



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

Paula Grippa Sant’Ana

Fator induzível por hipóxia miocárdica, metabolismo da glicose, estrutura e função ventricular durante o processo de evolução da remodelação cardíaca: comportamento e associação

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

Orientador: Prof. Emérito Dr. Antônio Carlos Cicogna

**Botucatu
2018**

Paula Grippa Sant'Ana

Fator induzível por hipóxia miocárdica, metabolismo da glicose, estrutura e função ventricular durante o processo de evolução da remodelação cardíaca: comportamento e associação

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna

Botucatu
2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Sant'Ana, Paula Grippa.

Fator induzível por hipóxia miocárdica, metabolismo da glicose, estrutura e função ventricular durante o processo de evolução da remodelação cardíaca : comportamento e associação / Paula Grippa Sant'Ana. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Antonio Carlos Cicogna
Capes: 40101002

1. Remodelação ventricular. 2. Hipóxia. 3. Estenose da válvula aórtica. 4. Metabolismo energético. 5. Rato como animal de laboratório.

Palavras-chave: Estenose aórtica supravalvar; HIF-1 α ; Metabolismo da glicose; Ratos; Remodelação cardíaca.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, a oportunidade de tê-lo como orientador, pela dedicação e atenção dispensada durante todos estes anos; o senhor contribuiu para que eu alcance os meus sonhos. Agradeço pela confiança, amizade, conselhos e a severidade quando necessário. O senhor é um exemplo de competência e preocupado não só com a realização do trabalho, mas principalmente com o ser humano.

Consciente de que é impossível listar todos que de uma forma ou de outra me acrescentaram conhecimentos e experiências essenciais à forma de ver o mundo e nele atuar. Preciso expressar meu agradecimento por ter convivido e aprendido com pessoas:

à minha mãe (Paulina Maria Grippa) e ao meu pai (Sebastião Nunes Sant'Ana) que me ensinaram o máximo que puderam, dentro das suas condições, agradeço por me ensinarem que na vida precisamos ter em primeiro lugar amor, respeito e compaixão com o próximo, além de valores familiares.

à minha equipe de Judô (Praia Judô Clube), em especial ao Sensei, José Adelino de Souza Mendes; a todos de maneira direta ou indireta que participaram da minha formação e mostraram que na vida, por vezes não vencemos mas devemos lutar para chegar à vitória.

à Loreta Loreta Casquel De Tomasi, além de amiga de laboratório, amiga para vida;

aos amigos do laboratório LabCic por toda a experiência e amizade, Dijon Henrique S. de Campos; Gustavo Augusto F. Mota; Vitor Loureiro; Sérgio Luiz Borges e a Daniela F. Vileigas.

à todos meus amigos de UNIPEX que fiz nesse caminho de 4 anos, em especial a Luana Urbano Pagan;

ao Gilson Murata e a sua equipe, do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP, pela amizade que ultrapassou os ensaios enzimáticos.

ao Professor Carlos Roberto Padovani pela disponibilidade e cooperação com este trabalho. O professor e sua equipe foram fundamentais para este trabalho.

ao meu noivo Vinicius Dorini, pela compreensão e amor em dias complicados da tese; e aos meus familiares pela compreensão e amor, foram poucas visitas ao ano;

ao CNPq, pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento deste trabalho e

a CAPES pela bolsa.

Aos funcionários da UNIPEX que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho;

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

***“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixa um pouco de si, levam um pouco de nós”***

Antoine de Saint-Exupéri

RESUMO

Introdução - A estenose aórtica supravalvar (EAO) experimental é utilizada para induzir a remodelação cardíaca (RC) patológica; esse modelo provoca, inicialmente disfunção diastólica e, posteriormente, distúrbio sistólico e insuficiência cardíaca (IC). Diferentes fatores podem contribuir para essa alteração funcional como, déficit de oxigênio (O₂). O principal regulador da homeostase do O₂ é o fator induzível por hipóxia-1 α (HIF-1 α) que na condição normóxia é sintetizado e degradado. No coração hipertrofiado, isquêmico, o HIF-1 α torna-se estável e regula a transcrição de vários genes que aumentam a disponibilidade de O₂. Além disso, aumenta a expressão das proteínas da via da glicose, com a finalidade de aumentar a oferta de energia. Embora, existam trabalhos que mostraram alteração do HIF-1 α , metabolismo de glicose e função cardíaca, não encontramos na literatura pesquisas que analisaram o comportamento e a associação do HIF-1 α com o metabolismo glicídico, estrutura e função ventricular durante a evolução da remodelação por EAO. **Objetivos gerais** – Analisar durante o processo de evolução da RC o comportamento do HIF-1 α , metabolismo da glicose, estrutura e função ventricular e a associação entre o HIF-1 α e estas variáveis. **Material e métodos** – Foram utilizados dois grupos de ratos *Wistar*: controle operado (Sham, n=48) e EAO (n=48): os animais foram submetidos a cirurgia e no grupo EAO foi implantado um clipe de 0,60 mm de diâmetro na raiz da aorta. Os ratos foram avaliados nos momentos de 2, 6, 18 semanas após cirurgia e na fase de IC grave. Os subgrupos Sham_{2, 6, 18, IC}, e EAO_{2, 6, 18, IC} foram constituídos por 12 animais. A estrutura e função cardíaca foram analisadas por ecocardiograma. A hipertrofia cardíaca foi também avaliada, *post mortem*. No miocárdio foram analisadas a expressão do HIF-1 α , das proteínas da glicólise [hexoquinaseII (HKII), fosfofrutoquinase-2 (PFK-2)], via aeróbica [piruvato desidrogenase (PDH)], via anaeróbica [lactato desidrogenase (LDH)], da captação de glicose [transportador de glicose 1 e 4 (GLUT1 e GLUT4), do receptor de insulina (IR), do fosfatoinositol-3-quinase (PI3K) e quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK)] pela técnica de Western Blot. As atividades das HK, PK, LDH, citrato sintase (CS) e a concentração de lactato foram analisadas por ensaio enzimático. Análise estatística foi realizada pela técnica de variância (ANOVA) para o esquema fatorial 2x4, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey (paramétrico) e Dunn (não paramétrico). A

associação entre o HIF-1 α e os conjuntos de variáveis foi estudada por meio da correlação canônica. Todas as conclusões estatísticas foram discutidas ao nível de 5% de significância. **Resultados:** Os principais achados significativos deste estudo foram: **a)** acentuação da hipertrofia ventricular esquerda durante a evolução da RC, alteração precoce na função diastólica e severa disfunção sistólica e diastólica na fase de IC grave; **b)** aumento do HIF-1 α no início da RC e agravamento na fase de IC ; **c)** alteração precoce no metabolismo da glicose, com acentuação da via glicolítica e desvio para a via anaeróbica a partir da 6ª semana de EAo; **d)** associação significativa entre o HIF-1 α e alteração estrutural, função diastólica e metabolismo da glicose. **Conclusões:** **a)** há aumento do HIF-1 α e reprogramação do metabolismo da glicose, hipertrofia e disfunção diastólica a partir da 2ª semana de EAo; **b)** durante a evolução da RC ocorre elevação do HIF-1 α , das proteínas da captação de glicose e via glicolítica com desvio para via anaeróbia; **c)** há associação canônica entre o conjunto do HIF-1 α com o agrupamento das variáveis relacionadas com a via da glicose, estrutura e função diastólica cardíaca.

Palavras chaves: remodelação cardíaca, HIF-1 α , metabolismo da glicose, estenose aórtica supravalvar e ratos.

ABSTRACT

Introduction - The experimental supralvalvar aortic stenosis (AS) is used to induce pathological cardiac remodeling (CR); this model causes, initially, diastolic dysfunction and, later, systolic disorder and heart failure (HF). Different factors may contribute to these cardiac functional alterations, such as oxygen (O₂) deficiency. The main regulator of O₂ is hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1 α) that in normoxia condition is synthesized and degraded. In the hypertrophied, ischemic heart, HIF-1 α becomes stable and regulates the transcription of several genes that increase O₂ availability. In addition, it increases the expression of the glucose pathway proteins, in order to increase energy supply. Although there are studies that have shown alterations in HIF-1 α , glucose metabolism and cardiac function, we have not found in the literature studies that investigated the behavior and association of HIF-1 α with glucose metabolism, ventricular structure and function during the evolution of CR by AS. **Objective** - To analyze, during the course of CR evolution, the behavior of HIF-1 α , glucose metabolism, ventricular structure and function, and the association between HIF-1 α and these variables. **Material and methods** - Two groups of rats were studied: operated control (Sham, n=48) and supralvalvar aortic stenosis (AS, n=48): the animals underwent surgery and in the AS group a clip of 0.60 mm diameter was placed at the aorta's root. The rats were evaluated at 2, 6, 18 weeks after surgery and at the severe HF phase. The subgroups Sham_{2, 6, 18, HF} and AS_{2, 6, 18, HF} were composed of 12 animals/group. Cardiac structure and function were analyzed by echocardiogram. Cardiac hypertrophy was also evaluated, *post mortem*. The expression of myocardial: HIF-1 α ; glycolytic proteins [hexokinase II (HKII), phosphofructokinase-2 (PFK-2), pyruvate dehydrogenase (PDH) and lactate dehydrogenase (LDH)]; glucose uptake proteins [intracellular glucose transporters (GLUT1 and GLUT4)]; insulin receptor (IR); phosphatoinositol-3-kinase (PI3K) and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) were analyzed by Western Blot. The activities of HKII, pyruvate kinase (PK), LDH and citrate synthase (CS) were also analyzed by enzymatic assays, and lactate concentration was also measured. Statistical analysis was performed by analysis of variance (ANOVA) technique for the 2x4 factorial scheme, complemented with Tukey's (parametric) or Dunn's (non-parametric) multiple comparisons test. The association between HIF-1 α and the sets of variables was analyzed through canonical

correlation. All statistical conclusions were discussed at the 5% significance level.

Results - The main significant findings of this study were: **a)** accentuation of left ventricular hypertrophy during the course of CR, early alteration in diastolic function and severe systolic and diastolic dysfunction in the phase of severe heart failure; **b)** increased HIF-1 α at the onset of CR and worsening in severe HF phase; **c)** early changes in glucose metabolism, with enhancement of the glycolytic pathway and switch to the anaerobic pathway from the 6th week of AS; **d)** significant association between HIF-1 α and cardiac structural alteration, diastolic function and glucose metabolism. **Conclusions** - **a)** there is an increase in HIF-1 α , reprogramming of glucose metabolism, hypertrophy and diastolic dysfunction from the 2nd week of AS; **b)** during the evolution of CR, there is an elevation in HIF-1 α , in glucose uptake and glycolytic pathway proteins with switch to the anaerobic pathway; **c)** there is an association between HIF-1 α and the grouping of variables related to the glucose pathway, cardiac structure and diastolic function.

Keywords: cardiac remodeling, HIF-1 α , glucose metabolism, supralvalvar aortic stenosis and rats.

Lista de tabelas

Tabela 1 Estrutura macroscópica cardíaca <i>post mortem</i> e peso corporal	43
Tabela 2 Dados clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca.....	44
Tabela 3 Avaliação ecocardiográfica estrutural e funcional	47
Tabela 4 Medidas de associação canônica do HIF-1 α com as variáveis estruturais do ventrículo e átrio esquerdo dos grupos EAo ₂ , 6, 18 e IC por ecocardiograma ...	59
Tabela 5 Medidas de associação canônica do HIF-1 α com a função diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos EAo ₂ , 6, 18 e IC por ecocardiograma.....	60
Tabela 6 Medidas de associação canônica do HIF-1 α com a função sistólica do ventrículo esquerdo dos grupos EAo ₂ , 6, 18 e IC por ecocardiograma.....	60
Tabela 7 Medidas de associação canônica do HIF-1 α com análise morfológica cardíaca – <i>post mortem</i> dos grupos EAo ₂ , 6, 18 e IC.....	61
Tabela 8 Medidas de associação canônica do HIF-1 α com proteínas envolvidas na captação de glicose miocárdica dos grupos EAo ₂ , 6, 18 e IC	61
Tabela 9 Medidas de associação canônica do HIF-1 α com as proteínas envolvidas na glicólise cardíaca dos grupos EAo ₂ , 6, 18 e IC.....	62
Tabela 10 Medidas de associação canônica do HIF-1 α com a expressão proteica e atividade da LDH dos grupos EAo ₂ , 6, 18 e IC.....	63

Lista de figuras

Figura 1 Diagrama representando diferentes fatores transcripcionais que respondem à hipóxia.....	17
Figura 2 Esquema da sinalização molecular do fator induzível por hipóxia (HIF-1 α).....	19
Figura 3 Genes ativados pelo HIF-1 α	20
Figura 4 Esquema da cascata de sinalização de insulina envolvido no transporte de glicose do citosol para a membrana plasmática.....	22
Figura 5 Metabolismo da glicose.....	23
Figura 6 Desenho esquemático do protocolo experimental em semanas.....	28
Figura 7 Expressão da proteína HIF-1 α ..	48
Figura 8 Concentração de insulina sérica..	49
Figura 9 A, B e C Expressão da proteína pIR (A), IR total (B) e a relação pIR/IR total (C).....	50
Figura 10 Expressão da proteína PI3K.....	51
Figura 11 A e B Expressão da proteína GLUT4 (A) e GLUT1(B).....	52
Figura 12 A, B e C Expressão da proteína pAMPK(A), AMPKTotal (B) e relação pAMPK/AMPKTotal (C).....	53
Figura 13 A, B, C e D Expressão da proteína HKII (A) e PFKFB2 (B) e atividade enzimática da proteína HKII (C) e PK (D).....	55
Figura 14 A e B Expressão da proteína piruvato desidrogenase (A) e da atividade da citrato sintase (B).....	56
Figura 15 A, B e C Expressão da proteína LDH (A), atividade enzimática da proteína LDH (B) e Lactato cardíaco (C).....	58

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO	15
2-OBJETIVOS GERAIS	25
2.1 Objetivos específicos	25
3-MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Protocolo Experimental	27
3.3 Indução de estenose aórtica supravalvar	29
3.4 Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma.....	30
3.5 Análise macroscópica do animal e do coração post mortem	31
3.6 Determinação da concentração de insulina sérica	32
3.7 Expressão proteica no miocárdio	32
3.7.1 Extração das proteínas miocárdicas	32
3.7.2 Delineamento dos grupos para o Western Blot.....	33
3.7.3 Western Blot	34
3.8 Quantificação da atividade das enzimas reguladoras da via glicolítica, lactato desidrogenase e piruvato desidrogenase	36
3.9 Determinação da concentração de lactato cardíaco	37
3.10 Análise estatística	38
4-RESULTADOS	40
4.1 Peso corporal e análise macroscópica do coração post mortem	40
4.2 Sinais clínico-patológico de insuficiência cardíaca.....	44
4.3 Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma.....	44
4.4 Expressão proteica HIF-1 α no miocárdio	48
4.5 Metabolismo da glicose no miocárdio	48
4.5.1 Captação e transporte da glicose	48
4.5.2 AMPK miocárdica	52
4.5.3 Glicólise miocárdica	54
4.5.4 Expressão da piruvato desidrogenase e atividade da citrato sintase miocárdico	56
4.5.5 Lactato desidrogenase e lactato miocárdico	57
4.6 Análise canônica	58
5-DISCUSSÃO	65

5.1 Remodelação cardíaca	65
5.1.1 Expressão do HIF-1 α	65
5.1.2 Estrutura e função.....	66
5.1.3 Associação canônica entre HIF-1 α com a estrutura e a função cardíaca	68
5.1.4 Metabolismo da glicose.....	70
5.1.5 Associação entre o HIF-1 α e metabolismo da glicose	77
6-CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS	82

INTRODUÇÃO

1-INTRODUÇÃO

O estresse cardiovascular, fisiológico ou patológico, provoca uma cascata de eventos no miocárdio, definida como remodelação cardíaca (RC), de fundamental importância na preservação da função do coração. A RC é consequente de alterações na expressão gênica, em resposta a uma determinada agressão, resultando em modificação na quantidade e qualidade das proteínas, que pode manifestar-se por variações elétrica, metabólica, estrutural e funcional⁽¹⁾. É um processo tempo dependente e, a longo prazo, pode resultar em disfunção, insuficiência cardíaca ou até morte súbita, na RC patológica⁽²⁾.

Diversos modelos experimentais têm sido propostos para investigar a RC induzida por sobrecarga pressórica⁽³⁻⁷⁾. Em nosso laboratório, o modelo de estenose aórtica supralvar tem sido usado para promover o desenvolvimento progressivo da hipertrofia ventricular esquerda em ratos^(6,8-11). Nesse modelo, os corações hipertrofiados apresentam, na fase inicial, disfunção diastólica e melhora da função sistólica e, posteriormente, queda do desempenho sistólico e insuficiência cardíaca^(6,9). Os mecanismos responsáveis pela depressão da função ventricular não estão totalmente esclarecidos; diferentes fatores podem contribuir para a disfunção: alteração no processo de acoplamento excitação-contração-relaxamento, nas proteínas contráteis, na matriz extracelular, no citoesqueleto, na modulação autonômica, necrose/apoptose/fagocitose miocárdica e déficit do metabolismo energético^(3,6,8-14).

No coração adulto cerca de 60-70% da energia utilizada no processo de contração e relaxamento é normalmente obtida a partir dos ácidos graxos, sendo a contribuição da glicose em torno de 30-40%⁽¹⁵⁻¹⁹⁾. Na remodelação cardíaca ocorre

maior dependência da utilização glicose em detrimento dos ácidos graxos⁽²⁰⁾; a mudança mais significativa no metabolismo da glicose é a elevação da taxa de captação e da via glicolítica⁽²¹⁾. Os mecanismos envolvidos no desbalanço dos substratos no coração hipertrofiado não estão suficientemente esclarecidos⁽²²⁾. A explicação clássica para esse desequilíbrio envolve o nível energético; a glicose é fonte mais eficiente de energia do que os ácidos graxos, isto é, gera mais adenosina trifosfato (ATP) por moléculas de oxigênio (3,17 ATPs/O₂) do que a oxidação dos ácidos graxos (2,83 ATPs/O₂)(15,16,23–25). Essa condição é particularmente importante, quando a demanda supera a oferta de O₂, por exemplo, na situação de hipertrofia cardíaca⁽²²⁾.

O organismo procura manter a homeostase do oxigênio tecidual, processo finamente regulado, essencial para o metabolismo energético e importante fonte de energia para a manutenção da sobrevivência da célula^(26–28). Existem diversas respostas celulares à hipóxia, que ocorrem de forma coordenada, e que se baseia principalmente na expressão gênica^(29–34), que aumentam a disponibilidade de oxigênio⁽³⁰⁾ (Figura 1).

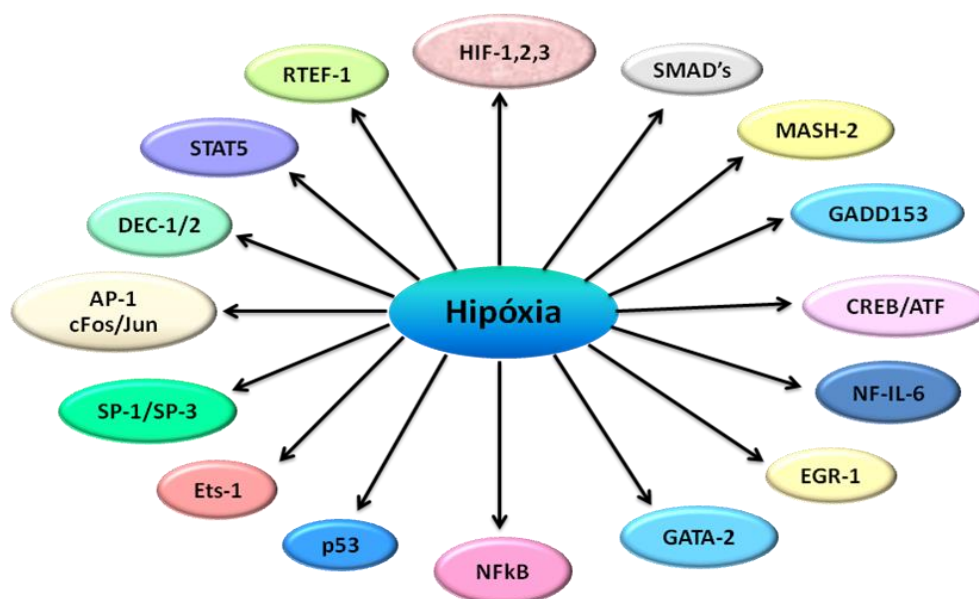


Figura 1| Diagrama representando diferentes fatores transcricionais que respondem à hipóxia. HIF-1 α , fator induzível por hipóxia; CREB, proteínas de ligação de elementos de resposta do AMP cíclico; ATF, ativação de fatores de transcrição; NF-IL-6, fator nuclear para interleucina 6; NFkB, fator nuclear kappa-B; p53, fator de transcrição tetramica envolvido em impedir o ciclo celular e apoptose; GATA, fator de transcrição eritróide; MASH-2, mamíferos *achaete-scute* homologa proteína-2; GADD153, para o crescimento e danifica o DNA-153; DEC1-2, diferencialmente expressos em condrócitos; RTEF-1, relacionados a transcrição do potencial do fator-1; AP-1 cFos/Jun, a ativação da proteína-1, que compreende os membros cFos e Jun; GATA-2, proteína celular de ligação específico do DNA; ETS1, fator de transcrição de induzido por hipóxia; SP-1/SP3, fatores de transcrição ubíquos da família dos fatores de transcrição Sp/ XKLF; EGR-1, crescimento inicial de resposta-1. STAT, transdutores de sinais e ativadores de transcrição. Modificado de Cummins, EP; Taylor, CT. Eur J Phys. 2005;450:363–371⁽³⁰⁾.

O principal regulador da homeostase do oxigênio em resposta à hipóxia é o fator induzível por hipóxia (HIF, do inglês, *hypoxia-inducible factor*)^(28,29,34–38). Esse fator transcricional é uma proteína heterodímera, composta de subunidades α e β ; a β , expressa constitucionalmente no núcleo é também conhecida como translocador nuclear receptor de aril hidrocarboneto (ARNT, do inglês, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*)^(39,40). Ambas pertencem a família de proteínas hélice-alça-hélice básica, com domínio PAS (bHLH-PAS, do inglês, *basic helix-loop-helix-Per-ARNT-Sim*). Existem pelo menos três subunidades do HIF α , nomeadas de HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α ^(41–49); a combinação de qualquer uma destas três subunidades α com o HIF-

1 β , forma o fator transcricional funcional. Enquanto os HIF α são regulados diretamente por oxigênio, os β não sofrem influência deste elemento químico. Na situação de normóxia tecidual, são detectadas pequenas quantidades das proteínas HIF-1 α e HIF-2 α ; na condição de hipóxia, há aumento significativo da expressão destas duas proteínas^(35,39,40,42,50–56).

