

Avaliação do desempenho cardíaco de ratos infartados e tratados com óleo de soja por via intramuscular

Sérgio Lisbôa Júnior

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

(Fisiologia Cardiovascular)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Novembro de 2012

Lisbôa Júnior, Sérgio, 1975

Avaliação do desempenho cardíaco de ratos infartados e tratados com óleo de soja por via intramuscular [Vitória] 2012

83 p., 29,7cm (UFES, M. Sc., Ciências Fisiológicas, 2012)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

Orientação: Prof. Dra. Ivanita Stefanon, UFES

1. Infarto do Miocárdio 2. Óleo de Soja 3. Insuficiência Cardíaca 4. Ratos

Avaliação do desempenho cardíaco de ratos infartados e tratados com óleo de soja por via intramuscular

Sérgio Lisbôa Júnior

Dissertação submetida ao programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovado em: 28/11/2012

Prof.ª. Dr.ª Ivanita Stefanon – Orientadora, PPGCF-UFES

Prof.º Dr.º Leonardo dos Santos, PPGCF-UFES

Prof.º Dr.º Fausto Edmundo Lima Pereira, PPGDI-UFES

Coordenador do PPGCF: Prof.º Dr.º Luiz Carlos Schenberg

Universidade Federal do Espírito Santo

Vitória, Novembro de 2012

“A empresa científica, como um todo, de vez em quando se revela útil, abre territórios novos, revela ordem e testa crenças aceitas há muito. Não obstante, o indivíduo mergulhado num problema comum de pesquisa não está quase nunca fazendo qualquer uma dessas coisas. Uma vez envolvido, aquilo que o desafia é a convicção de que, se ele for bastante habilidoso, será capaz de resolver um quebra-cabeça que ninguém resolveu... Muitas das maiores mentes científicas dedicaram toda sua atenção profissional a quebra-cabeças desafiantes desse tipo.”

Thomas S. Kuhn

AGRADECIMENTOS

Inicio os meus agradecimentos pelos animais de experimentação. O que posso dizer a seu respeito? Eles nos deram a única coisa que possuíam para que concluíssemos esse trabalho. Tenho plena consciência de que, ainda que nossos resultados um dia tragam benefícios à nossa própria espécie, pouco provavelmente lhes será concedido um consolo semelhante. Faço votos de que em um futuro próximo tenhamos alternativas melhores para obtenção de nossos resultados. A eles o meu mais sincero obrigado.

Agradeço a minha esposa Bianca de todo o coração e lhe peço desculpas pelos dias de folga não partilhados, pelos intermináveis momentos que passei à frente do computador e por sua paciência em ouvir meus “devaneios” sobre o metabolismo mitocondrial; lembre-se: eu te amo! Agradeço aos meus pais Sérgio e Teresinha, sem a base sólida, o apoio e o carinho que proporcionaram duvido que eu tivesse alcançado tão nobre objetivo. Agradeço ainda a Ireni, nossa funcionária que, na ausência de Bianca, se dispunha a ser audiência dos meus já ditos “devaneios”. Agradeço também a Malu, um anjo de quatro patas, que muito nos ajudou a superar momentos de profunda tristeza. Aos meus irmãos, José Fernando, José Márcio e Victor, agradeço por uma infância feliz e uma vida adulta de eterna amizade.

Agradeço a Prof. Dr^a Ivanita Stefanon e ao Prf.^o Dr.^o Dalton Valentin Vassallo por terem me dado um voto de confiança quando me receberam em seu laboratório. À Prof.^a Ivanita agradeço ainda pela árdua tarefa de me orientar, sei que nem de longe fui seu melhor aluno, mas saiba que me esforcei com todo empenho em sê-lo. Ao colega doutorando Rogerio Faustino Ribeiro Junior, agradeço pela Co-orientação e pela prestimosa troca de ideias. Ao Prof.^o Antonio Augusto B. de Menezes agradeço por ter me estimulado na conclusão de mais essa etapa acadêmica e por continuar sendo modelo de competência e ética profissional os quais procuro espelhar diariamente. Agradeço ao David, amigo durante os bons e maus dias (e noites) de experimentos, a Aliny, aos demais alunos de iniciação científica e aos colegas mestrandos e doutorandos por toda a ajuda que me deram.

Por fim agradeço ao Criador por ter proporcionado condições para o surgimento de nossos cérebros inquisitivos em um universo cheio de mistérios, não tenho dúvidas de ter sentido sua genial presença nos recônditos mais profundos da célula.

RESUMO

Após o infarto do miocárdio, o remodelamento das câmaras cardíacas ocorre secundariamente à sobrecarga do ventrículo esquerdo com redução da contratilidade miocárdica (Stefanon et al, 1994;. Mill et al 2011). Em um estudo com ratos saudáveis foi demonstrado que o tratamento com óleo de soja, 100 µL por via intramuscular durante 15 dias, aumenta o desempenho cardíaco sem alterar a pressão arterial associado com aumento de atividade da Na^+/K^+ ATPase e da expressão da proteína SERCA2a (Ribeiro Junior et a., 2010). Considerando que a diminuição da contratilidade miocárdica após o infarto do miocárdio está associada com alterações na expressão destas enzimas, o objetivo deste estudo foi avaliar se o tratamento com óleo de soja via intramuscular por 15 dias, pode melhorar o desempenho cardíaco de ratos submetidos ao infarto agudo do miocárdio. Para este estudo foram usados ratos Wistar machos (230-250 g). Todos os ratos tiveram livre acesso à água e foram alimentados com ração “ad libitum”. Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo Sham Soja: animais submetidos à operação simulada e tratados com óleo de soja 0,1 mL i.m. por quinze dias; grupo Sham: Os animais foram submetidos a operação simulada e foram tratados com 0,1 mL de solução de NaCl a 0,9% durante quinze dias; grupo Infarto do Miocárdio (IM) Soja : a artéria coronária esquerda foi permanentemente ocluída e os animais foram tratados com 0,1 mL de óleo de soja por via i.m. durante 15 dias; grupo infarto do miocárdio (IM): a artéria coronária esquerda foi permanentemente ocluída e os animais foram tratados com 0,1 mL de solução de NaCl a 0,9% durante quinze dias. Após 15 dias de tratamento os animais foram anestesiados e sacrificados para avaliar a pressão arterial e ventricular, e a contratilidade miocárdica em coração isolado perfundido pela técnica de Langendorff em fluxo constante, nutridos com solução de Krebs. Os

valores foram analisados pelo teste t ou ANOVA (uma ou duas vias). Quando a ANOVA revelou uma diferença significativa para $p < 0,05$, os testes de Tukey ou de Bonferroni foram aplicados. Resultados: A área de cicatriz do miocárdio não foi diferente entre os grupos (IM Soja: $34.13 \pm 5\%$ N = 8; IM: $34.75 \pm 6\%$ N= 8). O tratamento com óleo de soja não alterou o peso do ventrículo esquerdo. No entanto, o grupo infartado tratado com óleo de soja apresentou melhor desempenho cardíaco em relação ao grupo infartado tratado com placebo sendo esse aumento acompanhado por aumento na PAS (IM: $89,11 \pm 6,4$ mmHg x IM Soja: $108,6 \pm 9,5$ mmHg) e diminuição da PDFVE (IM: 6.37 ± 0.9 mmHg x IM Soja: 4.72 ± 0.4 mmHg). Além disso, a resposta inotrópica ao Ca^{++} extracelular também aumentou nos grupos tratados em comparação com não-tratados. Conclusão: Este estudo demonstrou que o tratamento com óleo de soja i.m. durante 15 dias preveniu a queda do desempenho cardíaco de ratos que sofreram infarto agudo do miocárdio, sem modificar a área de cicatriz.

ABSTRACT

After myocardial infarction, compensatory remodeling of cardiac chambers occurs secondary to left ventricular overload with reduction of myocardial contractility (Stefanon et al. 1994; Mill et al 2011). In a previous study we demonstrated that the treatment with soybean oil, 100 μ l intramuscular for 15 days, increased cardiac performance without change blood pressure and it was associated with increased Na^+/K^+ ATPase activity and SERCA2a protein expression (Ribeiro Junior et al., 2010). Since the decrease in myocardial contractility after myocardial infarction is associated with changes in expression of these enzymes, the purpose of this study was to evaluate whether treatment with soybean oil, intramuscularly for 15 days, can improve cardiac performance in rats subjected to acute myocardial infarction. Methods: Male Wistar rats (230–250 g) were used for this study. All rats had free access to water and were fed with rat chow ad libitum. The animals were divided into four groups: Sham Soybean group: animals underwent sham operation and were treated with soybean oil 0.1 mL for fifteen days. Sham group: animals underwent sham operation and were treated with 0.1 mL of 0.9% NaCl solution for fifteen days. Myocardial Infarction (MI) Soybean group: the left coronary artery was permanently occluded and the animals were treated with 0.1 mL intramuscular soybean oil for fifteen days; Myocardial Infarction group (MI): the left coronary artery was permanently occluded and the animals were treated with 0.1 mL of 0.9% NaCl solution for fifteen days. After 15 days of treatment animals were anesthetized and sacrificed to evaluate the ventricular pressure and myocardial mechanics. Values were analyzed using the t-test or ANOVA (one- or two-way). When ANOVA revealed a significant difference ($p < 0.05$), the Tukey or Bonferroni test was applied. Results: The myocardial infarction scar was not different between groups (MI Soybean: 34.13

$\pm 5\%$ $N = 8$; MI: $34.75 \pm 6\%$ $N = 8$). The treatment with soybean oil did not change the left ventricular weight. However, the infarcted group treated with soybean oil showed better cardiac performance compared to infarcted group treated with placebo, and this increase was accompanied by an increase in SBP (MI: 89.11 ± 6.4 mmHg x MI Soybean: 108.6 ± 9.5 mm Hg) and decreased LVEDP (MI: 6.37 ± 0.9 mmHg x MI Soybean: 4.72 ± 0.4 mm Hg). In addition, the inotropic response to extracellular Ca^{+2} was also significantly increased in the treated groups compared to non-treated. Conclusion: This study demonstrated that treatment with soybean oil intramuscular for 15 days prevented the decrease in cardiac performance in rats that suffered myocardial infarction without modifying the area of the scar.

LISTA DE FIGURAS

Figura – 1: Exemplos de moléculas de ácido graxo saturado (A) e insaturado (B). (modificado de www.medicine-raw-materials.com).

Figura – 2: Ácidos graxos essenciais ômega 3 e 6.(modificado de <http://www.csiro.au>).

Figura – 3: Estrutura molecular da cardiolipina. (modificado de Sparagna et al., 2009)

Figura – 4: Representação esquemática da interação da cardiolipina (CL) com os complexos I, II, III, IV, citocromo c (cyt c) e ATP sintase (V) na membrana mitocondrial interna. (modificação de Houtkooper et al., 2008).

Figura – 5: Registro eletrocardiográfico típico de um animal selecionado para o grupo infarto. Em ordem cronológica - A: ritmo sinusal pré-procedimento; B: ritmo sinusal com desnivelamento de S-T; C: desnivelamento de S-T e arritmia ventricular; D: arritmia ventricular sustentada.

Figura – 6: Comparação da área de infarto entre os grupos Infarto (IM) tratado com 0,1 ml de óleo de soja por via intramuscular e Infarto (IM).

Figura – 7: Comparação dos valores das derivadas de pressão sobre as derivadas de tempo máximas positivas entre os grupos IM, IM Soja, Sham e Sham Soja. (*) Diferente para $P < 0,05$.

Figura – 8: Comparação dos valores das derivadas de pressão sobre as derivadas de tempo máximas negativas entre os grupos IM, IM Soja, Sham e Sham Soja. (*) Diferente para $P < 0,05$.

Figura – 9: Registro das pressões sistólicas de ventrículos esquerdos obtidos de animais dos grupos Sham, Sham Soja, IM e IM Soja. (A) curva de Frank- starling, (B) curva do Isoproterenol, (C) curva de cálcio. Dados obtidos por meio do transdutor de pressão “TSD 104A - MP36 Biopac Systems, Inc; CA.

Figura – 10: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função da PDVE (pressão diastólica de ventrículo esquerdo) nos animais sham e infartados. (*) Diferente para $P < 0,05$.

Figura – 11: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função da PDVE (pressão diastólica de ventrículo esquerdo) nos animais Sham e Sham tratados com óleo de soja. (*)Diferente para $P < 0,05$.

Figura – 12: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função da PDVE (pressão diastólica de ventrículo esquerdo) nos animais infartados (IM) e nos infartados tratados com óleo de soja. (*) Diferente para $P < 0,05$.

Figura – 13: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função da PDVE (pressão diastólica de ventrículo esquerdo) nos animais Sham, Sham tratados, infarto (IM) e infarto tratado.

Figura – 14: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função das concentrações de Cálcio na solução de perfusão. (A) Grupos Sham e (B) Grupos Infarto (IM). (*) Diferente para $P < 0,05$.

Figura – 15: Comparação dos percentuais de resposta a 5 μ M de Isoproterenol. (A) Grupos Sham Soja (48.4 + 12.3 %) e Sham (42.5 + 9.6); (B) Grupos Infarto (IM) (40.4 + 7.5) e Infarto Soja (43.8 + 7.6).

LISTA DE TABELAS

Tabela – 1: Valores das medidas ponderais obtidos no 15º dia de pós-operatório dos grupos Sham, Sham tratado, Infarto (IM) e Infarto tratado. PC: peso corporal; PVE: peso do ventrículo esquerdo; PVE/PC: peso do ventrículo esquerdo dividido pelo peso corporal; PVD: peso do ventrículo direito; PVD/PC: peso do ventrículo direito dividido pelo peso corporal; PPU: peso do pulmão úmido; PPU/PC: peso do pulmão úmido dividido pelo peso corporal; PFu: peso do fígado úmido; PFu/PC: peso do fígado úmido dividido pelo peso corporal.

Tabela – 2: Parâmetros hemodinâmicos obtidos após o 15º dia de pós-operatório. FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PSVE e PSVD: pressão sistólica de ventrículo esquerdo e direito; PDFVE e PDFVD: pressão diastólica final de ventrículo esquerdo e direito; dP/dT + e -: derivadas de pressão sobre a derivada de tempo máximas positiva e negativa. (*) e (#): Diferente para $P < 0,05$.

LISTA DE ABREVIATURAS

DCV Doenças cardiovasculares

SCA Síndrome Coronariana Aguda

IM Infarto do miocárdio

IC Insuficiência cardíaca

ATP Trifosfato de adenosina

PMCA Bomba de cálcio da membrana plasmática

ECA Enzima Conversora de Angiotensina

All Angiotensina-II

AG Ácidos graxos

FL Fosfolídeos

AGE Ácidos graxos essenciais

EPA Ácido eicosapentaenoico

DHA Ácido docosaexaenóico

ALA Alfa-linolênico

CL Cardiolipina

AA Ácido araquidônico

AO Ácido Oleico

AP Ácido Palmítico

ECG	Eletrocardiograma
PC	Peso corporal
PVE	Peso do ventrículo esquerdo
PVE/PC	Peso do ventrículo esquerdo dividido pelo peso corporal
PVD:	Peso do ventrículo direito
PVD/PC	Peso do ventrículo direito dividido pelo peso corporal
PPu	Peso do pulmão úmido
PPu/PC	Peso do pulmão úmido dividido pelo peso corporal
PFu	Peso do fígado úmido
PFu/PC	Peso do fígado úmido dividido pelo peso corporal
PAS	Pressão arterial sistólica
PAD	Pressão arterial diastólica
PSVE	Pressão sistólica de ventrículo esquerdo
PSVD	Pressão sistólica de ventrículo direito
PDFVE	Pressão diastólica final de ventrículo esquerdo e direito;
PDFVD	Pressão diastólica final de ventrículo esquerdo e direito;
dP/dT	Derivadas de pressão sobre a derivada de tempo
PDVE	Pressão diastólica de ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Fisiopatologia do infarto agudo do miocárdio	18
1.2 Lipídios e infarto do miocárdio	22
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1 Animais e grupos	32
3.2 Infarto do miocárdio	33
3.3 Medidas hemodinâmicas	34
3.4 Perfusão do coração isolado. técnica modificada de langendorff	35
3.4.1 Protocolo experimental durante a perfusão do coração isolado	36
3.5 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38
4.1 Registro eletrocardiográfico	38
4.2 Medidas ponderais	40
4.3 Área de infarto	41

4.4 Medidas hemodinâmicas	42
4.5 Curvas de função ventricular	44
5 DISCUSSÃO	50
5.1 Área de infarto, medidas ponderais e medidas hemodinâmicas	50
5.2 Curvas de função ventricular	53
6 CONCLUSÃO	61
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1 INTRODUÇÃO:

As doenças cardiovasculares (DCV) são a principal causa de morbidade, incapacidade e morte no Brasil e no mundo. No Brasil foram responsáveis por 29% das mortes registradas em 2007. Os gastos com internações pelo SUS totalizaram 1,2 milhões de reais em 2009, sendo que naquele mesmo ano o Brasil teve 319 mil óbitos causados por doenças cardiovasculares (31% das mortes). Estima-se a ocorrência de 300 a 400 mil casos anuais de infarto do miocárdio no Brasil, e que a cada 5 a 7 casos, ocorra um óbito (DATA-SUS - 2009). Soma-se a isso a constatação de que a mortalidade devido a isquemia miocárdica no Brasil tem ocorrido em idades progressivamente mais precoces (Chor et al., 1995). Além disso, a Organização Mundial de Saúde estima que haverá um aumento de 145% na taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares nos países em desenvolvimento no período de 1990 a 2020 (Rubistein et al., 2010).

