

**A dieta hiperprotéica exacerba a disfunção
mitocondrial na insuficiência cardíaca induzida
pela sobrecarga de pressão em ratos**

Rogério Faustino Ribeiro Junior

**Tese de Doutorado em Ciências Fisiológicas
(Fisiologia Cardiovascular)**

**Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas
Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, julho de 2013**

A dieta hiperprotéica exacerba a disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão em ratos

Rogério Faustino Ribeiro Junior

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Cardiovascular.

Aprovada em 25 / 07 /2013 por:

Prof. Dr^a. Ivanita Stefanon

Universidade Federal do Espírito Santo

Orientadora

Prof. Dr. Leonardo dos Santos

Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr^a. Suely Gomes de Figueiredo

Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira

Universidade de Vila Velha

Prof. Dr^a. Silvia Carolina Guatimosim Fonseca

Universidade Federal de Minas Gerais

"Live your life in such a way that you would be willing to repeat the same life
eternally"

Irvin D. Yalom, The Schopenhauer Cure

*"Two things are infinite: the universe and human stupidity; and I am not sure about
the universe."*

Albert Einstein

À minha família, especialmente à minha mãe por dedicar sua vida na educação dos filhos. Ao meu pai e irmãos, por tanto amar e ainda não saber a razão.

Agradecimentos

Os indianos crêm em uma teoria que basicamente fala que a vida é feita de ciclos. Assim como eles, eu acredito que estou fechando mais um ciclo da minha vida; uma jornada que começou há quatro anos. Foram muitas alegrias vividas, encontros e desencontros, viagens, comemorações de artigos, grande crescimento pessoal e científico, muitas noites e finais de semana no laboratório, leituras, experimentos, discussões intermináveis a respeito de possíveis mecanismos; enfim, posso olhar para trás e ver que o esforço não foi em vão e que tudo valeu à pena. Eu não teria chegado até aqui se não fosse pela ajuda de algumas pessoas que foram fundamentais para o desenvolvimento deste e de outros trabalhos ao longo da minha jornada científica. Como disse minha amiga Giulia... “Este trabalho é o esforço de muitas mãos, cabeças e corações” de pessoas que eu considero muito e que muito contribuíram para o meu crescimento científico. **Quero deixar aqui o meu muito obrigado!**

Agradeço a Deus, pela proteção, força e guia fundamental nessa jornada. Obrigado por colocar verdadeiros amigos no meu caminho. Pude perceber que alguém sempre veio me ajudar na hora que a dificuldade cruzava meu caminho.

Aos meus pais, Rogério e Lucia, por sempre acreditarem que a educação é o bem mais precioso que podemos ter nessa vida. O apoio incondicional é a luz que me permitiu tomar muitas decisões difíceis. Aos meus irmãos, Kassio e Filipe, muito obrigado pelo apoio.

A minha orientadora Ivanita Stefanon, pessoa chave na minha vida científica. Quero deixar aqui minha eterna gratidão! Mesmo você achando que eu não daria em nada, quero agradecer por ter um coração de mãe e ter me aceitado no LEMC. Foram muitos anos de convivência, discussões, puxões de orelha, comemorações de artigos, viagens, reclamações no telefone quando tudo parecia perdido. Enfim, obrigado por ser um exemplo de pessoa, tanto no âmbito pessoal quanto no profissional. Valeu chefe!

Ao Professor Dalton Vassallo, muito obrigado pelos conselhos científicos e ajuda com os artigos, discussões científicas e principalmente pela ajuda financeira! Sem seu apoio não teríamos conseguido publicar alguns trabalhos. Valeu chefe!

Ao Professor William Stanley (Bill), quero dizer que jamais esquecerei a oportunidade que você me deu! Foi uma honra fazer parte do seu time. Foram muitas discussões, comemorações, congressos, jantares etc... Agradeço pela atenção e ensinamentos ao longo desses dois anos que estive em Baltimore e por ser um orientador presente na vida dos alunos. Minha visão científica definitivamente mudou depois do doutorado sanduíche.

A Dra Erinne Dabkowski, minha companheira de café e como uma co-orientadora na parte experimental, desde o início me ensinou toda a parte mitocondrial. Obrigado pela paciência, carinho e generosidade. Espero que não tenha úlcera.... rs!

Aos amigos do lab e agregados em Baltimore: Kelly, Kad, Peter, Britany, Wenhong, Brigitte, Betany e James. Quero dizer que sou eternamente grato a vocês por toda a ajuda que recebi. Sem vocês esse trabalho não seria o mesmo e é claro que não seria tão divertido. Podem ter certeza que jamais esquecerei vocês. Foram os dois melhores anos da minha vida!

A família Galvão, especialmente a Tatiana e Luciano. Quero deixar aqui meu muito obrigado por tudo! Baltimore não teria sido a mesma coisa sem vocês!

Aos amigos de fora do lab: Valério, Viviane, Marcos, Michelle, Patrícia, Isa, Frederick e Chelsea. Nossas noitadas não teriam a mesma graça sem a Cia de vocês!

Ao casal Franck e Giulia, obrigado pelo carinho e pelos momentos divertidos! Aquela pós não é a mesma coisa sem vocês! Mas tenho certeza que a Universidade Federal do Pampa fez duas ótimas aquisições!

As amigas Karina e Patrícia, com vocês a diversão é garantida! Obrigado por tudo!

As amigas que considero especiais, Aurélia, Fernanda Vargas e Jonaina. Quero dizer que sou muito grato por ter vocês como companheiras de pesquisa e amigas! Obrigado pela paciência nos momentos difíceis, quando batia aquele desespero e tudo parecia perdido... A convivência no LEMC não seria a mesma sem vocês!

A Bruna e Maylla, pela amizade e ajuda com alguns experimentos!