Em condições de normóxia o HIF-1 α é sintetizado e degradado constantemente através do sistema de proteassoma 26S. O processo de degradação é iniciado rapidamente pela presença de O₂ que ativa a enzima prolil-hidroxilase (PHD, do inglês *Prolyl Hydroxylation Domin*), que hidroxila o HIF-1 α nos resíduos específicos de prolina, no domínio de degradação regulada por oxigênio (ODD, do inglês, *Oxygen-regulated degradation*)⁽⁵⁷⁾. A hidroxilação destes resíduos promove a interação de alta afinidade entre HIF-1 α e a proteína do gene supressor de tumor, von Hippel-Lindau (vHL). A proteína vHL funciona como um substrato de reconhecimento para um complexo ubiquitina ligase E3, que adiciona a ubiquitina ao HIF-1 α , marcando-o para a degradação no proteossoma 26S^(49,58–61). Ao mesmo tempo, a atividade de transcrição é inibida pela ação de fator de inibição do HIF-1 (FIH, do inglês *Factor Inhibiting HIF-1*), que hidroxila um resíduo de arginina específico, impedindo a junção dos elementos responsivos a hipóxia (HRE, do inglês, *Hypoxia response element*) e bloqueando a ligação das proteínas co-ativadoras CBP/p300 (do inglês, *Co-activators Binding Protein/p300*), processo que resulta na inibição da transcrição do gene mediado pelo HIF-1 α ^(23,33,45). Em condições de hipóxia, o HIF-1 α se estabiliza, une-se aos co-ativadores CBP/p300, movimenta-se para o núcleo, ligando-se ao HIF-1 β e, juntos, iniciam o processo de transcrição^(29,32,33,62) (Figura 2).

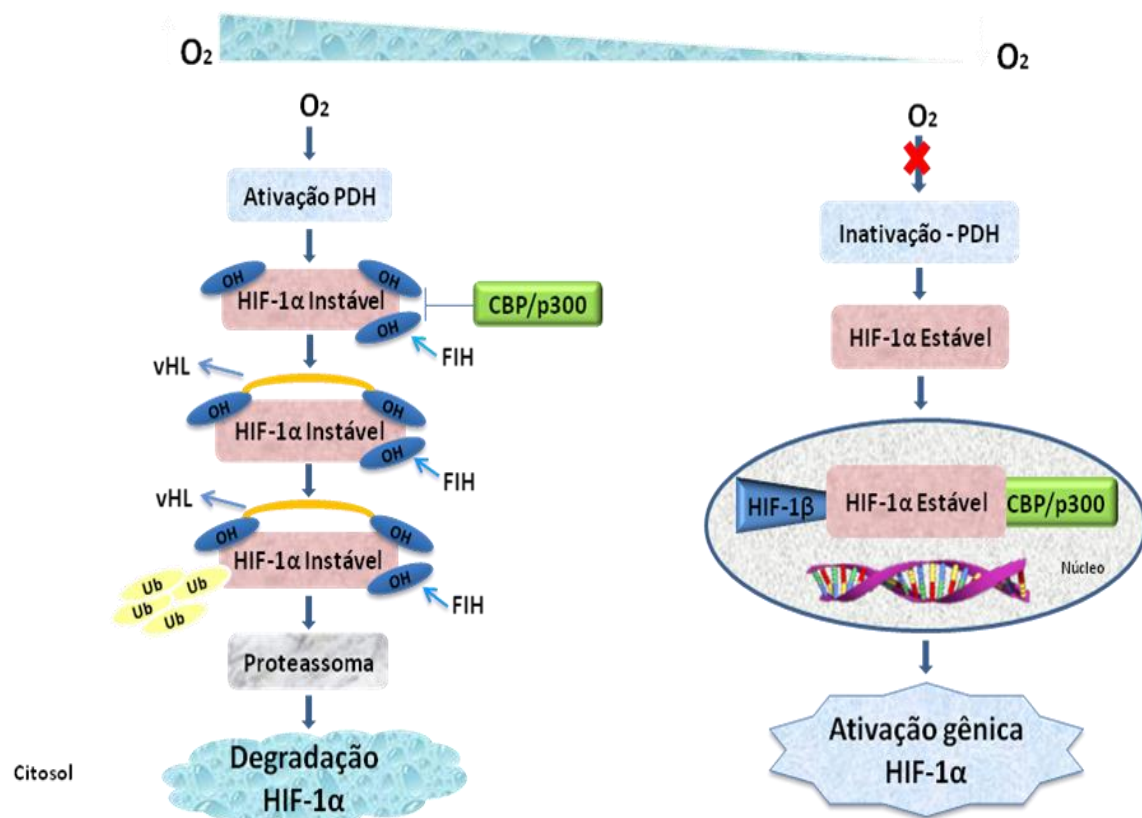


Figura 2| Esquema da sinalização molecular do fator induzível por hipóxia (HIF-1α). O_2 , oxigênio; PHD, hidroxilação prolil; OH, hidroxila; CBP/p300, proteínas co-ativadoras; vHL, von Hippel-Lindau; Ub, ubiquitina; FIH, fator de inibição de HIF-1. Em normóxia, a degradação da HIF-1α é regulada por modificações pós-traducionais, como a hidroxilação e ubiquitinação para marcar a proteína para via proteossomal. Em hipóxia, a subunidade HIF-1α não é hidroxilada, permitindo que a proteína entre no núcleo, onde se liga à subunidade HIF-1β, formando fator transcrricional ativo, ao se ligar ao DNA inicia a transcrição dos genes. Modificado de Trayhurn P. et al. Brit J Nutri.2008,100:(2):227-235⁽⁶³⁾.

Em situação de hipóxia são ativados mais de 100 genes regulados transcricionalmente pelo HIF-1α⁽⁶⁴⁾; estes genes, que facilitam a sobrevivência da célula frente ao déficit de O_2 , estão envolvidos nos processos de angiogênese, eritropoiese, apoptose, tônus vascular, citoesqueleto, homeostasia epitelial, células proliferativas, sobrevivência das células e metabolismo do ferro, matriz extracelular, aminoácidos e glicose^(23,24,65-67)(Figura 3).

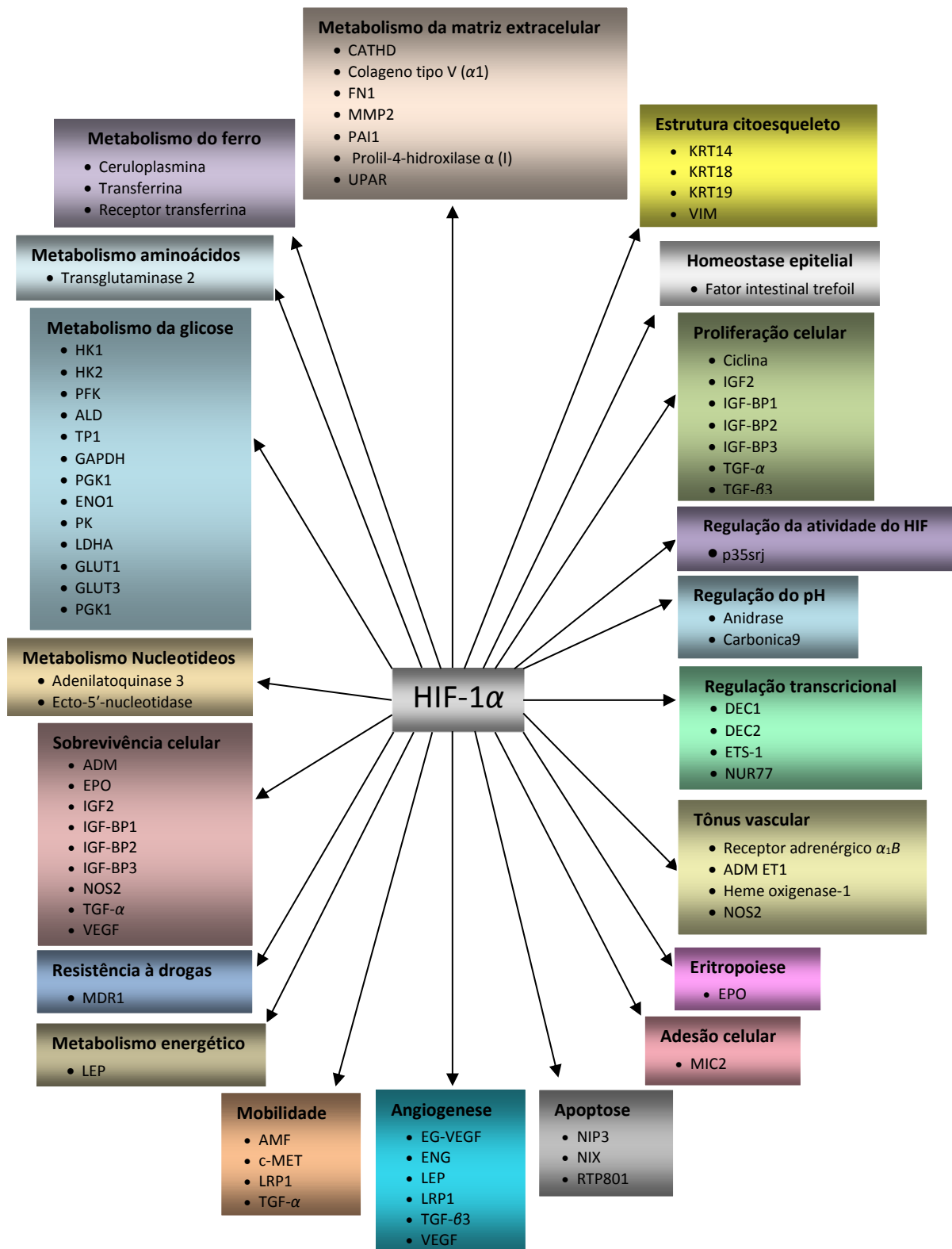


Figura 3| Genes ativados pelo HIF-1 α . Metabolismo da glicose: HK1, hexoquinase1; HK2, hexoquinase2; PFK1, fosfofrutoquinase1; ALD, aldolase; TPI, triose-fosfato-isomerase; GAPDH, gliceraldeído-3-fostato-desidrogenase; PGK1, fosfoglicerato-quinase1; ENO1, enolase1; PK, piruvato-quinase; LDHA, lactato desidrogenase A; GLUT1, transportador de glicose1; GLUT3, transportador de glicose3; AMF, fator de mobilidade autócrino; proliferação celular: IGF2, insulina como fator de crescimento2; IGF-BP1, fator de crescimento da proteína de ligação1; IGF-BP2, fator de crescimento

da proteína de ligação²; IGF-BP3, IGF fator de crescimento da proteína de ligação³; TGF- β 3, fator de transformação crescimento- β 3; TGF- α , fator de transformação crescimento α ; eritropoiese: EPO, eritropoietina; sobrevivência celular: adrenomedulina; NOS2, óxido nítrico síntese²; VEGF, fator de crescimento endotelial vascular; angiogênese: EG-VEGF, glândula endócrina derivado de VEGF; ENG, endolina; LEP, leptina; LRP1, proteína do receptor de LDL-1; TGF- β 3; VEGF; estrutura do citoesqueleto: KRT14, queratina 14; KRT18, queratina 18; KRT19, queratina 19, VIM, vimentina; tônus vascular: Receptor adrenérgico α_1 B; ET1, endotelina-1; Heme oxigenase-1; NOS2; resistência a drogas: MDR1, resistência múltiplas a drogas¹; Metabolismo da matriz extracelular: CATHD, catepsina D; FN1, fibronectina 1; MMP2, matriz de metaloproteinases 2; PAI1, inibidor do ativador do plasminogênio-1;. Modificado de Semenza, GL. Nat Rev Cancer.2003;3(10):721-732⁽²³⁾.

Na situação de hipertrofia cardíaca, em que o consumo supera a oferta de O₂, um dos possíveis fatores que contribui para a elevação da utilização da glicose em detrimento dos ácidos graxos é o HIF-1 α , desde que esse fator transcricional regula a expressão envolvidas no transporte de glicose (GLUTs) e na via glicolítica intracelular⁽⁶⁸⁾. Embora não existam controvérsia a respeito da participação do HIF-1 α na expressão do GLUT1^(69,70), não há consenso do envolvimento deste fator transcricional na gênese do GLUT4; enquanto diversos autores não mostraram associação entre HIF-1 α e a proteína^(56,69), outros pesquisadores constataram que o HIF-1 α é um ativador da transcrição do GLUT4^(71–73).

No cardiomiócito a captação de glicose ocorre por processo de difusão pela membrana plasmática, utilizando-se de GLUT1 e GLUT4⁽⁷⁴⁾. O músculo cardíaco expressa ambos transportadores; em ratos respondem por 30% e 70%, respectivamente, pelo transporte total de glicose^(75,76). Enquanto, a captação da glicose pelo GLUT1, localizado na membrana plasmática, é independente de insulina^(77,78), o transporte de glicose pelo GLUT4, localizado em vesículas citosólicas, é dependente deste hormônio; a ligação da insulina ao seu receptor inicia a ativação de uma cascata de sinalização que acarreta a translocação do GLUT4 no citosol para a membrana plasmática, onde é incorporado^(74,79–83) (Figura 4).

Existem outras vias independente de insulina que contribuem para a translocação do GLUT4 para a membrana⁽⁸⁴⁾. Em situação de isquemia tecidual, a

translocação do GLUT4 passa ter a contribuição da proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK)^(71,72,85,86). A AMPK é ativada pelo aumento da concentração da adenosina monofosfato (AMP), sendo considerada regulador máster de energia e com importante papel no metabolismo de ácidos graxos e carboidratos. A AMPK aumenta a captação de glicose por elevar a disponibilidade de GLUT4 na superfície celular (Figura 4) e ativar as enzimas da via glicolítica no coração remodelado isquêmico^(86–88).

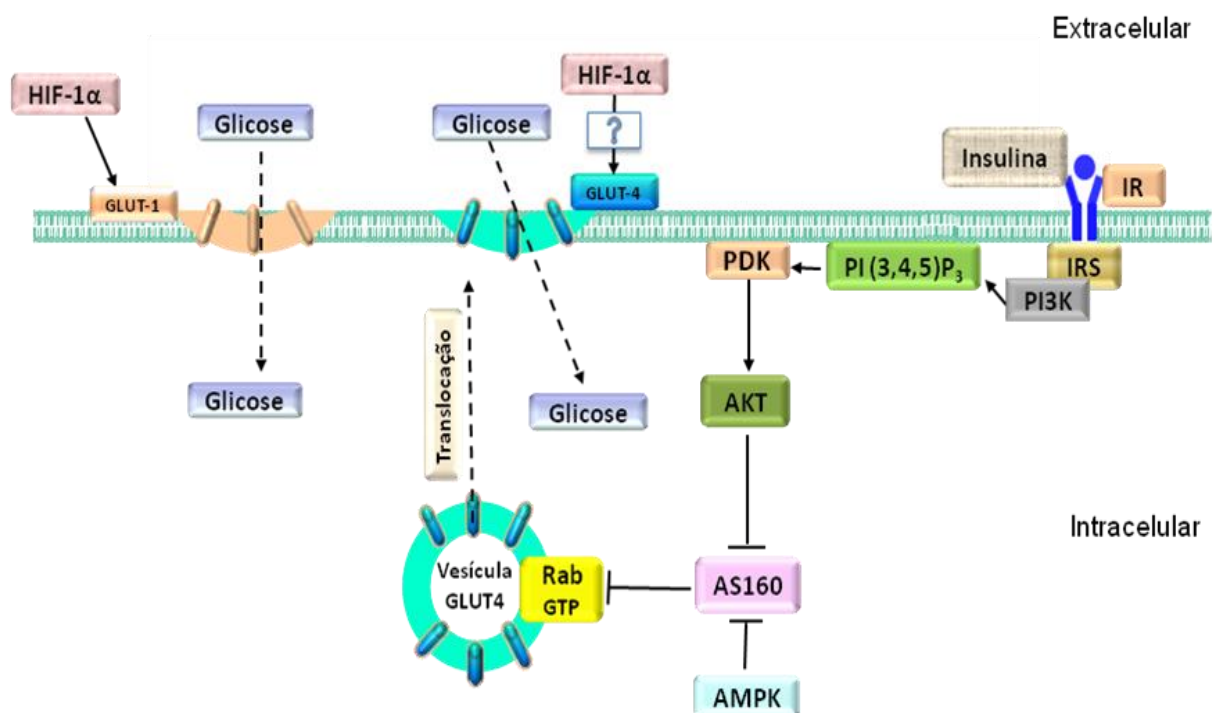


Figura 4| Esquema da cascata de sinalização de insulina envolvido no transporte de glicose do citosol para a membrana plasmática. A insulina se liga ao receptor de insulina (IR), que se autofosforila. A ativação do IR desencadeia a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS), que ativa o fosfoinositol-3-quinase (PI3K), que cataliza a formação de 3,4,5 trifosfato inositol que ativa fosfoinositol-dependente de quinase (PDK). O PDK fosforilado ativa proteína quinase B (PKB/AKT) que, por sua vez fosforila e inativa o substrato 160 da AKT (AS160), que inibi a função de uma pequena proteína ligada guanosina trifosfato da subfamília denominada Ras (Rab-GTP), favorecendo a translocação da vesícula contendo transportador de glicose 4 (GLUT4) para a membrana plasmática, onde sofre processo de fusão; em adição, a interação entre a insulina e proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK) estão representadas na figura; transportador de glicose 1 (GLUT1) localizado na membrana plasmática.

→ ativação; —| : inibição; ---→ translocação. Modificado de Stöckli J, et al. J Cell Scien. 2011;124(24): 4147-4159⁽⁸⁹⁾.

O HIF-1 α , além de participar da captação de glicose, intensifica o processo de glicólise no coração hipertrofiado, em razão de acarretar aumento na expressão das enzimas da via glicolítica cardíaca⁽⁹⁰⁾. A glicólise que engloba dez etapas reguladas por proteínas específicas [hexoquinase (HK), fosfo-hexose-isomerase, fosfofrutoquinase (PFK), aldolase, triose-fosfato-isomerase, gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, fosfoglicerato-quinase, fosfoglicero-mutase, enolase e piruvato-quinase (PK)], acarreta aumento da disponibilidade energética proveniente do metabolismo glicídico. Em condição aeróbica, o piruvato citosólico, produto final da glicólise, é carregado para a mitocôndria e se transforma em acetilcoenzima A (Acetil-CoA) pela ação da piruvato desidrogenase (PDH); na situação anaeróbica, o piruvato é convertido em lactato pela enzima lactato desidrogenase(LDH)(16,23,29,48,91) (Figura 5).

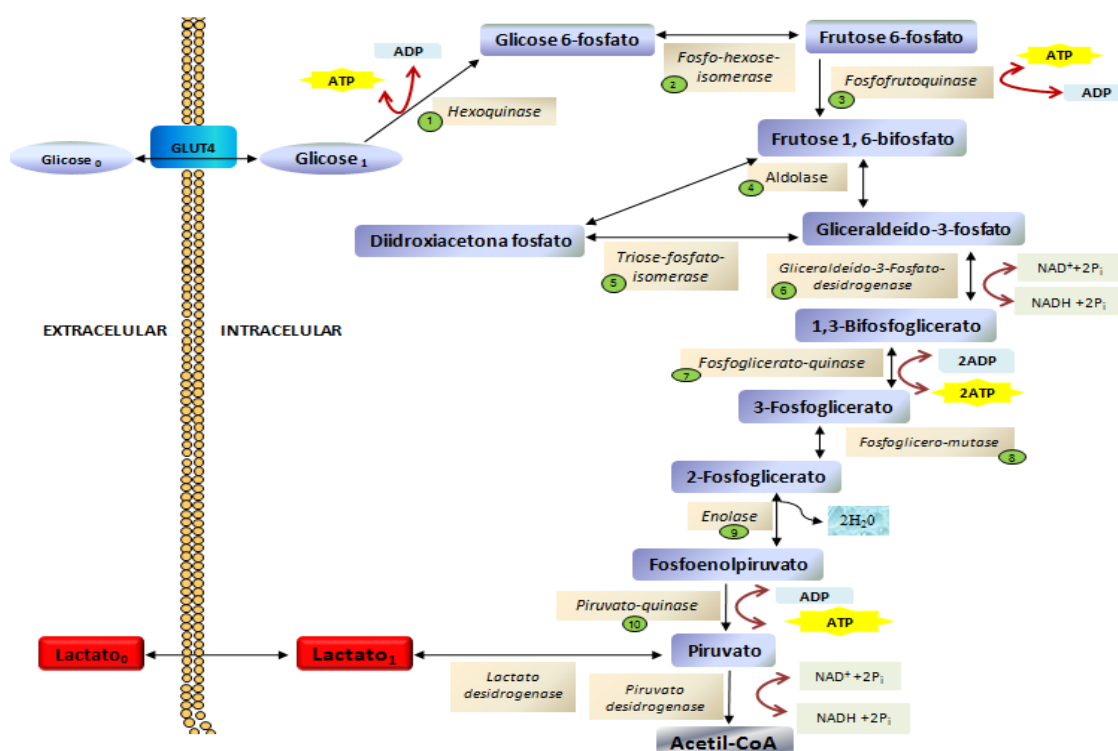


Figura 5| Metabolismo da glicose. $Glicose_0$, glicose extracelular; $Glicose_1$, glicose intracelular; GLUT4, transportador de glicose; ATP, adenosina trifosfato; ADP, adenosina difosfato; NAD, nicotinamida adenina de dinucleotídeo; $NADH$, nicotinamida adenina de dinucleotídeo reduzidos; os números de 1 a 10 representam as 10 etapas da via glicolítica. Modificado Katz, AM. Physiology of the heart. 2011:44⁽⁸⁸⁾.

O HIF-1 α , a curto prazo, ativa mecanismos cardioprotetores, com a finalidade de aumentar a disponibilidade energética, à custa da reprogramação metabólica e elevação da disponibilidade de O₂ tecidual; entretanto, a longo prazo, a estabilização crônica do HIF-1 α acarreta efeitos mal-adaptativos, deletérios ao coração, contribuindo ativamente para o processo de hipertrofia e disfunção cardíaca^(62,92,93).

Não encontramos na literatura pesquisas que analisaram concomitantemente o HIF-1 α , metabolismo glicídico, estrutura e função ventricular durante o processo progressivo da remodelação cardíaca por estenose aórtica supravalar. A realização da avaliação sequencial permite responder o momento em que há sinalização de hipóxia, alteração do metabolismo de glicose e agravamento estrutural e funcional do coração. Além disso, a análise da associação poderia sinalizar a possível participação do HIF-1 α com as mudanças metabólicas, estruturais e funcionais cardíacas.

Em relação as questões elencadas acima, as hipóteses deste trabalho são:

- ✓ o aumento do HIF-1 α e reprogramação do metabolismo da glicose ocorre no momento em há hipertrofia do ventrículo esquerdo e disfunção diastólica;
- ✓ durante o processo evolutivo há elevação do HIF-1 α , das proteínas da captação da glicose e das enzimas da via glicolítica, com desvio para via anaeróbia;
- ✓ há associação entre o HIF-1 α com a expressão das proteínas compreendidas no transporte e no catabolismo da glicose e a depressão da função sistólica e diastólica cardíaca.

2- OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos gerais deste trabalho foram de analisar durante o processo de evolução da remodelação cardíaca:

- ✓ o comportamento do HIF-1 α , metabolismo da glicose, estrutura e função ventricular;
- ✓ a associação entre o HIF-1 α com o metabolismo da glicose, estrutura e função ventricular.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Mensurar a expressão do HIF-1 α ;
- ✓ Analisar a expressão das proteínas IR fosforilada e total, PI3K, AMPK, GLUT1 e GLUT4 envolvidas na captação da glicose;
- ✓ Verificar atividade enzimática da HK e PK e expressão das HKII e PFK2 implicadas na via glicolítica;
- ✓ Analisar atividade enzimática das CS e LDH, expressão das PDH e LDH e a concentração do lactato;
- ✓ Avaliar a estrutura e função cardíaca por ecocardiograma;
- ✓ Investigar a estrutura morfológica do coração, *post-mortem*;
- ✓ Averiguar associação do HIF-1 α com a estrutura cardíaca determinada por ecocardiograma e *post mortem*, função diastólica e sistólica ventricular esquerda, captação de glicose, glicólise, via aeróbica e anaeróbica.