Contrariamente ao observado nos países em desenvolvimento, a incidência e a prevalência da Síndrome Coronariana Aguda (SCA) em países desenvolvidos vêm apresentando declínio em anos recentes. Nos Estados Unidos da América a prevalência de SCA decresceu de 6,7% em 2006 para 6,0% em 2010. Nesse mesmo país a prevalência variou substancialmente conforme o sexo (homens 7,8%; mulheres 4,6%) e o nível educacional (primeiro grau 9,2%, segundo grau 6,7%, nível superior 6,2% e pós graduação 4,6%) (CDC/USA, 2011). Na Inglaterra, de 2002 a 2010 a taxa de mortalidade total por SCA reduziu-se pela metade, enquanto a incidência de infarto do miocárdio (IM) e a taxa de mortalidade imediata reduziram-se cerca de um terço (Smolina et al., 2012).

Essas reduções, observadas durante a década passada nos países desenvolvidos, têm sido atribuídas a melhorias na prevenção e no tratamento médico imediato da SCA. No entanto, ainda não houve um impacto significativo desses avanços terapêuticos sobre a morbimortalidade da SCA no Brasil. Tais fatos têm grande importância sócio-econômica tendo em vista que as consequências do infarto do miocárdio são graves e acometem indivíduos em faixa etária de 35-65 anos e que estão em plena atividade produtiva (Mill et al., 2001). Acrescenta-se ainda que a morbidade decorrente do IM é elevada uma vez que, ao sobreviver, são grandes as chances de o paciente desenvolver graus variáveis de Insuficiência cardíaca (IC) decorrentes do processo de remodelamento ventricular.

1.1 FISIOPATOLOGIA DO INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO:

Após a interrupção do fluxo sanguíneo coronariano a tensão de oxigênio no miocárdio decai praticamente a zero dentro de um minuto, levando a interrupção do processo de fosforilação oxidativa mitocondrial (Lee et al., 2012). A queda da concentração intracelular de ATP reduz a contratilidade, mas leva principalmente a uma diminuição acentuada do relaxamento miocárdico, uma vez que reduz a atividade de bombas iônicas (Koretsune et al., 1991). A atividade diminuída da Na^+/K^+ ATPase resulta em elevação do sódio citosólico, o que por sua vez reduz a atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$ por diminuir o gradiente de sódio. O acúmulo de Ca^{+2} resultante da diminuição da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$, é somado ao acúmulo desse mesmo íon resultante da diminuição da atividade da SERCA 2a e da PMCA (do inglês: "*plasma membrane calcium pump*"). Tais fatos dificultam o relaxamento, que juntamente com a diminuição da contratilidade, reduzem

significativamente o débito cardíaco em questão de minutos após a oclusão coronariana (Tian et al., 1996).

Com a redução da massa contrátil ventricular por necrose de miócitos, que ocorre dentro dos primeiros 45 minutos após a interrupção do fluxo coronário (Leshnower et al., 2007), e a diminuição do desempenho do miocárdio remanescente na fase aguda (diminuição da contratilidade e do relaxamento), instala-se uma situação de baixo débito cardíaco com consequente ativação neuro-endócrina envolvendo aumento da atividade do sistema nervoso simpático, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e liberação de fator natriurético atrial (Mill et al., 2011).

A hiperatividade simpática aumenta a frequência cardíaca e o consumo de O₂ pelo miocárdio em um momento de isquemia, o que pode aumentar a área de infarto, além disso, diminui o limiar de fibrilação favorecendo o surgimento de taquiarritmias (Mill et al., 1991). Somado ao aumento do tono simpático, ocorre também aumento no número de receptores β adrenérgicos na membrana dos miócitos (Domniak & Turck, 1986). Como consequência da estimulação de receptores adrenérgicos, há incremento na concentração do cálcio citosólico contribuindo para aumentar a lesão celular, dificultar o relaxamento e explicando em parte a maior propensão às arritmias cardíacas (McCance et al., 1993). Além disso, Decker et al. (1993) demonstraram que miócitos ventriculares de coelho mantidos em cultura por uma semana e, em seguida, expostas a agonistas alfa e / ou beta-adrenérgicos, apresentaram aumento na razão proteína total/DNA e elevação na concentração de RNA, ambos indicativos de hipertrofia celular.

A persistência na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, tanto o sistêmico quanto o parácrino cardíaco, leva a uma maior exposição do miocárdio remanescente à angiotensina II que por sua vez determina vasoconstrição coronariana, hipertrofia de miócitos por ativação de protooncogenes (Yamazaki et al., 1996) e estimula a deposição de colágeno (Mill et al., 1997).

No coração infartado a região de cicatriz tem um aumento importante de atividade da Enzima Conversora de Angiotensina (ECA) (Mill et al., 2011), tornando-se sítio importante na geração local de Angiotensina-II (AII), sendo que sua atividade máxima ocorre duas semanas após o IM (Bussato et al., 1997). Ao se ligar aos receptores AT₁ dos miócitos, a AII promove a ativação da fosfolipase C levando ao crescimento celular e ao aumento do cálcio citosólico, que por sua vez também pode contribuir para a hipertrofia do miócito (de Resende et al., 2007).

Durante as primeiras horas após a interrupção do fluxo coronariano inicia-se edema local com infiltração leucocitária e proliferação de fibroblastos, dando início ao processo de formação de tecido cicatricial (Fishbein et al., 1978). Os miócitos cardíacos podem morrer de duas maneiras: necrose ou apoptose. A necrose é a responsável pela inflamação, pois resulta da lesão da membrana plasmática. Sem a membrana há liberação do conteúdo intracelular que funciona como poderoso quimiotático, resultando em infiltração leucocitária e estimulando a proliferação de fibroblastos e a deposição de colágeno (Fishbein et al., 1978). Também resulta do processo de necrose a liberação de marcadores plasmáticos do infarto do miocárdio como a creatinofosfoquinase (CK e CK-MB), as transaminases e a troponina (Vranckx et al., 2012).

Já o processo de apoptose é um processo controlado de morte celular. Ela não resulta em inflamação, pois o conteúdo da célula é armazenado em pequenas vesículas que são fagocitadas por leucócitos teciduais. A apoptose ocorre no miocárdio após o infarto, em especial no tecido reperfundido e tem sido implicada como parte do processo de remodelamento cardíaco (Palojoki et al., 2001).

O processo de apoptose, que é dependente de ATP, tem participação central das mitocôndrias lesadas, que promovem a liberação de citocromo C no citosol. A cardiolipina, um fosfolípido da membrana mitocondrial, apresenta papel importante na liberação do citocromo C e, portanto, no processo de apoptose, fato que será abordado mais adiante (Labeledzka et al., 2006).

Em estudo recente, Heather et al. (2010) demonstraram que após 2 semanas do infarto do miocárdio havia uma diminuição marcante na função das mitocôndrias, e que o grau de insuficiência cardíaca pós-infarto tinha correlação direta com o grau de disfunção mitocondrial. Além disso, os autores localizaram a disfunção no complexo III da cadeia respiratória, associada à diminuição na concentração de citocromo c e de cardiolipina da membrana mitocondrial. Como será abordada à frente, tal disfunção mitocondrial resulta em redução da concentração de ATP citosólico cronicamente, fato que tem sido implicado como um dos responsáveis pelo remodelamento ventricular.

Além disso, com o decorrer do tempo, ocorre também a dilatação progressiva da câmara cardíaca, decorrente do aumento da pressão diastólica ventricular e do deslizamento das fibras musculares da região infartada (Weisman et al., 1988; Olivete et al., 1990). Embora a dilatação ventricular contribua para manter o débito cardíaco através do uso da reserva diastólica (mecanismo de Frank-Starling), em

longo prazo ela promove uma sobrecarga mecânica importante sobre o miocárdio viável, o que leva a dilatação adicional do ventrículo e hipertrofia do miocárdio remanescente (Mill et al.,1990). É importante salientar que, na hipertrofia pós IM, o aumento do volume muscular é maior que o aumento do volume vascular, com aumento da distancia média entre capilares e células; tal fato poderia agravar ainda mais a hipóxia miocárdica (Mill et al., 1991).

Do que foi exposto deve-se ter em perspectiva o fato de que o remodelamento ventricular é um fenômeno multifatorial. Em um primeiro momento a diminuição aguda do débito cardíaco leva a uma resposta neuroendócrina na tentativa de se manter parâmetros hemodinâmicos adequados às demandas metabólicas periféricas. No entanto, quando a lesão miocárdica é mais extensa, essa atividade hormonal se torna persistente e é somada a uma disfunção mitocondrial com diminuição crônica nos níveis de ATP citosólico (Mill et al., 2011; Heather et al.,2010). Todo esse processo resulta em um ciclo deletério que pode levar à insuficiência cardíaca.

1.2 LIPÍDIOS E INFARTO DO MIOCÁRDIO

O infarto do miocárdio promove também alterações na composição lipídica das membranas cardíacas como foi demonstrado por Nasa et al., 1997. Além desse, outros estudos têm demonstrado que os ácidos graxos (AG) e os fosfolípidos (FL) da membrana celular sofrem alterações em decorrência do infarto do miocárdio (Chien et al., 1987; Okumura et al., 1991).

Os lipídios constituem uma família de compostos orgânicos de grande heterogeneidade, uma vez que são moléculas muito diferentes entre si tendo em

comum o fato de serem insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Muitos desses lipídios possuem ácidos graxos como um de seus constituintes, que por sua vez, são ácidos carboxílicos que possuem uma cadeia carbônica geralmente não ramificada (apolar) e uma única carboxila (polar) (Chemin & Mura, 2010).

Os ácidos graxos (figura-1), por sua vez, podem ser (A) saturados: possuindo apenas ligações simples entre seus carbonos, ou (B) insaturados: possuindo ligações duplas entre seus carbonos (Alberts, 2004). O sistema ômega (ω) de nomenclatura baseia-se na posição da primeira dupla ligação, sendo esta contada a partir do carbono do grupo metil ($-\text{CH}_3$) que é chamado carbono ω . Assim um ácido graxo ω -3 possui uma dupla ligação entre o terceiro e o quarto carbonos a partir do grupo metil terminal (Mahan & Escott-Stump, 2005).

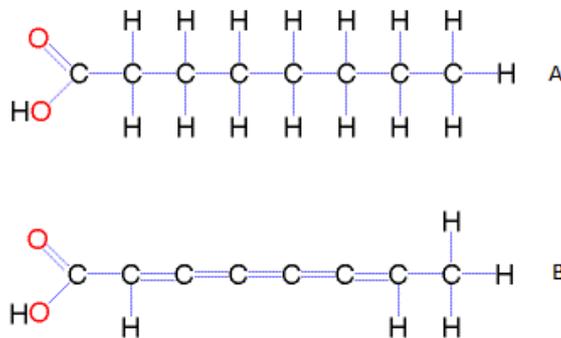


Figura - 1: Exemplos de moléculas de ácido graxo saturado (A) e insaturado (B).

(modificado de www.medicine-raw-materials.com)

Os ácidos graxos essenciais (AGE) são aqueles que o organismo humano não tem capacidade de sintetizar, sendo sua presença na dieta obrigatória. São

ácidos graxos poli-insaturados pertencentes à família ω -3 ou ω -6. O ácido linoleico (C18:2 ω -6, AL) e o ácido alfa-linolênico (C18:3 ω -3, ALA) são dois estabelecidos AGE (figura-2). O AL é convertido no organismo em ácidos graxos de cadeia longa ω -6 como o ácido aracdônico (AA) e entra na formação de fosfolipídios como a cardiolipina (CL), já o ALA é convertido em dois ácidos graxos de cadeia longa ω -3: ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosaexaenóico (DHA). Estes dois últimos são os ácidos graxos ω -3 encontrados no óleo de peixe (Mahan & Escott-Stump, 2005).

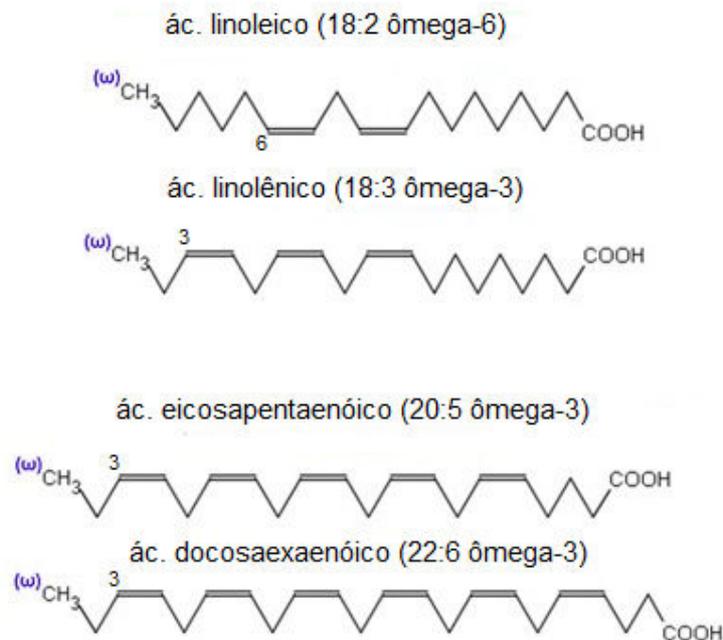


Figura – 2: Ácidos graxos essenciais ômegas 3 e 6.

(modificado de <http://www.csiro.au>)

Postula-se que a dieta paleolítica dos seres humanos era mais rica em vegetais ricos em ALA (convertido no organismo em EPA e DHA) e em peixes (fonte natural de EPA e DHA), sendo que a proporção dietética ideal ω -6/ ω -3 para humanos seria em torno de 1:1 (Crawford et al., 2009). No entanto, a dieta moderna é mais rica em ácidos graxos ω -6, com uma proporção estimada ω -6/ ω -3 de 8:1 a 12:1 (Kris-Etherton et al., 2000).

Além disso, os ácidos graxos essenciais com vinte carbonos, como o ácido araquidônico (20:4 ω -6,AA) e o ácido eicosapentaenóico (20:5 ω -3,EPA), são precursores dos eicosanóides (do grego *eicosi* ou vinte) que estão envolvidos em diversos processos e em especial na resposta inflamatória (Chemin & Mura, 2010).

Os eicosanóides derivados do AA (ω -6) pela via da cicloxigenase (PGE2 , tromboxano A2 , LTB4) possuem atividades: pró-inflamatória, são potentes agregantes plaquetários e vasoconstrictores. Ao contrário, os eicosanóides derivados do EPA (ω -3) também pela via da cicloxigenase (PGI3 , tromboxano A3 , LTB5) são fracos agregantes plaquetários e agentes pró-inflamatórios, e possuem menor atividade vasoconstrictora, sendo portanto considerados cardioprotetores (Chemin & Mura, 2010).

A relação entre os ácidos graxos e a doença coronariana aguda tem sido amplamente estudada. Vários estudos epidemiológicos demonstram diminuição do risco para doenças cardiovasculares com o consumo regular de ácidos graxos polinsaturados ω -3 como o ácido alfa-linolênico (C18:3,ALA), o ácido docosaexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA).

Lemaitre et al. (2003) demonstraram que uma dieta rica em ALA estava associada a um baixo risco para isquemia cardíaca fatal. Baylin et al (2003)

demonstraram que uma alta concentração de ALA no tecido adiposo de indivíduos adultos da Costa Rica estava associado a um baixo risco de infarto agudo do miocárdio não fatal. Em outro estudo Rastogi et al. (2004) demonstraram que o consumo de óleo de mostarda (rico em ALA) estava associado a um baixo risco de doença isquêmica cardíaca.