Aos amigos do LEMC antigos e novatos: Alessandra, Mirian, Lorena, Leo, Priscila, Eduardo, Fabiana, Edna, Thais, Teca, Fabiana Simões, Núbia, Dieli, Marito, Gilson, Camila, Paula e aos ICs! Obrigado por tornarem melhor as longas horas passadas no LEMC.

Aos amigos da pós-graduação: Marcella, Marcelo, Ludimila, Rebeca, Patrick, Clarissa, Bianca, Camille e Helena!

Aos amigos fora da pós-graduação: Maria, Humberto, Cecy, Jana, Amanda que de alguma forma me apoiaram nos momentos difíceis e compartilharam ótimos momentos ao longo desses anos!

Aos funcionários Fonseca e Cláudia, pelo apoio técnico.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPES (Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo) pelo apoio financeiro.

Ribeiro Junior, Rogerio Faustino, 1986.

A dieta hiperprotéica exacerba a disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão em ratos. [Vitória] 2013.

XIX, 167p., 29,7 cm (UFES, M Sc., Ciências Fisiológicas, 2013)

Tese Doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Insuficiência Cardíaca 2. Dieta Hiperprotéica 3. Mitocôndria 4. Função cardíaca

RESUMO

Apesar dos avanços terapêuticos para o tratamento sintomático, as doenças cardiovasculares permanecem um grande fardo sobre o sistema público de saúde. Dentre as doenças cardiovasculares, a insuficiência cardíaca (IC) é a maior responsável pela morbidade e mortalidade da população. Até o momento, existe pouca informação na literatura a respeito da dieta e seus macro nutrientes na IC. Existe uma necessidade de desenvolvimento de dietas para pessoas que estão em risco de desenvolvimento da IC tão como para indivíduos que apresentam doença coronariana, hipertensão, hipertrofia do ventrículo esquerdo e diabetes. Nesse estudo mostramos, pela primeira vez, os efeitos da dieta controle e hiperprotéica (a dieta controle continha 20% de energia de proteína (caseína + L-cisteína), 68 % da energia de carboidratos (maltodextrina correspondia a 12% e 55% de milho) e 12 % de energia de gordura (mistura de banha de porco, manteiga de cacau e óleo de soja). A dieta hiperprotéica foi modificada com um aumento de 10% de caseína e uma diminuição na mesma proporção de carboidrato), durante 14 e 22 semanas sobre a mortalidade, função cardíaca e função mitocondrial em ambas as subpopulações mitocondriais (fração interfibrilar e subsarcolemal) de ratos normais e com insuficiência cardíaca. Os animais controle (SHAM) e Insuficientes (TAC) foram divididos em 2 grupos (SHAM, SHAM Proteína, TAC e TAC Proteína) recebendo dieta controle e hiperprotéica. Encontramos que a dieta hiperprotéica aumentou a mortalidade de ratos com insuficiência cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão (33 % comparado ao grupo SHAM). Ao analisarmos a função mitocondrial, vimos que a dieta hiperprotéica foi capaz de reduzir a bioenergética (β -oxidação), aumentar a captação de cálcio pela mitocôndria e ao mesmo tempo aumentar a probabilidade de abertura do poro mitocondrial induzida pelo peróxido de hidrogênio, efeito esse visto somente após 14 semanas de dieta. Embora a função mitocondrial estivesse alterada após 14 semanas, a dieta hiperprotéica não foi capaz de alterar a função cardíaca analisada pelo ecocardiograma, tanto no grupo SHAM Proteína quanto no grupo TAC Proteína quando comparada aos respectivos controles. Além disso, observamos que a dieta hiperprotéica induziu perda de peso corporal no grupo TAC Proteína após 14 semanas, sem alterar os demais parâmetros ponderais nos grupos restantes. Tal fato não ocorreu após 22 semanas de dieta. Os animais TAC Proteína de 22 semanas não apresentaram perda de peso como o grupo de 14 semanas.

Portanto, a dieta hiperprotéica parece afetar a função mitocondrial somente de ratos com insuficiência cardíaca, reduzindo a bioenergética mitocondrial e aumentando a mortalidade após 14 semanas.