MATERIAL E MÉTODOS

3-MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar*, com 21 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos nas seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado, forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada; temperatura ambiente ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação de 12 horas. A oferta de água e ração foi *ad libitum*, e o peso corporal aferido semanalmente. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the U.S. National Institutes of Health” e submetidos e aprovados pela “Comissão de Ética no Uso de Animais – UNESP” (Nº1081).

3.2 Protocolo Experimental

Foram formados dois grupos experimentais: controle operado (Sham, n=48) e estenose aórtica supralvar (EAo, n=48). O grupo EAo foi submetido a cirurgia com implantação de um clipe na artéria aorta para a indução da estenose aórtica supralvar e o Sham submetido à mesma cirurgia, porém sem a implantação do clipe.

Os animais de ambos os grupos foram avaliados 2, 6, 18 semanas após a cirurgia e no momento do aparecimento de sinais de insuficiência cardíaca, que ocorre, de maneira geral, a partir da 20ª semana^(9,94–96); assim, foram formados os seguintes subgrupos, Sham₂ (n=12), Sham₆ (n=12), Sham₁₈ (n=12), Sham_{IC} (n=12) e EAo₂(n=12), EAo₆(n=12), EAo₁₈(n=12), EAo_{IC} (n=12) (Figura 6). A escolha destes

períodos justifica-se por serem intervalos em que as variáveis foram analisadas em situações de ausência ou alteração funcional discreta no ventrículo esquerdo (Sham₂, EAo₂), disfunção diastólica isolada (Sham₆, EAo₆), disfunção diastólica e sistólica (Sham₁₈, EAo₁₈) e sinais de insuficiência cardíaca grave (Sham_{IC}, EAo_{IC}). Os animais foram caracterizados com insuficiência cardíaca grave quando apresentaram importante alteração do padrão respiratório (taquipneia com inspiração profunda, tipo abdominal) e diminuição acentuada da ingestão, associados com os seguintes sinais *pós-mortem*: edema, ascite, derrame pleuropericárdico, trombo em átrio esquerdo e hipertrofia do ventrículo direito⁽⁹⁷⁾. Os animais com EAo_{IC} foram eutanasiados entre 22 e 36 semanas após a indução da estenose aórtica.

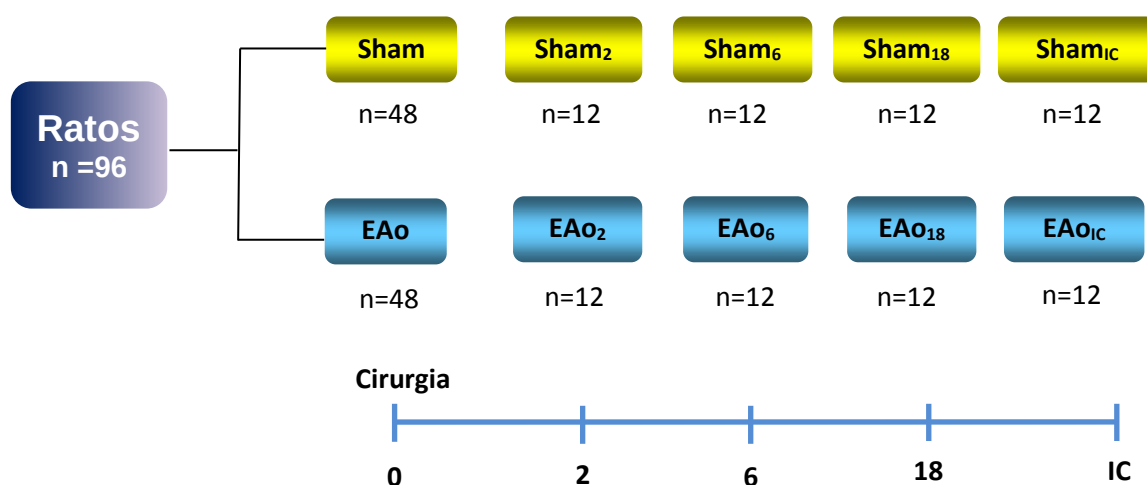


Figura 6| Desenho esquemático do protocolo experimental em semanas. IC, insuficiência cardíaca; Sham, grupo controle; Sham₂, grupo controle 2 semanas; Sham₆, grupo controle 6 semanas; Sham₁₈, grupo controle 18 semanas; Sham_{IC}, grupo controle com IC; EAo, grupo com estenose aórtica supra-avalvar; EAo₂, grupo com 2 semanas de EAo; EAo₆, grupo com 6 semanas de EAo; EAo₁₈, grupo com 18 semanas de EAo; EAo_{IC}, grupo EAo com IC.

Após cada período experimental, os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1,0 mg/kg) intraperitoneal, e eutanasiados por decapitação. Após a coleta do sangue, o tórax foi aberto, o coração

removido, os átrios dissecados e o ventrículo direito separado do ventrículo esquerdo.

3.3 Indução de estenose aórtica supravalvar

A estenose aórtica supravalvar foi induzida de acordo com o método previamente descrito em nosso laboratório^(6,10,11,98). Os animais com três a quatro semanas de vida e pesando de 70 a 90g, foram medicados com acetaminofeno (200 mg/kg, Tylenol® Gotas, Janssen-Cilag Farmacêutica Ltda, São José dos Campos, São Paulo, Brasil), via oral, 3 vezes ao dia e logo em seguida anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg/kg; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (1,0 mg/kg; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil), intraperitoneal, submetidos à toracotomia mediana, a aorta ascendente dissecada e um clipe de prata, com 0,60 mm de diâmetro interno, colocado aproximadamente a 3 mm da sua raiz. A parede torácica foi fechada, sendo o esterno, as camadas musculares e a pele suturados com fio *mononylon* 5.0. Durante a cirurgia, os animais receberam intraperitonealmente 1 ml de soro fisiológico aquecido e foram ventilados manualmente com pressão positiva, oxigênio a 100%. Após a conclusão do 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. Os ratos foram acompanhados por 5 dias com medicação analgésica, via oral, e antibiótico (enrofloxacino, 10mg/kg, 1x/dia, 5 dias), via subcutânea (Zelotril®, Indústria Farmacêutica Vialfarma Ltda, São Sebastião do Paraíso – Minas Gerais, Brasil).

3.4 Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma

A análise estrutural e funcional cardíaca foi realizada por meio do ecocardiograma nos diferentes períodos descrito no protocolo experimental. Os ratos foram anestesiados com cloridrato de ketamina (60 mg/kg/IP; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/IP; Anasedan®, Sespo Indústria e Comércio Ltda - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil). Após anestesia e tricotomia da face anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo. O exame foi realizado, segundo técnica já consolidada em nosso laboratório⁽⁹⁾, utilizando-se aparelho Vivid S6 (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel) equipado com transdutor multifrequencial de 5,0 – 11,5 MHz. A mensuração das estruturas cardíacas foi realizada a partir de imagens obtidas em modo monodimensional (M), com o feixe de ultrassom orientado pela imagem bidimensional e o transdutor posicionado na região paraesternal eixo menor. A imagem do ventrículo esquerdo (VE) foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares; as imagens dos diâmetros da aorta (AO) e do átrio esquerdo (AE) foram obtidas ao nível da valva aórtica. As seguintes estruturas do VE foram analisadas: diâmetros sistólico e diastólico (DSVE e DDVE), espessuras sistólica e diastólica da parede posterior (ESPP e EDPP) e do septo interventricular (ESSIV e EDSIV). O DDVE, a EDPP e a EDSIV foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade; o DSVE, a ESPP e a ESSIV foram analisadas no menor diâmetro. A espessura relativa da parede (ERelVE) foi calculada pela equação $(2 \times EDPP)/DDVE$. A mensuração das estruturas cardíacas foi realizada com o auxílio de um paquímetro, utilizando-se a média aritmética de cinco ciclos

cardíacos consecutivos.

O desempenho sistólico do VE foi mensurado pelos seguintes índices: fração de ejeção do VE (FE), $[(DDVE.^3 - DSVE.^3)/(DDVE.^3)]$, fração de encurtamento mesocárdico (ΔD meso), $\{[(DDVE+^{1/2} EDPP+^{1/2} EDSIV)-(DSVE+^{1/2} ESPP+^{1/2} ESSIV)]/(DDVE+^{1/2} EDPP+^{1/2} EDSIV)\} \times 100\%$ e velocidade de encurtamento sistólico da parede posterior (VEPP); a VEPP foi mensurada pela tangente máxima do encurtamento sistólico da parede posterior.

A função diastólica do VE foi analisada pelos seguintes parâmetros: velocidades do fluxo transvalvar mitral correspondente à fase de enchimento inicial (onda E) e tardia consequente à contração atrial (onda A), relação onda E/onda A (E/A), tempos de desaceleração da onda E (TDE) e de relaxamento isovolumétrico (TRIV). As ondas E e A foram medidas no momento de maior velocidade dos fluxos transvalvar. Para a obtenção dos fluxos relacionados à função diastólica, o transdutor foi posicionado na região correspondente a ponta do coração na imagem denominada quatro câmaras. O TRIV foi mensurado na imagem denominada cinco câmaras. As medidas de velocidade e tempo foram realizadas em tempo real no monitor do ecocardiógrafo.

3.5 Análise macroscópica do animal e do coração *post mortem*

A análise macroscópica *post mortem* do rato e do coração, que permite identificar os sinais de insuficiência cardíaca, foram realizados nos diferentes períodos descritos no protocolo experimental. 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 entre VE, VD e AT e o peso corporal final (PCF) e o comprimento da tibia (T), obtendo as seguintes relações: VE/PCF, VD/PCF, AT/PCF, VE/T, VD/T e AT/T. Os sinais que identificaram a presença de insuficiência

cardíaca foram descritos no item 3.2.

3.6 Determinação da concentração de insulina sérica

Após decapitação dos animais, as amostras de sangue foram coletadas em tubos *Falcon*, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e armazenadas em freezer à -80°C. A concentração de insulina foi determinada pelo método de ELISA utilizando-se *kit* específico (EZRMI-13K - Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de microplaca (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

3.7 Expressão proteica no miocárdio

A expressão protéica foi realizada pela técnica de *Western Blot*, que é um método utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico(99). Foi analisada a expressão do HIF-1 α , das proteínas envolvidas na captação e metabolismo da glicose (captação, glicólise e vias aeróbica e anaeróbica).

3.7.1 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 Ultra Turrax™ T25 Basic (IKA Works, Wilmington, NC, USA) com tampão de lise RIPA (Amresco, Solon, OH, USA) e coquetéis inibidores de protease e fosfatase. O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da

homogeneização foi centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos *ependorfs* e armazenado em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada utilizando o *kit* BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Para as proteínas de membrana (GLUT1 e GLUT4) o homogenato foi centrifugado por 3 min, a 1000 G, a 4°C, para eliminação de material insolúvel. Em seguida o sobrenadante foi centrifugado a 18000 G por 10 min a 4°C e, posteriormente, transferido para ultracentrífuga (Sorvall WX80 Ultracentrifuge - Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a 100000 G por 45 min a 4°C. Após a ultracentrifugação o pellet foi ressuspenso em 100 µL de tampão de lise. A concentração de proteína foi analisada utilizando o *kit* BCA Protein Assay (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

A distribuição dos grupos no gel para a realização da técnica de Western Blot.

3.7.2 Delineamento dos grupos para o Western Blot

Na análise do Western Blot foram usados oito animais de cada grupo experimental, distribuído em oito géis. Um rato do grupo Sham de 18 semanas, presente em todos géis, foi utilizado como padrão e denominado controle interno da amostra (CIA). O valor da quantificação de cada rato (x) foi normalizado pelo valor gerado pela CIA (y) gerando um determinado resultado (z). Este procedimento utilizado para as proteínas alvos, foi também usado para a beta-actina, que resultou em valores (w). Finalmente, o valor (z) das proteínas alvos de cada animal foi normalizado pelos valores (w) da beta-actina, respectivo a cada rato.

3.7.3 Western Blot

Neste trabalho foi mensurada a expressão das seguintes proteínas: HKII, PFKB2, PK, PDH, LDH, GLUT1, GLUT4, pIR, IRtotal, PI3K, pAMPK, AMPKtotal e HIF-1 α . Além disso, foi analisada a expressão da proteína de normalização, a β -actina.

Após a extração e quantificação da concentração proteica, 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 pode ser 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 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por um período variável de acordo com o tamanho da proteína, em média 90 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%) ou por transferência úmida, dependendo do peso molecular da proteína analisada. Após a transferência os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução bloqueadora a 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 10mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase diluído na solução bloqueadora, por 1 hora sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T. A imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Finalmente, as membranas de nitrocelulose foram analisadas em fotodocumentador ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, UK) e as análises quantitativas das bandas protéicas (blots) foram realizadas pelo software Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA).

Anticorpos primários

- HIF-1 α , *mouse IgG2b* (ab463 - Abcam, Cambridge, MA, USA).
- GLUT1, *mouse IgG* (12939- Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- GLUT4, *mouse IgG* (2213 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- IR β , *rabbit IgG* (3025 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- IR β (Thr1150/1151), *rabbit IgG* (3025 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- PI3K, *rabbit IgG* (4292 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- AMPK, *rabbit IgG* (2532 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

- AMPK (*Thr172*), *rabbit IgG* (2535 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- HKII, *rabbit IgG* (2106 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- PFKFB2, *rabbit IgG* (07-1530- Millipore, Temecula, CA, USA).
- PK, *rabbit IgG* (3186 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- LDHA, *rabbit IgG* (2012 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- PDH, *rabbit IgG* (2784 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).
- β -Actin, *rabbit IgG* (4967 - Cell Signaling, Danvers, MA, USA).

Anticorpos secundários

- *Anti-Rabbit IgG-HRP* (ab97069 - Abcam, Cambridge, MA, USA).
- *Anti-Mouse IgG-HRP* (ab98808 - Abcam, Cambridge, MA, USA).

3.8 Quantificação da atividade das enzimas reguladoras da via glicolítica, lactato desidrogenase e piruvato desidrogenase

Foram analisadas a atividade máxima de enzimas chave que participam do metabolismo de glicose, via aeróbica e anaeróbica: hexoquinase (HK, E.C.2.7.1.1), fosfofrutoquinase (PFK, E.C.2.7.1.11) e piruvato quinase (PK, (EC 2.7.1.40), associada com a via anaeróbica, lactato desidrogenase (LDH); e a piruvato desidrogenase (PDH) citrato sintase (CS, E.C. 4.1.3.7) associado com o ciclo de Krebs e via aeróbica. Amostras do ventrículo esquerdo foram homogeneizadas em 50 mmol/L de Tris-HCl, 1 mmol/L de EDTA, e coquetel de inibidor de protease, pH 7,4, utilizando um instrumento Polytron (Kinematica, Littau-Lucerna, Suíça). O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. Todas as atividades enzimáticas foram determinadas a 25°C utilizando espectrofotômetro de microplacas Spectra Max 250 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A atividade da

citrato sintase foi medida numa mistura de reação contendo 100 mMol/l de Tris-HCl, 1 mMol/l de $MgCl_2$, 1 mMol/l de EDTA, 0,2 mMol/l ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico), 0,3 mMol/l de acetil-CoA, e 0,5 mMol/l de oxaloacetato (omitido no controle), pH 8,1. A taxa de alteração da absorbância foi monitorada a 412 nm ($\epsilon = 13.6 \mu\text{mol}.\text{ml}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A atividade máxima da HK foi determinada utilizando uma mistura de reação contendo 75 mMol/L de Tris-HCl, 7,5 mMol/L de $MgCl_2$, 0,8 mMol/L de EDTA, 1,5 mMol/L de KCl, 4 mMol/L, β -mercaptoetanol, 0,05% de Triton X-100, 0,4 mMol/l de $NADP^+$, 2,5 mMol/L de ATP, 1,4 unidades/ml de glicose-6-fosfato desidrogenase e 1,0 mMol/L de glicose, pH 7,2; reação foi monitorada a 340 nm. Para a mensuração da atividade da piruvato quinase (PK) foi utilizado 100 mM KH_2PO_4 , 10 mM $MgCl_2$, 80 mM KCl, 0,05% Triton x 100, 9 U LDH, 0,17 mM NADH, 5 mM ADP, o homogeneizado e como iniciador da reação, 2 mM de PEP. A leitura da absorbância foi efetuada a 340nm em placas UV. As análises enzimáticas para LDH (utilizamos *kits* comerciais da LABTEST, seguindo o protocolo do fabricante).

3.9 Determinação da concentração de lactato cardíaco

Amostras do ventrículo esquerdo foram desproteinizadas e homogeneizadas em 3,67% de ácido perclórico utilizando o instrumento Polytron (Kinematica, Littau-Lucerna, Suíça), posteriormente neutralizado com solução de 3 M de KOH. O lisado foi centrifugado a 12000 rpm durante 10 min. a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. Para a determinação da concentração de lactato cardíaco, com ácido perclórico, utilizamos kit de lactato (LABTEST), utilizando como branco o ácido perclórico neutralizado.

3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade. No estudo das variáveis moleculares, metabólicas, estruturais e funcionais, considerando as duas fontes de variação, estenose aórtica supravalvar (ausência ou presença) e os momentos de eutanásia (2, 6, 18 semanas após a cirurgia e insuficiência cardíaca), utilizou a técnica da análise de variância (ANOVA) para o esquema fatorial 2x4, com delineamento inteiramente casualizado, complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey (paramétrico) e Dunn (não paramétrico)⁽¹⁰⁰⁾. A opção pelo procedimento paramétrico ou não paramétrico foi resultante do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov; quando o resultado mostrou aderência a normalidade foi utilizada a técnica paramétrica, e caso contrário não paramétrica.

O estudo da associação entre os conjuntos formados pelo HIF-1 α e as variáveis moleculares, metabólicas, estruturais e funcionais foi realizado por meio da técnica multivariada envolvendo a análise de correlação canônica. A técnica multivariada exploratória de dados denominados de análise de correlação canônica foi proposta por Harold Hotelling (1935) e tem como finalidade analisar as relações lineares entre dois agrupamentos de variáveis. A ideia básica do procedimento matemático-estatístico consiste em resumir a informação de cada conjunto de variáveis-respostas em combinações lineares, sendo que a escolha dos coeficientes dessas combinações é feita tendo-se como referência a maximização da correlação existente entre os dois conjuntos de variáveis-respostas. As combinações lineares construídas, denominadas variáveis canônicas, enquanto as correlações entre elas são correlações canônicas, que indicam o grau associação existentes entre os dois conjuntos de variáveis⁽¹⁰¹⁾. A análise canônica foi realizada com os grupos EAO. Todas as conclusões estatísticas foram discutidas ao nível de 5% de significância.

RESULTADOS

4-RESULTADOS

4.1 Peso corporal e análise macroscópica do coração *post mortem*

A Tabela 1 mostra a estrutura macroscópica *post mortem* dos grupos estudados: Sham₂, Sham₆, Sham₁₈, Sham_{1c}, EA₀₂, EA₀₆, EA₀₁₈ e EA_{01c}. A comparação entre os dois grupos, fixados os momentos, mostrou que não houve diferença no peso corporal (PC) entre os EAo com os respectivos controles; entretanto a comparação entre os diferentes momentos, fixados os grupos, mostrou que o PC nos grupos Sham₁₈ e Sham_{1c} foram semelhantes entre si, e maiores que Sham₆ e Sham₂; Sham₆ foi maior que o Sham₂. O grupo EAo apresentou, para o PC, o mesmo comportamento que o Sham.

As variáveis peso do VE, VE/PC e VE/Tíbia foram maiores nos grupos EAo comparados com os respectivos controles. O peso do VE nos Sham₂ e Sham₆ foram semelhantes, assim como Sham₁₈ e Sham_{1c}; entretanto, os últimos dois grupos foram maiores do que Sham₂ e Sham₆. O peso do VE foi diferente em todos os momentos no grupo EAo, sendo maior no EA_{01c}. A relação VE/PC nos grupos Sham₂ e EA₀₂ foi maior do que nos outros três momentos estudados, que foram semelhantes entre si. A relação VE/Tíbia no Sham_{1c} foi maior que Sham₂ e Sham₆ e semelhante com Sham₁₈, sendo que o Sham₁₈ foi maior que o Sham₂. A relação VE/Tíbia do EA_{01c} foi maior em relação aos demais momentos; os grupos, EA₀₁₈ e EA₀₆, semelhantes entre si, foram maiores que EA₀₂.

Em relação ao VD, VD/PC e VD/Tíbia, as variáveis foram maiores nos grupos EA₀₁₈ e EA_{01c} comparados com os respectivos Sham. O peso do VD foi menor no grupo Sham₂ em comparação aos demais grupos, que foram semelhantes entre si. O VD no EA_{01c} foi maior que os três momentos; o grupo EA₀₁₈ foi maior do que EA₀₂ e

EAo₆, que são semelhantes entre si. A relação VD/PC do Sham₂ aumentou em comparação aos três outros grupos; o Sham₆ foi maior que o Sham₁₈ e Sham_{1c}, que foram semelhantes entre si. No grupo EAo, a relação VD/PC foi maior no EAo_{1c} do que nos demais grupos. Grupo EAo₂ foi maior que o EAo₆ e EAo₁₈ que foram semelhantes. A relação VD/Tíbia foi igual nos quatro grupos Sham. O EAo_{1c} foi maior que os demais momentos; o EAo₁₈ aumentou em relação aos EAo₂ e EAo₆, que foram semelhantes.

Os pesos AT, AT/PC e AT/Tíbia foram maiores no EAo₆, EAo₁₈ e EAo_{1c} comparado com os respectivos Sham. O peso dos AT nos grupos Sham foram semelhantes nos quatro grupos. Nos grupos EAo, os pesos dos átrios foram diferentes em todos os momentos estudados, sendo maior no grupo EAo_{1c}. A relação AT/PC foi maior Sham₂ em relação aos demais grupos, que foram semelhantes entre si. A AT/PC foi maior no EAo_{1c} em relação aos três grupos; o EAo₂ foi maior do que EAo₆ e 18, que não diferem. A AT/Tíbia nos grupos Sham foram semelhantes nos quatro momentos; o EAo_{1c} foi maior em relação aos demais grupos; os EAo₆ e EAo₁₈ foram semelhantes e maiores que o EAo₂.

O peso do pulmão, pulmão/PC e pulmão/Tíbia foram maiores no EAo_{1c} *versus* Sham_{1c}. A comparação ao longo tempo mostrou que o peso do pulmão no Sham₂ foi semelhante ao Sham₆ e menor que o Sham₁₈ e Sham_{1c}. Esses dois grupos e Sham₆ foram semelhantes. O peso do pulmão nos EAo₂ e EAo₆ foram semelhantes, assim como EAo₆ e EAo₁₈. O peso do EAo_{1c} foi maior do que os demais grupos EAo. A relação do Pulmão/PC do Sham₂ foi semelhante ao Sham₆ e maior do que os Sham₁₈ e Sham_{1c}; os grupos Sham₆, Sham₁₈ e Sham_{1c} foram semelhantes. O EAo₂ foi semelhante ao EAo₆ e EAo_{1c}; o grupo EAo_{1c} se diferiu dos animais EAo₁₈ e EAo₆. Não houve diferença entre o grupo EAo₆ e EAo₁₈. A relação Pulmão/Tíbia foi semelhantes

nos quatros grupos Sham; o EAO_{1c} foi maior que os demais grupos; o EAO₂ foi menor que os grupos EAO₆, EAO₁₈, que foram semelhantes entre si.