Outros autores demonstraram o efeito antiarrítmico do ALA, do DHA e do EPA. Billman et al. (1999) em estudo com cães infartados, demonstraram que a infusão venosa de ALA, DHA e EPA podem prevenir a fibrilação ventricular induzida por isquemia. McLennan et al. (1985) demonstraram que ratos alimentados com dieta rica em óleo de girassol tiveram uma redução de 70% na incidência de eventos arrítmicos fatais pós ligadura da artéria coronária. Outros autores obtiveram resultados semelhantes (Abdukeyum et al., 2008; Hock et al., 1990; Yang et al., 1993; Kinoshita et al., 1994; Anderson et al., 1996).

Os efeitos antiarrítmicos mencionados acima podem decorrer dos efeitos dos ácidos graxos polinsaturados sobre diversos trocadores e canais iônicos da membrana dos cardiócitos. Por exemplo, sabe-se que o AL e o ALA podem inibir o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (Hallaq et al., 1992) e que o EPA tem a propriedade de inibir o canal de Na^+ voltagem-dependente (Xiao et al., 2000).

Em cardiomiócitos isquêmicos, o trocador Na^+/H^+ tem sua atividade aumentada devido ao acúmulo de ions H^+ no citosol provenientes do metabolismo anaeróbico. O conseqüente aumento do Na^+ intracelular promove uma maior entrada de Ca^{++} através do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$. A sobrecarga de Ca^{++} é um reconhecido promotor de arritmia e de hipertrofia no miocárdio (Goel et al., 2000). Baartscheer et al. (2008) demonstraram que a inibição do trocador Na^+/H^+ pelo cariporide causa a

regressão da hipertrofia e melhora do desempenho cardíaco em corações insuficientes de coelhos. Em outro estudo de Goel et al. (2002) ficou demonstrado que o EPA e o DHA inibem o trocador Na^+/H^+ e que isso poderia explicar em parte seus efeitos antiarrítmicos e cardioprotetores.

Como foi mencionado o ácido linoleico é um dos constituintes do complexo molecular da cardiolipina. Por sua vez a cardiolipina (figura-3) é um fosfolípido dimérico que está predominantemente presente na membrana mitocondrial interna. Os fosfolípidios são lípidios anfipáticos formados por moléculas de glicerol, ácidos graxos e fosfato, unidas a um grupo polar variável. A principal função dos fosfolípidios é compor a bicamada lipídica das membranas biológicas. A cardiolipina é formada por três moléculas de glicerol e quatro cadeias de ácidos graxos formando uma ultraestrutura ligeiramente cônica implicada em diversos processos mitocondriais (Houtkooper et al., 2008).

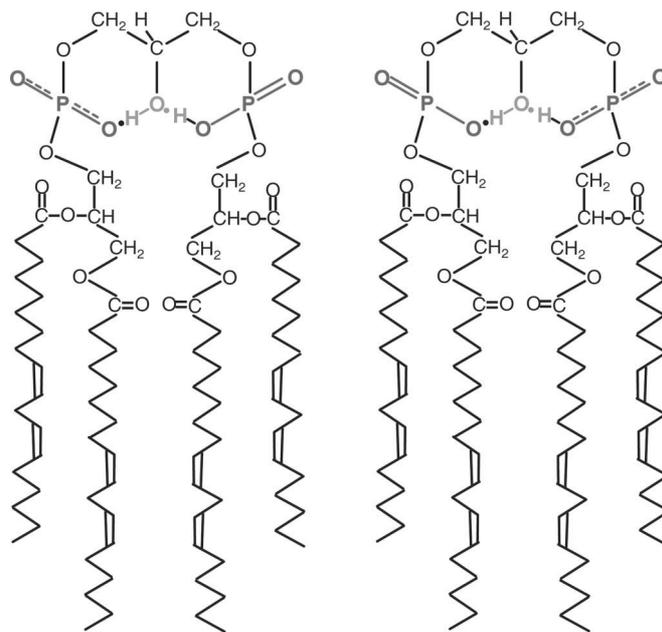


Figura – 3: Estrutura molecular da cardiolipina. (modificado de Sparagna et al., 2009).

As cadeias de ácidos graxos da cardiolipina são bastante específicas, sendo composta predominantemente por cadeias insaturadas de 18 carbonos. No coração, o ácido linoleico (AL - 18:2 ω -6) constitui de 80 a 90% das cadeias de ácidos graxos da cardiolipina, sendo que esta corresponde de 16 a 20% dos fosfolipídios da membrana interna mitocondrial. Funcionalmente a cardiolipina tem grande importância na mitocôndria, já que apresenta a propriedade de interagir com proteínas da membrana mitocondrial de forma modulatória e estrutural, em especial às da cadeia respiratória (Chicco et al., 2006).

Além disso, a cardiolipina está envolvida na manutenção da fluidez da membrana mitocondrial e na sua estabilidade osmótica, destacando-se aqui a manutenção do gradiente eletroquímico de prótons hidrogênio entre o espaço intermembranas e o interior da mitocôndria (Chicco et al., 2006).

Este gradiente é formado quando os elétrons de alta energia, (derivados da oxidação de gorduras e carboidratos no ciclo do ácido cítrico), são transferidos ao longo de uma série de carreadores proteicos (cadeia respiratória) embebidos na membrana, e que funcionam como bombas de hidrogênio, transportando este íon de dentro para fora da mitocôndria (Alberts, 2004).

O gradiente eletroquímico que se forma, armazena energia potencial, sendo a energia do refluxo desses prótons hidrogênio em direção ao interior da mitocôndria utilizada pela ATP sintase para catalisar a síntese de ADP + fosfato em ATP (figura-4). Sem a cardiolipina todo esse processo de acoplamento quimiosmótico fica prejudicado.

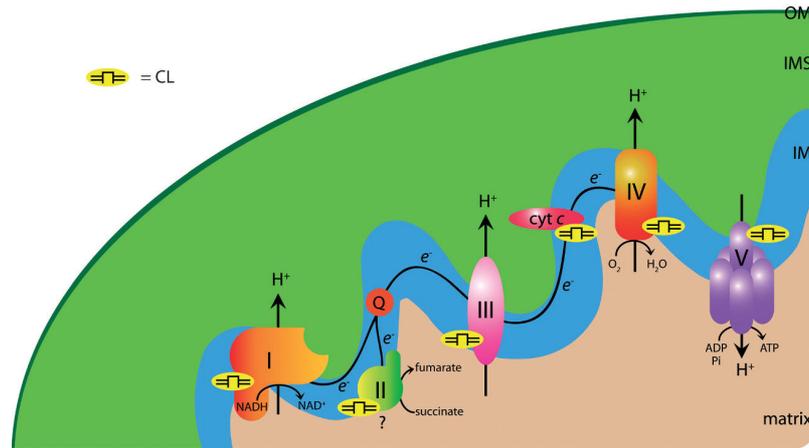


Figura – 4: Representação esquemática da interação da cardiolipina (CL) com os complexos I, II, III, IV, citocromo c (cyt c) e ATP sintase (V) na membrana mitocondrial interna. (modificação de Houtkooper et al., 2008).

Partindo do exposto acima, conclui-se que a redução dos níveis de cardiolipina na membrana mitocondrial interna, leva a uma significativa diminuição no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial resultando em queda nos níveis de ATP citosólico. Como será abordado adiante, essa diminuição na concentração de ATP seria um dos indutores do processo de remodelamento ventricular (Heather et al., 2010).

Em estudo recente realizado em nosso laboratório, Ribeiro Junior et al. (2011) demonstraram que o tratamento de ratos com óleo de soja intramuscular por 15 dias aumentou a performance do ventrículo esquerdo sem alterar a pressão arterial, efeitos esses associados ao aumento da atividade da ATPase miosínica e da Na⁺/K⁺ ATPase, além de aumento na expressão da SERCA2a e do trocador sódio-cálcio.

O óleo de soja é composto por 54,5% de Ácido Linoleico (AL), 23,2 % de Ácido Oleico (AO), 7,2% de Ácido α -Linolênico (ALA), 10,5% de Ácido Palmítico (AP) e 4,6% de outros ácidos graxos (Ohara et al., 2008). Destacam-se dentre esses

constituintes o AL e o ALA. Como já mencionado, o primeiro é o principal constituinte da cardiolipina mitocondrial cardíaca e o segundo é convertido em EPA e DHA. Tais fatos poderiam, em parte, explicar os efeitos do óleo de soja no aumento do desempenho contrátil do miocárdio.

Baseando-se no levantamento bibliográfico exposto acima e nos resultados obtidos por Ribeiro Júnior et al. (2011) sobre a contratilidade miocárdica utilizando-se do óleo de soja administrado por via intramuscular, levantamos algumas questões: será que o óleo de soja, administrado por essa via e por igual período, poderia melhorar o desempenho cardíaco em ratos infartados? Se isso realmente ocorrer, qual será a magnitude desse efeito em relação ao resultado obtido quando animais saudáveis, do grupo controle, foram tratados? Será que haverá impacto na área de infarto dos ratos tratados em relação aos infartados e não tratados? Será que o tratamento proposto terá algum impacto na hipertrofia cardíaca? Ocorrerá algum efeito do tratamento com óleo de soja sobre a pressão arterial ou sobre outros parâmetros hemodinâmicos obtidos “in vivo”?

Partindo desses questionamentos propusemos o estudo aqui apresentado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Avaliar os possíveis efeitos inotrópicos, hemodinâmicos e ponderais do tratamento com óleo de soja intramuscular durante quinze dias em corações infartados de ratos.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar contratilidade miocárdica nos ratos infartados e tratados com óleo de soja por meio de medidas heterométricas (curva de Frank-Starling) e homeométricas (curva de resposta ao Ca^{++} e ao isoproterenol), utilizando-se a técnica de Langendorff modificada.
- Avaliar possíveis efeitos do tratamento com óleo de soja sobre a pressão arterial, pressão sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo e direito por meio de cateterismo arterial e venoso “in vivo” (medidas hemodinâmicas).
- Avaliar possível alteração na área de infarto e na hipertrofia cardíaca pós IM em resposta ao tratamento com óleo de soja intramuscular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E GRUPOS

Foram utilizados ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*), com peso corporal entre 230 a 250 gramas. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado com temperatura e umidade constantes, sendo submetidos a um ciclo claro-escuro de doze horas em alternância. O acesso à ração e a água foram “ad libitum”. A composição básica da ração era: farelo de soja (transgênico - espécie doadora de gene: *Agrobacterium tumefaciens*), milho integral moído (transgênico - espécie doadora de gene: *Bacillus thuringiensis*), dextrina, casca de arroz, farelo de trigo, farelo de arroz, óleo de soja refinado, farinha de carne, farinha de peixe, calcário calcítico, cloreto de sódio, óxido de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selênio de sódio, vitaminas A, D3, E, K3, B1 e B2, niacina, e ácido pantotênico.

Estes animais foram distribuídos entre quatro grupos experimentais com dez indivíduos cada um:

1 - Grupo Sham Soja: submetidos à cirurgia fictícia e tratados com 0,1 mL de óleo de soja intramuscular por quinze dias.

2 - Grupo Sham: submetidos à cirurgia fictícia e tratados com 0,1 mL de solução de NaCl a 0,9% intramuscular por quinze dias.

3 - Grupo Infarto do Miocárdio (IM) Soja: submetidos à ligadura do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e tratados com 0,1 mL de óleo de soja intramuscular por quinze dias.

4 - Grupo Infarto do Miocárdio (IM): submetidos à ligadura do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda e tratados com 0,1 mL de solução de NaCl a 0,9% intramuscular por quinze dias.

3.2 INFARTO DO MIOCÁRDIO

Para a realização do infarto do miocárdio foi utilizado procedimento cirúrgico baseado na técnica previamente descrita por Johns e Olson (1954) e adaptada por Mill et al (1990).

Os animais foram submetidos à anestesia utilizando-se Xilazina (10 mg/kg) e Quetamina (50 mg/kg) por via intraperitoneal (Faria et al., 2011). Assim que atingido o estado anestésico os animais foram postos em mesa cirúrgica apropriada e na posição de decúbito dorsal. Neste momento eram instalados eletrodos para realização de eletrocardiograma (ECG) pré e pós-procedimento utilizando-se a derivação D1 e sendo o registro feito com o sistema de aquisição de dados “MP 36 Biopac System, Inc; CA”.

Após o registro do ECG pré-procedimento (feito durante um minuto), os animais foram submetidos à tricotomia e incisão cutânea torácica oblíqua esquerda, sendo a musculatura peitoral divulsionada para exposição do gradil costal. Em seguida era confeccionada uma sutura em bolsa com fio de algodão englobando a referida musculatura, sendo que o fechamento desta era postergado até o final do

procedimento. Neste momento era realizada uma toracotomia em espaço intercostal definido pela visualização do “ictus cordis” e o coração era gentilmente exteriorizado por manobra de compressão torácica, sendo então realizada a identificação e ligadura do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda utilizando-se de fio de mononylon 6.0 agulhado. Logo após, o coração era reintroduzido ao tórax e a sutura em bolsa, previamente confeccionada, era imediatamente fechada selando a cavidade torácica. Todo o procedimento acima descrito durou em média 40 segundos sendo que o animal retomava a respiração assim que o tórax era fechado. Procedia-se então a síntese cutânea com pontos simples utilizando-se de fio de algodão e logo em seguida realizava-se o registro de ECG pós-procedimento por 15 minutos.

Os animais dos grupos Sham e Sham Soja eram submetidos aos mesmos procedimentos realizados para os grupos Infarto do Miocárdio e Infarto do Miocárdio Soja com exceção da ligadura do ramo descendente anterior da artéria coronária esquerda.

3.3 MEDIDAS HEMODINÂMICAS

Após o termino dos quinze dias de tratamento, os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg, intraperitoneal) e submetidos a novo procedimento cirúrgico para dissecação e cateterismo da artéria carótida direita e da veia jugular direita utilizando-se cateter de polyethyleno (PE50) preenchido com salina heparinizada a 50 UI/mL. O cateter da artéria carótida era introduzido até a aorta onde se procedia as medidas de pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD). Com uma nova manobra de introdução o cateter era posicionado no ventrículo

esquerdo onde se realizava o registro da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) e da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE). O cateter da veia jugular era introduzido até o ventrículo direito para medida da pressão sistólica do ventrículo direito (PSVD) e da pressão diastólica final do ventrículo direito (PDFVD). As medidas das derivadas de pressão (dP/dt) máxima positiva e máxima negativa foram determinadas a partir das medidas pressóricas de ambos os ventrículos em função do tempo.

Ambos os cateteres estavam conectados a um transdutor de pressão "TSD104A – Biopac", sendo que os registros foram feitos pelo sistema de aquisição de dados "MP36 Biopac Systems, Inc; CA".

3.4 PERFUSÃO DO CORAÇÃO ISOLADO PELA TÉCNICA MODIFICADA DE LANGENDORFF:

Logo após o registro hemodinâmico e ainda sob efeito anestésico da uretana os animais eram tratados com heparina sódica (500 UI) via intraperitoneal e após dez minutos eram sacrificados por decapitação. O coração era então retirado após toracotomia anterior e montado no aparato de perfusão pelo coto aórtico. Iniciava-se a perfusão do coração com fluxo contínuo (10 mL/min) com solução de Krebs tamponada contendo (em mM): NaCl 120; KCl 5,4; $CaCl_2$ 1,2; $MgSO_4$ 2,50; Na_2SO_4

1,2; NaH_2PO_4 2,0; NaHCO_3 27,0 e glicose 11. Essa solução era mantida a $33 \pm 1^\circ \text{C}$

era aerada por borbulhamento de mistura carbogênica contendo 95% de O_2 5% de CO_2 mantendo um pH estável em 7,4. Nesse momento os átrios eram retirados e era introduzido no ventrículo esquerdo, através da abertura da valva mitral, um balão de látex flexível montado em tubo de plástico rígido. Este balão estava conectado por meio de uma via em “Y” a um transdutor de pressão (TSD 104A – Biopac) e a uma seringa por meio da qual a pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PDVE) poderia ser ajustada em valores de 5 a 35 mm Hg a intervalos de 5 mm Hg. Todo este sistema estava preenchido com água. O coração foi mantido sob estimulação elétrica extrínseca por meio de eletrodos de estimulação (Ag/AgCl), sendo a frequência cardíaca fixada em 200 bpm utilizando-se de pulsos elétricos de onda quadrada, de intensidade uma vez e meia a limiar (5 a 10 V) e duração de 5 ms. A pressão de perfusão coronariana era medida continuamente por meio de um transdutor de pressão “TSD 104A – Biopac” conectado ao sistema de perfusão. Considerando-se que o fluxo era constante (10 mL/min.) as variações da pressão de perfusão coronarianas foram interpretadas como sendo causadas por mudanças na resistência do leito vascular coronariano.