ABSTRACT

Despite aggressive diagnosis and treatment, HF remains a major clinical problem and a huge burden on the health care system. Among all cardiovascular diseases, heart failure is responsible for the high morbidity and mortality rates. At present there is limited information regarding the effects of dietary macronutrient composition and heart failure. There is a clear need to develop recommendations for dietary macronutrients for people who are “at risk” for the development of heart failure (eg, patients with coronary heart disease, hypertension, left ventricular hypertrophy, diabetes), and for patients with established heart failure. We assessed the effects of a high protein diet on the development of heart failure characterized by cardiac hypertrophy, impaired mitochondrial oxidative metabolism and contractile dysfunction induced by transverse aortic constriction (TAC) in rats. In this study, for the first time, we demonstrated the effects of high protein diet for 14 and 22 weeks on mortality, cardiac function and mitochondrial function from both subpopulations (interfibrillar and Subsarcolemal) of rats with or without heart failure. We showed that high protein diet increased mortality in heart failure animal whereas it did not increase mortality in SHAM animals. Mitochondrial analyses showed that high protein diet decreased bioenergetics (i.e. β -oxidation), increased calcium uptake and permeability transition pore after 14 weeks. Despite mitochondrial function impairment at 14 weeks, high protein diet did not affect cardiac function analyzed by echocardiography, in both Sham protein and TAC protein groups when compared to control. Besides, we showed that high protein diet induced weight loss in TAC animals at 14 weeks without changing any other parameter evaluated. The animals at 22 weeks did not show weight loss. It seems that high protein diet affects mitochondrial function in heart failure animals, decreasing β -oxidation and increasing mortality.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura I: Modelo de sinalização intracelular iniciado pelo stress mecânico em cardiomiócitos. Abreviações: Angio II – angiotensina II; AT1-R – receptor de angiotensina II tipo I; DAG – diacilglicerol; IP3 – trifosfato de inositol; MAPK – cinase ativada pelo fator miogênico; PKC – proteína cinase C; PLC – fosfolipase C. Adaptado de Molkenin et al. 1998.	27
Figura II: Utilização de substratos pelo miócito. (A) miócito saudável – Principal substrato utilizado é o ácido graxo; (B) estágio inicial da insuficiência cardíaca – A utilização de ácidos graxos é menor com redução da beta oxidação; (C) Estágio final da insuficiência cardíaca – a captação de ácidos graxos e o metabolismo estão reduzidos, entretanto, a utilização de glicose e a respectiva captação estão aumentados. Adaptado de Lionetti et al, Cardiovasc Res. 2011 May 1;90(2):202-9.	31
Figura III: Vias de captação e extrusão de cálcio na mitocôndria. UP – Uniporter; RaM – captação de cálcio modo rápido; RyR – receptor de rianodina mitocondrial; PTP – poro mitocondrial. Adaptado de Paul S. Brookes, Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, Am J Physiol Cell Physiol 287: C817–C833, 2004	38
Figura IV: Representação esquemática dos efeitos da dieta composta de gordura e carboidratos sobre o cardiomiócito. Adaptado de Stanley et al, Circ Res. 2012;110:764-776.	43
Figura V: Fotografia ilustrativa mostrando a cirurgia de coarctação aórtica. Animais que sofreram coarctação à esquerda e animais SHAM à direita. Um clipe de tântalo com diâmetro interno de 0.45 mm foi colocado entre o tronco braquiocefálico e a artéria carótida comum esquerda. Adaptado de Hu et al., Am J Physiol Heart Circ Physiol 285: H1261–H1269, 2003.	48
Figura 1: Curva de sobrevivência em função do tempo de duração da dieta hiperprotéica. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. $P < 0,05$ pelo teste de Mantel-Cox. $n = 12-15$	59
Figura 2: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado III de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado III de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado III de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$	65
Figura 3. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio	67

atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0.05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

Figura 4: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato + Oligomicina. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina + Oligomicina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato + Oligomicina. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$ 69

Figura 5: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e TAC tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$ 71

Figura 6: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Razão fosfato/Oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão fosfato/Oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão fosfato/Oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$ 72

Figura 7: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado III de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado III de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado III de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $*P < 0,05$ ANOVA 2 vias seguido de post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$ 74

Figura 8: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$ 76

Figura 9: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com 78

substrato malato + glutamato + Oligomicina. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina + Oligomicina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato+ Oligomicina. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

- Figura 10:** Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$ **80**
- Figura 11:** Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$ **81**
- Figura 12:** Queda da absorvância após adição de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM em ambas as subpopulações mitocondriais de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 14 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$ **83**
- Figura 13:** Captação de cálcio (A) e probabilidade de abertura do poro mitocondrial (B) da fração interfibrilar de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 14 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias seguido de post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$ **85**
- Figura 14:** Captação de cálcio (A) e probabilidade de abertura do poro mitocondrial (B) da fração subsarcolemal de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 14 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias seguido de post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$ **87**
- Figura 15:** Análise densitométrica de Western Blot para expressão protéica do canal uniporter em ambas subpopulações mitocondriais de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 14 semanas de tratamento. As fotos acima mostram as bandas representativas da expressão do canal da fração interfibrilar (A) e subsarcolemal (B). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias seguido de post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$ **89**
- Figura 16:** Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado III de consumo de oxigênio com **94**

substrato malato + glutamato. (B) Estado III de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado III de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. *P<0,05 ANOVA 1 via.n = 12-15

Figura 17: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. P> 0,05 ANOVA 1 via.n = 12-15

95

Figura 18: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato + Oligomicina. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina + Oligomicina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato+ Oligomicina. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. P> 0,05 ANOVA 1 via.n = 12-15

97

Figura 19: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. *P< 0,05 ANOVA 1 via.n = 12-15

99

Figura 20: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. P> 0.05 ANOVA 1 via.n = 12-15

100

Figura 21: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado III de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado III de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado III de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. *P<0,05 ANOVA 1 via e post hoc de Bonferroni.n = 12-15

102

Figura 22: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$ **103**

Figura 23: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato + Oligomicina. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina + Oligomicina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato + Oligomicina. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$ **104**

Figura 24: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*P < 0,05$ ANOVA 1 via e *post hoc* de Bonferroni. $n = 12-15$ **105**

Figura 25: Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$ **106**

Figura 26: Queda da absorvância após adição de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM em ambas as subpopulações mitocondriais de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 22 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $*P < 0,05$ ANOVA 2 vias *post hoc* de Bonferroni. $n = 12-15$ **108**

Figura 27: Captação de cálcio (A) e probabilidade de abertura do poro mitocondrial (B) da fração subsarcolemal de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 22 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias e *post hoc* de Bonferroni. $n = 12-15$ **110**

Figura 28: Captação de cálcio (A) e probabilidade de abertura do poro mitocondrial (B) da fração interfibrilar de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) com dieta **112**

normal e hiperprotéica após 22 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias e post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