Tabela 1. Estrutura macroscópica cardíaca post morte e peso corporal

Variável	Grupos	2 Semanas	6 semanas	18 Semanas	IC	Valor p
PC (g)	Sham	147 ± 11,5 A	295 ± 56,4 B	455 ± 65,5 C	511 ± 43,5 C	<0,05
	EAo	158 ± 16,3 A	288 ± 38,0 B	475 ± 62,4 C	471 ± 95,6 C	<0,05
Valor p		NS	NS	NS	NS	
VE (g)	Sham	0,42 ± 0,05 A	0,56 ± 0,14 A	0,73 ± 0,13 B	0,89 ± 0,12 B	<0,05
	EAo	0,66 ± 0,11 A	0,96 ± 0,11 B	1,30 ± 0,18 C	1,58 ± 0,21 D	<0,05
Valor p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	
VD (g)	Sham	0,12 ± 0,02 A	0,19 ± 0,03 B	0,23 ± 0,05 B	0,24 ± 0,03 B	<0,05
	EAo	0,14 ± 0,03 A	0,22 ± 0,03 A	0,33 ± 0,07 B	0,57 ± 0,11 C	<0,05
Valor p		NS	NS	<0,05	<0,05	
AT (g)	Sham	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02	NS
	EAo	0,09 ± 0,02 A	0,15 ± 0,03 B	0,21 ± 0,06 C	0,46 ± 0,07 D	<0,05
Valor p		NS	<0,05	<0,05	<0,05	
Pulmão (g)	Sham	0,84 ± 0,21 A	1,39 ± 0,21 AB	1,79 ± 0,37 B	1,93 ± 0,35 B	<0,05
	EAo	0,99 ± 0,09 A	1,50 ± 0,41 AB	1,94 ± 0,42 B	3,45 ± 1,37 C	<0,05
Valor p		NS	NS	NS	<0,05	
VE/PC (g/kg)	Sham	2,89 ± 0,38 B	1,92 ± 0,55 A	1,70 ± 0,20 A	1,80 ± 0,30 A	<0,05
	EAo	4,16 ± 0,70 B	3,40 ± 0,50 A	2,80 ± 0,40 A	3,40 ± 0,60 A	<0,05
Valor p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	
VD/PC (g/kg)	Sham	0,84 ± 0,12 C	0,68 ± 0,14 B	0,53 ± 0,07 A	0,49 ± 0,06 A	<0,05
	EAo	0,91 ± 0,20 B	0,78 ± 0,13 A	0,71 ± 0,15 A	1,25 ± 0,20 C	<0,05
Valor p		NS	NS	<0,05	<0,05	
AT/PC (g/kg)	Sham	0,46 ± 0,11 B	0,31 ± 0,04 A	0,23 ± 0,05 A	0,22 ± 0,04 A	<0,05
	EAo	0,55 ± 0,18 B	0,53 ± 0,09 A	0,46 ± 0,13 A	0,98 ± 0,17 C	<0,05
Valor p		NS	<0,05	<0,05	<0,05	
Pulmão/PC	Sham	5,76 ± 1,44 B	4,73 ± 0,80 AB	3,94 ± 0,88 A	3,86 ± 0,65 A	<0,05
	EAo	6,36 ± 0,92 BC	5,63 ± 1,90 AB	4,19 ± 0,94 A	6,76 ± 0,20 C	<0,05
Valor p		NS	NS	NS	<0,05	
Tíbia (cm)	Sham	2,94 ± 0,76 A	3,57 ± 1,50 B	4,21 ± 1,62 C	4,44 ± 2,1 D	<0,05
	EAo	3,04 ± 1,10 A	3,61 ± 1,01 B	4,29 ± 1,31 C	4,37 ± 1,6 C	<0,05
Valor p		NS	NS	NS	NS	
VE/Tíbia (g/cm)	Sham	0,14 ± 0,02 A	0,16 ± 0,04 AB	0,18 ± 0,03 BC	0,20 ± 0,03 C	<0,05
	EAo	0,22 ± 0,04 A	0,27 ± 0,03 B	0,30 ± 0,04 B	0,36 ± 0,04 C	<0,05
Valor p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	
VD/Tíbia (g/cm)	Sham	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	NS
	EAo	0,05 ± 0,01 A	0,06 ± 0,01 A	0,08 ± 0,02 B	0,13 ± 0,03 C	<0,05
Valor p		NS	NS	<0,05	<0,05	
AT/Tíbia (g/cm)	Sham	0,02 ± 0,005	0,02 ± 0,003	0,02 ± 0,005	0,02 ± 0,004	NS
	EAo	0,02 ± 0,008 A	0,04 ± 0,009 B	0,05 ± 0,016 B	0,10 ± 0,001 C	<0,05
Valor p		NS	<0,05	<0,05	<0,05	
Pulmão/Tíbia (g/cm)	Sham	0,03 ± 0,008	0,04 ± 0,011	0,04 ± 0,012	0,04 ± 0,007	NS
	EAo	0,03 ± 0,012 A	0,05 ± 0,013 B	0,05 ± 0,011 B	0,07 ± 0,029 C	<0,05
Valor p		NS	NS	NS	<0,05	

Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2 semanas (n=12); Sham₆: Sham 6 semanas (n=12); Sham₁₈: Sham 18 semanas (n=15);

Sham_{IC}: Sham IC ; EAo₂: EAo, 2 semanas (n=12); EAo, 6 semanas (n=14); EAo, 18 semanas (n=16); EAo_{IC}, IC grave (n=14); VE: ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio; VE/PC: VE corrigido pelo PC; VD/PC: VD corrigido pelo PC; AT/PC: AT corrigido pelo PC; VE/Tíbia: VE corrigido pela tíbia; VD/Tíbia: VD corrigido pela tíbia; AT/P Tíbia: AT corrigido pela tíbia; NS: não significativo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste C, nível de significância de 5%. Letras diferentes: comparação de momentos, $p < 0,05$.

4.2 Sinais clínico-patológico de insuficiência cardíaca

Todos os ratos do grupo EAo_{IC} apresentaram alteração do padrão respiratório, ascite, derrame pleural, hipertrofia do VD e trombo em átrio esquerdo. O átrio esquerdo apresentou trombo de grande dimensão em 80% dos ratos e de tamanho moderado em 20%; a hipertrofia de VD foi acentuada em 90% e tamanho moderado em 10%. O grupo Sham_{IC} não apresentou sinais clínicos e patológicos de IC (Tabela 2).

Tabela 2 - Dados clínicos e patológicos de insuficiência cardíaca

Sinais de IC	Grupos	Intensidade e FR
Alteração do padrão Respiratório	Sham _{IC}	(-) 0%
	EAo _{IC}	(+++) 100%
Ascite	Sham _{IC}	(-) 0%
	EAo _{IC}	(+++) 100%
Derrame pleural	Sham _{IC}	(-) 0%
	EAo _{IC}	(+++) 100%
Trombo em AE	Sham _{IC}	(-) 0%
	EAo _{IC}	(++) 20%; (+++) 80%
Hipertrofia de VD	Sham _{IC}	(-) 0%
	EAo _{IC}	(++) 10%; (+++) 90%

FR: frequência relativa em porcentagem (%); intensidade dos sinais de insuficiência cardíaca: (-) ausente; (+) leve; (++) moderado e (+++) severo; AE: átrio esquerdo; VD: ventrículo direito; Sham_{IC}: controle operado (n=12); EAo_{IC}: EAo com insuficiência cardíaca grave (n=12).

4.3 Análise estrutural e funcional do coração por ecocardiograma

Os dados ecocardiográficos da estrutura e função cardíaca dos grupos estudados estão apresentados na Tabela 3. A comparação entre os grupos Sham e

EAo, fixados os momentos, mostra que a FC no EAo₂ foi menor do que no Sham₂; não houve diferença entre os demais momentos. A FC do Sham₂ foi maior em comparação com Sham₆, Sham₁₈ e Sham_{1c}; sendo que o Sham₆ é maior que o Sham_{1c} e semelhante ao Sham₁₈; Sham_{1c} foi igual ao Sham₁₈. A FC foi semelhante nos quatros grupos de EAo.

O AE, a relação AE/AO foram maiores nos quatros grupos EAo em relação aos respectivos Sham. O AE Sham₂ foi menor que os Sham₆, Sham₁₈ e Sham_{1c}. O Sham₆ foi semelhante ao Sham₁₈ e menor que o Sham_{1c}. O AE no EAo foi diferente entre os quatros grupos, sendo o maior valor para o grupo EAo_{1c}. A AE/AO foi semelhante nos grupos Sham. A relação AE/AO foi maior no EAo_{1c} em comparação com os demais grupos EAo, que foram semelhantes entre si.

O DDVE e EDPP foram maiores no grupo EAo₆, EAo₁₈ e EAo_{1c} comparadas aos respectivos grupos controles. O DDVE no grupo Sham₂ foi menor do que nos demais grupos Sham, que foram semelhantes. O EAo₂ foi menor que os outros três grupos EAo. Os animais do EAo₆ são semelhantes com EAo₁₈ e ambos foram menores que o EAo_{1c}. A EDPP do Sham₂ e Sham₆ foram semelhantes, assim como o Sham₁₈ e Sham_{1c}; entretanto, o Sham₂ e Sham₆ foi menor em relação Sham₁₈ e Sham_{1c}. A EDPP foi diferente nos quatros grupos EAo, sendo maior valor no grupo EAo_{1c}. A ERVE dos grupos EAo foi maior em relação aos grupos controles. O Sham₂ foi diferente do Sham₆ e semelhantes aos grupos Sham₁₈ e Sham_{1c}. Não houve diferença do Sham₆, Sham₁₈ e Sham_{1c}. A ERVE do EAo₂ e EAo₆ foram semelhantes, assim como EAo₁₈ e EAo_{1c}. Porém, os grupos EAo₁₈ e EAo_{1c} foram maiores em relação aos grupos EAo₂ e EAo₆.

A avaliação da função sistólica mostrou que a % FE e Enc. meso foram maiores no EAo₆ versus Sham₆ e menores no EAo_{1c} em relação ao Sham_{1c}. A FE nos grupos

Sham foram semelhantes nos quatro momentos estudados; o grupo EAo_{1c}, a %FE foi reduzida em comparação com os demais grupos EAo, que foram semelhantes. O Enc. meso foi semelhante nos quatro Sham; os grupos EAo₂ e EAo₆, foram semelhantes e maiores que os EAo₁₈ e EAo_{1c}; EAo_{1c} foi menor que EAo₁₈. A VEPP foi menor nos EAo₁₈ e _{1c} em relação aos respectivos controles. Não houve diferença nos grupos Sham e EAo nos quatros momentos estudados.

Em relação a função diastólica, a onda E elevou significativamente nos EAo₆, EAo₁₈ e EAo_{1c} em comparação com os respetivos controles. Nos quatro momentos estudados não houve diferença entre os grupos Sham. Durante o processo evolutivo, a EAo_{1c} foi maior que os demais grupos EAo. Os animais EAo₆ e EAo₁₈ são semelhantes e diferentes do grupo EAo₂. A Onda A foi maior nos grupos EAo₆, EAo₁₈ e menor no grupo EAo_{1c} em relação aos Sham₆, Sham₁₈ e Sham_{1c}; a Onda A foi semelhante nos quatro momentos estudados nos grupos Sham, respectivamente; EAo_{1c} foi menor comparado com os demais grupos, que foram semelhantes. A relação das ondas E/A foi maior no grupo EAo_{1c} comparado com Sham_{1c}; a E/A foi semelhante nos quatro momentos estudados nos grupos Sham; EAo_{1c} foi maior em relação aos grupos EAo₂, EAo₆, EAo₁₈, que foram semelhantes. A TDE foi menor nos grupos EAo₁₈ e EAo_{1c} *versus* respectivos controles. Os animais Sham₂ apresentaram a TDE menor em relação aos Sham₆, Sham₁₈ e Sham_{1c}, que foram semelhantes. No grupo EAo, a TDE foi menor no grupo EAo_{1c} em relação aos três grupos, que não apresentaram diferenças.

Tabela 3 - Avaliação ecocardiográfica estrutural e funcional

Variável	Grupos	2 Semanas	6 semanas	18 Semanas	IC	Valor p
FC (bpm)	Sham	357 ± 49 C	295 ± 40 B	274 ± 33 AB	259 ± 12 A	<0,05
	EAo	298 ± 31	290 ± 25	291 ± 31	283 ± 19	NS
Valor p		<0,05	NS	NS	NS	
AE (mm)	Sham	4,10 ± 0,43 A	4,96 ± 0,36 B	5,19 ± 0,61 B	5,66 ± 0,38 C	<0,05
	EAo	4,73 ± 0,30 A	6,09 ± 0,58 B	6,65 ± 0,66 C	9,32 ± 0,96 D	<0,05
Valor p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	
AE/AO	Sham	1,36 ± 0,09	1,46 ± 0,12	1,31 ± 0,16	1,39 ± 0,08	NS
	EAo	1,56 ± 0,10 A	1,68 ± 0,18 A	1,67 ± 0,92 A	2,39 ± 0,31 B	<0,05
Valor p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	
DDVE (mm)	Sham	6,13 ± 0,35 A	6,85 ± 0,21 B	7,05 ± 0,30 B	8,07 ± 0,37 B	<0,05
	EAo	6,11 ± 0,51 A	7,87 ± 0,15 B	8,01 ± 0,11 B	9,65 ± 0,64 C	<0,05
Valor p		NS	<0,05	<0,05	<0,05	
EDPP (mm)	Sham	1,15 ± 0,10 A	1,21 ± 0,08 A	1,36 ± 0,10 B	1,35 ± 0,03 B	<0,05
	EAo	1,24 ± 0,10 A	1,53 ± 0,18 B	1,88 ± 0,25 C	2,31 ± 0,32 D	<0,05
Valor p		NS	<0,05	<0,05	<0,05	
ERVE	Sham	0,38 ± 0,02 B	0,34 ± 0,03 A	0,39 ± 0,03 AB	0,34 ± 0,05AB	<0,05
	EAo	0,41 ± 0,05 A	0,39 ± 0,05 A	0,47 ± 0,08 B	0,48 ± 0,07B	<0,05
Valor p		<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	
FE (%)	Sham	90,9 ± 0,03	86,9 ± 0,04	88,2 ± 0,05	87,1 ± 0,03	NS
	EAo	92,8 ± 0,03 B	91,8 ± 0,03 B	88,0 ± 0,06 B	78,2 ± 0,08 A	<0,05
Valor p		NS	<0,05	NS	<0,05	
Enc Meso (%)	Sham	34,6 ± 4,7	30,2 ± 4,9	30,8 ± 5,2	31,1 ± 4,2	NS
	EAo	34,8 ± 6,3 C	34,7 ± 5,0 C	28,7 ± 5,3 B	22,9 ± 4,4 A	<0,05
Valor p		NS	<0,05	NS	<0,05	
VEPP (mm/s)	Sham	34,5 ± 5,1	36,5 ± 5,1	38,4 ± 7,0	39,5 ± 5,0	NS
	EAo	33,3 ± 4,9	31,5 ± 4,7	31,6 ± 8,3	28,5 ± 3,3	NS
Valor p		NS	NS	<0,05	<0,05	
Onda E (cm/s)	Sham	81,8 ± 10,3	81,5 ± 6,9	75,5 ± 5,9	74,6 ± 4,8	NS
	EAo	81,3 ± 8,4 A	102 ± 16,0 B	98,0 ± 8,0 B	139 ± 20,0 C	<0,05
Valor p		NS	<0,05	<0,05	<0,05	
Onda A (cm/s)	Sham	58,0 ± 15,5	57,5 ± 14,1	45,7 ± 13,4	49,7 ± 8,2	NS
	EAo	63,8 ± 12,8 B	68,1 ± 9,3 B	59,5 ± 14,4 B	19,5 ± 5,8 A	<0,05
Valor p		NS	<0,05	<0,05	<0,05	
E/A	Sham	1,47 ± 0,34	1,46 ± 0,33	1,59 ± 0,30	1,53 ± 0,27	NS
	EAo	1,31 ± 0,20 A	1,52 ± 0,30 A	1,43 ± 0,27 A	7,72 ± 2,51 B	<0,05
Valor p		NS	NS	NS	<0,05	
TDE (ms)	Sham	33,1 ± 8,8 A	44,7 ± 3,9 B	48,5 ± 7,3 B	46,6 ± 8,2 B	<0,05
	EAo	39,5 ± 5,1 B	41,2 ± 6,1 B	42,0 ± 4,7 B	31,3 ± 4,1 A	<0,05
Valor p		NS	NS	<0,05	<0,05	

Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2 semanas (n=12); Sham₆: Sham 6 semanas (n=12); Sham₁₈: Sham 18 semanas (n=15); Sham_{IC}: Sham IC ; EAo₂: (n=12); EAo, 2 semanas (n=12); EAo, 6 semanas (n=14); EAo, 18 semanas (n=16); EAo, IC (n=10); VE: ventrículo esquerdo; PC: peso corporal; FC: frequência cardíaca; DDVE: diâmetro

diastólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior; ERVE: espessura relativa do VE; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AO: diâmetro da aorta; E/A: razão entre a velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E; Enc Meso%: encurtamento de mesocardio em porcentagem; FE%: fração de ejeção do VE em porcentagem; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; NS: não significativo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão; técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%. Letras diferentes: comparação de momentos, $p < 0,05$.

4.4 Expressão proteica HIF-1 α no miocárdio

A expressão proteica do HIF-1 α está apresentado na Figura 7. Houve diferença estatística entre os grupos EAo e os respectivos Sham. A análise da evolução dos animais com estenose aórtica mostrou que o grupo EAo_{IC} foi significativamente maior em comparação aos EAo₂ e EAo₁₈. Não houve diferença entre os grupos Sham.

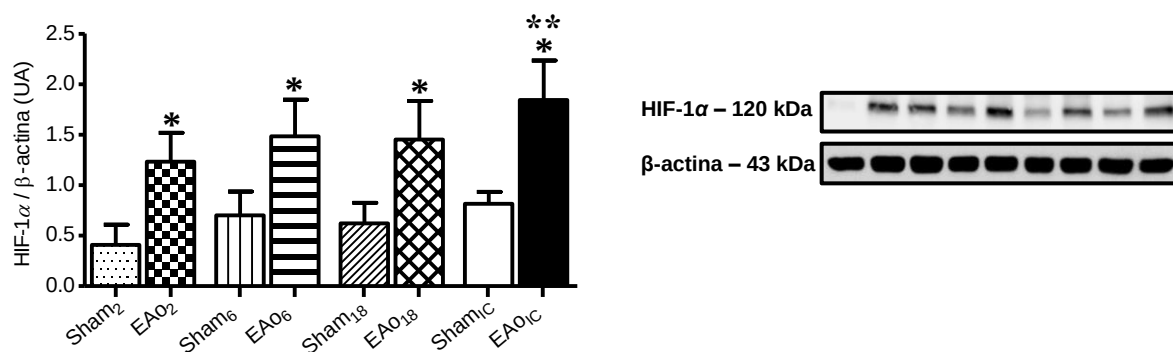


Figura 7 | Expressão da proteína HIF-1 α . Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supraavalar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2 semanas; Sham₆: Sham 6 semanas; Sham₁₈: Sham 18 semanas; Sham_{IC}: Sham IC; EAo₂: EAo 2 semanas; EAo₆: EAo 6 semanas; EAo₁₈: EAo 18 semanas; EAo_{IC}: EAo IC grave; CIA: controle interno da amostra; UA: unidade arbitrária. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8/grupo); técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%, $p < 0,05$. * EAo vs respectivo Sham; ** EAo_{IC} vs EAo₂ e 18.

4.5 Metabolismo da glicose no miocárdio

4.5.1 Captação e transporte da glicose

As variáveis analisadas na captação e transporte de glicose celular foram insulina sérica e expressão proteica do IR fosforilado, IR total, PI3K, GLUT1, GLUT4, AMPK fosforilado e AMPK total miocárdica.

4.5.1.1 Insulina sérica

A Figura 8 mostra que houve aumento significativo da concentração de insulina sérica nos grupos EAo₆ e EAo₁₈ comparado com os Sham₆ e Sham₁₈; porém, o EAo_{IC} apresentou redução significativa em relação ao Sham_{IC}. Ao analisar a evolução dos animais com EAo verifica-se que o EAo_{IC} apresentou diminuição da insulina em relação aos grupos EAo₆ e EAo₁₈; os animais EAo₁₈ aumentaram em relação ao EAo₂. Não houve diferença entre os grupos Sham.

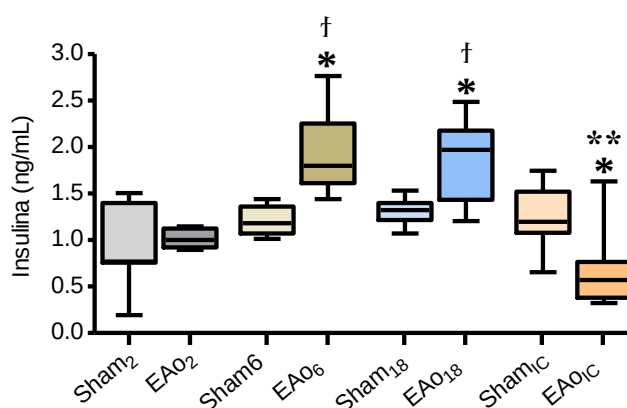


Figura 8| Concentração de insulina sérica. Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2 semanas; Sham₆: Sham 6 semanas; Sham₁₈: Sham 18 semanas; Sham_{IC}: Sham IC; EAo₂: EAo 2 semanas; EAo₆: EAo 6 semanas; EAo₁₈: EAo 18 semanas; EAo_{IC}: EAo IC grave. Dados expressos em mediana e valores mínimo e máximo (n=12/grupo); técnica de análise de variância não paramétrica (ANOVANP) para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado, complementada com o teste de comparações múltiplas de Dunn, nível de significância de 5%, $p < 0,05$. *, **, †, $p < 0,05$. * EAo vs respectivos Sham; ** EAo_{IC} vs EAo₆ e EAo₁₈; † EAo₁₈ e 6 VS EAo₂.

4.5.1.2 Receptor de insulina miocárdica

As expressões proteicas dos receptores de insulina fosforilada (pIR), do IR total e a relação pIR/IR total estão apresentadas nas Figuras 9A, 9B e 9C. O pIR foi maior nos EAo₆, EAo₁₈ e EAo_{IC} em relação aos respectivos Sham. O EAo_{IC} foi maior em relação ao EAo₂, EAo₆ e EAo₁₈; EAo₆ e EAo₁₈ foram maiores que EAo₂; não houve diferença entre os grupos Sham (Figura 9A). O IR total foi maior nos EAo₁₈ e EAo_{IC}

em relação aos respectivos Sham; não houve diferença entre os quatros grupos Sham; o mesmo comportamento ocorreu nos quatro grupos EAo (Figura 9B). A relação pIR/IR total, foi maior nos EAo₆, EAo₁₈ e EAo_{IC} versus respectivos Sham. A análise evolutiva mostrou que os Sham₆, Sham₁₈ e Sham_{IC} foram maiores do que Sham₂; e que os EAo₆, EAo₁₈ e EAo_{IC} foram maiores do que o EAo₂ (Figura 9C).