3.4.1 Protocolo experimental durante a perfusão do coração isolado:

As curvas de função ventricular foram obtidas por meio da medida da pressão sistólica do ventrículo esquerdo (PSVE) enquanto se variava a pressão diastólica do ventrículo esquerdo (PDVE) de 5 a 35 mmHg em intervalos de 5 mmHg.

Para estudo da resposta da estimulação de receptores β -adrenérgicos sobre a PSVE desenvolvida, a PDVE era mantida em 10 mmHg enquanto administrava-se uma única dose de 50 μ l de Isoproterenol a 10^{-4} M, tendo a solução de perfusão 0,62 mM de cálcio.

Por fim para a avaliação da resposta inotrópica ao cálcio, a PDVE era mantida em 10 mmHg e a PSVE era registrada enquanto se perfundia o coração com soluções com diferentes concentrações de cálcio (em mM): 0.62; 1.25; 1.87; 2.5 e 3.12.

Após os registros acima descritos o coração era retirado do aparato de perfusão, as câmaras cardíacas eram separadas e pesadas e o peso úmido foi corrigido pelo peso corporal para estimativa de hipertrofia cardíaca. Nos corações dos grupos infarto do miocárdio, a área cicatricial foi identificada por transiluminação e foi cortada e medida em papel milimetrado para avaliação da área de infarto em mm^2 (Mill et al., 1990). Para tais medidas o septo interventricular foi considerado parte do ventrículo esquerdo.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados foram descritos como Média \pm EPM. Os testes estatísticos utilizados foram o teste t de Student não pareado e análise de variância (ANOVA 1 ou 2 vias) seguida, quando o $p < 0,05$, pelo teste post-hoc de Tukey ou Bonferroni.

Os valores foram considerados significantes para um mínimo de $p < 0,05$. O programa de análise estatística utilizado foi o GraphPad Prism 5 Software (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS:

4.1 REGISTRO ELETROCARDIOGRÁFICO:

Neste estudo utilizamos para os grupos infarto apenas os animais que desenvolveram alteração do segmento S-T (“supra-desnivelamento”) e/ou algum tipo de arritmia ventricular durante o registro pós-procedimento. A utilização do registro eletrocardiográfico pré e pós-procedimento se mostrou de grande utilidade uma vez que, ao separar os animais com maior probabilidade de desenvolver infarto transmural (Ovsepyan et al., 2011), evitou-se o desperdício de recursos e tempo.

O registro eletrocardiográfico típico consistiu em um padrão de ritmo sinusal pré-procedimento, seguido, após a ligadura da artéria coronária, por um progressivo

desnivelamento de seguimento S-T intercalado com arritmias ventriculares, (Figura - 5).

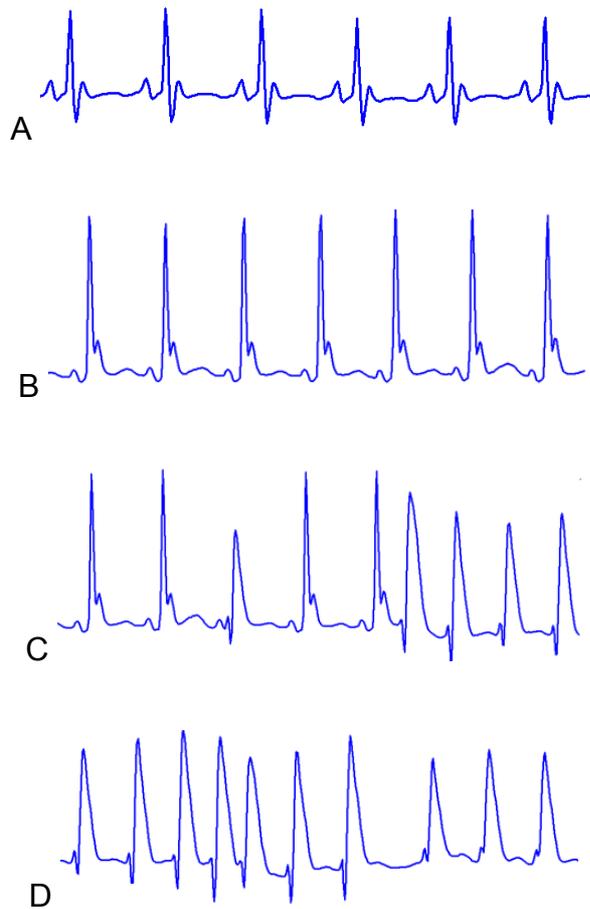


Figura – 5: Registro eletrocardiográfico típico de um animal selecionado para o grupo infarto. Em ordem cronológica - A: ritmo sinusal pré-procedimento; B: ritmo sinusal com desnivelamento de S-T; C: desnivelamento de S-T e arritmia ventricular; D: arritmia ventricular sustentada.

4.2 MEDIDAS PONDERAIS:

A tabela - 1 mostra os parâmetros ponderais dos grupos estudados, os dados foram obtidos no 15º dia após o início do tratamento. Não houve diferença significativa entre os grupos em nenhum dos parâmetros analisados.

	Sham (N=6)	Sham Soja (N=6)	IM Soja (N=6)	IM (N=6)
PC (g)	272,0 ± 23,7	280,7 ± 25,9	288,7 ± 36,4	278,7 ± 27,9
PVE (g)	0,69 ± 0,03	0,65 ± 0,05	0,62 ± 0,04	0,70 ± 0,10
PVE/PC (mg/g)	2,1 ± 0,25	2,0 ± 0,10	2,2 ± 0,31	2,2 ± 0,21
PVD (g)	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,04	0,30 ± 0,06	0,24 ± 0,06
PVD/PC (mg/g)	0,6 ± 0,08	0,6 ± 0,11	0,7 ± 0,14	0,73 ± 0,15

PPu (g)	2,13 ± 0,2	2,25 ± 0,3	2,31 ± 0,7	2,07 ± 0,61
PPu/PC (mg/g)	5,8 ± 1,16	6,9 ± 1,44	6,6 ± 1,18	6,0 ± 1,44
PFu (g)	14,2 ± 1.11	12,7 ± 1,7	13,3 ± 0,9	14,4 ± 1,4
PFu/PC (g)	40,8 ± 2,4	38,9 ± 4,4	37,7 ± 6,6	43,0 ± 3,8

Tabela – 1: Valores das medidas ponderais obtidos no 15º dia de pós-operatório dos grupos Sham, Sham tratado, Infarto (IM) e Infarto tratado. PC: peso corporal; PVE: peso do ventrículo esquerdo; PVE/PC: peso do ventrículo esquerdo dividido pelo peso corporal; PVD: peso do ventrículo direito; PVD/PC: peso do ventrículo direito dividido pelo peso corporal; PPu: peso do pulmão úmido; PPu/PC: peso do pulmão úmido dividido pelo peso corporal; PFu: peso do fígado úmido; PFu/PC: peso do fígado úmido dividido pelo peso corporal.

4.3 ÁREA DE INFARTO:

As áreas de infarto, obtidas por meio de planimetria, foram plotadas e convertidas em valores percentuais de tecido ventricular esquerdo. Os resultados foram então analisados e representados no gráfico da Figura-6, onde temos as áreas de infarto dos grupos Infarto (IM) ($34.75 \pm 5.6 \%$) e Infarto Soja (IM Soja) ($34.1 \pm 5.0 \%$). Ficou demonstrado que não houve diferença estatística com relação a área de infarto entre os grupos.

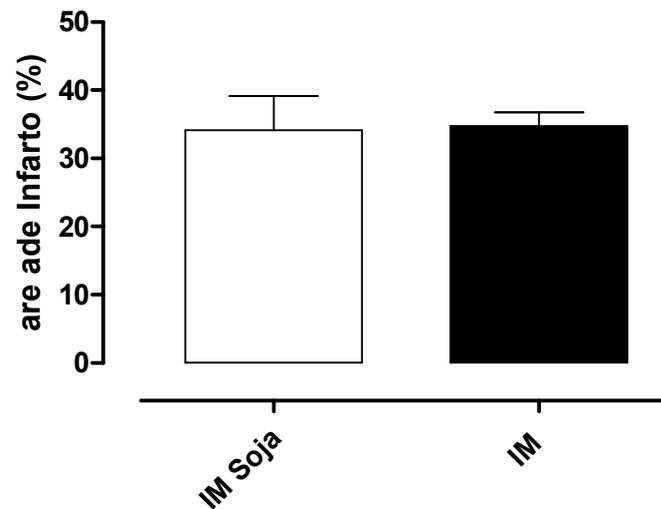


Figura – 6: Comparação da área de infarto entre os grupos Infarto (IM) tratado com 0,1 ml de óleo de soja por via intramuscular e Infarto (IM).

4.4 MEDIDAS HEMODINÂMICAS:

A tabela – 2 resume os resultados obtidos por meio de registro pressórico por cateterismo arterial e venoso “in vivo” (medidas hemodinâmicas).

	Sham (N=7)	Sham soja (N=7)	IM soja (N=7)	IM (N=7)
FC (BPM)	348,3 ± 24,7	334,2 ± 59,19	346,7 ± 64,21	330,7 ± 24,38
PAS (mmHg)	117,5 ± 8,4*	121,6 ± 6,8*#	108,6 ± 9,579*#	89,11 ± 6,48*
PAD (mmHg)	59,95 ± 3,27	61,73 ± 5,84	60,82 ± 16,5	51,48 ± 8,39
PSVE (mmHg)	129,4 ± 15,12	133,3 ± 18,55*	117,7 ± 13,15	95,19 ± 7,36*
PSVD (mmHg)	39,43 ± 6,82	37,50 ± 5,73	35,86 ± 4,75	41,06 ± 6,66

PDFVE (mmHg)	4,06 ± 1,1*	3,30 ± 0,9*	4,72 ± 0,4*	6,37 ± 0,9*
PDFVD (mmHg)	1,12 ± 0,2#	1,32 ± 0,3	2,10 ± 0,6#	1,7 ± 0,5
dP/dt+ (mmHg/s)	6465 ± 1038‡	8849 ± 1626*#‡	6302 ± 1022#	4958 ± 535*
dP/dt- (mmHg/s)	-4618 ± 462*	-5283 ± 845*	-5439 ± 1011*	-3331 ± 701*

Tabela – 2: Parâmetros hemodinâmicos obtidos após o 15º dia de pós-operatório. FC: frequência cardíaca; PAS: pressão arterial sistólica; PAD: pressão arterial diastólica; PSVE e PSVD: pressão sistólica de ventrículo esquerdo e direito; PDFVE e PDFVD: pressão diastólica final de ventrículo esquerdo e direito; dP/dt + e -: derivadas de pressão sobre a derivada de tempo máximas positiva e negativa. (*), (#) e (‡): Diferente para P < 0,05.

Não houve diferença significativa entre os quatro grupos com relação à frequência cardíaca, pressão arterial diastólica, pressão sistólica de ventrículo direito.

No que diz respeito à pressão arterial sistólica (PAS) e encontramos diferença significativa entre o grupo IM e os demais três grupos, e entre o grupo IM Soja e Sham Soja. Outro parâmetro onde encontramos diferença significativa foi nas medidas de pressão sistólica de ventrículo esquerdo (PSVE) entre os grupos IM e Sham Soja. Também houve diferença nos valores de pressão diastólica final de ventrículo esquerdo (PDFVE) entre o grupo IM e os demais três grupos (tabela-2). Nesse ponto cabe ressaltar que os valores de PAS, PSVE e PDFVE do grupo IM Soja não apresentaram diferença quando comparados aos mesmos valores do grupo Sham.

Quanto a análise da dP/dt máxima positiva (tabela-2 e figura-7), observamos diferença significativa entre o grupo Sham Soja e os demais grupos. Ao

compararmos as médias dos grupos IM, IM Soja e Sham encontramos uma menor média para o grupo IM, no entanto a diferença não foi significativa.

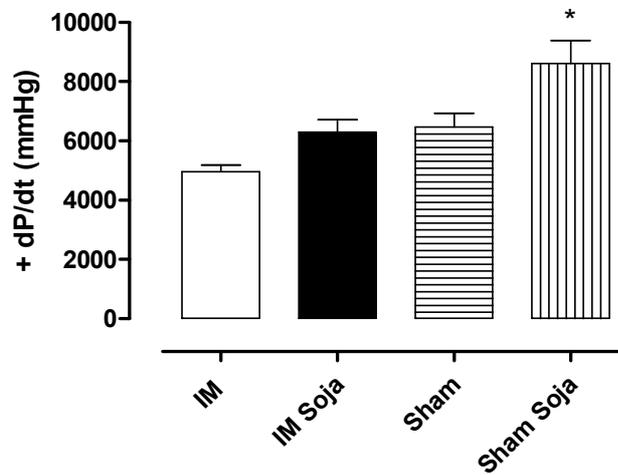


Figura – 7: Comparação dos valores das derivadas de pressão sobre as derivadas de tempo máximas positivas entre os grupos IM, IM Soja, Sham e Sham Soja. (*) Diferente para $P < 0,05$.

Com relação a dP/dt máxima negativa (tabela-2 e figura-8) , houve diferença significativa entre o grupo IM e os demais grupos, sendo que as comparações entre as médias dos grupos IM Soja, Sham e Sham Soja não apresentaram diferença estatística.

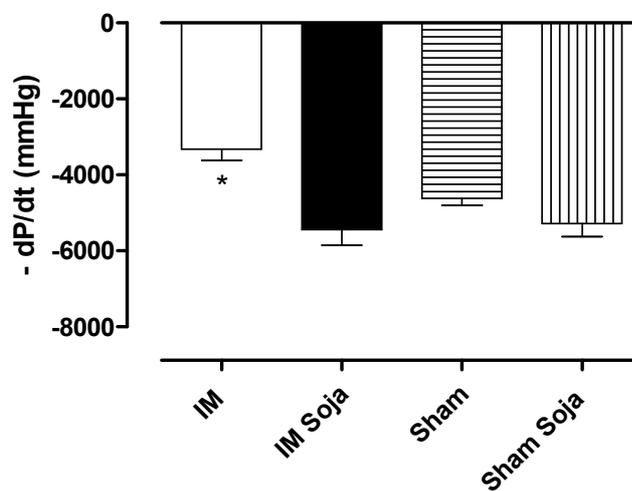


Figura – 8: Comparação dos valores das derivadas de pressão sobre as derivadas de tempo máximas negativas entre os grupos IM, IM Soja, Sham e Sham Soja. (*) Diferente para $P < 0,05$.

4.5 CURVAS DE FUNÇÃO VENTRICULAR:

Utilizamos o método de perfusão do coração isolado (método de Langendorff modificado) para abordar a resposta inotrópica ventricular. A figura-9 mostra o registro das pressões sistólicas de ventrículos esquerdos obtidos de animais dos grupos Sham, Sham Soja, IM e IM Soja.