LISTA DE TABELAS

Página

- Tabela 1:** Dados ponderais dos animais SHAM e TAC após dieta normal e hiperprotéica durante 14 semanas. Valores de peso corporal, peso do pulmão, peso do átrio, peso do ventrículo direito, razão ventrículo direito/peso corporal, razão ventrículo direito/tíbia, peso do ventrículo esquerdo, peso do ventrículo esquerdo/peso corporal, razão ventrículo esquerdo/tíbia, gordura retroperitoneal, gordura epidídimo, peso do fígado, peso dos rins e razão massa renal/peso corporal. **61**
- Tabela 2:** Avaliação ecocardiográfica dos animais SHAM e TAC após dieta padrão e hiperprotéica durante 14 semanas. Valores de frequência cardíaca, débito cardíaco, volume sistólico, volume diastólico, volume sistólico final, fração de ejeção e fração de encurtamento. **63**
- Tabela 3:** Dados ponderais dos animais SHAM e TAC após dieta normal e hiperproteica durante 22 semanas. Valores de peso corporal, peso do pulmão, peso do átrio, peso do ventrículo direito, razão ventrículo direito/peso corporal, razão ventrículo direito/tíbia, peso do ventrículo esquerdo, peso do ventrículo esquerdo/peso corporal, razão ventrículo esquerdo/tíbia, gordura retroperitoneal, gordura epidídimo, peso do fígado, peso dos rins e razão massa renal/peso corporal. **91**
- Tabela 4:** Avaliação ecocardiográfica dos animais SHAM e TAC após dieta padrão e hiperproteica durante 22 semanas. Valores de frequência cardíaca, débito cardíaco, volume sistólico, volume diastólico, volume sistólico final, fração de ejeção e fração de encurtamento. **92**

Lista de Abreviaturas

ADP – difosfato de adenosina

ANT – transportador de ADP e ATP

ATP – Trifosfato de adenosina

GAPDH – gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GLUT -1 – Transportador de glicose sensível a insulina tipo 1

GLUT-4 – Transportador de glicose sensível a insulina tipo 4

HIF-1 Fator induzível pela hipóxia do tipo 1

IC – Insuficiência cardíaca

IFM – Subpopulação mitocondrial interfibrilar

IGF – Insulin-like growth factor

IMM – membrana interna mitocondrial

LCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia longa

MCAD – desidrogenase de acil-CoA de cadeia média

mPTP – Poro de permeabilidade transicional

OMM – membrana externa mitocondrial

SSM – Subpopulação mitocondrial subsarcolemal

TAC – coartação da aorta

VDAC – canal de ânions voltagem dependente

SUMÁRIO

	Páginas
Resumo	8
Abstract	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	15
I INTRODUÇÃO	
1.1 Aspectos epidemiológicos	22
1.2 Aspectos fisiopatológicos	23
1.3 Alterações metabólicas do miocárdio na insuficiência cardíaca	28
1.4 Disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca	32
1.5 Papel da dieta na insuficiência cardíaca	39
II OBJETIVOS	
2.1 Objetivo geral	45
2.2 Objetivos específicos	45
III MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Animais experimentais	47
3.2 Cirurgia de coarctação da aorta	47
3.3 Dieta hiperprotéica	48
3.4 Análise da função ventricular por ecocardiografia	49
3.5 Purificação mitocondrial	50
3.6 Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial – fosforilação oxidativa	51
3.7 Medidas de potencial de membrana e tamanho da mitocôndria	52
3.8 Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial	53
3.9 Estudo da expressão de proteína pelo método de western blot	53

3.9.1 Eletroforese e transferência das amostras	54
3.9.1.2 Incubação com o anticorpo e detecção da proteína	54
3.10 Resistência ao cálcio	55
3.11 Expressão dos resultados e análise estatística	56
3.12 Fármacos e reagentes utilizados	56

IV RESULTADOS

4.1 Curva de sobrevivência	59
4.2 Análise ponderal após 14 semanas de tratamento	60
4.3 Avaliação ecocardiográfica após 14 semanas de dieta	62
4.4 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado III	64
4.5 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado IV	66
4.6 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado IV + Oligomicina	68
4.7 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – RCR	70
4.8 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Razão ADP:O	72
4.9 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado III	73
4.10 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado IV	75
4.11 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado IV + Oligomicina	77
4.12 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – RCR	79
4.13 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Razão ADP:O	81

4.14 Análise da resistência ao cálcio	82
4.15 Análise da captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial – Fração interfibrilar	84
4.16 Análise da captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial – Fração subsarcolemal	86
4.17 Expressão protéica do canal Uniporter em ambas subpopulações mitocondriais	88
4.18 Análise ponderal após 22 semanas de tratamento	90
4.19 Avaliação ecocardiográfica após 22 semanas de tratamento	92
4.20 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado III	93
4.21 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado IV	95
4.22 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado IV + Oligomicina	96
4.23 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – RCR	98
4.24 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Razão fosfato/oxigênio (ADP:O)	100
4.25 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado III	101
4.26 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado IV	103
4.27 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado IV + Oligomicina	104
4.28 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – RCR	105

4.29 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Razão fosfato/oxigênio (ADP:O)	106
4.30 Análise da resistência ao cálcio	107
4.31 Análise da captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial – Fração subsarcolemal	109
4.32 Análise da captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial – Fração interfibrilar	111
V DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	113
VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
ANEXOS	
Artigo da tese submetido	170

INTRODUÇÃO

I INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos

As doenças do aparelho cardiovascular são responsáveis pelo aumento da mortalidade e morbidade nos países desenvolvidos e subdesenvolvidos. De acordo com a *American Heart Association*, só nos Estados Unidos, um em cada três adultos apresenta um ou mais tipos de doença do aparelho cardiovascular (132) sendo que as doenças do aparelho cardiovascular são responsáveis por um número maior de mortes quando comparadas com câncer, doenças respiratórias e acidentes (132).

Apesar dos avanços terapêuticos para o tratamento sintomático, as doenças cardiovasculares permanecem um grande fardo sobre o sistema público de saúde (147; 221). Dentre as doenças cardiovasculares, a insuficiência cardíaca (IC) é a maior responsável pela morbidade e mortalidade da população (132) sendo que 75% dos pacientes que desenvolvem IC têm quadro de hipertensão já instalado anteriormente (132).

Dados do ministério da saúde informam que no Brasil o principal grupo de causas de mortes, em todas as regiões, foram as doenças do aparelho circulatório, representando em 2009 cerca de 28,6 % entre as causas de morte definidas (202).