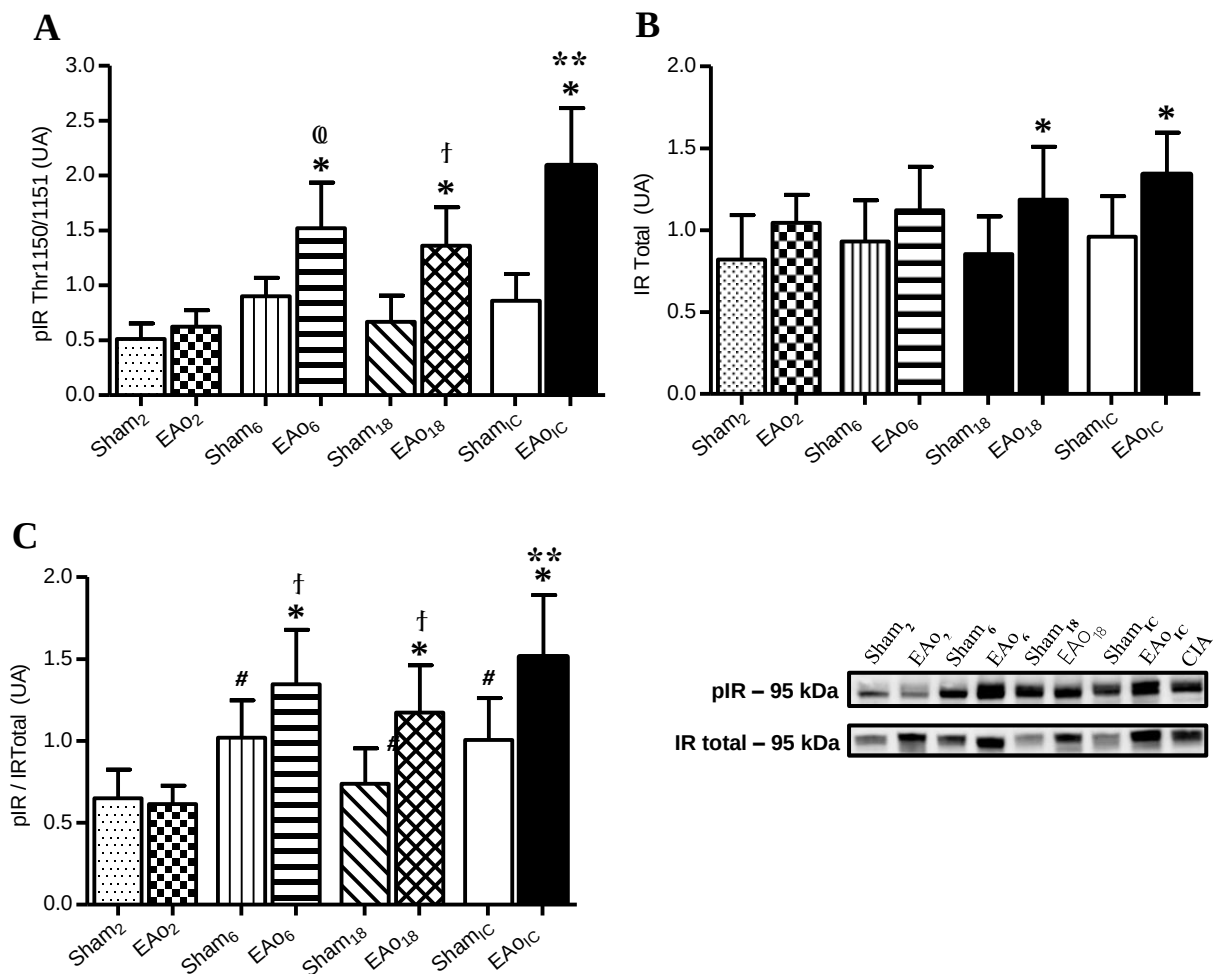


Figura 9 A, B e C| Expressão da proteína pIR (A), IR total (B) e a relação pIR/IR total (C). Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2, semanas; Sham₆: Sham 6, semanas; Sham₁₈: Sham, 18 semanas; Sham_{IC}: Sham, IC; EAo₂: EAo, 2 semanas; EAo₆: EAo, 6 semanas; EAo₁₈: EAo 18, semanas; EAo_{IC}: EAo, IC grave; CIA: controle interno da amostra; UA: unidade arbitrária. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8/grupo); técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado, complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%, $p < 0,05$. * EAo vs respectivos Sham; ** EAo_{IC} vs EAo_{2, 6 e 18}; † EAo_{18 e 6} vs EAo₂; # Sham_{IC, 18 e 6} vs Sham₂.

4.5.1.3 PI3K miocárdica

Na Figura 10 estão os dados referente a expressão proteica do PI3K miocárdica; houve aumento no EAo_{IC} em relação Sham_{IC}. O PI3K foi maior no EAo_{IC} em relação aos demais grupos EAo. Não houve diferença entre os grupos Sham.

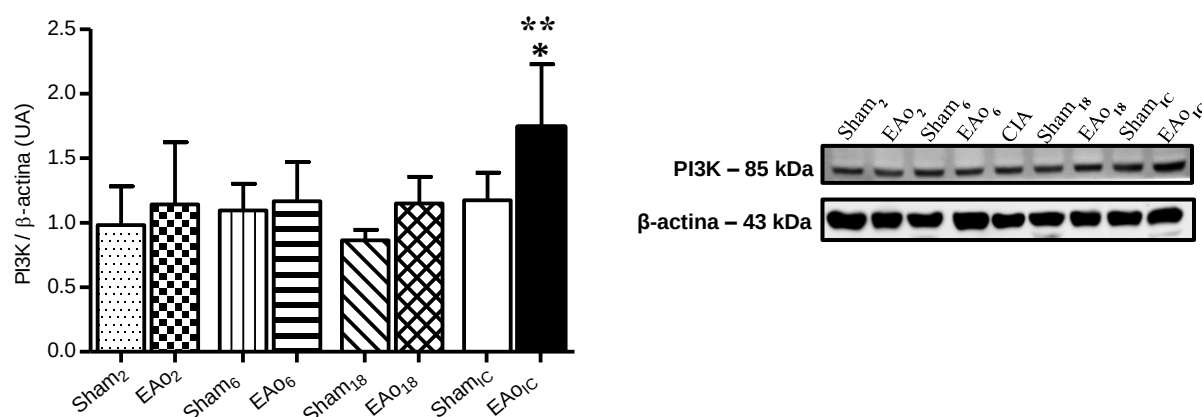


Figura 10| Expressão da proteína PI3K. Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2, semanas; Sham₆: Sham 6, semanas; Sham₁₈: Sham, 18 semanas; Sham_{IC}: Sham, IC; EAo₂: EAo, 2 semanas; EAo₆: EAo, 6 semanas; EAo₁₈: EAo 18, semanas; EAo_{IC}: EAo, IC grave; CIA: controle interno da amostra; UA: unidade arbitrária. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8/grupo); técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%, $p < 0,05$. * EAo vs respectivo Sham; ** EAo_{IC} vs EAo₂, EAo₆ e EAo₁₈.

4.5.1.4 GLUT1 e GLUT4 miocárdico

As expressões proteicas dos transportadores de glicose, GLUT 4 e GLUT 1, estão apresentados nas Figuras 11A e 11B. O GLUT 4 foi maior nos EAo₆, EAo₁₈ e EAo_{IC} versus respectivos Sham; não houve diferença entre os quatros grupos Sham; o mesmo comportamento ocorreu nos quatro grupos EAo (Figura 11A); o GLUT1 foi maior nos grupos EAo em relação aos respectivos Sham. O EAo_{IC} foi maior que o EAo₆; não houve diferença entre os quatros grupos Sham (Figura 11B).

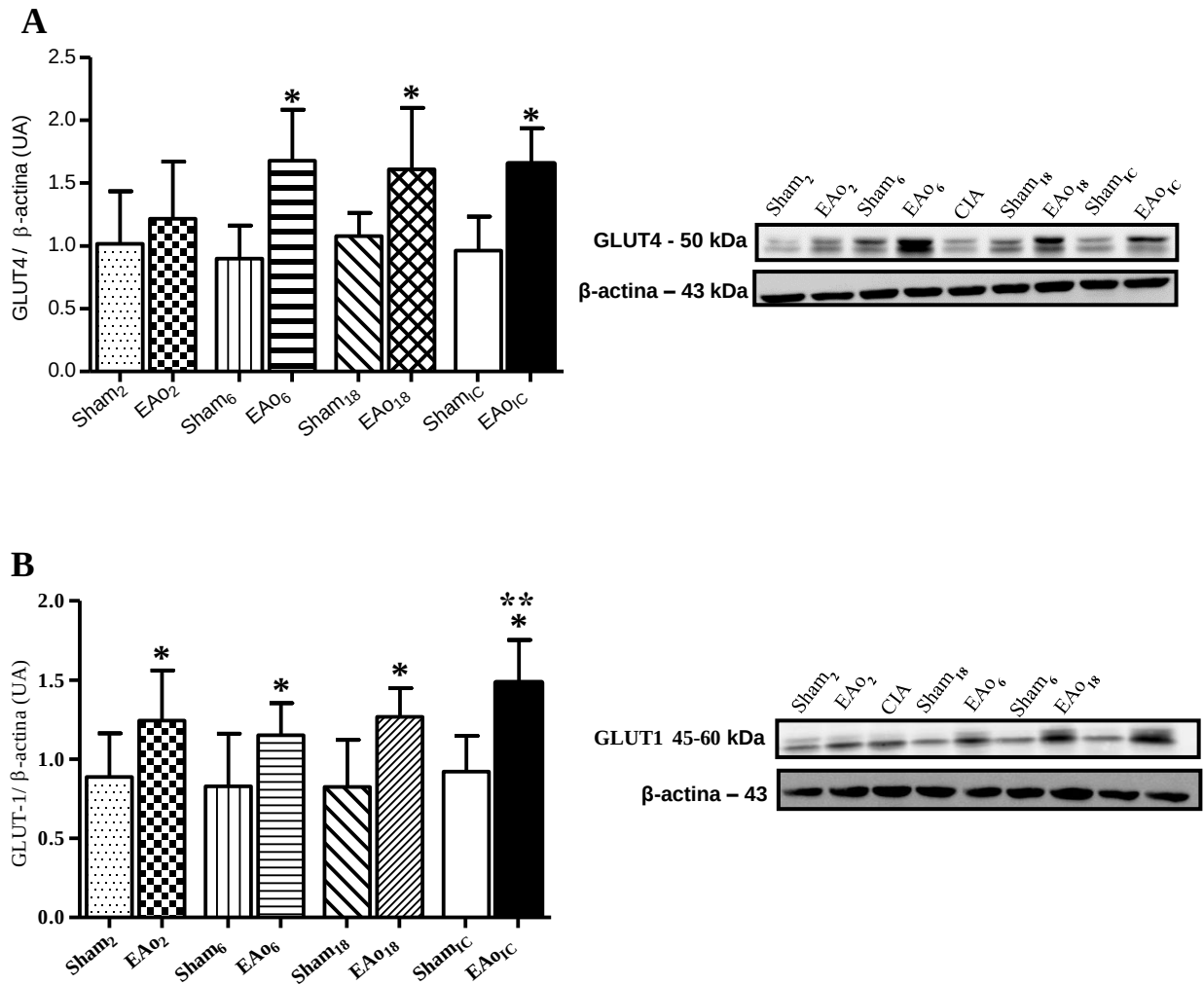


Figura 11 A e B| Expressão da proteína GLUT4 (A) e GLUT1(B). Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2, semanas; Sham₆: Sham 6, semanas; Sham₁₈: Sham, 18 semanas; Sham_{IC}: Sham, IC; EAo₂: EAo, 2 semanas; EAo₆: EAo, 6 semanas; EAo₁₈: EAo 18, semanas; EAo_{IC}: EAo, IC grave; CIA: controle interno da amostra; UA: unidade arbitrária. Dados expressos em média ± desvio padrão (n=8/grupo); técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%, p<0,05. * EAo vs respectivos Sham; ** EAo_{IC} vs EAo₆.

4.5.2 AMPK miocárdica

As expressões proteicas do pAMPK, do AMPK total e a relação pAMPK/AMPKtotal estão apresentados nas Figuras 12A, 12B e 12C. A pAMPK foi menos nos grupos EAo₁₈ e EAo_{IC} versus respectivos Sham; o EAo_{IC} é menor do que o EAo₂ e EAo₆; não houve diferença entre os quatro grupos Sham (Figura 12A). O AMPK total não apresentou diferença significativa dos EAo versus respectivos Sham; no processo evolutivo, não houve diferença de comportamento nos grupos Sham e

nos EAo(Figura 12B). A relação pAMPK/AMPKtotal mostrou que houve redução dos EAo₁₈ e EAo_{1c} versus respectivos Sham; o grupo EAo_{1c} e EAo₁₈ foram menores que o EAo₂; não houve diferença entre os quatros grupos Sham (Figura 12C).

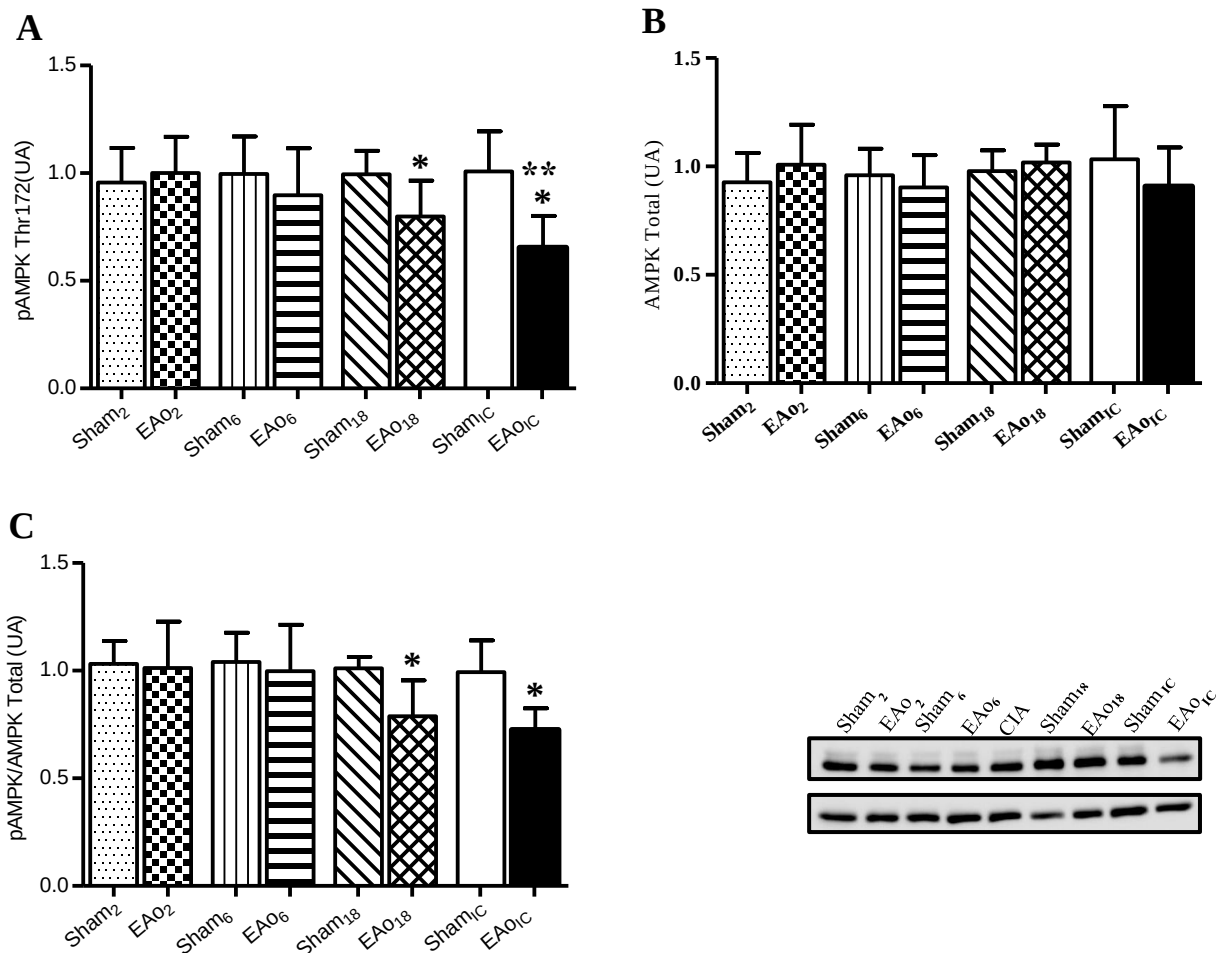


Figura 12 A, B e C| Expressão da proteína pAMPK(A), AMPKTotal (B) e relação pAMPK/AMPKTotal (C). Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supraválvular; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2, semanas; Sham₆: Sham 6, semanas; Sham₁₈: Sham, 18 semanas; Sham_{1c}: Sham, IC; EAo₂: EAo, 2 semanas; EAo₆: EAo, 6 semanas; EAo₁₈: EAo 18, semanas; EAo_{1c}: EAo, IC grave; CIA: controle interno da amostra; UA: unidade arbitrária. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8/grupo); técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%, $p < 0,05$. * EAo vs respectivos Sham; ** EAo_{1c} vs EAo₂, e † EAo₁₈ vs EAo₂.

4.5.3 Glicólise miocárdica

As expressões proteicas e as atividades enzimáticas envolvidas na via glicolítica miocárdica estão apresentados nas Figuras 13A, 13B, 13C e 13D. A expressão proteica da HKII foi maior nos grupos EAO₆, EAO₁₈ e EAO_{1c} comparado com os respectivos Sham. Não houve diferença entre os quatros grupos Sham; o EAO_{1c} foi maior versus EAO₂ (Figuras 13A). A expressão da PFKF2 foi mais elevada nos EAO₆, EAO₁₈ e EAO_{1c} em relação aos Sham. Não houve diferença entre os quatros grupos Sham; a PFKF2 foi maior no EAO_{1c} em relação aos demais grupos EAO (Figura 13B).

As atividades enzimáticas da HK e PK estão apresentadas nas Figuras 13C e 13D, respectivamente. A atividade da HK dos grupos EAO foram maiores do que os respectivos Sham. A análise evolutiva dos animais Sham mostrou que os Sham₁₈ e Sham_{1c} foram menores do que os Sham₂ e ₆. O estudo evolutivo mostrou que os grupos EAO₂, EAO₆ e EAO₁₈ são semelhantes e o grupo EAO_{1c} foi maior em relação ao EAO₁₈ (Figura 13C). A Figura 13D mostra que houve diferença da PK nos grupos EAO₁₈ e EAO_{1c} versus os respectivos Sham. A evolução temporal mostra que houve diferença do Sham₂ versus Sham₆, ₁₈ e _{1c}; o Sham₆ foi maior do que Sham₁₈ e _{1c}. A PK foi semelhante dos grupos EAO.

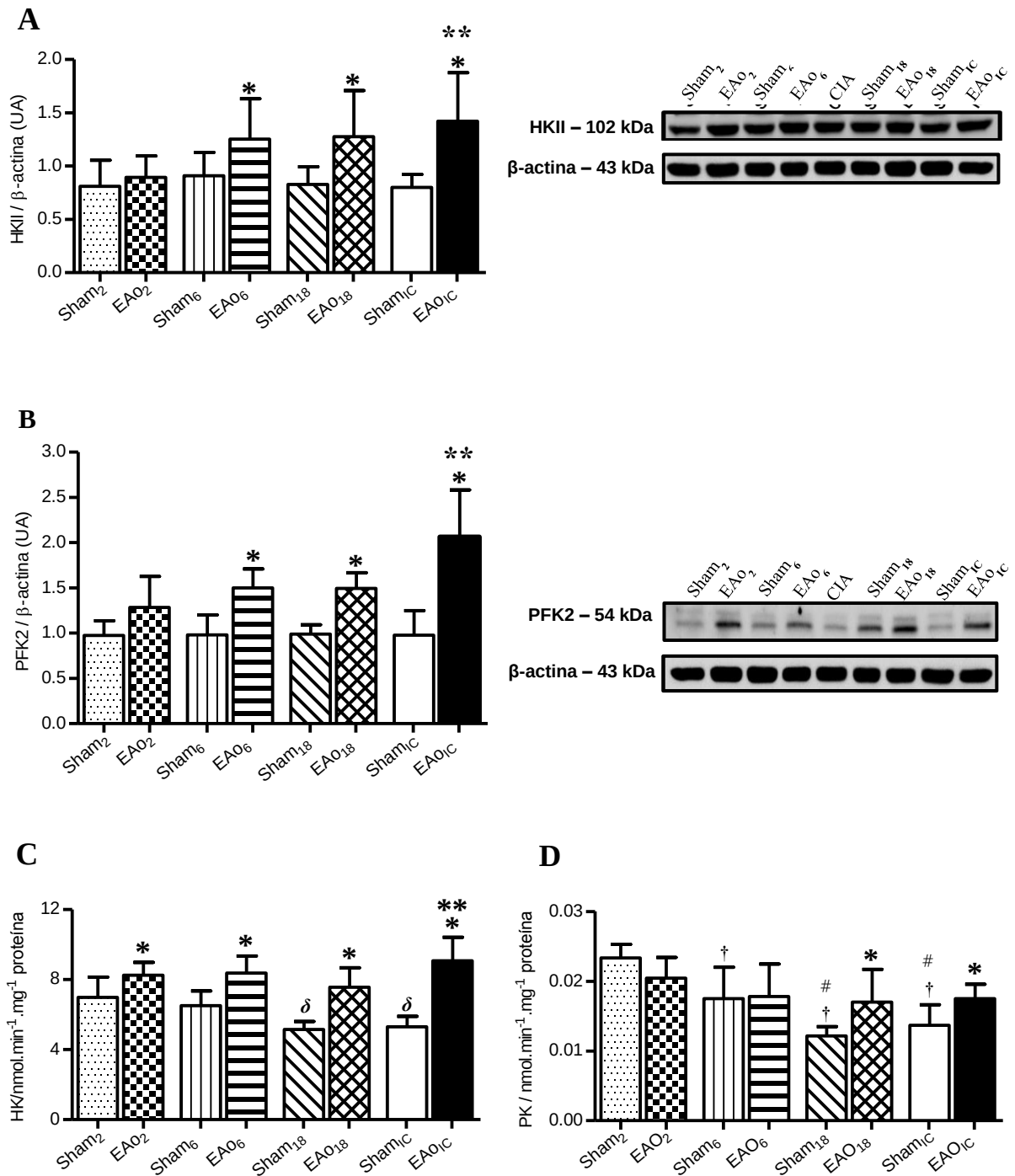


Figura 13 A, B, C e D| Expressão da proteína HKII (A) e PFKFB2 (B) e atividade enzimática da proteína HKII (C) e PK (D). Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2, semanas; Sham₆: Sham 6, semanas; Sham₁₈: Sham, 18 semanas; Sham_{1c}: Sham, IC; EAo₂: EAo, 2 semanas; EAo₆: EAo, 6 semanas; EAo₁₈: EAo 18, semanas; EAo_{1c}: EAo, IC grave; CIA: controle interno da amostra; UA: unidade arbitrária. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8/grupo); técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%, $p < 0,05$. * EAo vs Sham; 13 A: ** EAo_{1c} vs EAo₂; 13 B: ** EAo_{1c} vs EAo₂, 6 e 18; 13C: ** EAo_{1c} vs EAo₁₈; δ Sham_{1c} e 18 vs Sham₂ e 6.; 14D: $\dagger$ Sham₆, 18 e 1c vs Sham₂. # Sham₁₈ e 1c vs Sham₆.