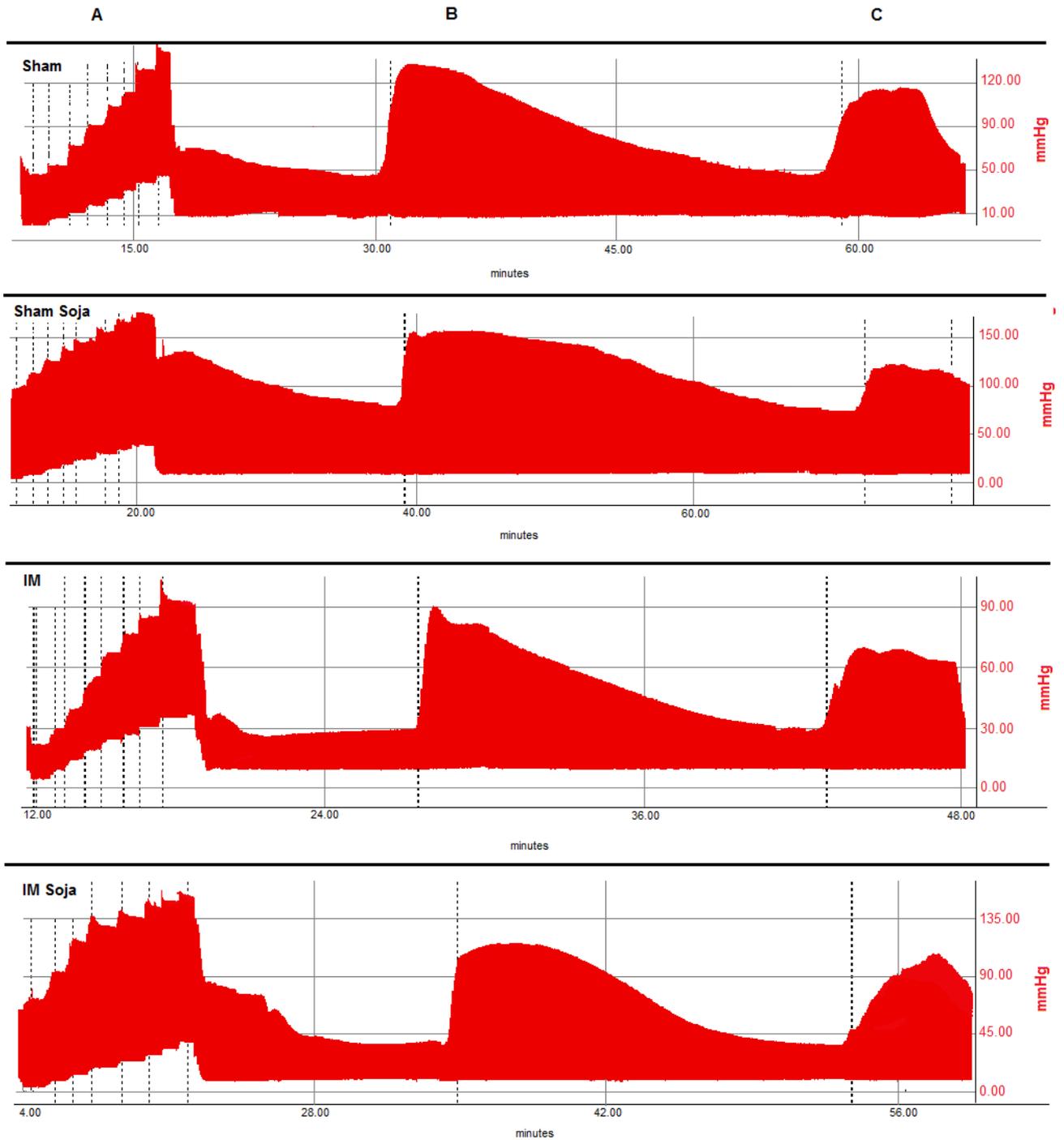


Figura – 9: Registro das pressões sistólicas de ventrículos esquerdos obtidos de animais dos grupos Sham, Sham Soja, IM e IM Soja. (A) curva de Frank- starling, (B) curva do Isoproterenol, (C) curva de cálcio. Dados obtidos por meio do transdutor de pressão “TSD 104A - MP36 Biopac Systems, Inc; CA.

Os dados apresentados no gráfico da Figura-10 demonstram que, após 15 dias do procedimento de infarto, houve diferença na PSVE entre os animais infartados e os animais Sham para todos os valores de PDVE analisados.

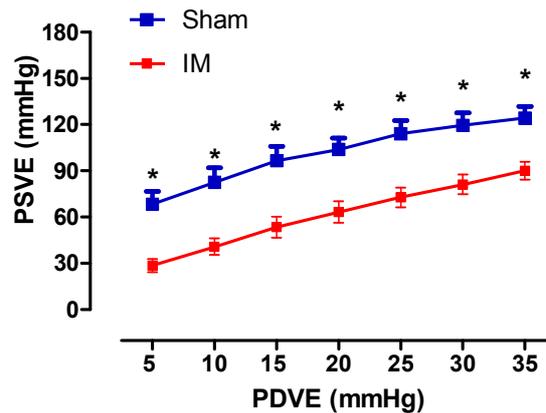


Figura – 10: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função da PDVE (pressão diastólica de ventrículo esquerdo) nos animais sham e infartados. (*) Diferente para $P < 0,05$.

Na Figura-11 foram comparados os valores absolutos de PSVE dos corações dos ratos Sham Soja, com os corações dos ratos Sham. Os resultados mostram que o tratamento com óleo de soja levou à melhora do desempenho ventricular esquerdo no coração isolado não infartado.

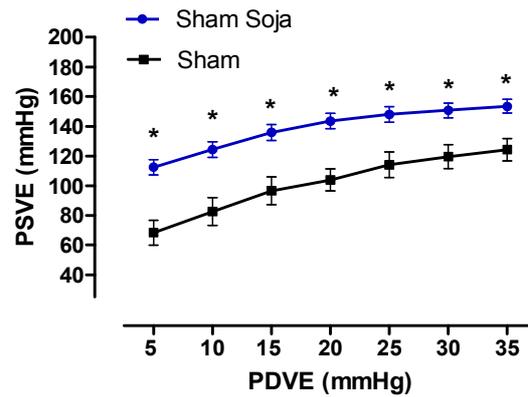


Figura – 11: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função da PDVE (pressão diastólica de ventrículo esquerdo) nos animais Sham e Sham tratados com óleo de soja. (*)Diferente para $P < 0,05$.

Quando comparamos as curvas de PSVE dos corações dos ratos IM Soja (Figura-12), com as curvas dos corações dos ratos IM, observamos um aumento na força de contração ventricular, à semelhança do que ocorre com os corações dos ratos Sham.

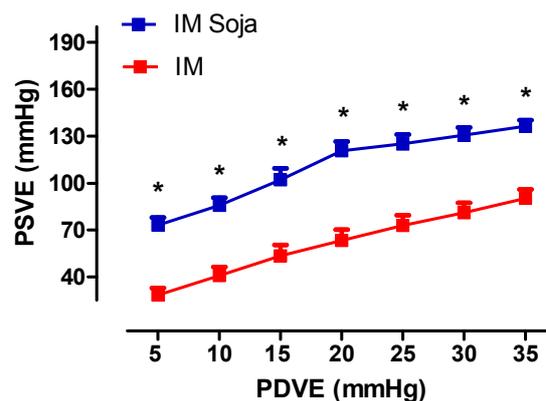


Figura – 12: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função da PDVE (pressão diastólica de ventrículo esquerdo) nos animais infartados (IM) e nos infartados tratados com óleo de soja. (*) Diferente para $P < 0,05$.

Ao analisarmos as curvas de PSVE dos quatro grupos simultaneamente (Figura-13), observamos que o referido tratamento com óleo de soja trouxe a curva de PSVE dos corações dos ratos IM Soja para valores semelhantes aos apresentados pelos corações dos ratos Sham, não havendo diferença significativa entre as duas curvas mencionadas. Ficou claro também, que o tratamento com óleo de soja melhorou o desempenho contrátil do ventrículo esquerdo, tanto nos animais IM Soja como nos animais Sham Soja.

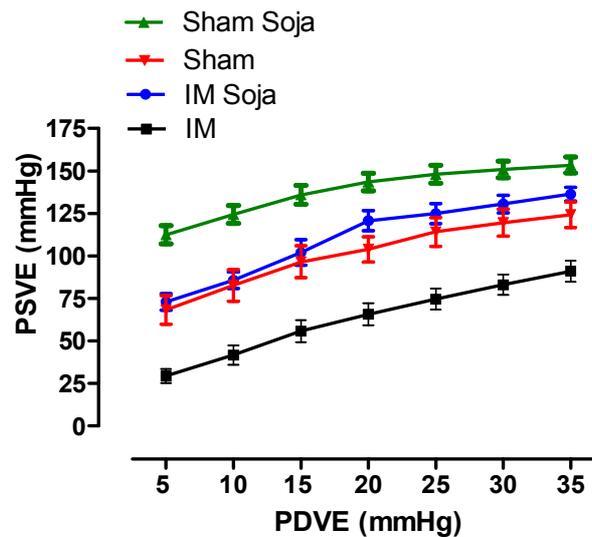


Figura – 13: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função da PDVE (pressão diastólica de ventrículo esquerdo) nos animais Sham, Sham tratados, infarto (IM) e infarto tratado.

Avaliamos ainda a resposta inotrópica ao Ca^{++} . Na Figura-14 ficou demonstrado que o tratamento com óleo de soja promoveu o aumento da PSVE, em resposta a elevação das concentrações de Cálcio na solução de perfusão, tanto nos corações dos animais Sham Soja, como nos corações dos animais IM Soja.

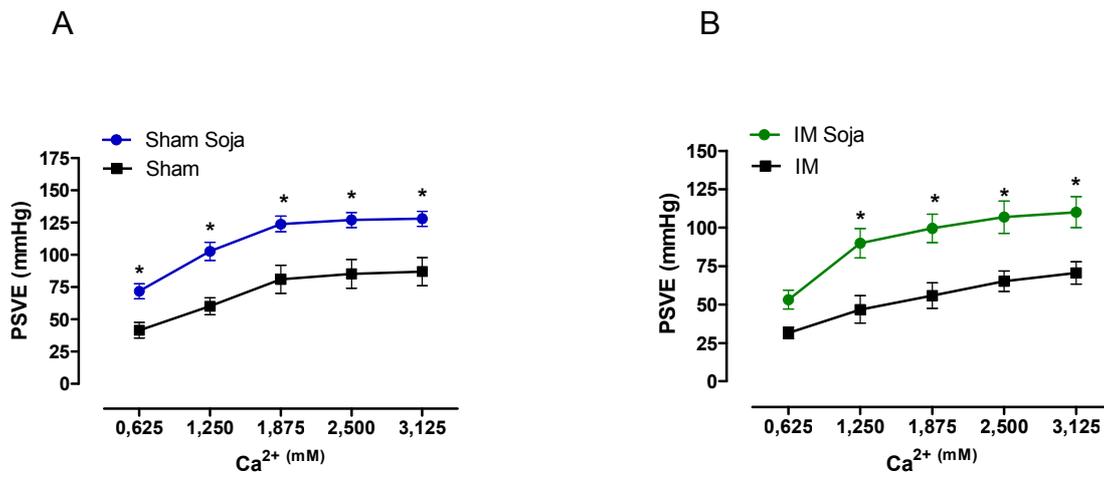


Figura – 14: Variação da PSVE (pressão sistólica de ventrículo esquerdo) em função das concentrações de Cálcio na solução de perfusão. (A) Grupos Sham e (B) Grupos Infarto (IM). (*) Diferente para $P < 0,05$.

Utilizamos uma única dose de $5 \mu\text{M}$ de Isoproterenol na solução de perfusão para estudo da resposta da estimulação de receptores β -adrenérgicos sobre a PSVE desenvolvida. Os valores foram apresentados em percentual de aumento em relação ao valor de PSVE prévio (PD de 10 mmHg e perfusão com $0,62 \text{ mM}$ de Ca^{++}). Como ficou demonstrado na Figura-15, o tratamento com óleo de soja não resultou em diferença na resposta β -adrenérgica entre os grupos.

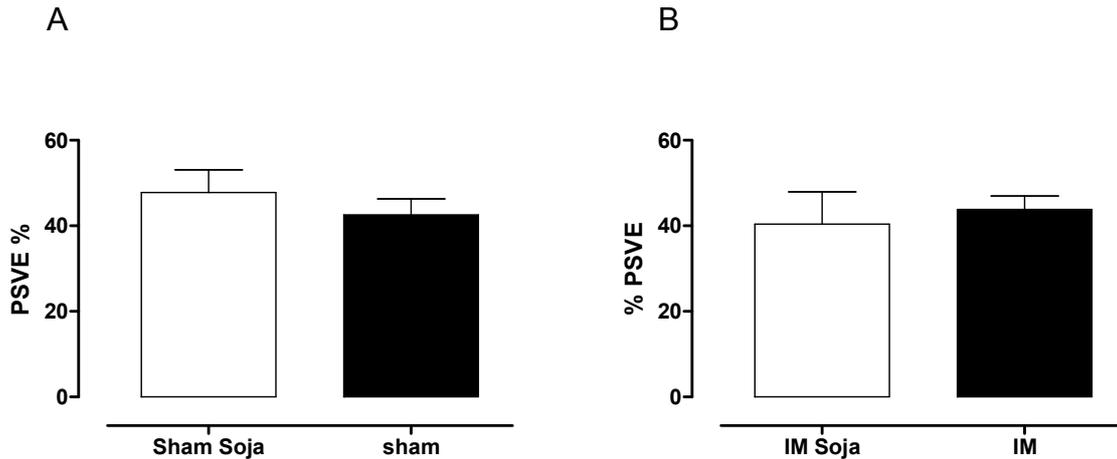


Figura – 15: Comparação dos percentuais de resposta a 5 μM de Isoproterenol. (A) Grupos Sham Soja (48.4 ± 12.3 %) e Sham (42.5 ± 9.6); (B) Grupos Infarto (IM) (40.4 ± 7.5) e Infarto Soja (43.8 ± 7.6).

5 DISCUSSÃO:

5.1 ÁREA DE INFARTO, MEDIDAS PONDERAIS E MEDIDAS HEMODINÂMICAS:

O melhor método para a determinação da área de infarto após a morte ainda não está totalmente definido e depende muito de quão tardiamente a necropsia é feita. Nos primeiros dias após o infarto, a área de necrose ainda não está totalmente delimitada, o que requer recursos histológicos mais elaborados como o método do trifetil-tetrazolio, o mais acurado nesse estágio (Tucci et al., 2009). Em nosso estudo, no entanto, a área de infarto foi determinada após quinze dias do infarto. Nesse tempo já é possível uma identificação segura da cicatriz, tornando factível a sua separação por transiluminação e a determinação de sua área por meio de planimetria em papel milimetrado. Tal método tem se mostrado reprodutível e de

baixo custo, e já foi utilizado em trabalhos prévios de nosso laboratório (Mill et al., 1990, Stefanon et al., 2009, Faria et al., 2011). Por meio dele nossos resultados demonstraram que não houve diferença com relação a área de infarto entre os grupos IM ($34.75 \pm 5.6 \%$) e IM Soja ($34.1 \pm 5.0 \%$).

Apesar da uniformidade no que concerne a área infartada, é sabido que animais com a mesma área de infarto podem ou não desenvolver quadro de insuficiência cardíaca, como já foi demonstrado por Pereira et al. (2005). A possibilidade de haver um subgrupo de animais infartados e insuficientes entre os nossos animais era de grande relevância, uma vez que tal fato tornaria problemática a comparação envolvendo os animais dos grupos infartados, em especial no que concerne a avaliação de possíveis efeitos inotrópicos do óleo de soja.

No já mencionado estudo de Pereira et al. (2005), foram utilizados, para a identificação dos animais infartados e insuficientes, os seguintes critérios: aumento de ao menos duas vezes no valor das relações PPU/PC e PVD/PC quando comparado aos mesmos valores do grupo Sham, e valor de PDFVE maior do que 15 mmHg. Os valores de PPU/PC dos nossos animais Sham ($5,8 \pm 1,1$ mg/g), Sham Soja ($6,9 \pm 1,4$ mg/g), IM ($6,0 \pm 1,4$ mg/g) e IM Soja ($6,6 \pm 1,1$ mg/g) não apresentaram diferença significativa. O mesmo pode ser dito quanto aos valores de PVD/PC: Sham ($0,6 \pm 0,08$ mg/g), Sham Soja ($0,6 \pm 0,11$ mg/g), IM ($0,73 \pm 0,15$ mg/g) e IM Soja ($0,7 \pm 0,14$ mg/g). Além disso, a PDFVE dos nossos grupos IM (6.37 ± 0.9 mmHg) e IM soja (4.72 ± 0.4 mmHg) se mantiveram abaixo dos 15 mmHg. Adicionalmente, em trabalho recente de Faria et al. (2011), ficou demonstrado que os animais infartados e insuficientes sofrem perda ponderal significativa ao longo do período pós-operatório, e que essa perda ponderal poderia ser utilizada como critério para detectar a insuficiência cardíaca nos animais infartados. Da mesma

forma, em nosso estudo não houve diferença significativa nos valores ponderais entre os grupos (Sham: 272 ± 23 g, Sham Soja: 280 ± 25 g, IM: 278 ± 27 g, e IM Soja: 288 ± 36 g). Assim, utilizando-se dos critérios previamente estabelecidos por Pereira et al. (2005) e por Faria et al. (2011), podemos afirmar, com significância estatística, que nossos grupos IM e IM Soja pertencem ao conjunto de animais infartados sem insuficiência cardíaca.