De acordo com a literatura, aproximadamente 2 % da população nos Estados Unidos apresenta quadro de IC. Os custos sobre o sistema de saúde são alarmantes, sendo alvo constante de investigações para desenvolvimento de novas terapias mais eficazes a fim de melhorar a qualidade de vida e diminuir os custos do tratamento.

Nos Estados Unidos, somente no ano de 2007 foram gastos 33 bilhões de dólares em internações de pacientes com IC, representando aproximadamente 1.5 % do orçamento destinado à saúde (114). O número de pacientes com IC tem

crescido nas duas últimas décadas e concomitantemente o número de internações (95; 114). Em média, 550 mil casos novos surgem a cada ano (203). Como as internações de pacientes com IC são complexas e frequentes, mais recursos são gastos com essas internações em relação a outros tratamentos (114).

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento da doença coronariana e conseqüentemente a IC, a hipertensão e o infarto do miocárdio têm um papel fundamental.

O aumento da expectativa de vida e conseqüentemente o envelhecimento da população agravam ainda mais o quadro já que a IC tem afetado principalmente a população economicamente ativa (95; 114).

1.2 Aspectos fisiopatológicos

A IC é uma síndrome complexa que depende da etiologia, duração, existência de síndrome coronariana e/ou isquemia, disfunção endotelial e a coexistência de comorbidades como diabetes, hipertensão e obesidade (79; 222).

A *American Heart Association* define a IC como uma síndrome complexa resultante de qualquer alteração estrutural ou funcional que impede o ventrículo de encher ou ejetar sangue. Descrita inicialmente por Hipócrates (460 a.C.-370 a.C.), os sinais cardinais da IC são dispnéia e fadiga, o que pode levar a tolerância ao exercício e retenção de líquido, que pode causar congestão pulmonar e edema periférico (79; 99).

O estudo de Framingham foi essencial para o melhor entendimento do desenvolvimento da IC. Em 1972, Kannel e colaboradores (96) demonstraram que 75% dos pacientes que desenvolveram IC apresentavam quadro de hipertensão já

instalado. Indivíduos hipertensos e com hipertrofia do ventrículo esquerdo apresentavam risco 10 vezes maior de desenvolvimento de IC (96; 205).

O miocárdio se hipertrofia de forma adaptativa e protetora para regular o stress de parede gerado pelo aumento da pressão. De acordo com a lei de Laplace, a sobrecarga aumenta o stress de parede na sístole que é compensado pelo aumento da espessura do ventrículo (56). Classicamente, a hipertrofia cardíaca pode ser dividida em: concêntrica, na qual existe um aumento da espessura de parede sem aumento do volume da câmara e hipertrofia excêntrica na qual ocorre aumento da massa e do volume da câmara cardíaca (8; 15).

Os dois principais tipos de hipertrofia podem resultar em alterações como o aumento da espessura da parede sem o aumento do volume da câmara cardíaca, que pode culminar em queda da fração de ejeção já que se não existir aumento do volume da câmara, tanto o volume ejetado quanto o débito cardíaco diminuem (15; 205).

Nos casos de dilatação do ventrículo esquerdo e subsequente afinamento da parede, o stress de parede aumenta, levando ao aumento do consumo de oxigênio e queda da fração de ejeção (8; 96; 205). O processo de desenvolvimento da hipertrofia cardíaca devido ao aumento da pós-carga já é bem definido. Em contrapartida, o mecanismo da dilatação e conseqüente instalação da IC ainda permanecem indefinidos.

Dois principais mecanismos podem desencadear a hipertrofia: o stress biomecânico e fatores neuro-humorais. O stress mecânico induz a ativação de genes responsáveis pela hipertrofia, além de induzir a liberação de fatores neuro-humorais pelo cardiomiócito, como a angiotensina II, endotelina e IGF-I que também ativam a transcrição gênica através de segundo mensageiro (196). O stress mecânico

também ativa a transcrição de genes como c-fos, c-jun, Egr-1, and c-myc e induz a ativação de genes fetais como o peptídeo natriurético atrial, α -actina esquelética e β -miosina (196; 197). (figura 1)

De um modo geral, em cardiomiócitos, o stress mecânico ativa mecanosensores, canais iônicos e segundo mensageiros como fosfolipase C, D e A2, tirosina cinases, c-Jun N-terminal proteína cinase (JNK), proteína cinase C, mitogen-activated protein (MAP cinase), proteínas responsáveis pela ativação de genes que levam a hipertrofia cardíaca (195; 196). (figura 1)

O processo de hipertrofia do cardiomiócito no estágio inicial ao aumento da pressão é caracterizado por aumento da expressão das proteínas contráteis, formação de novas estruturas contráteis, com conseqüente hiperplasia das unidades miofibrilares, expandindo a área de secção em torno de 80% (8; 205). Nos estágios iniciais da hipertrofia, novas isoformas de actina e miosina aparecem em diferentes tempos. Além disso, a parede do ventrículo esquerdo aumenta devido à hipertrofia concêntrica do miócito gerar um alinhamento dos sarcômeros em paralelo (8; 98; 152; 227). O processo de hipertrofia reduz o stress gerado na parede do ventrículo. Neste tipo de hipertrofia concêntrica, o stress de parede permanece constante, refletindo numa função ventricular e consumo de oxigênio normais (205; 223; 224).

Outro fato importante que ocorre é a fibrose intersticial na matriz extracelular. O interstício do miocárdio contém uma gama de componentes que ajudam a manter a estrutura e arquitetura do miocárdio além de distribuírem de forma uniforme o stress gerado pelos sarcômeros para a cavidade ventricular, e por distribuir o stress de enchimento diastólico através do ventrículo. Os principais componentes da matriz extracelular são os colágenos do tipo I e III, além de tecido conectivo, dentre outros (204; 242-246).