4.5.4 Expressão da piruvato desidrogenase e atividade da citrato sintase miocárdico

A PDH foi menor nos grupos EA0₁₈ e EA0_{IC} em relação aos respectivos Sham. Não houve diferença entre os quatros grupos Sham; o EA0_{IC} foi menor que o EA0₂ e EA0₆ (Figura 14A). A citrato sintase (CS) foi menor nos grupos EA0₆, EA0₁₈ e EA0_{IC} comparado com os seus respectivos Sham (Figura 14B). Não houve diferença entre os quatros grupos Sham e nos EAo.

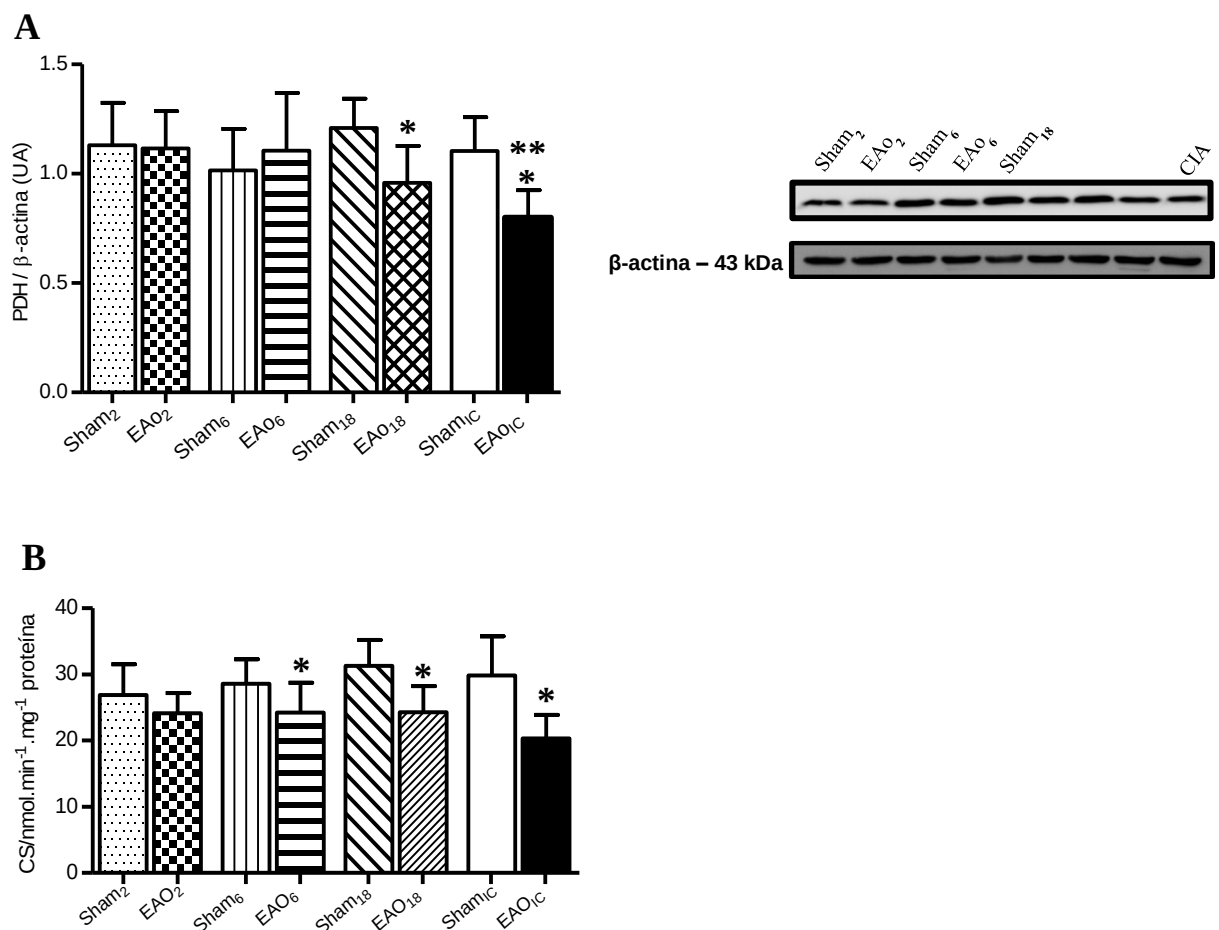


Figura 14 A e B| Expressão da proteína piruvato desidrogenase (A) e da atividade da citrato sintase (B). Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2, semanas; Sham₆: Sham 6, semanas; Sham₁₈: Sham 18 semanas; Sham_{IC}: Sham, IC; EA0₂: EAo, 2 semanas; EA0₆: EAo, 6 semanas; EA0₁₈: EAo 18, semanas; EA0_{IC}: EAo, IC grave; PDH: piruvato desidrogenase; CS: atividade da citrato sintase; CIA: controle interno da amostra; UA: unidade arbitrária. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8/grupo); técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%, $p < 0,05$. * EAo vs Sham; ** EA0_{IC} vs EA0₂ e EA0₆.

4.5.5 Lactato desidrogenase e lactato miocárdico

A expressão proteica, a atividade enzimática da LDH e a concentração do lactato miocárdico estão apresentados nas Figuras 15A, 15B e 15C.

A expressão proteica da LDH aumentou nos grupos EAO₁₈ e EAO_{1c} versus os respectivos Sham; não houve diferença entre os quatros grupos Sham e nos EAO (Figura 15A). A atividade enzimática da LDH dos EAO₆, EAO₁₈ e EAO_{1c} foi maior do que os Sham. O EAO_{1c} foi maior em relação ao EAO₂; não houve diferença entre os quatros grupos Sham (Figura 15B). A concentração de lactato foi maior nos grupos EAO₆, EAO₁₈ e EAO_{1c} em comparação aos respectivos Sham. O lactato no Sham_{1c} foi menor que o Sham₆ e ₁₈. O EAO_{1c} fora menor que o EAO₆ e ₁₈; o EAO₆ e ₁₈ foram maiores que EAO₂ (Figura 15C).

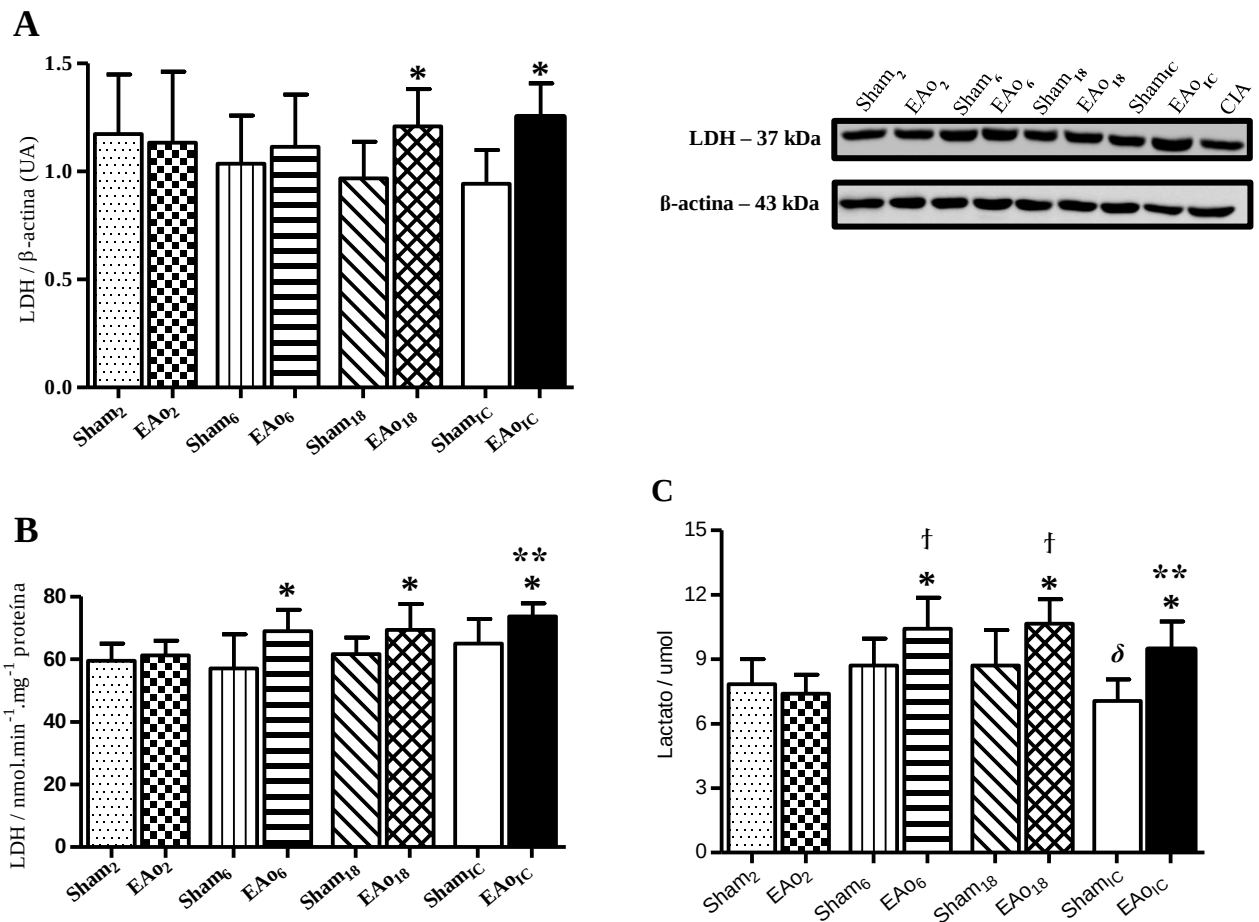


Figura 15 A, B e C| Expressão da proteína LDH (A), atividade enzimática da proteína LDH (B) e Lactato cardíaco (C). Sham: controle operado; EAo: estenose aórtica supravalvar; IC: insuficiência cardíaca grave; Sham₂: Sham 2, semanas; Sham₆: Sham 6, semanas; Sham₁₈: Sham, 18 semanas; Sham_{IC}: Sham, IC; EAo₂: EAo, 2 semanas; EAo₆: EAo, 6 semanas; EAo₁₈: EAo 18, semanas; EAo_{IC}: EAo, IC grave; CIA: controle interno da amostra; UA: unidade arbitrária. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (n=8/grupo); técnica de análise de variância para o esquema de dois fatores (grupo e momento de eutanásia) no delineamento casualizado complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey, nível de significância de 5%, $p < 0,05$. * $p < 0,05$, EAo vs Sham; 15B: ** $p < 0,05$, EAo_{IC} vs EAo₂; 15C: ** $p < 0,05$, EAo_{IC} vs EAo₆ e 18; † $p < 0,05$, EAo₆ e 18 vs EAo₂; δ $p < 0,05$, Sham_{IC} vs Sham₆ e 18.

4.6 Análise canônica

Análise de correlação canônica (ACC) tem como objetivo principal medir associação linear entre conjuntos de variáveis; neste estudo foi utilizada ACC para medir associação entre os conjuntos do HIF-1 α com os seguintes grupamentos derivados de: a) ecocardiograma - estrutura (AE, DDVE, EDPP e ESRVE), função diastólica (ONDAS E e A, E/A) e sistólica (%FE, %ENC. MESO); b) macroscopia *post*

mortem cardíaca (VE, VD e AT); c) captação e transporte de glicose (insulina sérica, expressão proteica miocárdica do pIR, IR total, pIR/IRtotal, PI3K, GLUT1, GLUT4, pAMPK, AMPKtotal e pAMPK/AMPKtotal); d) glicólise cardíaca (expressão da HKII e atividade da HK, expressão da PFK e atividade da PK); e) via anaeróbica (expressão e atividade da LDH); e f) via aeróbica (expressão da PDH).

A Tabela 4 mostra associação positiva e significativa do HIF-1 α (u_1) com o conjunto das variáveis estruturais do ecocardiograma (v_1). A análise da carga canônica direta de v_1 indica que as maiores correlações foram com as variáveis AE (0,95) e DDVE (0,88). Na correlação cruzada, as cargas mais altas foram com AE (0,57) e DDVE (0,53).

Tabela 4| Medidas de associação canônica do HIF-1 α com as variáveis estruturais do ventrículo e átrio esquerdo dos grupos EAo₂, 6, 18 e ic por ecocardiograma

Conjunto	Variável (Coef.)	Carga direta	Carga Cruzada
HIF-1 α (u_1)	HIF-1 α (1,00)	1,00	0,60*
Ecocardiograma estrutural (v_1)	DDVE (0,53)	0,88	0,53
	EDPP (0,44)	0,73	0,44
	ERVE (0,15)	0,24	0,15
	AE (0,57)	0,95	0,57

EAo: estenose aórtica supralvar; EAo₂: 2 semanas (n=08); EAo₆, 6 semanas (n=08); EAo₁₈, 18 semanas (n=08); EAo_{ic}, IC grave (n=08); Coef: coeficiente; VE: ventrículo esquerdo; DDVE: diâmetro diastólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; ERVE: espessura relativa do VE; AE: diâmetro átrio esquerdo;

* $p < 0,05$;

$u_1 = 1,00$ (HIF-1 α);

$v_1 = 0,53$ DDVE + 0,44 EDPP + 0,15 ERVE + 0,57 AE

A Tabela 5 revela associação significativa e linear do HIF-1 α (u_1) com as variáveis que analisam a função diastólica (v_1). A análise da carga canônica direta de v_1 , indica que as maiores correlações foram com onda E (0,91), onda A (-0,79) e E/A (0,75). Na correlação cruzada, os maiores valores foram: onda E (0,56), onda A (-0,48) e E/A (0,46).

Tabela 5| Medidas de associação canônica do HIF-1 α com a função diastólica do ventrículo esquerdo dos grupos **EAo_{2, 6, 18}** e **IC** por ecocardiograma

Conjunto	Variável (Coef.)	Carga direta	Carga Cruzada
HIF-1 α (u_1)	HIF-1 α (1,00)	1,00	0,61*
Ecocardiograma – função diastólica (v_1)	Onda E (0,56)	0,91	0,56
	Onda A (-0,48)	-0,79	-0,48
	E/A (0,75)	0,75	0,46
	TDE (-0,65)	-0,65	-0,40

EAo: estenose aórtica supravalvar; EAo₂: 2 semanas, (n=08); EAo₆, 6 semanas (n=08); EAo₁₈, 18 semanas (n=08); EAo_{IC}, IC grave (n=08); Coef: coeficiente; VE: ventrículo esquerdo; AE: átrio esquerdo; AO: aorta; E/A: razão entre a velocidade de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral; TDE: tempo de desaceleração da onda E.

* $p < 0,05$; $u_1 = 1,00$ (HIF-1 α);

$v_1 = 0,56$ onda E - 0,48 onda A + 0,46 E/A - 0,40 TDE

A Tabela 6 visualiza que não houve associação significativa HIF-1 α com os parâmetros utilizados para avaliação da função sistólica do ventrículo esquerdo.

Tabela 6| Medidas de associação canônica do HIF-1 α com a função sistólica do ventrículo esquerdo dos grupos EAo_{2, 6, 18} e IC por ecocardiograma

Conjunto	Variável (Coef.)	Carga direta	Carga Cruzada
HIF-1 α (u_1)	HIF-1 α (1,00)	1,00	0,37
Ecocardiograma - função sistólica (v_1)	Enc Meso % (-0,04)	0,11	0,40
	FE% (-0,26)	0,70	0,26
	VEPP (-0,06)	0,15	0,06

EAo: estenose aórtica supravalvar; EAo₂: 2 semanas(n=08); EAo₆, 6 semanas (n=08); EAo₁₈, 18 semanas (n=08); EAo_{IC}, IC grave (n=08); Coef: coeficiente; Enc Meso%: encurtamento de mesocardio em porcentagem; FE%: fração de ejeção em porcentagem; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior.

$u_1 = 1,00$ (HIF-1 α);

$v_1 = - 0,04$ Enc Meso - 0,26 FE% – 0,06 VEPP

A Tabela 7 exibe associação positiva e significativa do HIF-1 α (u_1) com o conjunto das variáveis morfológica cardíaca - *post mortem* (v_1). A análise da carga canônica direta de v_1 mostra que as correlações foram altas para o AT (0,97), seguidas do VD (0,96) e VE (0,92). Na correlação cruzada os valores são: AT (0,56), VE (0,53) e VD (0,55).

Tabela 7 – Medidas de associação canônica do HIF-1 α com análise morfológica cardíaca – post mortem dos grupos EAo₂, 6, 18 e IC

Conjunto	Variável (Coef.)	Carga direta	Carga Cruzada
HIF-1 α (u_1)	HIF-1 α (1,00)	1,00	0,57*
Análise morfológica (post mortem) (v_1)	VE (0,53)	0,92	0,53
	VD (0,55)	0,96	0,55
	AT (0,56)	0,97	0,56

EAo: estenose aórtica supralvar; EAo₂: 2 semanas (n=08); EAo₆, 6 semanas (n=08); EAo₁₈, 18 semanas (n=08); EAo_{IC}, IC grave (n=08); Coef: coeficiente; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio.

* $p < 0,05$; $u_1 = 1,00$ (HIF-1 α);

$v_1 = 0,53$ VE + 0,55 VD + 0,56 AT

A Tabela 8 revela associação significativa do HIF-1 α (u_1) com as variáveis que analisam a captação de glicose (v_1), apresentando cargas canônica direta de v_1 mais altas para GLUT4 (-0,69) e pAMPK (0,57). Na correlação cruzada, os valores mais altos foram para o GLUT4 (-0,50) e a pAMPK (0,42).

Tabela 8 – Medidas de associação canônica do HIF-1 α com proteínas envolvidas na captação de glicose miocárdica dos grupos EAo₂, 6, 18 e IC

Conjunto	Variável (Coef.)	Carga direta	Carga Cruzada
HIF-1 α (u_1)	HIF-1 α (1,00)	1,00	0,73*
Captação de glicose miocárdica (v_1)	pAMPK (-0,42)	0,57	0,42
	AMPK total (-0,25)	0,34	0,25
	pAMPK/AMPK total (-0,48)	0,34	0,25
	pIR (0,37)	-0,51	-0,37
	IR total (0,0007)	0,001	0,001
	pIR/IR total (0,40)	-0,55	-0,40
	PI3K (0,36)	-0,50	-0,36
	GLUT4 (0,60)	-0,69	-0,50
	GLUT1 (0,18)	-0,24	-0,18
	Insulina (-0,14)	0,18	-0,14

EAo: estenose aórtica supralvar; EAo₂: 2 semanas (n=08); EAo₆, 6 semanas (n=08); EAo₁₈, 18 semanas (n=08); EAo_{IC}, IC grave (n=08); Coef: coeficiente; pAMPK: expressão proteica de adenosina monofosfato quinase, fosforilada; AMPK total: expressão proteica de adenosina monofosfato quinase total; pAMPK/AMPK total: relação pAMPK/AMPKTotal; pIR: expressão da proteína do receptor de insulina fosforilado; IR total: expressão da proteína do receptor de insulina total; pIR/IR total: relação pIR/IR total; PI3K: fosfatidilinositol-3-quinase; Glut4 e 1: transportador de glicose 4 e 1.

* $p < 0,05$;

$u_1 = 1,00$ (HIF-1 α);

$v_1 = -0,42$ pAMPK -0,25 AMPKt -0,25 pAMPK/AMPKt + 0,37 pIR - 0,0007 pIRt + 0,40pIR/IRt + 0,36 PI3K + 0,50 GLUT-4 + 0,18 GLUT-1 + 0,18 Insulina.

A Tabela 9 indica associação positiva e significativa do HIF-1 α (u_1) com o conjunto das variáveis da glicólise (v_1). A análise da carga canônica direta de v_1 visualiza que as maiores correlações foram da expressão da PFK2 (0,81) e atividade HK (0,66). Na correlação cruzada os valores superiores foram: expressão PFK2 (0,51) e atividade HK (0,41).

Tabela 9 – Medidas de associação canônica do HIF-1 α com as proteínas envolvidas na glicólise cardíaca dos grupos EAo₂, 6, 18 e IC

Conjunto	Variável (Coef.)	Carga direta	Carga Cruzada
HIF-1α (u_1)	HIF-1 α (1,00)	1,00	0,62*
Glicólise (v_1)	Exp. HKII (0,20)	0,32	0,20
	Ativ. HK (0,41)	0,66	0,41
	Exp. PFK2 (0,51)	0,81	0,51
	Ativ. PK (-0,15)	-0,24	-0,15

EAo: estenose aórtica supraválvula; EAo₂: 2 semanas (n=08); EAo₆, 6 semanas (n=08); EAo₁₈, 18 semanas (n=08); EAo_{IC}, IC grave (n=08); Coef: coeficiente; Exp. HKII: expressão proteica da hexoquinase II; Ativ. HKII: atividade da hexoquinase II; Exp. PFK: expressão proteica da fosfofrutoquinase; Ativ. PK: atividade da piruvato quinase.

* $p < 0,05$;

$u_1 = 1,00$ (HIF-1 α);

$v_1 = 0,20$ Exp. HKII + 0,41 Ativ. HKII + 0,51 PFK – 0,15 PK

A Tabela 10 indica associação positiva e significativa do HIF-1 α (u_1) com o conjunto das variáveis da via anaeróbica (v_1). A análise da carga canônica direta de v_1 mostra que a maior correlação foi com a expressão LDH (0,89). Na correlação cruzada o valor superior foi a expressão LDH (0,48).

Tabela 10 – Medidas de associação canônica do HIF-1 α com a expressão proteica e atividade da LDH dos grupos EAo₂, 6, 18 e ic

Conjunto	Variável (Coef.)	Carga direta	Carga Cruzada
HIF-1 α (u_1)	HIF-1 α (1,00)	1,00	0,62*
Via anaeróbica (v_1)	Exp. LDH (0,02)	0,89	0,48
	Ativ. LDH (0,48)	0,05	0,02

EAo: estenose aórtica supravalvar; EAo₂: 2 semanas (n=08); EAo₆, 6 semanas (n=08); EAo₁₈, 18 semanas (n=08); EAo_{ic}, IC grave (n=08); Coef: coeficiente; Exp. LDH: expressão proteica lactato desidrogenase; Ativ. LDH: atividade lactato desidrogenase.

* $p < 0,05$;

$u_1 = 1,00$ (HIF-1 α);

$v_1 = 0,02$ Exp. LDH + 0,48 Ativ. LDH.

DISCUSSÃO

5-DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento do HIF-1 α , metabolismo da glicose e função e associação entre o HIF-1 α e estes parâmetros durante o processo de evolução da remodelação cardíaca. Os principais achados foram: a) aumento do HIF-1 α início da RC, com agravamento nas fases finais da doença; b) alteração precoce no metabolismo da glicose caracterizada por acentuação da via glicolítica e desvio para a via anaeróbica a partir da 6ª semana de EAo; c) acentuação da hipertrofia ventricular esquerda, deterioração precoce na função diastólica e severa disfunção sistólica e diastólica na fase de insuficiência cardíaca grave; d) associação entre o HIF-1 α com mudança na estrutura, função diastólica e metabolismo da glicose.

5.1 Remodelação cardíaca

5.1.1 Expressão do HIF-1 α

O HIF-1 α , sinalizador máster da homeostase do oxigênio celular, ativado em situação de déficit de O₂, tem como finalidade de elevar a disponibilidade dessa molécula e de energia⁽²⁶⁾, por exemplo, aumentar a angiogênese e o metabolismo da glicose^(102,103). Os resultados mostraram que houve aumento do HIF-1 α em todos os momentos de EAo comparados com os controles, inclusive na fase precoce da hipertrofia cardíaca (EAo₂); durante o processo evolutivo da remodelação houve importante elevação do HIF-1 α na fase insuficiência cardíaca grave. Esses dados corroboram com estudos da literatura, em que amostras de corações de diferentes tipos de hipertrofia cardíaca patológica apresentaram valores aumentados de HIF-1 α ^(92,104,105).