No que concerne às medidas pressóricas “in vivo” observamos que o infarto do miocárdio promoveu diminuição dos valores de PAS ($89,11 \pm 6,4$ mmHg) e PSVE ($95,19 \pm 7,3$ mmHg) no grupo infarto e que resultou também em aumento na PDFVE ($6,37 \pm 0,9$ mmHg) nesse mesmo grupo. Tais resultados estão em concordância com os valores obtidos para animais infartados e não insuficientes dos trabalhos de Pereira et al. (2005) e Faria et al. (2011). Quando então submetemos os animais infartados ao tratamento com o óleo de soja (grupo IM Soja), houve prevenção desse aumento na PAS: $108,6 \pm 9,5$ mmHg e na PDFVE: $4,72 \pm 0,4$ mmHg. Presumimos, portanto, que esse resultado deveu-se provavelmente à melhora do desempenho contrátil do ventrículo esquerdo, o que está em concordância com os resultados que obtivemos no grupo IM Soja com o método de perfusão de coração isolado “in vitro”.

5.2 CURVAS DE FUNÇÃO VENTRICULAR:

Quanto a análise do desempenho contrátil do ventrículo esquerdo “in vitro”, nossos resultados confirmaram que o infarto do miocárdio deprime a contratilidade do ventrículo esquerdo (figura – 10). Tal resposta, que nos serviu para reforçar a efetividade do procedimento de infarto, já havia sido demonstrado anteriormente por Stefanon et al. (1998) e portanto já era esperada. Além disso, constatamos que o tratamento com óleo de soja intramuscular por 15 dias, promoveu a melhora do desempenho contrátil ventricular nos animais Sham (figura – 11), como já havia sido demonstrado em nosso laboratório por Ribeiro Júnior et al. (2010).

Ao comparamos as curvas de PSVE dos corações dos ratos IM Soja (figura-12), com as curvas dos corações dos ratos IM, observamos um aumento na força de contração ventricular, à semelhança do que ocorre com os corações dos ratos Sham, demonstrando, também aqui, uma melhora na resposta inotrópica ventricular esquerda após o tratamento com óleo de soja. Nossos resultados demonstraram ainda que o referido tratamento trouxe a curva de PSVE dos corações dos ratos IM Soja para valores semelhantes aos apresentados pelos corações dos ratos Sham, não havendo diferença significativa entre as duas curvas mencionadas (figura-13).

Essa melhora do desempenho contrátil ventricular ocorreu também em resposta a elevação das concentrações de cálcio na solução de perfusão (figura – 14), tanto nos corações dos animais Sham Soja (repetindo mais uma vez os resultados prévios de Ribeiro Júnior et al., 2010), como nos corações dos animais IM Soja.

Nesse ponto esperávamos que esse padrão de melhora na contratilidade ventricular ocorreria também em resposta a administração de isoproterenol por meio da solução de perfusão, à semelhança do que havia sido obtido por Ribeiro Júnior et al. (2010). Para nossa surpresa, não houve diferença no padrão de resposta inotrópica ao isoproterenol entre nenhum dos quatro grupos. Cabe aqui ressaltar que, diferentemente de Ribeiro Júnior et al. (2010), nós utilizamos 5 μ M de Isoproterenol, o que representa metade da dose utilizada pelo grupo do mencionado autor. É sabido que a resposta aos agonistas β -adrenérgicos é dose dependente, e que nos animais infartados essa resposta é consideravelmente deprimida como já foi demonstrado por Stefanon et al. (1998). Sendo assim, supomos que a falta de melhora na contratilidade ventricular em resposta ao isoproterenol em nosso estudo, tenha se devido a utilização de uma menor dose do fármaco, entretanto esse fato necessita ser melhor esclarecido em estudos futuros.

Os nossos resultados deixam claro que algum componente do óleo de soja apresenta ação inotrópica positiva no ventrículo esquerdo tanto nos animais infartados quanto nos animais Sham, e que essa resposta se reflete na pressão arterial sistólica e na pressão diastólica final do ventrículo esquerdo dos animais infartados e tratados com óleo de soja. Cabe aqui, para delineamento de estudos futuros sobre o tema, uma discussão sobre o provável mecanismo desse efeito.

Em primeiro lugar vale lembrar que o óleo de soja é composto por 54,5% de Ácido Linoleico (AL), 23,2 % de Ácido Oleico (AO), 7,2% de Ácido α -Linolênico (ALA), 10,5% de Ácido Palmítico (AP) e 4,6% de outros ácidos graxos (Ohara et al., 2008). Destacamos dentre esses constituintes o AL, uma vez que, além de estar presente em maior proporção no óleo de soja, ele apresentou efeitos sobre a função

cardíaca em diversos estudos prévios (Mitchell et al., 2002; Kang et al., 1994; Pietri et al., 1991).

O AL é também o principal constituinte da cardiolipina mitocondrial cardíaca. Tal fato é de grande importância, uma vez que o coração apresenta uma demanda alta e continuada de energia e, portanto, deve gerar ATP em uma taxa bastante elevada para sustentar sua função contrátil, seu metabolismo basal e a homeostase iônica. Além disso, o infarto do miocárdio é um reconhecido indutor de desarranjos no metabolismo energético mitocondrial do miocárdio, resultando em uma depleção no fornecimento de ATP, sendo esse déficit energético um fator relevante na disfunção contrátil ventricular encontrada após o infarto (Heather et al., 2010).

Nasa et al. (1997) demonstraram que após 12 semanas do infarto do miocárdio havia uma diminuição da concentração de ácido linoleico no miocárdio remanescente. Estudos realizados por Lesnefsky et al. (2004), usando métodos de isquemia em coração isolado de coelho, indicaram que havia perda de 20 a 25% na concentração de cardiolipina miocárdica após a isquemia. Em outro estudo, Heather et al. (2010) demonstraram baixos níveis de cardiolipina e citocromo c em corações insuficientes de ratos submetidos ao infarto do miocárdio por ligadura da artéria coronária descendente anterior.

A participação da cardiolipina na modulação das proteínas da cadeia respiratória já foi demonstrada inúmeras vezes. Fry et al. (1981) demonstraram que os complexos I e III da cadeia respiratória (obtidos a partir de métodos de eluição) só tinham atividade enzimática na presença de cardiolipina. Em outro estudo Robinson et al. (1990), concluíram que o complexo IV dessa mesma cadeia necessita de duas moléculas de cardiolipina associadas para manter sua função enzimática. Em

mitocondrias isoladas de corações submetidos à isquemia/reperfusão e que tinham deficiência no funcionamento da cadeia respiratória, Hoffman et al. (1994) restauraram a funcionalidade da cadeia realizando tratamento com cardiolipina. Além disso, a cardiolipina está envolvida na manutenção da estabilidade osmótica da membrana mitocondrial, e portanto na manutenção do gradiente eletroquímico de prótons hidrogênio entre o espaço Inter membranas e o interior da mitocôndria (Chicco et al., 2007).

Partindo do exposto acima, fica claro que reduções nos níveis de cardiolipina na membrana mitocondrial interna, levarão a uma significativa diminuição no processo de fosforilação oxidativa mitocondrial resultando em queda nos níveis de ATP citosólico. Tal fato foi claramente demonstrado por Heather et al. (2010) utilizando-se de modelo de infarto do miocárdio semelhante ao que empregamos no presente estudo. Essa diminuição na concentração de ATP citosólico torna-se relevante, uma vez que ela tem sido considerada como um dos indutores do processo de remodelamento ventricular (Ingwall et al., 2004 e 2006).

Sabe-se que após o infarto, instala-se um estado de redução importante na concentração de fosfocreatina e do ATP. Normalmente o cardiomiócito apresenta uma taxa de hidrólise de ATP elevada ($\sim 30 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$) e uma concentração baixa de ATP ($5 \mu\text{mol/g}$), isso indica que a taxa de reciclagem do ATP total é muito alta, sendo estimada uma troca total do 'pool' de ATP a cada 10 segundos (Lopaschuk et al., 2010).

A manutenção de uma concentração constante de ATP é fundamental para o funcionamento normal do cardiomiócito. Para que isso ocorra houve o desenvolvimento de um mecanismo bioquímico robusto, com o intuito de se manter

uma concentração de ATP uniforme, mesmo em condições de aumento de demanda. Tal aparato envolve a síntese constante de ATP por meio da fosforilação oxidativa mitocondrial e a transferência de fosfato (Pi) da fosfocreatina (PCr) para o ADP catalisada pela creatino-quinase (CK) (Ingwall et al., 2004 e 2006). É sabido que, após o infarto do miocárdio, ambos os processos estão diminuídos, o que resulta em um ambiente citosólico pobre em ATP (Heather et al., 2010).

Levando-se em consideração que 75% do ATP produzido pelas mitocôndrias dos cardiócitos são gastos com a contração e que os demais 25 % são usados para manutenção da homeostase iônica, conclui-se que, a incapacidade mitocondrial em fornecer um suprimento adequado de ATP resultaria na utilização das reservas de fosfocreatina. Com a persistência do déficit na concentração de ATP, haveria o esgotamento progressivo da PCr, agravando ainda mais o déficit energético (Freya et al., 2006).

A estequiometria da reação $ADP + Pi \rightarrow ATP$ pode ser representada por um índice conhecido como “Potencial de fosforilação” (PF), definido por $[ATP] / [ADP][Pi]$. Quando o valor do PF é alto, há uma inibição da síntese de ATP e um favorecimento das reações que consomem ATP, quando o valor do PF é baixo ocorre o contrário. Tal fato demonstra que a manutenção de uma concentração constante de ATP é determinante para diversos aspectos do metabolismo celular. Quando, por alguma razão, os mecanismos responsáveis pela manutenção da concentração de ATP (fosfocreatina e síntese mitocondrial) falham, o cardiomiócito promove uma alteração fenotípica com o intuito de se adaptar às menores concentrações de ATP (Ingwall et al., 2006).

De fato, a queda nas concentrações de ATP resulta na ativação de fatores transcripcionais envolvidos no processo de remodelamento ventricular. Com a diminuição da razão entre ATP : AMP, há a ativação da AMPK (do inglês: "AMP-Activated Protein Kinase"), que por sua vez ativa três outros fatores: o PPAR- γ (do Inglês: "Peroxisome Proliferator Activated Receptor"), o PGC-1 α (do Inglês: "Proliferator Gamma Coactivator") e o MEF-2 (do Inglês: "Myocyte Enhancer Factor-2"). Todos os três fatores mencionados estão associados ao aumento ou diminuição da expressão de genes que controlam a síntese de miofilamentos e o metabolismo energético mitocondrial (Czubryt et al., 2004; Finck et al., 2007).

Dentre as alterações moleculares que ocorrem no miocárdio insuficiente, e que podem estar relacionadas à disfunção mitocondrial e à queda nas concentrações de ATP, encontram-se: 1- aumento da expressão da isoforma β da cadeia pesada da miosina que possui menor atividade ATPásica e que desenvolve menos força contrátil, 2- redução quantitativa da SERCA 2a, da expressão da Fosfolamban e dos canais de Rianodina no retículo sarcoplasmático, levando a uma maior dependência do ciclo de cálcio extracelular, 3- diminuição de atividade da bomba de sódio/potássio e aumento nos níveis do trocador sódio/cálcio na membrana citoplasmática (Dixon et al., 1992, Gómez et al., 2002, Talukder et al., 2008, Sallinen et al., 2007, Katz, 2006).

Em suma, a queda nas concentrações de ATP funcionaria como um indutor do remodelamento miocárdico. Corroborando tal fato, tem-se um modelo natural que é a Síndrome de Barth, uma doença genética com padrão de hereditariedade recessivo ligado ao X, onde há uma marcante deficiência quantitativa e qualitativa na síntese de cardiolipina, resultando em cardiomiopatia com dilatação biventricular infanto-juvenil decorrentes do déficit de ATP mitocondrial (Schlame et al., 2006).

Em estudo realizado por Heather et al. (2010), ficou demonstrado que a produção de H₂O₂ estava significativamente aumentada em corações de ratos após o infarto do miocárdio, e que os corações com piores índices de função ventricular tinham os mais baixas concentrações de cardiolipina e os maiores níveis de produção de H₂O₂, e ainda estavam associados a disfunção importante no complexo III da cadeia respiratória. Nesse mesmo estudo, o tratamento com cardiolipina restabeleceu totalmente a atividade do complexo III, sugerindo fortemente que a cardiolipina sofreu peroxidação por radicais livres, resultando na disfunção mitocondrial.

A peroxidação da cardiolipina mitocondrial por radicais livres foi implicada também na disfunção ventricular em decorrência do envelhecimento por Savitha et al. (2007), sendo que nesse mesmo estudo a coadministração de L-Carnitina e Ácido Lipóico restabeleceu os níveis de cardiolipina e conseqüentemente a função mitocondrial.

Soma-se a isso o fato de que, na disfunção ventricular decorrente do envelhecimento, também há diminuição na expressão da SERCA 2a (Schmidt et al., 2000). Além disso, sabe-se que durante o envelhecimento há uma troca progressiva da isoforma α da cadeia pesada da miosina pela isoforma β à semelhança do que ocorre após o infarto, e que tal substituição tem sido atribuída a um processo adaptativo aos menores níveis de ATP conseqüentes à disfunção mitocondrial (Gupta et al., 2007). O envelhecimento, portanto, promove um declínio progressivo na contratilidade ventricular, possivelmente em decorrência de disfunção mitocondrial miocárdica, o que é um fato comum ao infarto do miocárdio.

Em estudo de suplementação dietética, Mulligan et al (2012) demonstraram que uma dieta rica em ácido linoleico (AL) preservou as concentrações de cardioplipina durante o desenvolvimento da insuficiência cardíaca em ratos espontaneamente hipertensos, e reduziu significativamente a hipertrofia e a disfunção sistólica nos mesmos animais. A administração de óleo de soja intramuscular realizada por Ribeiro Júnior et al. em estudo prévio e por nós no presente estudo, poderia de forma semelhante, ter funcionado como uma forma de reposição de Ácido Linoléico (AL).

Novas questões surgem deste ponto: seria possível que o tratamento com óleo de soja intramuscular tenha restaurado os níveis de cardioplipina e conseqüentemente melhorado a função mitocondrial? Será que a melhora da função mitocondrial por sua vez, poderia ter impedido a instalação das alterações fenotípicas decorrentes dos baixos níveis de ATP citosólico? Seria essa a explicação para o aumento da atividade da ATPase miosínica (por provável aumento da isoforma α da miosina) e da atividade da Na^+/K^+ ATPase, o aumento na expressão da SERCA2a e do NCX, observados por Ribeiro Junior et al. e para a melhora no desempenho contrátil do ventrículo esquerdo infartado que obtivemos por meio do referido tratamento? Ainda carecemos de novos estudos para obtenção dessas respostas.

6 CONCLUSÃO:

Concluimos com o presente trabalho que:

- O tratamento de ratos infartados com óleo de soja intramuscular por quinze dias preveniu a redução de contratilidade ventricular esquerda e promoveu aumento na PAS e diminuição da PDFVE, sem alterar a área de infarto e nem os parâmetros ponderais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- Aguila MB, Pinheiro AR, Mandarim-de-Lacerda CA. Spontaneously hypertensive rats left ventricular cardiomyocyte loss attenuation through different edible oils long-term intake. *Int J Cardiol.* 2005 Apr 28;100(3):461-6.
- Abdukeyum GG, Owen AJ, McLennan PL. Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. *J Nutr.* 2008 Oct;138(10):1902-9.
- Alberts, A. *Biologia molecular da célula.* Tradução Ana Beatriz Gorine et al. 4a ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
- An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Oct;291(4):H1489-506.
- Anderson KE, Du XJ, Sinclair AJ, Woodcock EA, Dart AM. Dietary fish oil prevents reperfusion $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ release in rat heart: possible antiarrhythmic mechanism. *Am J Physiol.* 1996 Oct;271(4 Pt 2):H1483-90.
- Arai M, Alpert NR, MacLennan DH, Barton P, Periasamy M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ Res.* 1993 Feb;72(2):463-9.