Embora nos estágios iniciais da hipertrofia a função sistólica esteja normal (205; 223; 224), o enchimento diastólico fica comprometido pela hipertrofia do ventrículo esquerdo (69; 205; 208; 218). Ocorre um prejuízo do relaxamento do ventrículo devido ao enrijecimento da câmara com a progressão da fibrose intersticial que ocorre nesse modelo, movendo a curva pressão-volume para a esquerda e para cima. Esse aumento da pressão diastólica, causado pelo prejuízo no relaxamento, a modificação da geometria ventricular e todas as alterações ocorridas, desencadeia aumento da resistência na circulação pulmonar (69; 208; 219).

Após um período prolongado de sobrecarga de pressão sobre o ventrículo, ocorre a dilatação da câmara (205; 223; 224). O miocárdio passa por uma série de alterações que culminam na dilatação da câmara cardíaca, embora não se saiba ao certo como esse processo ocorre. Alterações moleculares das proteínas sintetizadas pelo miocárdio, desarranjo das fibras colágenas na matriz extracelular, diminuição da espessura da parede ventricular e aumento da câmara que culminam no aumento do stress de parede por razões geométricas. Ao mesmo passo, ocorre queda da fração de ejeção devido à sobrecarga sobre o ventrículo, que ainda existe, e conseqüentemente o consumo de oxigênio aumenta (49; 57; 98; 246).

Portanto, a queda da contratilidade causada por todas as alterações descritas acima levam prejuízo do coração como bomba.

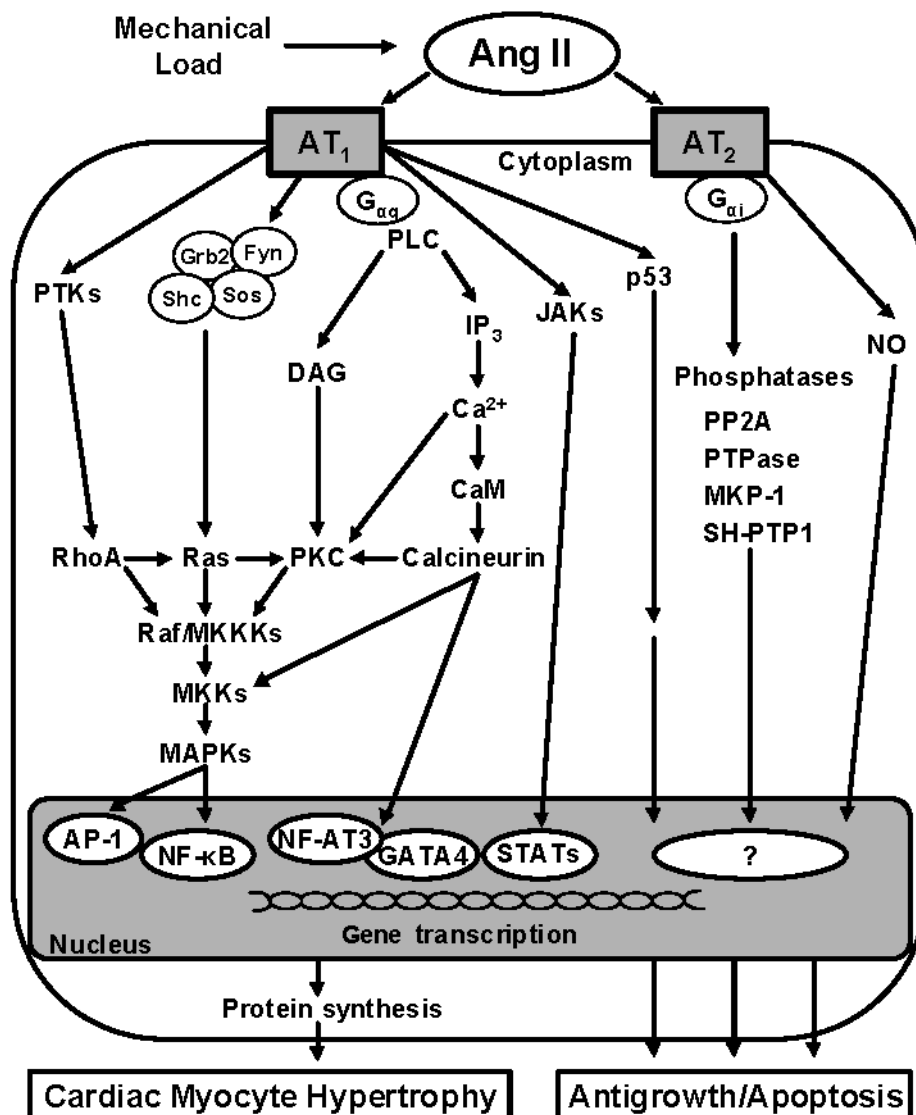


Figura I: Modelo de sinalização intracelular iniciado pelo stress mecânico em cardiomiócitos. Abreviações:; Angio II – angiotensina II; AT1-R – receptor de angiotensina II tipo I; DAG – diacilglicerol; IP3 – trifosfato de inositol; MAPK – cinase ativada pelo fator miogênico; PKC – proteína cinase C; PLC – fosfolipase C. Adaptado de Molkenin et al. 1998.

1.3 Alterações metabólicas do miocárdio na insuficiência cardíaca

Como em qualquer músculo, o metabolismo e a contração estão intimamente conectados. O coração é um eficiente conversor de energia química em mecânica (228; 229). Sob circunstâncias normais, 95% do ATP gerado é proveniente da fosforilação oxidativa na mitocôndria, sendo o restante derivado da glicólise e da formação de GTP no ciclo do ácido cítrico. O coração tem baixa quantidade de ATP (~5 $\mu\text{mol/g}$ tecido) e uma alta taxa de hidrólise no repouso (0.5 $\mu\text{mol/g}$ tecido/seg.), sendo o tempo de um “turnover” (tempo necessário para renovação dos estoques) de 10 segundos (83; 166). Aproximadamente 60-70 % do ATP produzido mantém a contração do músculo cardíaco (principalmente miosina) e o ATP remanescente (30-40%) serve para manter a bomba do retículo sarcoplasmático e outras bombas iônicas (53; 222; 225).