Os possíveis mecanismos responsáveis pelo incremento do HIF-1 α durante o

processo de remodelamento, não estão totalmente esclarecidos⁽¹⁰⁶⁾. A elevação do HIF-1 α pode estar relacionada com aumento da sua síntese e/ou diminuição da degradação⁽³⁵⁾. A literatura mostra que o HIF-1 α pode ser sintetizado por fator mecânico, aumento do estresse parietal⁽¹⁰⁷⁾ e/ou por estímulo bioquímico, por exemplo: fatores de crescimento, interleucina-6, interferon gamma e óxido nítrico^(108–110). A elevação do HIF-1 α pode, também, estar relacionado com a redução da degradação, desde que esse fenômeno está associado a níveis de O₂ tecidual; em condição de hipóxia há estabilização do HIF-1 α e, conseqüentemente, redução da sua decomposição. Com a estabilização, ele liga-se a co-ativadores, direciona para o núcleo e inicia a transcrição gênica; esse processo, efeito cardioprotetor, tem como finalidade elevar a disponibilidade de O₂ tecidual pela busca da homeostase energética^(24,111–113).

Existem evidências na literatura que pode haver desequilíbrio entre a demanda e a oferta de oxigênio no miocárdio remodelado, em razão do processo de angiogênese ser de menor intensidade que o grau de hipertrofia do miócito^(114,115). Esse desajuste pode levar a redução da disponibilidade de oxigênio no tecido, o que acarreta diminuição da degradação e conseqüente aumento dos níveis do HIF-1 α cardíaco^(24,111–113) visualizado neste trabalho, em corações com estenose aórtica supralvar e hipertrofia ventricular esquerda.

5.1.2 Estrutura e função

A análise dos dados da macroscopia cardíaca, *post mortem*, durante o processo de remodelação, mostrou que com 2 semanas de estenose aórtica houve aumento da massa do ventrículo esquerdo. A avaliação da função evidenciou que, embora, as variáveis que analisaram o desempenho diastólico e sistólico não tenham se alterado,

houve aumento do diâmetro do átrio esquerdo; esta mudança é, provavelmente, decorrente de disfunção diastólica, embora não tenha alterações nas variáveis utilizadas na avaliação da função diastólica pelo ecocardiográfico. Após 6 semanas de EAo, a acentuação da hipertrofia concêntrica foi acompanhada de intensificação da disfunção diastólica, com características de pseudonormal. Com 18 semanas houve maior grau de remodelação concêntrica, com estabilização da disfunção diastólica e deterioração do desempenho sistólico. Na fase de insuficiência cardíaca grave manteve-se o padrão de hipertrofia concêntrica, aumento importante do átrio esquerdo e piora significativa das funções sistólica e diastólica.

A análise dos resultados obtidos, neste trabalho, durante o processo evolutivo da RC mostrou que a estenose aórtica supralvar provocou agravamento estrutural e funcional do coração. Em resposta a sobrecarga mecânica, tipo pressórica, ocorre desenvolvimento de remodelação concêntrica, como a finalidade de normalizar o estresse parietal sistólico, determinante do grau de encurtamento da fibra cardíaca, isto é, ejeção ventricular^(1,6). O estímulo para o aumento do tecido cardíaco é decorrente de fatores mecânicos e bioquímicos, que agem nos receptores, canais iônicos e integrinas presentes na membrana sarcolemal; esse processo, via cascata de sinalizadores citosólicos, ativa fatores transcrpcionais que acarretam alterações na expressão gênica e, conseqüentemente, aumento na síntese proteica miocárdica, desencadeando hipertrofia do miócito, da célula muscular lisa e hiperplasia da matriz extracelular^(8,14).

Dependendo da relação entre as características do agente agressor (estímulo) e a resposta do receptor (coração), a remodelação do tecido miocárdico pode acarretar distúrbio funcional, diastólico e/ou sistólico, e posteriormente levar ao quadro de insuficiência cardíaca^(116,117). Os mecanismos responsáveis pela deterioração da

função cardíaca permanecem incertos. No modelo experimental de sobrecarga pressórica, diversos fatores podem estar envolvidos: alteração na geometria das câmaras, qualidade das proteínas contráteis, matriz extracelular, citoesqueleto, trânsito de cálcio intracelular, suporte neuro-hormonal, aumento na morte celular (necrose, apoptose e autofagia), déficit de substrato energético e/ou de oxigênio^(3,6,8-14). Estas alterações devem ter se intensificado durante o processo evolutivo com agravamento, importante, na fase de insuficiência cardíaca grave.

5.1.3 Associação canônica entre HIF-1 α com a estrutura e a função cardíaca

Um dos objetivos deste trabalho foi analisar a associação canônica entre o HIF-1 α , estrutura e função do coração dos animais com EAO. Os dados mostraram que houve correlação significativa entre o aumento do HIF-1 α e a estrutura cardíaca analisada por ecocardiograma e *post mortem*. Em situação de hipertrofia cardíaca, o desbalanço entre a demanda e a oferta de oxigênio, acarreta déficit dessa molécula e aumento na expressão do HIF-1 α ⁽¹⁰⁶⁾.

Embora os achados significativos da associação canônica não indiquem relação de causa e efeito, há evidência na literatura que o HIF-1 α participa do processo de hipertrofia cardíaca patológica; Chu et al., 2012⁽⁶²⁾ mostraram em cultura neonatal de miócitos de ratos *Wistar*, com 1 a 2 dias de idade, que o HIF-1 α tem papel importante no desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em resposta ao estresse gerado pela hipóxia, ativando a via cálcio/calcineurina. Além do HIF-1 α estar associado com resposta hipertrófica do miócito, que é o principal responsável pelo aumento da massa cardíaca, o HIF-1 α media a transcrição de genes envolvidos no processo de angiogênese⁽¹¹⁸⁾ e da regulação da matriz extracelular⁽³⁴⁾.

Os resultados também indicaram associação entre a expressão do HIF-1 α e as

variáveis que analisaram a função diastólica; a correlação mostrou valor positivo para onda E, E/A e negativa para onda A e TDE. Há evidências na literatura que mostram que o HIF-1 α pode estar envolvido na gênese da disfunção diastólica do ventrículo esquerdo hipertrofiado; entre os possíveis mecanismos envolvidos na deterioração do desempenho diastólico encontram-se a diminuição na expressão e atividade da bomba de cálcio (Ca²⁺) do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e aumento da matriz extracelular, fibrose^(95,119,120).

Estudos mostraram que o HIF-1 α participa da gênese da disfunção diastólica; Ronkainen et al.⁽¹²¹⁾ evidenciaram em miócitos embrionários de ratos submetido a situação de hipóxia diminuição da recaptção do Ca²⁺ pela SERCA2a; os autores sugeriram que o aumento do HIF-1 α provocou a supressão da expressão da SERCA2a. Bekeredjian et al, 2010⁽⁹³⁾ verificaram em corações de camundongos com mutação na expressão do HIF-1 α , um decréscimo de 92% na expressão da SERCA2a. Essas pesquisas mostraram o envolvimento do HIF-1 α na disfunção diastólica por acarretar supressão/diminuição da gênese da SERCA2a.

Outro mecanismo em que o HIF-1 α contribui para a disfunção diastólica está relacionado com alteração na matriz extracelular. Ruthenborg et al.⁽¹²²⁾ relataram que o HIF-1 α participa do processo de fibrose ativando a proliferação e migração dos fibroblastos e diferenciação dos miofibroblastos. Dados não publicados, relacionados a este trabalho, evidenciaram que animais com EAO₁₈ e EAO_{1c} mostraram importante fibrose, com aumento de colágeno I e V miocárdico. Neste sentido, os resultados deste estudo permitem direcionar que o aumento do HIF-1 α pode estar envolvido na disfunção diastólica por diminuição na expressão da SERCA2a e elevação da matriz extracelular.

5.1.4 Metabolismo da glicose

No processo de contração e relaxamento no coração adulto normal, cerca de 60-70% da energia é obtida da beta oxidação de ácidos graxos e 30-40% da via glicolítica^(15–19,123), em razão da maior produção de energia pelos lipídeos. Na situação de remodelação cardíaca patológica ocorre reprogramação metabólica, com redução da utilização dos lipídeos e aumento da glicose^(84,124). Entretanto, há carência de informações a respeito do momento em que inicia e se intensifica a reprogramação metabólica da glicose durante o processo de evolução da estenose aórtica, e se essa mudança está associada com déficit de oxigênio e disfunção sistólica e/ou diastólica^(16,17).

Em condições normais, a captação de glicose cardíaca depende do gradiente de concentração transmembrana da glicose, do número, atividade e distribuição subcelular dos transportadores de glicose (GLUTs)⁽⁸⁴⁾. Os mecanismos moleculares envolvidos na translocação do GLUT4 inclui, entre outros, a via dependente de insulina⁽⁸⁴⁾. A insulina é o principal hormônio envolvido na regulação do metabolismo da glicose, mediando a translocação da vesícula contendo GLUT4 para a membrana. A insulina se liga ao receptor de insulina (IR), que se autofosforila; esse fenômeno acarreta a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS), ativando o fosfoinositol-3-quinase (PI3K), que catalisa a formação de 3,4,5 trifosfato inositol [PI(3,4,5)P₃]. Essa molécula, estimulando a quinase dependente de fosfoinositol (PDK), ativa a proteína quinase B (PKB/AKT) que fosforila e inativa o substrato 160 da AKT (AS160); o AS160 inibe a função de uma pequena proteína, ligada a guanosina trifosfato da subfamília, denominada Ras (Rab-GTP). A inibição favorece a translocação da vesícula contendo GLUT4 para a membrana plasmática, onde sofre processo de fusão.

Além da insulina, a translocação do GLUT4 pode também sofrer influência da proteína quinase ativada pela adenosina monofosfato (AMPK) que é regulada por isquemia, contração e exercício físico⁽⁸⁴⁾. Outro importante transportador da glicose miocárdica, principalmente em condições basais, é o GLUT1, localizado na membrana plasmática e independente de insulina^(84,89) (Figura 4).

A partir do momento em que é captada pelo miocárdio, a glicose sofre fosforilação pela enzima hexoquinase (HK), formando a glicose 6-fosfato (G-6P); este substrato, utilizado principalmente na via glicolítica, também está envolvido na síntese de glicogênio, ribose, vias da pentose fosfato e aldose redutase-poliol⁽⁸⁴⁾. O produto final da via glicolítica, o piruvato, pode seguir diferentes caminhos, dependendo da disponibilidade de oxigênio celular. Na via aeróbica, o piruvato, na mitocôndria, é convertido em Acetil Coenzima A (Acetil CoA) pela ação da piruvato desidrogenase (PDH) e, posteriormente, o Acetil CoA reage com oxaloacetato pela citrato sintase (CS) formando o citrato no ciclo de Krebs. Na via anaeróbica, o piruvato é reduzido para lactato pela ação da lactato desidrogenase (LDH)^(16,84).

Os resultados desse trabalho mostraram que ocorreu alteração do metabolismo da glicose na 2ª semana de EAO, visualizada pelo aumento da expressão do GLUT1 e da atividade da HK. Nesta fase inicial, a resposta hipertrófica ventricular esquerda, em torno 30%, acarreta elevação da demanda energética. Afim de manter a homeostase, o coração utiliza de recursos que aumenta oferta de energia às custas de processos que consomem menos ATP. Neste sentido, poupa a via de sinalização de insulina envolvida na translocação do GLUT4, dependente de ATP e utiliza o GLUT1, independente de insulina. O incremento do GLUT1 acarreta elevação da captação, aumento na concentração citosólica de glicose e, conseqüentemente, maior atividade enzimática da hexoquinase. Neste trabalho, o aumento da atividade da HK

não foi acompanhada da elevação da expressão dessa enzima, sugerindo que a alteração na celeridade foi suficiente para compensar o aumento da demanda energética miocárdica. Os mecanismos envolvidos no aumento da expressão do GLUT1 não estão totalmente esclarecidos; os possíveis fatores envolvidos são: isquemia/hipóxia e estímulos hipertróficos, como agonista alfa-adrenérgico⁽⁸⁴⁾. O aumento do sinalizador de hipóxia na fase da EAo₂ corrobora para indicativo de isquemia/hipóxia sugerido pelos investigadores.

Na 6ª semana, os dados mostraram que houve acentuação na alteração do metabolismo da glicose nos grupos EAo₆ em relação aos respectivos Sham₆. A maior demanda energética derivada do aumento da hipertrofia ventricular, em torno de 41%, além de acarretar elevação do GLUT1, também ativou outros sistemas, como o da via de sinalização da insulina, com a finalidade de incrementar a captação e utilização da glicose. Nesse sentido, houve aumento dos níveis séricos de insulina, fosforilação do IR, relação pIR/IRtotal, GLUT4 e das enzimas envolvidas na glicólise como, atividade da HK e expressão da HKII e PFK2. A hiperinsulinemia e o aumento da fosforilação do IR não foi acompanhada de alteração na expressão do PI3K, considerado o mediador mais importante da captação da glicose na via da insulina⁽¹²⁵⁾. Além desta via, outros fatores podem participar da translocação do GLUT4 como a isquemia, contração e exercício físico; essas vias são independentes do PI3K, mas utilizam do AMPK para translocar o GLUT4 para a membrana⁽⁸⁴⁾. Entretanto, na 6ª semana, não houve alteração na expressão e na atividade do AMPK, o que sugere que essa via poderia não estar participando do aumento da expressão do GLUT4. Portanto, em razão desses resultados, sugerimos que estudos posteriores são necessários para verificar o(s) possível(eis) mecanismo(s) envolvido(s) no aumento do GLUT4 na condição de EAo₆.

A elevação das proteínas envolvidas no processo de captação de glicose foi acompanhada pelo aumento de duas enzimas da via glicolítica: HK, que fosforila a glicose (G-6P) e a PFK2 que ativa a PFK1, via formação de frutose-2-6-bifosfato (F2,6-BP). A atividade da hexoquinase é regulada pela concentração de G-6P, ATP, adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e fosfato (P)⁽⁸⁸⁾. Enquanto o aumento da G-6P e do ATP inibe, a elevação da ADP, AMP e P estimula a atividade da HK⁽⁸⁸⁾. Além do incremento da atividade, houve também aumento na quantidade da HKII, possivelmente, em razão da maior demanda metabólica necessária para o miocárdio hipertrofiado e com importante disfunção diastólica; a expressão da HKII é regulada pela insulina e HIF-1 α ^(126,127). O aumento da expressão da PFK2 pode também estar relacionada com a situação de hipóxia; a elevação do HIF1- α , constatada na EAO₆, induz ativação gênica da PFK⁽¹²⁸⁾, na tentativa de manter a homeostase energética⁽¹²⁹⁾. A atividade e a expressão da PFK2 também podem estar sujeitas à regulação hormonal; insulina eleva os níveis de PFK2, que via F2,6BP, aumenta atividade do PFK1 e consequentemente a via glicolítica^(128,130,131).

Resultado interessante foi o comportamento da citrato sintase no ciclo de Krebs; a redução significativa dessa enzima no coração hipertrofiado permite inferir que no EAO₆ houve desvio do metabolismo da via aeróbica para anaeróbica, comprovado pelo aumento da atividade da LDH e da concentração de lactato. Uma possível explicação para o aumento da atividade da LDH e da concentração de lactato poderia ser proveniente da redução da oxidação do piruvato, visualizada pela queda da atividade SC; a diminuição da oxidação do piruvato aumenta atividade e a expressão da LDH e, consequentemente, eleva a concentração de lactato⁽⁸⁴⁾. O lactato via ciclo de Cori pode se transformar em glicose que é utilizada no coração, via glicolítica, com a finalidade de aumentar a disponibilidade energética⁽¹³²⁾. Na 18ª semana, as

alterações na via da insulina foram análogas as observadas em relação aos grupos EAO₆ versus Sham₆; entretanto, houve redução da expressão da pAPMK e da pAMPK/AMPKtotal, sem alteração da AMPKtotal. Os dados referentes a AMPK divergem da literatura, desde que investigadores que analisaram essa enzima verificaram aumento desta proteína em processos isquêmicos e hipertróficos^(84,133). Trabalho recente em nosso laboratório, utilizando ratos com EAO₁₈ e características morfo-funcionais cardíacas semelhantes ao desta investigação, não encontrou diferença na fosforilação e expressão da AMPK em relação ao controle⁽¹³⁴⁾.

A AMPK é considerada "medidora *master* de energia" da célula, e ativa em resposta a inúmeros fatores, como o aumento da relação AMP/ATP^(84,133,135). A queda da fosforilação da AMPK, neste trabalho, sugere que embora a relação AMP/ATP possa estar aumentada em situação de hipertrofia acentuada, pode haver anormalidade nas quinases responsáveis pela fosforilação do AMPK [proteína quinase dependente de cálcio-calmodulina quinase (CAMKK) e quinase de fígado B1 (LKB1)].

Na 18ª semana de EAO ocorreu incremento da via glicolítica visualizada pelo aumento na atividade da HK e PK e na expressão da HKII e PFK2; os mecanismos responsáveis por essas mudanças foram descritos acima, no momento EAO₆.

A análise da PDH, SC, LDH e do lactato mostrou que houve acentuação do desvio para a via anaeróbica em detrimento da aeróbica; ocorreu redução da expressão da PDH e aumento da expressão da LDH, situação não visualizada no grupo EAO₆ versus Sham₆. A redução da expressão da PDH, neste trabalho sugere que esse fenômeno possa estar envolvido na diminuição da CS miocárdica e consequentemente da oxidação da glicose. Entretanto, no EAO₆ em que houve redução da CS, não ocorreu a queda da expressão da PDH; esse comportamento

mostra que a diminuição da CS não é exclusivamente dependente da alteração da PDH. A redução da oxidação do piruvato, visualizada pela redução da CS, poderia elevar a atividade e a expressão da LDH e, conseqüentemente, aumento da concentração de lactato. O comportamento dessas variáveis que indicam acentuação do desvio para via anaeróbica, sugerem déficit de oxigênio, sinalizado nesse trabalho pelo incremento do HIF-1 α , em razão do grau de hipertrofia ventricular esquerda, em torno de 48%.

Na fase de insuficiência cardíaca grave, o grupo EAo_{IC} apresentou alterações em todas as proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina, na glicólise e desvio para via anaeróbica, em relação ao controle. Neste momento, foi constatada queda importante do nível de insulina sérica; dado marcante, é que esta redução não foi acompanhada de queda da expressão e da fosforilação do receptor de insulina, que se mostraram elevados. Esses resultados, associado a elevação da expressão do PI3K, importante enzima na sinalização da via da insulina, sugerem tentativa de elevar a regulação das proteínas envolvidas na translocação do GLUT4, com a finalidade de aumentar a captação de glicose, mesmo na condição de redução da insulina.

O organismo busca constantemente a homeostase, na tentativa de manter o nível ideal de glicose miocárdica, em condições de repouso ou de estresse. Em situação de hiperinsulinemia, a manutenção adequada de glicose intracelular pode ser ajustada por adaptação nas proteínas envolvida na captação, por exemplo, diminuição da atividade e expressão destas proteínas. Na situação de hipoinsulinemia, como nesta investigação, há uma tentativa de manter a homeostase da glicose miocárdica às custas do aumento da expressão e/ou da atividade das proteínas da via de sinalização de insulina⁽⁸⁸⁾.

Os mecanismos envolvidos na situação de hipoinsulinemia acompanhada da elevação das proteínas da via de sinalização da insulina precisam ser esclarecidos. A redução da insulina sérica sugere que o pâncreas pode estar com a função comprometida. Além das alterações na via de insulina, o aumento do GLUT1 no EAO_{1c} indica que o coração está utilizando diferentes recursos para elevar a produção de energia, que encontra-se reduzida na fase de insuficiência cardíaca grave^(84,88). Um resultado intrigante foi a redução da atividade da AMPK no grupo EAO_{1c}. Este resultado diverge da literatura, em que na maioria dos trabalhos a fosforilação da AMPK está aumentada, no sentido de tentar manter a homeostase energética⁽⁸⁸⁾. A possível explicação para diminuição da pAMPK e pAMPK/AMPKtotal foi explanada anteriormente no grupo EAO₁₈.

As proteínas envolvidas na glicólise (HK, HKII, PFK2, PK), na via aeróbica (PDH e SC) e na via anaeróbica (LDH e lactato) mostraram comportamento semelhante ao grupo EAO₁₈ versus Sham₁₈, isto é, aumentadas na glicólise e via anaeróbica e reduzidas na aeróbica. As explicações para essas alterações foram descritas acima quando abordados os grupos EAO₆ e ₁₈ comparados com Sham₆ e Sham₁₈.

Nesse trabalho, a análise do metabolismo da glicose, durante o processo de evolução da remodelação, mostrou alteração significativa ao longo do tempo, que acentuou-se na fase de insuficiência cardíaca grave. Os dados revelaram que a reprogramação energética ocorreu precocemente, no momento EAO₂, intensificando-se nas fases EAO_{6,18} e _{1c}, observado pelo aumento das proteínas envolvidas na captação da glicose e glicólise. O desvio da via aeróbica para anaeróbica ocorreu a partir do momento EAO₆.

As alterações no metabolismo da glicose no coração remodelado podem ser consequentes ao déficit de oxigênio tecidual^(79,80,136), visualizado precocemente pelo

aumento do HIF-1 α . O incremento da massa cardíaca acarreta desequilíbrio entre a oferta e demanda de oxigênio; a desarmonia entre a capacidade proliferativa da rede capilar e o grau de hipertrofia do miocárdio^(114,115) limita a oferta de oxigênio, levando ao déficit energético⁽¹³⁷⁾. Com a finalidade de compensar a redução da disponibilidade energética, o coração utiliza a via glicolítica em detrimento dos ácidos graxos, o que acarreta diminuição da capacidade de produzir o ATP, que pode causar disfunção cardíaca⁽¹³⁸⁾. A redução na oferta de energia acarreta fibrose, dilatação e deterioração contrátil⁽¹³⁷⁾, em razão do coração ser um órgão que necessita de alta disponibilidade energética⁽¹³⁹⁾.

5.1.5 Associação entre o HIF-1 α e metabolismo da glicose

Uma das finalidades desta pesquisa foi analisar a associação canônica entre o conjunto formado pelo HIF-1 α e as variáveis do metabolismo da glicose durante o processo de evolução da remodelação. Os resultados mostraram correlação significativa do HIF-1 α com os conjuntos das variáveis que analisaram a captação de glicose, glicólise e via anaeróbica.

Embora, como referido, a associação canônica não indique relação de causa e efeito, há evidências na literatura que o HIF-1 α participa da captação de glicose, glicólise e via anaeróbica^(23,68,106). No processo de captação, o maior grau de correlação cruzada do HIF-1 α foi com o GLUT4 (-0,50); isto é, quanto mais alto o valor o HIF-1 α , menor o de GLUT4. Os dados da literatura são controversos a respeito da participação do HIF-1 α como fator transcricional do GLUT4^(56,69,71–73); de acordo com nossos resultados, podemos sugerir que o HIF-1 α não participa da transcrição do GLUT4. Não encontramos na literatura explicação biológica para a alta associação positiva entre o HIF-1 α e o pAMPK (0,42).