- Baartscheer A, Hardziyenka M, Schumacher CA, Belterman CN, van Borren MM, Verkerk AO, Coronel R, Fiolet JW. Chronic inhibition of the Na⁺/H⁺ - exchanger causes regression of hypertrophy, heart failure, and ionic and electrophysiological remodelling. *Br J Pharmacol*. 2008 Jul;154(6):1266-75.
- Bautista-Ortega J, Goeger DE, Cherian G. Egg yolk omega-6 and omega-3 fatty acids modify tissue lipid components, antioxidant status, and ex vivo eicosanoid production in chick cardiac tissue. *Poult Sci*. 2009 Jun;88(6):1167-75.
- Barter P, Ginsberg HN. Effectiveness of combined statin plus omega-3 fatty acid therapy for mixed dyslipidemia. *Am J Cardiol*. 2008 Oct 15;102(8):1040-5.
- Bays HE. Safety considerations with omega-3 fatty acid therapy. *Am J Cardiol*. 2007 Mar 19;99(6A):35C-43C.
- Baylin A, Kabagambe EK, Ascherio A, Spiegelman D, Campos H. Adipose tissue alpha-linolenic acid and nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica. *Circulation*. 2003 Apr 1;107(12):1586-91.
- Billman GE, Kang JX, Leaf A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure omega-3 polyunsaturated fatty acids in dogs. *Circulation*. 1999 May 11;99(18):2452-7.
- Boger-Megiddo I, Heckbert SR, Weiss NS, McKnight B, Furberg CD, Wiggins KL, Delaney JA, Siscovick DS, Larson EB, Lemaitre RN, Smith NL, Rice KM, Glazer NL, Psaty BM. Myocardial infarction and stroke associated with diuretic based two drug antihypertensive regimens: population based case-control study. *BMJ*. 2010 Jan 25;340:c103.

- Busatto VC, Cicilini MA, Mill JG. Increased angiotensin-converting enzyme activity in the left ventricle after infarction. *Braz J Med Biol Res.* 1997 May;30(5):679-87.
- Broderick TL, Glick B. Effect of gender and fatty acids on ischemic recovery of contractile and pump function in the rat heart. *Gend Med.* 2004 Dec;1(2):86-99.
- Carnieto A Jr, Dourado PM, Luz PL, Chagas AC. Selective cyclooxygenase-2 inhibition protects against myocardial damage in experimental acute ischemia. *Clinics (Sao Paulo).* 2009;64(3):245-52.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of coronary heart disease--United States, 2006-2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011 Oct 14;60(40):1377-81.
- Chemin S.M.S.S.; Mura J. D. P. *Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia.* 2ª ed. São Paulo: Roca. 2010.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem.* 2003 Sep 19;278(38):36027-31.
- Chicco AJ, Sparagna GC. Role of cardiolipin alterations in mitochondrial dysfunction and disease. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007 Jan;292(1):C33-44.
- Chicco AJ, Sparagna GC, McCune SA, Johnson CA, Murphy RC, Bolden DA, Rees ML, Gardner RT, Moore RL. Linoleate-rich high-fat diet decreases mortality in hypertensive heart failure rats compared with lard and low-fat diets. *Hypertension.* 2008 Sep;52(3):549-55.

- Chien KR, Sen A, Buja LM, Willerson JT Membrane phospholipid metabolism during myocardial ischaemia: past, present and future. *Basic Res Cardiol*. 1987;82 Suppl 1:121-5. Review.
- Choi SY, Gonzalez F, Jenkins GM, Slomianny C, Chretien D, Arnoult D, Petit PX, Frohman MA. Cardiolipin deficiency releases cytochrome c from the inner mitochondrial membrane and accelerates stimuli-elicited apoptosis. *Cell Death Differ*. 2007 Mar;14(3):597-606.
- Chor D, da Fonseca MJ, de Andrade CR. Cardiovascular diseases. Comments on early mortality in Brazil. *Arq Bras Cardiol*. 1995 Jan;64(1):15-9.
- Christensen K. Influence of different dietary concentrations of linoleic acid on the essential fatty acid (EFA) status and functional characteristics of porcine hepatic and cardiac mitochondria. *Comp Biochem Physiol B*. 1986;85(2):419-25.
- Crawford, M. A. The Role of Dietary Fatty Acids in Biology: Their Place in the Evolution of the Human Brain. *Nutrition Reviews*, Apr 27, 2009 50: 3–11.
- Cundiff DK, Lanou AJ, Nigg CR. Relation of omega-3 Fatty Acid intake to other dietary factors known to reduce coronary heart disease risk. *Am J Cardiol*. 2007 May 1;99(9):1230-3.
- Czubryt MP, Olson EN. Balancing contractility and energy production: the role of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) in cardiac hypertrophy. *University of Texas Recent Prog Horm Res*. 2004;59:105-24.
- DATA-SUS. Banco de dados do Sistema Único de Saúde. Notícias, produtos, serviços e dados sobre a saúde do Brasil. <http://www.datasus.gov.br>

- de Resende MM, Mill JG. Effect of high salt intake on local renin-angiotensin system and ventricular dysfunction following myocardial infarction in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007 Apr;34(4):274-9.
- de Tombe PP, Mateja RD, Tachampa K, Ait Mou Y, Farman GP, Irving TC. Myofilament length dependent activation. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 May;48(5):851,8.
- Decker RS, Cook MG, Behnke-Barclay MM, Decker ML, Lesch M, Samarel AM. Catecholamines modulate protein turnover in cultured, quiescent rabbit cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 1993 Jul;265(1 Pt 2):H329-39.
- DiMauro Salvatori. *Mitochondrial Myopathies*. *Curr Opin Rheumatol* 18:636-641. 2006, Lippincott Williams & Wilkins.
- Dixon IM, Hata T, Dhalla NS. Sarcolemmal Na(+)-K(+)-ATPase activity in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1992 Mar;262(3 Pt 1):C664-71.
- Dominiak P, Türck D. Alterations of beta-adrenoceptors subsequent to myocardial infarction. *Basic Res Cardiol*. 1986;81 Suppl 1:243-51.
- Eritsland J, Arnesen H, Seljeflot I, Høstmark AT. Long-term metabolic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in patients with coronary artery disease. *Am J Clin Nutr*. 1995 Apr;61(4):831-6.
- Eritsland J, MD, Harald Arnesen, MD, PhD, Knut Grønseth, MD, Nils B. Fjeld, MD, Michael Abdelnoor, MPH, PhD. Effect of dietary supplementation with n-3 fatty acids on coronary artery bypass graft patency. *American Journal of Cardiology* Volume 77, Issue 1 , Pages 31-36, 1 January 1996.

- Faria Tde O, Baldo MP, Simões MR, Pereira RB, Mill JG, Vassallo DV, Stefanon I. Body weight loss after myocardial infarction in rats as a marker of early heart failure development. *Arch Med Res*. 2011 May;42(4):274-80.
- Finck BN, Kelly DP. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest*. 2006 Mar;116(3):615-22.
- Finck BN, Kelly DP. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. *Circulation*. 2007 May 15;115(19):2540-8.
- Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol*. 1978 Jan;90(1):57-70.
- Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. The histopathologic evolution of myocardial infarction. *Chest*. 1978 Jun;73(6):843-9.
- Furukawa Y, Matsumori A, Hwang MW, Hirozane T, Ono K, Shioi T, Sasayama S. Cytokine gene expression during the development of graft coronary artery disease in mice. *Jpn Circ J*. 1999 Oct;63(10):775-82.
- Frey L, Sheeran, Salvatore Pepe, Energy deficiency in the failing heart: Linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics* Volume 1757, Issues 5–6, May–June 2006, Pages 543–552.
- Fry M, Green DE. Cardiolipin requirement for electron transfer in complex I and III of the mitochondrial respiratory chain. *J Biol Chem*. 1981 Feb 25;256(4):1874-80.

- Goel DP, Vecchini A, Panagia V, Pierce GN. Altered cardiac Na(+)/H(+) exchange in phospholipase D-treated sarcolemmal vesicles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Sep;279(3):H1179-84.
- Goel DP, Maddaford TG, Pierce GN. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on cardiac sarcolemmal Na(+)/H(+) exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Oct;283(4):H1688-94.
- Gómez AM, Schwaller B, Porzig H, Vassort G, Niggli E, Egger M. Increased exchange current but normal Ca²⁺ transport via Na⁺-Ca²⁺ exchange during cardiac hypertrophy after myocardial infarction. *Circ Res*. 2002 Aug 23;91(4):323-30.
- Grynberg A, Fournier A, Sergiel JP, Athias P. Effect of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the phospholipids of rat heart muscle cells on adrenoceptor responsiveness and mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. 1995 Nov;27(11):2507-20.
- Guo YF, Zhang XX, Liu Y, Duan HY, Jie BZ, Wu XS. Neuregulin-1 attenuates mitochondrial dysfunction in a rat model of heart failure. *Chin Med J (Engl)*. 2012 Mar;125(5):807-14.
- Gupta A, Akki A, Wang Y, Leppo MK, Chacko VP, Foster DB, Caceres V, Shi S, Kirk JA, Su J, Lai S, Paolocci N, Steenbergen C, Gerstenblith G, Weiss RG. Creatine kinase-mediated improvement of function in failing mouse hearts provides causal evidence the failing heart is energy starved. *J Clin Invest*. 2012 Jan 3;122(1):291-302.

- Gupta MP. Factors controlling cardiac myosin-isoform shift during hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 Oct;43(4):388-403.
- Hagen MK, Lehenbauer-Lüdke AR, Paludo AC, Schenkel P, Gonçalves L, Fernandes TG, Caron R, Llesuy S, Mill JG, Belló-Klein A. Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and preserves ventricular function in rats with myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2009 Feb;19(2):91-7.
- Hallaq H, Smith TW, Leaf A. Modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in heart cells by fish oil fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Mar 1;89(5):1760-4.
- Harper CR, Jacobson TA. Usefulness of omega-3 fatty acids and the prevention of coronary heart disease.. Takeo S, Nasa Y, Tanonaka K, Yabe K, Nojiri M, Hayashi M, Sasaki H, Ida K, Yanai K. Effects of long-term treatment with eicosapentaenoic acid on the heart subjected to ischemia/reperfusion and hypoxia/reoxygenation in rats. *Am J Cardiol.* 2005 Dec 1;96(11):1521-9.
- Harris WS, Reid KJ, Sands SA, Spertus JA. Blood omega-3 and trans fatty acids in middle-aged acute coronary syndrome patients. *Am J Cardiol.* 2007 Jan 15;99(2):154-8.
- Harris WS, Assaad B, Poston WC. Tissue omega-6/omega-3 fatty acid ratio and risk for coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2006 Aug 21;98(4A):19i-26i.
- Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H. Relationship between Na⁺-Ca²⁺-exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation.* 1999 Feb 9;99(5):641.

- Heather LC, Carr CA, Stuckey DJ, Pope S, Morten KJ, Carter EE, Edwards LM, Clarke K. Critical role of complex III in the early metabolic changes following myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2010 Jan 1;85(1):127-36.
- Hensler M, Bardova K, Jilkova ZM, Wahli W, Meztger D, Chambon P, Kopecky J, Flachs P. The inhibition of fat cell proliferation by n-3 fatty acids in dietary obese mice. *Lipids Health Dis.* 2011 Aug 2;10:128.
- Hock CE, Beck LD, Bodine RC, Reibel DK. Influence of dietary n-3 fatty acids on myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol.* 1990 Nov;259(5 Pt 2):H1518-26.
- Hoffman BM., Zhou JS. Stern-volmer in reverse: 2:1 stoichiometry of the cytochrome c-cytochrome c peroxidase electron-transfer complex. *Science.* 1994 Sep 16;265(5179):1693-6.
- Hoppel CL, Tandler B, Fujioka H, Riva A. Dynamic organization of mitochondria in human heart and in myocardial disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Oct;41(10):1949-56.
- Houtkooper RH, Akbari H, van Lenthe H, Kulik W, Wanders RJ, Frentzen M, Vaz FM. Identification and characterization of human cardiolipin synthase. *FEBS Lett.* 2006 May 29;580(13):3059-64.
- Houtkooper RH, Vaz FM. Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci.* 2008 Aug;65(16):2493-506.
- Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res.* 2004 Jul 23;95(2):135-45.

- Ingwall JS. Energetics of the failing heart: new insights using genetic modification in the mouse. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2006 Sep;99(9):839-47.
- Ingwall JS. On the hypothesis that the failing heart is energy starved: lessons learned from the metabolism of ATP and creatine. *Curr Hypertens Rep*. 2006 Dec;8(6):457-64.
- Jacobson TA. Secondary prevention of coronary artery disease with omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol*. 2006 Aug 21;98(4A):61i-70i.
- Jerardino A, Marean CW. Shellfish gathering, marine paleoecology and modern human behavior: perspectives from cave PP13B, Pinnacle Point, South Africa. *J Hum Evol*. 2010 Sep-Oct;59(3-4):412-24.
- Jing Fang, MD, Kate M. Shaw, MS, Nora L. Keenan, PhD. Prevalence of Coronary Heart Disease: United States, 2006—2010. Div for Heart Disease and Stroke Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion. October 14, 2011 / 60(40);1377-1381.
- Kang JX, Leaf A. Effects of long-chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Oct 11;91(21):9886-90.
- Kasama S, Furuya M, Toyama T, Ichikawa S, Kurabayashi M. Effect of atrial natriuretic peptide on left ventricular remodeling in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2008 Jun;29(12):1485-94.
- Kinoshita I, Itoh K, Nishida-Nakai M, Hirota H, Otsuji S, Shibata N. Antiarrhythmic effects of eicosapentaenoic acid during myocardial infarction--enhanced cardiac microsomal (Ca²⁺)-Mg²⁺)-ATPase activity. *Jpn Circ J*. 1994 Dec;58(12):903-12.

- Koretsune Y, Corretti MC, Kusuoka H, Marban E. Mechanism of early ischemic contractile failure. Inexcitability, metabolite accumulation, or vascular collapse? *Circ Res.* 1991 Jan;68(1):255-62.
- Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Huth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr.* 2000 Jan;71(1 Suppl):179S-88S.
- Labeledzka K, Grzanka A, Izdebska M. Mitochondria and cell death. *Postepy Hig Med Dosw.* 2006;60:439-46. Review.
- Laskowski KR, Russell RR 3rd. Uncoupling proteins in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* 2008 Jun;5(2):75-9.
- Lee GJ, Kim SK, Kang SW, Kim OK, Chae SJ, Choi S, Shin JH, Park HK, Chung JH. Real time measurement of myocardial oxygen dynamics during cardiac ischemia-reperfusion of rats. *Analyst.* 2012 Sep 26.
- Lemaitre RN, King IB, Mozaffarian D, Kuller LH, Tracy RP, Siscovick DS. n-3 Polyunsaturated fatty acids, fatal ischemic heart disease, and nonfatal myocardial infarction in older adults: the Cardiovascular Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2003 Feb;77(2):319-25.
- Leshnower BG, Sakamoto H, Hamamoto H, Zeeshan A, Gorman JH 3rd, Gorman RC. Progression of myocardial injury during coronary occlusion in the collateral-deficient heart: a non-wavefront phenomenon. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Sep;293(3):H1799-804.

- Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hassan MO, Tandler B, Hoppel CL. Ischemia, rather than reperfusion, inhibits respiration through cytochrome oxidase in the isolated, perfused rabbit heart: role of cardiolipin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Jul;287(1):H258-67.
- Lewandowski AJ, Lazdam M, Davis E, Kylintireas I, Diesch J, Francis J, Neubauer S, Singhal A, Lucas A, Kelly B, Leeson P. Short-term exposure to exogenous lipids in premature infants and long-term changes in aortic and cardiac function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011 Sep;31(9):2125-35.
- Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS, Stanley WC. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev*. 2010 Jan;90(1):207-58.
- Mahan L. K.; Escott-Stump S. Krause. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 10^a ed. São Paulo: Roca, 2005.
- Marean CW, Bar-Matthews M, Bernatchez J, Fisher E, Goldberg P, Herries AI, Jacobs Z, Jerardino A, Karkanas P, Minichillo T, Nilssen PJ, Thompson E, Watts I, Williams HM. Early human use of marine resources and pigment in South Africa during the Middle Pleistocene. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):905-8.
- McCance AJ, Thompson PA, Forfar JC. Increased cardiac sympathetic nervous activity in patients with unstable coronary heart disease. *Eur Heart J*. 1993 Jun;14(6):751-7.
- McLennan PL, Abeywardena MY, Charnock JS. Influence of dietary lipids on arrhythmias and infarction after coronary artery ligation in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1985 Nov;63(11):1411-7.