Estudo em humanos mostra que nos estágios iniciais da IC (estágio II e III de acordo com a classificação da *American Heart Association*) ocorre um pequeno aumento da oxidação de ácidos graxos e redução da oxidação de glicose. Em contrapartida, nos estágios finais existe redução da oxidação de ácidos graxos e aumento da oxidação de glicose (176).

Em resposta ao stress, de natureza hemodinâmica ou metabólica, o cardiomiócito pode diminuir parcialmente ou completamente a expressão gênica pós-natal e ativar a expressão gênica fetal (181; 183). Ainda não se sabe como essa ativação dos genes fetais ocorre e se seria protetora ou não para o miocárdio. Acredita-se que esse processo possa ser regulado pelo HIF-1 – fator induzido pela hipóxia tipo 1 - já que com a deposição de colágeno e fibrose intersticial e perivascular, o suporte de oxigênio fica prejudicado, elevando a expressão desse fator (181; 232).

Fortes evidências demonstram que essa reprogramação metabólica protegeria o miocárdio já que a eficiência do miocárdio, que é medida pela razão entre o trabalho cardíaco sobre o consumo de oxigênio, é maior quando o mesmo utiliza carboidratos como principal fonte de energia em relação a ácidos graxos (108; 181). Entretanto, a quantidade de ATP produzido pela mitocôndria é maior quando ácidos graxos são utilizados em comparação aos outros substratos (168).

Estudos em humanos e em animais mostram que existe queda da concentração de ATP (em torno de 30%) e aumento da quantidade de ADP no miocárdio com subsequente queda do potencial de fosforilação; demonstrando que a eficiência na produção de energia para as atividades celulares como a contração (miosina) e relaxamento (Serca2a) estão prejudicados na insuficiência cardíaca (13; 14; 84; 122; 125; 144; 148; 155; 156; 158; 213; 233; 240).

Quando o miocárdio é submetido ao stress como a hipertrofia, o metabolismo cardíaco muda. O miocárdio que basicamente utiliza ácidos graxos como principal fonte de energia passa a utilizar outros substratos mais eficientes como glicogênio, lactato e glicose (55; 108; 181). O mecanismo pelo qual essa mudança na utilização dos substratos ocorre ainda é indefinido. Sabe-se que o perfil da célula muda e fica bem parecido com o perfil fetal. Ocorre redução na expressão protéica das enzimas da via da beta oxidação como LCAD (desidrogenase de acil-CoA de cadeia longa) e MCAD (desidrogenase de acil-CoA de cadeia media) além da redução da expressão de PPAR α (receptor ativado pelo proliferador de peroxissoma) (97). Não somente as expressões das enzimas da beta oxidação estão reduzidas, mas também os receptores GLUT-1, GLUT-4 e a enzima GAPDH (116).

Tais alterações poderiam ser explicadas pelo efeito protetor que o glicogênio exerce sobre o miocárdio. Primeiramente, o armazenamento de glicose na forma de

glicogênio impediria a glicosilação protéica e conseqüentemente protegeria o miocárdio da glicotoxicidade (126; 181; 230). Além disso, o armazenamento rápido de glicogênio aumenta a sensibilidade ao cálcio e a força máxima desenvolvida pela ativação do cálcio (230). Outro fato importante é que as enzimas metabolizadoras de glicogênio estão localizadas próximas ao retículo sarcoplasmático, o principal regulador dos estoques de cálcio. Portanto, o glicogênio exerce papel fundamental na sinalização metabólica e na homeostase do cálcio (38; 105; 127; 181; 230)

As alterações metabólicas ocorridas durante o stress como na hipertrofia, englobam alterações na fosforilação oxidativa a fim de manter os níveis citosólicos e de hidrólise de ATP quando o suporte de oxigênio e/ou substrato é baixo. Além disso, a eficiência na produção de energia é baixa quando a organela responsável pela produção de ATP está danificada, portanto, limitando a produção de energia para suprir os processos celulares, incluindo a maquinaria contrátil, o que poderia levar ao surgimento da IC (85; 181). Devido a íntima conexão entre metabolismo oxidativo e contratilidade, alteração no suporte de oxigênio para o miocárdio poderia resultar na redução da contratilidade e do metabolismo oxidativo mitocondrial (181; 222; 229).

Estudos em humanos e animais mostram que existe redução da atividade dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial. Em humanos, já foi demonstrado redução do complexo I, III e IV da cadeia respiratória em torno de 30% em pacientes com doença isquêmica ou cardiomiopatia dilatada (22; 27; 86; 201). As conseqüências dessas alterações nos complexos da cadeia respiratória implicam na redução da capacidade do miocárdio em produzir ATP, limitando a contratilidade cardíaca durante exercício ou ativação adrenérgica (222).