A correlação do HIF-1 α com o conjunto da via glicolítica foi significativa. O maior grau de correlação do HIF-1 α foi com expressão da PFK2 (0,51). Esse resultado está compatível com a explicação biológica, desde que o HIF-1 α é fator transcricional para o PFK2 e das inúmeras proteínas envolvidas na via glicolítica, inclusive para a HKII⁽²³⁾. Embora a correlação canônica foi significativa entre o HIF-1 α com atividade da HK (0,41) não encontramos explicações para esse fenômeno.

HIF-1 α tem relação canônica significativa com o conjunto da via anaeróbica; este fato encontra suporte biológico, em razão do HIF-1 α participar da transcrição da LDH e não estar envolvido na expressão da piruvato desidrogenase⁽⁶⁸⁾. A interpretação da análise canônica nos leva a inferir que, na situação de hipóxia, o HIF-1 α favorece a formação de lactato via LDH, em detrimento da formação do citrato no ciclo de Krebs. É importante ressaltar que o lactato produzido pela glicólise pode pelo ciclo de Cori se transformar em glicose e ser utilizado pelo coração⁽¹³²⁾.

CONCLUSÃO

6-CONCLUSÃO

As hipóteses deste trabalho foram confirmadas:

- ✓ há aumento do HIF-1 α e reprogramação do metabolismo da glicose na fase inicial de hipertrofia e disfunção diastólica cardíaca (EAo₂);
- ✓ durante o processo de evolução da RC ocorre elevação do HIF-1 α , das proteínas envolvidas na captação de glicose e via glicolítica com desvio para via anaeróbia.
- ✓ há associação entre o conjunto do HIF-1 α com o agrupamento das variáveis relacionadas com o metabolismo da glicose, da estrutura e função diastólica cardíaca.

Este trabalho induz à novas perguntas relacionadas ao metabolismo da glicose, por exemplo: a) como a redução da insulina foi acompanhada de aumento da sua via de sinalização no EAo_{1c}? b) o que levou a redução da pAMPK e pAMPK/AMPKtotal a partir da EAo₁₈? Estas e outras perguntas, cuja as respostas não estão disponíveis na literatura, somente poderão ser obtidas com a realização de pesquisas posteriores no campo do metabolismo energético e da remodelação cardíaca.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000 Mar 1;35(3):569–82.
2. Cicogna AC, Okoshi MP OK. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo*. 2000;10:8–16.
3. Weinberg EO, Schoen FJ, George D et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation*. 1994 Sep;90(3):1410–22.
4. Bruckschlegel G, Holmer SR, Jandeleit K, Grimm D, Muders F, Kromer EP, Riegger GA SH. Blockade of the renin-angiotensin system in cardiac pressure-overload hypertrophy in rats. *Hypertension*. 1995;25(2):250–9.
5. Litwin SE1, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP DP. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation*. 1995;91(10):2642–54.
6. Mendes ODC, Campos DHS De, Damatto RL, Sugizaki MM, Padovani CR, Okoshi K, et al. Cardiac Remodeling: Serial Analysis and Indexes for Early Detection of Ventricular Dysfunction. *Arq Bras Cardiol*. 2010;94(1):62–70.
7. Okoshi K, Ribeiro HB, Okoshi MP, Matsubara BB, Gonçalves G, Barros R, et al. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J*. 2004;45(4):647–56.
8. McMullen JR, Jennings GL. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Apr;34(4):255–62.
9. Ribeiro, HB, Okoshi, K, Cicogna, AC et al. Follow-up study of morphology and cardiac function in rats undergoing induction of supravalvular aortic stenosis. *Arq Bras Cardiol*. 2003;81(6):19–25.
10. Bregagnollo EA, Okoshi K, Bregagnollo, IF et al. 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 Mar;84(3):225–32.
11. Bregagnollo EA1, Zornoff LA, Okoshi K, Sugizaki M, Mestrinel MA, Padovani CR, et al Myocardial contractile dysfunction contributes to the development of heart failure in rats with aortic stenosis. *Int J Cardiol*. 2007;117(1):109–14.
12. Gonçalves G, Zornoff LAM, Ribeiro HB, Okoshi MP, Cordaro RS, Okoshi K, et al. O Bloqueio do Sistema Renina-Angiotensina Atenua a Remodelação Cardíaca de Ratos Submetidos a Estenose Aórtica. *Arq. Bras. Cardiol*. 2005;84:0–4.
13. Bernardo BC, Weeks KL, Pretorius L, McMullen JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic

strategies. *Pharmacol Ther.* 2010 Oct;128(1):191–227.

14. Maillet M, Berlo JH Van, Molkentin JD. Molecular basis of physiological heart growth: fundamental concepts and new players. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013;14(1):38–48.

15. Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CDL, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol Rev.* 2010;1;90(1):207–58.

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

17. Tian Q, Barger PM. Deranged energy substrate metabolism in the failing heart. *Curr Hypertens Rep.* 2006;8(6):465–71.

18. Turer AT, Malloy CR, Newgard CB, Podgoreanu M V. Energetics and metabolism in the failing heart: important but poorly understood. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010;13(4):458–65.

19. van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ et al. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res.* 2004; 61(2):218-26.

20. Depre C, Vanoverschelde J-LL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation.* 1999; 99(4):578–88.

21. Korvald C, Elvenes OP, Myrmel T. Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(4):1345–51.

22. Douglas L. Mann GMF. *Heart Failure: A Companion to Braunwald's Heart Disease.* 3^a Ed. Elsevier-Saunders, Florida; 2014. p.256-257.

23. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721–32.

24. Semenza GL. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis. *Blood.* 2009;114(10):2015–9.

25. Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res.* 2007;101(4):335–47.

26. Liu W, Shen S, Zhao X, Chen G. Targeted genes and interacting proteins of hypoxia inducible factor-1. *Int J Biochem Mol Biol.* 2012;3(2):165–78.

27. Prabhakar NR. Sensing hypoxia: physiology, genetics and epigenetics. *J Physiol.* 2013;591(Pt9):2245–57.

28. Brahimi-Horn MC & Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 2007;(581):3582–91.

29. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(8):389–97.

30. Cummins EP, Taylor CT. Hypoxia-responsive transcription factors. *Pflugers Arch.* 2005;450(6):363–71.

31. Ye J, Gao Z, Yin J HQ. Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;293(4):1118–28.
32. Trayhurn P, Wang B WI. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr.* 2008;100(2):227–35.
33. Chun YS, Kim MS PJ. Oxygen-Dependent and -Independent Regulation of HIF-1alpha. *J Korean Med Sci.* 2002;17(5):581–8.
34. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol Med.* 2001;7(8):345–50.
35. Rocha S. Gene regulation under low oxygen: holding your breath for transcription. *Trends Biochem Sci.* 2007;32(8):389–97.
36. Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouyssegur J. Signalling via the hypoxia-inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modifications. *Cell Signal.* 2005 Jan;17(1):1–9.
37. Hwang KY, Oh YT, Yoon H, Lee J, Kim H, Choe W, et al. Baicalein suppresses hypoxia-induced HIF-1alpha protein accumulation and activation through inhibition of reactive oxygen species and PI 3-kinase/Akt pathway in BV2 murine microglial cells. *Neurosci Lett.* 2008;444(3):264–9.
38. Essop MF. Cardiac metabolic adaptations in response to chronic hypoxia. *J Physiol.* 2007;584(Pt 3):715–26.
39. Ke Q, Costa M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). 2006;70(5):1469–80.
40. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, Scholze C, Hörstrup JH, Warnecke C, et al. Widespread, hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 2003;(2):271-3.
41. Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(9):4273–8.
42. Muz B, Khan MN, Kiriakidis S, Paleolog EM. Hypoxia. The role of hypoxia and HIF-dependent signalling events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(1):201.
43. Mason SD, Howlett RA, Kim MJ, Olfert IM, Hogan MC, McNulty W, et al. Loss of skeletal muscle HIF-1alpha results in altered exercise endurance. *PLoS Biol.* 2004;2(10):288.
44. Augstein A, Poitz DM, Braun-Dullaeus RC, Strasser RH SA. Cell-specific and hypoxia-dependent regulation of human HIF-3 α : inhibition of the expression of HIF target genes in vascular cells. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(15):2627–42.
45. Girgis CM, Cheng K, Scott CH, Gunton JE. Novel links between HIFs, type 2 diabetes, and metabolic syndrome. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(8):372–80.
46. Blum R, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G KY. Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death.

Cancer Res. 2005;65(3):999–1006.

47. Heidbreder M, Qadri F, Jöhren O, Dendorfer A, Depping R, Fröhlich F, et al. Non-hypoxic induction of HIF-3 α by 2-deoxy-D-glucose and insulin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jan 12;352(2):437–43.

48. Shohet R V, Garcia J a. Keeping the engine primed: HIF factors as key regulators of cardiac metabolism and angiogenesis during ischemia. *J Mol Med (Berl)*. 2007;85(12):1309–15.

49. Fraga A, Ribeiro R, Medeiros R. Hipoxia tumoral. Papel del factor inducible por hipoxia. *Actas Urol Esp*. 2009;33(9):941–51.

50. Talks KL, Turley H, Gatter KC, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, et al. The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors hif-1 α and hif-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am J Pathol*. 2000;157(2):411–21.

51. Wang GL, Jiang BH, Rue E a, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(12):5510–4.

52. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett*. 2007 Jul 31;581(19):3582–91.

53. Maynard M a, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett M a S, Ohh M. Human HIF-3 α is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J*. 2005 Sep;19(11):1396–406.

54. Lei L, Mason S, Liu D, Huang Y, Marks C, Hickey R, et al. Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(11):3790-803.

55. He Q, Gao Z, Yin J, Zhang J, Yun Z, Ye J. Regulation of HIF-1{ α } activity in adipose tissue by obesity-associated factors: adipogenesis, insulin, and hypoxia. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;300(5):E877–85.

56. Huang Y, Hickey RP, Yeh JL, Liu D, Dadak A, Young LH, et al. Cardiac myocyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. 2004;21:1–21.

57. Pugh CW, Rourke JFO, Nagao M, Gleadle JM, Ratcliffe PJ. Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the α subunit. *J Biol Chem*. 1997;272(17):11205-14.

58. Silva MAM, Rivera IR, Souza MGB CA. Medida da pressão arterial em crianças e adolescentes: recomendações das diretrizes de hipertensão arterial e prática. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(4):491–5.

59. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, et al. Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001;292(5516):468-72.

60. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, et al. HIF-1 α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science*. 2001;292(5516):464-8.
61. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. *Nat Cell Biol*. 2000;2(7):423-7.
62. Chu W, Wan L, Zhao D, Qu X, Cai F, Huo R, et al. Mild hypoxia-induced cardiomyocyte hypertrophy via up-regulation of HIF-1 α -mediated TRPC signalling. *J Cell Mol Med*. 2012;16(9):2022–34.
63. Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr*. 2008;100(2):227–35.
64. Harris AL. von Hippel-Lindau syndrome: target for anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor therapy. *Oncologist*. 2000; 5 Suppl 1(suppl 1):32–6.
65. Qing M, Quing M, Görlach A, Schumacher K, Wöltje M, Vazquez-Jimenez JF, et al. The hypoxia-inducible factor HIF-1 promotes intramyocardial expression of VEGF in infants with congenital cardiac defects. *Basic Res Cardiol*. 2007;102(3):224–32.
66. Fu H, Luo F, Yang L, Wu W, Liu X. Hypoxia stimulates the expression of macrophage migration inhibitory factor in human vascular smooth muscle cells via HIF-1 α dependent pathway. *BMC Cell Biol*. 2010;11:66-70.
67. Lim CS, Kiriakidis S, Sandison A, Ewa MD. Hypoxia-inducible factor pathway and diseases of vascular wall. *J Vasc Surg*. 2013;58(1):219–30.
68. Semenza GL. Hypoxia-Inducible Factor 1 and Cardiovascular Disease. *Annu Rev Physiol*. 2014;76(1):39–56.
69. Xue W, Cai L, Tan Y, Thistlethwaite P, Kang YJ, Li X, et al. Cardiac-specific overexpression of HIF-1 α prevents deterioration of glycolytic pathway and cardiac remodeling in streptozotocin-induced diabetic mice. *Am J Pathol*. 2010;177(1):97–105.
70. Kelly C, Smallbone K, Brady M. Tumour glycolysis: the many faces of HIF. *J Theor Biol*. 2008;254(2):508–13.
71. Silva JLT, Giannocco G, Furuya DT, Lima GA, Moraes PA, Nachev S, et al. NF- κ B, MEF2A, MEF2D and HIF1- α involvement on insulin- and contraction-induced regulation of GLUT4 gene expression in soleus muscle. *Mol Cell Endocrinol*. 2005;240(1-2):82–93.
72. Royer C, Lachuer J, Crouzoulon G, Roux J, Peyronnet J, Mamet J, et al. Effects of gestational hypoxia on mRNA levels of Glut3 and Glut4 transporters, hypoxia inducible factor-1 and thyroid hormone receptors in developing rat brain. *Brain Res*. 2000;856(1-2):119–28.
73. Iyer NV, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev*. 1998 Jan 15;12(2):149-62
74. Machado UF. Transportadores de glicose. *Arq Bras Endocrinol Metabol*.

1998;42(6):413–21.

75. Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Muñoz P, Becker C, Holman G, et al. Insulin-induced Recruitment of Glucose Transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in Isolated Rat Cardiac Myocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(11):7085–92.
76. Ramos S, Goya L, Alvarez C, Martín MA, Agote M, Escrivá F. Different role of insulin in GLUT-1 and -4 regulation in heart and skeletal muscle during perinatal hypothyroidism. Different role of insulin in GLUT-1 and -4 regulation in heart and skeletal muscle during perinatal hypothyroidism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001;281(5):E1073–81.
77. Behrooz A I-BF. Stimulation of glucose transport by hypoxia: signals and mechanisms. *News Physiol Sci*. 1999;14:105–10.
78. Faramarz IB. Metabolic Regulation of Glucose Transport. *J Membr Biol. J Membr Biol*. 1993 Jul;135(1):1–10.
79. Azevedo PS, Minicucci MF, Santos PP, Paiva SA, Zornoff LA. Energy metabolism in cardiac remodeling and heart failure. *Cardiol Rev*. 2013;21(3):135–40.
80. Kolwicz SC, Tian R. Glucose metabolism and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2011;90(2):194–201.
81. Egert S, Nguyen N, Brosius FC, Schwaiger M. Effects of wortmannin on insulin- and ischemia-induced stimulation of GLUT4 translocation and FDG uptake in perfused rat hearts. *Cardiovasc Res*. 1997;35(2):283–93.
82. Karnieli E, Armoni M. Transcriptional regulation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 gene: from physiology to pathology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Jul;295(1):E38–45.
83. Schaan BD. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006;50(2):177–89.
84. Shao D, Tian R. Glucose Transporters in Cardiac Metabolism and Hypertrophy. *Compr Physiol*. 2015;6(1):331–51.
85. Iyer N V, Kotch LE, Agani F, Leung SW, Laughner E, Wenger RH, et al. Developmental by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev*. 2000;12(2):149–62.
86. Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab*. 2007;5(4):237–52.
87. Russell RR, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol*. 1999;277(2 Pt 2):H643–9.
88. Katz AM. *Physiology of the heart*. 5^a ed. Philadelphia; 2011. 64–65 p.
89. Stöckli J, Fazakerley DJ, James DE. GLUT4 exocytosis. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 24):4147–59.
90. Mirtschink P, Krek W. Hypoxia-driven glycolytic and fructolytic metabolic programs: Pivotal to hypertrophic heart disease. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2016;1863(7):1822–8.

91. Giordano FJ. Oxygen , oxidative stress , hypoxia , and heart failure. *J Clin Invest.* 2005;115(3):500-8.
92. Hölscher M, Schäfer K, Krull S, Farhat K, Hesse A, Silter M, et al. Unfavourable consequences of chronic cardiac HIF-1 α stabilization. *Cardiovasc Res.* 2012;94(1):77–86.
93. Bekerredjian R, Walton CB, MacCannell KA, Ecker J, Kruse F, Outten JT, et al. Conditional HIF-1 α expression produces a reversible cardiomyopathy. *PLoS One.* 2010;5(7):1–11.
94. Momken I, Kahapip J, Bahi L, Badoual T, Hittinger L, Ventura-Clapier R, et al. Does angiotensin-converting enzyme inhibition improve the energetic status of cardiac and skeletal muscles in heart failure induced by aortic stenosis in rats? *J Mol Cell Cardiol.* 2003;35(4):399–407.
95. Boluyt MO, Robinson KG, Meredith AL, Sen S, Lakatta EG, Crow MT, et al. Heart failure after long-term supra-ventricular aortic constriction in rats. *Am J Hypertens.* 2005;18(2 Pt 1):202–12.
96. Moreira VO, de Castro AVB, Yaegaschi MY, Cicogna AC, Okoshi MP, Pereira CA, et al. Echocardiographic criteria for the definition of ventricular dysfunction severity in aortic banded rats. *Arq Bras Cardiol.* 2006;86(6):432–8.
97. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Singh K, Squire R, Okoshi MP, et al. Direct effects of colchicine on myocardial function : studies in hypertrophied and failing spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999;33(1):60–5.
98. Bregagnollo E, Mestrinel M, 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. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88(2):225–33.
99. De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Júnior SA de O, et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca²⁺ channels. *Can J Physiol Pharmacol.* 2009;87(6):426–31.
100. Zar JH. Bioestatalical Analysis. In: 5th ed. New Jersey; 2009. p. 994.
101. Mlingoti SA. Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada. 1^a ed. UFMG E da, editor. Belo Horizonte; 2005. 143-150 p.
102. Weder N, Zhang H, Jensen K, Yang BZ, Simen A, Jackowski A, et al. Child abuse, depression, and methylation in genes involved with stress, neural plasticity, and brain circuitry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2014;53(4):417–24.e5.
103. Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor 1: mechanisms and consequences. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(1):47–53.
104. Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, Montessuit C, et al. Activation of a HIF1 α -PPAR γ Axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell Metab.* 2009;9(6):512–24.
105. Silter M, Kögler H, Zieseniss A, Wilting J, Schäfer K, Toischer K, et al. Impaired

Ca(2+)-handling in HIF-1 α (+/-) mice as a consequence of pressure overload. *Pflugers Arch.* 2010;459(4):569–77.

106. Hashmi S, Al-Salam S. Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha in the Heart. *Cardiol Rev.* 2012;20(6):268–73.

107. Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS. Early expression of myocardial hif-1 α in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res.* 2002;90(2):E25–33.

108. Masoud GN, Li W. HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B.* 2015;5(5):378–89.

109. Wigerup C, Pålman S, Bexell D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther.* 2016;164:152–69.

110. Semenza G. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012;33(4):207–14.

111. Verdegem D, Moens S, Stapor P, Carmeliet P. Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism. *Cancer Metab.* 2014;2(1):19.

112. Singh M, Thomas P, Shukla D, Tulsawani R, Saxena S, Bansal A. Effect of subchronic hypobaric hypoxia on oxidative stress in rat heart. *Appl Biochem Biotechnol.* 2013;169(8):2405–19.

113. Semenza GL. Regulation of Metabolism by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2011;76:347–53.

114. Carabello BA, Paulus WJ. Aortic stenosis. *Lancet.* 2009 Mar;373(9667):956–66.

115. Kawasaki T, Sugihara H. Subendocardial ischemia in hypertrophic cardiomyopathy. *J Cardiol.* 2014;63(2):89–94.

116. McKinsey TA, Olson EN. Toward transcriptional therapies for the failing heart: chemical screens to modulate genes. *J Clin Invest.* 2005;115(3):538–46.

117. Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K.. Natural evolution of the myocardial remodeling: from injury to symptoms. *Rev Soc Cardiol Estado São Paulo.* 2000;10(1):8–16.

118. Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. *Circ Res.* 2014 Jan 31;114(3):565–71.

119. Jalil JE, Doering CW, Janicki JS, et al. Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ Res.* 1989;64(6):1041–50.

120. Silveira, CFSMP, Campos D, Freire, PP et al. Importance of SERCA2a on early isolated diastolic dysfunction induced by supra-avalvular aortic stenosis in rats. *Brazilian J Med Biol Res.* 2017;50(5):1–9.

121. Ronkainen V, Skoumal R, Tavi P. Hypoxia and HIF-1 suppress SERCA2a expression in embryonic cardiac myocytes through two interdependent hypoxia response elements. *J Mol Cell Cardiol.* 2011;50(6):1008–16.

122. Ruthenborg RJ, Ban J-J, Wazir A, Takeda N, Kim J-W. Regulation of wound healing and fibrosis by hypoxia and hypoxia-inducible factor-1. *Mol Cells*. 2014;30;37(9):637–43.
123. Doenst T, Nguyen TD, Abel ED. Cardiac Metabolism in Heart Failure. *Circ Res*. 2013;113(6):709–24.
124. Rong Tian, Nicolas Musi, Jessica D'Agostino, Michael F. Hirshman LJG. Increased adenosine monophosphate-activated protein kinase activity in rat hearts with pressure-overload hypertrophy. *Circulation*. 2001;104(14):1664–9.
125. Le Marchand-Brustel Y, Gautier N, Cormont M, Van Obberghen E. Wortmannin inhibits the action of insulin but not that of okadaic acid in skeletal muscle: comparison with fat cells. *Endocrinology*. 1995;136(8):3564–70.
126. Osawa H, Printz RL, Whitesell RR, Granner DK. Regulation of hexokinase II gene transcription and glucose phosphorylation by catecholamines, cyclic AMP, and insulin. *Diabetes*. 1995;44(12):1426–32.
127. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*. 2003;206(12):2049–57.
128. Mor I, Cheung EC, Vousden KH. Control of glycolysis through regulation of pfk1: old friends and recent additions. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2011;76:211–6.
129. Minchenko O, Opentanova I, Caro J. Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett*. 2003;554(3):264–70.
130. Atsumi T, Nishio T, Niwa H, Takeuchi J, Bando H, Shimizu C, et al. Expression of inducible 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase/pfkfb3 isoforms in adipocytes and their potential role in glycolytic regulation. *Diabetes*. 2005;54(12):3349–57.
131. Rider MH, Bertrand L, Vertommen D, Michels PA, Rousseau GG, Hue L. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochem J*. 2004;381(3):561–79.
132. Facey A, Irving R, Dilworth L. Overview of Lactate Metabolism and the Implications for Athletes. *Am J Sport Sci Med*. 2013;1(3):42–6.
133. Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2009;89(3):1025–78.
134. De Tomasi, LC. Influência da dieta hiperlipídica insaturada na regulação do metabolismo energético lipídico e na disfunção cardíaca de ratos com estenose aórtica supravalvar. Tese [Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica] Faculdade de Medicina de Botucatu, 2017;
135. Salminen A, Kaarniranta K. AMP-activated protein kinase (AMPK) controls the aging process via an integrated signaling network. *Ageing Res Rev*. 2012;11(2):230–41.
136. Witteles RM, Fowler MB. Insulin-resistant cardiomyopathy clinical evidence, mechanisms, and treatment options. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(2):93–102.

137. Shah AM, Mann DL. In search of new therapeutic targets and strategies for heart failure: recent advances in basic science. *Lancet* (London, England). 2011;378(9792):704–12.
138. Lionetti V, Stanley WC, Recchia F a. Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc Res*. 2011;90(2):202–9.
139. Brown MD. Exercise and coronary vascular remodelling in the healthy heart. *Exp Physiol*. 2003;88(5):645–58.