- McMillin JB, Dowhan W. Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 30;1585(2-3):97-107.
- Meyrelles SS, Mauad H, Mathias SC, Cabral AM, Vasquez EC. Effects of myocardial hypertrophy on neural reflexes controlling cardiovascular function. *J Auton Nerv Syst*. 1998 Nov 10;73(2-3):135-42.
- Michiel J. Janse. Electrophysiological changes in heart failure and their relationship to arrhythmogenesis. *Cardiovascular Research* 61 (2004) 208 – 217.
- Mill JG, Milanez Mda C, Busatto VC, de Moraes AC, Gomes Mda G. Activation of the cardiac angiotensin-converting enzyme after myocardial infarction and its role in ventricular remodeling. *Arq Bras Cardiol*. 1997 Aug;69(2):101-10.
- Mill JG, Milanez Mda C, Stefanon I. Fisiopatologia das alterações estruturais e funcionais do coração após o infarto do miocárdio. *Fisiopatologia em medicina cardiovascular – 2001 – Editora RevinteR Ltda*. Pag. 257-280.
- Mill JG, Leite CM, Vassallo DV. Effects of sympathetic block on post-infarction cardiac hypertrophy and their impact on myocardial contractility. *Arq Bras Cardiol*. 1991 Dec;57(6):435-43.
- Mill JG, Stefanon I, dos Santos L, Baldo MP. Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart failure. *Braz J Med Biol Res* 2011 Sep;44(9):890-8
- Mill JG, Stefanon I, Leite CM, Vassallo DV. Changes in performance of the surviving myocardium after left ventricular infarction in rats. *Cardiovasc Res*. 1990 Sep;24(9):748-53.

- Mitchell LA, Grant DF, Melchert RB, Petty NM, Kennedy RH. Linoleic acid metabolites act to increase contractility in isolated rat heart. *Cardiovasc Toxicol.* 2002;2(3):219-30.
- Mullane KM, Read N, Salmon JA, Moncada S. Role of leukocytes in acute myocardial infarction in anesthetized dogs: relationship to myocardial salvage by anti-inflammatory drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 1984 Feb;228(2):510-22.
- Mulligan CM, Sparagna GC, Le CH, De Mooy AB, Routh MA, Holmes MG, Hickson-Bick DL, Zarini S, Murphy RC, Xu FY, Hatch GM, McCune SA, Moore RL, Chicco AJ. Dietary linoleate preserves cardiolipin and attenuates mitochondrial dysfunction in the failing rat heart. *Cardiovasc Res.* 2012 Jun 1;94(3):460-8.
- Naito Y, Kasama K, Yoshida H, Ohara N. Thirteen-week dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat in Wistar Kyoto rats-change in blood pressure. *Food Chem Toxicol.* 2000 Sep;38(9):811-6.
- Naito Y, Yoshida H, Nagata T, Tanaka A, Ono H, Ohara N. Dietary intake of rapeseed oil or soybean oil as the only fat nutrient in spontaneously hypertensive rats and Wistar Kyoto rats - blood pressure and pathophysiology. *Toxicology.* 2000 May 5;146(2-3):197-208.
- Naito Y, Konishi C, Ohara N. Blood coagulation and osmolar tolerance of erythrocytes in stroke-prone spontaneously hypertensive rats given rapeseed oil or soybean oil as the only dietary fat. *Toxicol Lett.* 2000 Aug 16;116(3):209-15.
- Nasa Y, Sakamoto Y, Sanbe A, Sasaki H, Yamaguchi F, Takeo S. Changes in fatty acid compositions of myocardial lipids in rats with heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.* 1997 Nov;176(1-2):179-89.

- Ohara N, Naito Y, Kasama K, Shindo T, Yoshida H, Nagata T, Okuyama H. Similar changes in clinical and pathological parameters in Wistar Kyoto rats after a 13-week dietary intake of canola oil or a fatty acid composition-based interesterified canola oil mimic. *Food Chem Toxicol.* 2009 Jan;47(1):157-62.
- Ohara N, Kasama K, Naito Y, Nagata T, Saito Y, Kuwagata M, Okuyama H. Different effects of 26-week dietary intake of rapeseed oil and soybean oil on plasma lipid levels, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and cyclooxygenase-2 expression in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem Toxicol.* 2008 Jul;46(7):2573-9.
- O'Keefe JH Jr, Abuissa H, Sastre A, Steinhaus DM, Harris WS. Effects of omega-3 fatty acids on resting heart rate, heart rate recovery after exercise, and heart rate variability in men with healed myocardial infarctions and depressed ejection fractions. *Am J Cardiol.* 2006 Apr 15;97(8):1127-30.
- Okumura K, Nishiura T, Shimizu K, Iwama Y, Kondo J, Hashimoto H, Ito T. Fatty acid composition in 1,2-diacylglycerol of diabetic and insulin-treated diabetic rat hearts. *Jpn Heart J.* 1991 Sep;32(5):667-73.
- Olivetti G, Capasso JM, Sonnenblick EH, Anversa P. Side-to-side slippage of myocytes participates in ventricular wall remodeling acutely after myocardial infarction in rats. *Circ Res.* 1990 Jul;67(1):23-34.
- Ono K, Matsumori A, Shioi T, Furukawa Y, Sasayama S. Cytokine gene expression after myocardial infarction in rat hearts: possible implication in left ventricular remodeling. *Circulation.* 1998 Jul 14;98(2):149-56

- Ovsepyan AA, Panchenkov DN, Prokhortchouk EB, Telegin GB, Zhigalova NA, Golubev EP, Sviridova TE, Matskeplishvili ST, Skryabin KG, Buziashvili UI, Patterson AJ, Zhang L. Modeling myocardial infarction in mice: methodology, monitoring, pathomorphology. *Acta Naturae*. 2011 Jan;3(1):107-15.
- Palojoki E, Saraste A, Eriksson A, Pulkki K, Kallajoki M, Voipio-Pulkki LM, Tikkanen I. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jun;280(6):H2726-31.
- Pereira RB, Sartório CL, Vassallo DV, Stefanon I. Differences in tail vascular bed reactivity in rats with and without heart failure following myocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Mar;312(3):1321-5.
- Periasamy M, Bhupathy P, Babu GJ. Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase pump expression and its relevance to cardiac muscle physiology and pathology. *Cardiovasc Res*. 2008 Jan 15;77(2):265-73.
- Pietri S, Bernard M, Cozzone PJ. Hydrodynamic and energetic aspects of exogenous free fatty acid perfusion in the isolated rat heart during high flow anoxia and reoxygenation: a ³¹P magnetic resonance study. *Cardiovasc Res*. 1991 May;25(5):398-406.
- Pinto VD, Cutini GJ, Sartório CL, Paigel AS, Vassallo DV, Stefanon I. Enhanced beta-adrenergic response in rat papillary muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase after myocardial infarction. *Acta Physiol (Oxf)*. 2007 Jun;190(2):111-7.
- Psota TL, Gebauer SK, Kris-Etherton P. Dietary omega-3 fatty acid intake and cardiovascular risk. *Am J Cardiol*. 2006 Aug 21;98(4A):3i-18i.

- Rastogi T, Reddy KS, Vaz M, Spiegelman D, Prabhakaran D, Willett WC, Stampfer MJ, Ascherio A. Diet and risk of ischemic heart disease in India. *Am J Clin Nutr.* 2004 Apr;79(4):582-92.
- Reiffel JA, McDonald A. Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.* 2006 Aug 21;98(4A):50i-60i.
- Ribeiro Junior RF, Fernandes AA, Meira EF, Batista PR, Siman FD, Vassallo DV, Padilha AS, Stefanon I. Soybean oil increases SERCA2a expression and left ventricular contractility in rats without change in arterial blood pressure. *Lipids Health Dis.* 2010 May 26;9:53.
- Robinson JG, Stone NJ. Antiatherosclerotic and antithrombotic effects of omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol.* 2006 Aug 21;98(4A):39i-49i.
- Robinson NC, Zborowski J, Talbert LH. Cardiolipin-depleted bovine heart cytochrome c oxidase: binding stoichiometry and affinity for cardiolipin derivatives. *Biochemistry.* 1990 Sep 25;29(38):8962-9.
- Rosca M, Minkler P, Hoppel CL. Cardiac mitochondria in heart failure: normal cardiolipin profile and increased threonine phosphorylation of complex IV. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Nov;1807(11):1373-82.
- Rubinstein A., Colantoniol L., Bardachl A., Caporalel J., Martíl S.G., Kopitowskill K., Alcarazl A., Gibbons L., Augustovskil F., Pichón-Rivièrel A. Estimación de la carga de las enfermedades cardiovasculares atribuible a factores de riesgo modificables en Argentina. *Rev Panam Salud Publica* vol.27 no.4 Washington Apr. 2010.

- Saini-Chohan HK, Holmes MG, Chicco AJ, Taylor WA, Moore RL, McCune SA, Hickson-Bick DL, Hatch GM, Sparagna GC. Cardiolipin biosynthesis and remodeling enzymes are altered during development of heart failure. *J Lipid Res.* 2009 Aug;50(8):1600-8.
- Sallinen P, Mänttari S, Leskinen H, Ilves M, Ruskoaho H, Saarela S. Time course of changes in the expression of DHPR, RyR(2), and SERCA2 after myocardial infarction in the rat left ventricle. *Mol Cell Biochem.* 2007 Sep;303(1-2):97-103.
- Samarel AM. Costameres, focal adhesions, and cardiomyocyte mechanotransduction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Dec;289(6):H2291-301.
- Santos PE, Barcellos LC, Mill JG, Masuda MO. Ventricular action potential and L-type calcium channel in infarct-induced hypertrophy in rats. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1995 Nov;6(11):1004-14.
- Savitha S, Panneerselvam C. Mitigation of age-dependent oxidative damage to DNA in rat heart by carnitine and lipoic acid. *Mech Ageing Dev.* 2007 Feb;128(2):206-12
- Schlame M, Ren M. Barth syndrome, a human disorder of cardiolipin metabolism. *FEBS Lett.* 2006 Oct 9;580(23):5450-5.
- Schlame M. Cardiolipin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res.* 2008 Aug;49(8):1607-20.
- Schlame M, Ren M. The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Oct;1788(10):2080-3.

- Schmidt U, del Monte F, Miyamoto MI, Matsui T, Gwathmey JK, Rosenzweig A, Hajjar RJ. Restoration of diastolic function in senescent rat hearts through adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Circulation*. 2000 Feb 22;101(7):790-6.
- Shah KB, Duda MK, O'Shea KM, Sparagna GC, Chess DJ, Khairallah RJ, Robillard-Frayne I, Xu W, Murphy RC, Des Rosiers C, Stanley WC. The cardioprotective effects of fish oil during pressure overload are blocked by high fat intake: role of cardiac phospholipid remodeling. *Hypertension*. 2009 Sep;54(3):605-11.
- Sheeran FL, Pepe S. Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *Biochim Biophys Acta*. 2006 May-Jun;1757(5-6):543-52. Epub 2006 Apr 5.
- Shin SH, Hung CL, Uno H, Hassanein AH, Verma A, Bourgoun M, Køber L, Ghali JK, Velazquez EJ, Califf RM, Pfeffer MA, Solomon SD. Mechanical dyssynchrony after myocardial infarction in patients with left ventricular dysfunction, heart failure, or both. *Circulation*. 2010 Mar 9;121(9):1096-103.
- Smolina K, Wright FL, Rayner M, Goldacre MJ. Determinants of the decline in mortality from acute myocardial infarction in England between 2002 and 2010: linked national database study. *BMJ*. 2012 Jan 25;344:d8059. doi: 10.1136/bmj.d8059.
- Simonini A, Chang K, Yue P, Long CS, Massie BM. Expression of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase is reduced in rats with postinfarction heart failure. *Heart*. 1999 Mar;81(3):303-7.

- Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ Res.* 1982 Dec;51(6):787-801.
- Song J, Zhang XQ, Wang J, Cheskis E, Chan TO, Feldman AM, Tucker AL, Cheung JY. Regulation of cardiac myocyte contractility by phospholemman: $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange versus $\text{Na}^+ -\text{K}^+ -\text{ATPase}$. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008 Oct;295(4):H1615-25.
- Sparagna GC, Lesnefsky EJ. Cardiolipin remodeling in the heart. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2009 Apr;53(4):290-301.
- Starkopf J, Andreassen TV, Bugge E, Ytrehus K. Lipid peroxidation, arachidonic acid and products of the lipoxygenase pathway in ischaemic preconditioning of rat heart. *Cardiovasc Res.* 1998 Jan;37(1):66-75.
- Stefanon I, Cade JR, Fernandes AA, Ribeiro Junior RF, Targueta GP, Mill JG, Vassallo DV. Ventricular performance and $\text{Na}^+ -\text{K}^+ \text{ATPase}$ activity are reduced early and late after myocardial infarction in rats. *Braz J Med Biol Res.* 2009 Oct;42(10):902-11.
- Stefanon I. Desempenho contrátil e reatividade vascular do coração isolado de rato após infarto agudo do miocárdio. Tese de doutorado em ciências fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo. Vitória, 1998.
- Stern MD, Cheng H. Putting out the fire: what terminates calcium-induced calcium release in cardiac muscle? *Cell Calcium.* 2004 Jun;35(6):591-601.

- Suzuki S, Ohkusa T, Ono K, Sato T, Yoshida MA, Yano M, Takebayashi S, Matsuzaki M. Beneficial effects of the dual L- and T-type Ca²⁺ channel blocker efonidipine on cardiomyopathic hamsters. *Circ J*. 2007 Dec;71(12):1970-6.
- Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999 Jan;79(1):215-62.
- Takeo S, Nasa Y, Tanonaka K, Yabe K, Nojiri M, Hayashi M, Sasaki H, Ida K, Yanai K. Effects of long-term treatment with eicosapentaenoic acid on the heart subjected to ischemia/reperfusion and hypoxia/reoxygenation in rats. *Mol Cell Biochem*. 1998 Nov;188(1-2):199-208.
- Talukder MA, Kalyanasundaram A, Zuo L, Velayutham M, Nishijima Y, Periasamy M, Zweier JL. Is reduced SERCA2a expression detrimental or beneficial to postischemic cardiac function and injury? Evidence from heterozygous SERCA2a knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008 Mar;294(3):H1426-34.
- Tian R, Ingwall JS. Energetic basis for reduced contractile reserve in isolated rat hearts. *Am J Physiol*. 1996 Apr;270(4 Pt 2):H1207-16.
- Tucci PJ. Pathophysiological characteristics of the post-myocardial infarction heart failure model in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2011 May;96(5):420-4
- Vassalo, Dalton Valentim; Mill, José Geraldo. Projeto de pesquisa, elaboração e solicitação de financiamento. *Arq. bras. cardiol*;64(5):419-422, Mai. 1995.
- Vranckx P, Farooq V, Garg S, Van Es GA, Silber S, Windecker S, Stone GW, Serruys PW. Different cardiac biomarkers to detect peri-procedural myocardial infarction in contemporary coronary stent trials: impact on outcome reporting. *Heart*. 2012 Oct;98(19):1424-30.

- Xiao YF, Wright SN, Wang GK, Morgan JP, Leaf A. Coexpression with beta(1)-subunit modifies the kinetics and fatty acid block of hH1(alpha) Na(+) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jul;279(1):H35-46.
- Weisman HF, Bush DE, Mannisi JA, Weisfeldt ML, Healy B. Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion. *Circulation*, 78:186-201, 1988.
- Williamson JR. Glycolytic control mechanisms. II. Kinetics of intermediate changes during the aerobic-anoxic transition in perfused rat heart. *J Biol Chem*. 1966 Nov 10;241(21):5026-36.
- Wu J, Li J, Zhang N, Zhang C. Stem cell-based therapies in ischemic heart diseases: a focus on aspects of microcirculation and inflammation. *Basic Res Cardiol*. 2011 May;106(3):317-24.
- Yamazaki T, Komuro I, Shiojima I, Yazaki Y. The renin-angiotensin system and cardiac hypertrophy. *Heart*. 1996 Nov;76(3 Suppl 3):33-5.
- Yang BC, Saldeen TG, Bryant JL, Nichols WW, Mehta JL. Long-term dietary fish oil supplementation protects against ischemia-reperfusion-induced myocardial dysfunction in isolated rat hearts. *Am Heart J*. 1993 Dec;126(6):1287-92.
- Zhang GX, Kimura S, Murao K, Obata K, Matsuyoshi H, Takaki M. Inhibition of cytochrome c release by 10-N-nonyl acridine orange, a cardiolipin-specific dye, during myocardial ischemia-reperfusion in the rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Feb;298(2):H433-9.