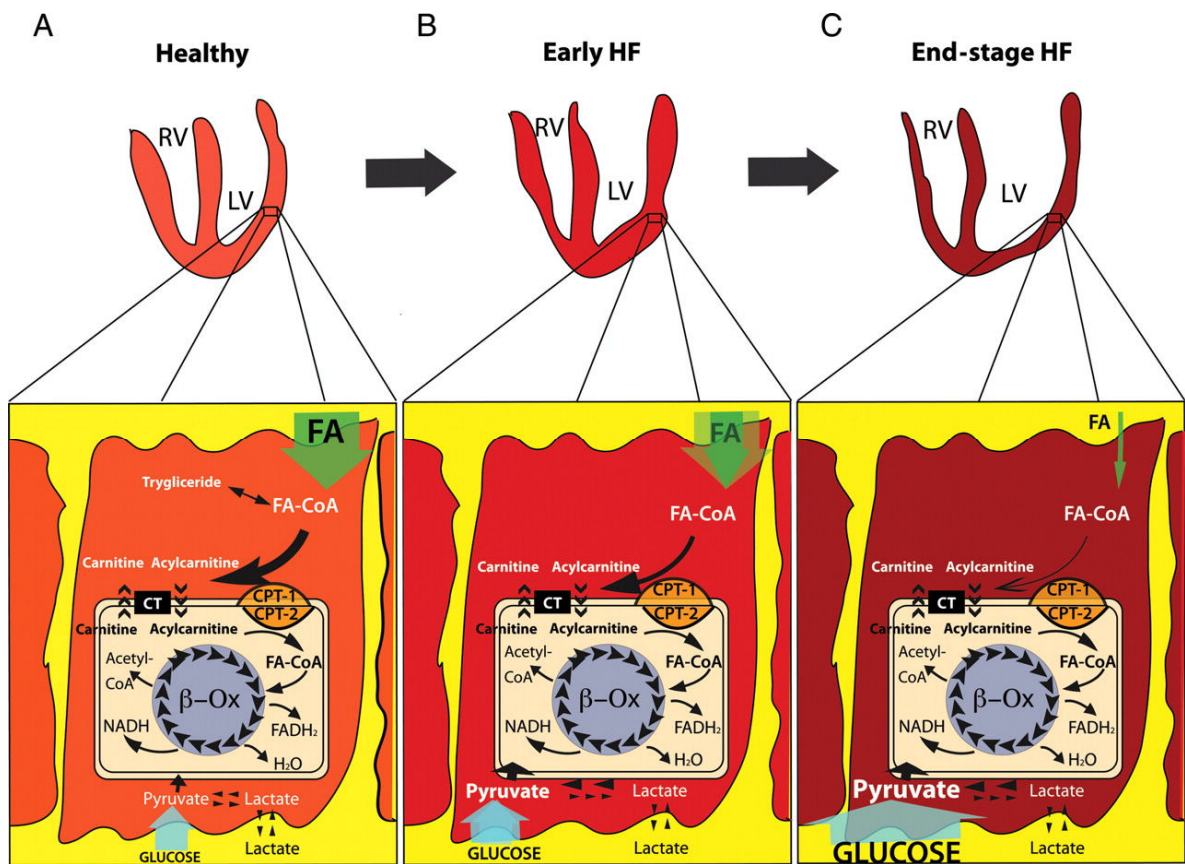


Figura II: Utilização de substratos pelo miócito. (A) miócito saudável – Principal substrato utilizado é ácido graxo; (B) estágio inicial da IC – A utilização de ácidos graxos é menor com redução da beta oxidação; (C) Estágio final da IC – a captação de ácidos graxos e o metabolismo estão reduzidos, entretanto, a utilização de glicose e a respectiva captação estão aumentadas. Adaptado de Lionetti et al, Cardiovasc Res. 2011 May 1;90(2):202-9.

1.4 Disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca

A mitocôndria é uma organela de aproximadamente 1µm de tamanho presente em toda célula. Apresenta morfologia variável, constituída por 2 membranas, uma externa (OMM, do inglês outer mitochondrial membrane) e uma interna (IMM, do inglês inner mitochondrial membrane). A membrana externa separa o espaço intermembrana do citosol enquanto que a membrana interna separa o espaço intermembrana da matriz mitocondrial. A integridade dessas duas membranas é essencial para a função mitocondrial. Além disso, vários domínios especializados na membrana interagem com o meio intracelular para atender as demandas energéticas da célula. A OMM exerce o papel de interagir com o citosol e com elementos do citoesqueleto a fim de garantir mobilidade, diferenciação e posicionar a organela onde as demandas energéticas são intensas (26; 193). A OMM também é responsável pela chamada importação de proteínas para a mitocôndria. Moléculas acima de 15 kDa são transportadas com o auxílio de canais presentes na membrana externa e interna chamados de TOM (do inglês, transport outer membrane) e TIM (do inglês, transport inner membrane). Essas duas proteínas formam um complexo chamado TOM/TIM que é responsável pelo transporte de proteínas para o interior da organela (44; 193).

Outro constituinte de extrema importância presente na membrana mitocondrial é o **mPTP** (poro de permeabilidade transicional) é um canal voltagem-dependente de alta condutância presente na mitocôndria que permite a passagem de água, íons e moléculas de até 15 kDa. Esse canal é altamente sensível ao cálcio, stress oxidativo, redox, voltagem, pH, ATP e ADP (40; 65; 109). Sua composição e regulação ainda não são bem definidas (67; 73; 247). Inicialmente acreditava-se que

ANT (do inglês, adenine nucleotide translocase) e VDAC (do inglês, voltage-dependent anion channel) assim como CypD (do inglês, Cyclophilin D) eram os principais constituintes deste poro (61; 73; 212; 247) já que inibidores do ANT (bongkrelic acid) e do CypD (cyclosporine-A) eram capazes de bloquear a abertura desse poro (109). Inicialmente pensava-se que VDAC era um constituinte do poro, entretanto, estudo recente em camundongo knockout para essa proteína mostrou que VDAC não é essencial para a abertura do mPTP (12).

A abertura desse poro resulta em perda da produção de ATP, desacoplamento da cadeia respiratória e ruptura de membrana mitocondrial. A perda de ATP e a saída do citocromo C da membrana da mitocôndria resulta em morte celular (39; 61; 73; 87; 247). Alguns estudos têm mostrado que o bloqueio farmacológico do poro mitocondrial seria benéfico ou reverteria o desenvolvimento da IC. Animais geneticamente modificados com hipertrofia do ventrículo esquerdo apresentam probabilidade maior de abertura do poro mitocondrial pela indução com cálcio (138; 141; 171). A sugestão é que a abertura do poro mitocondrial e o ponto chave do processo patológico causado pela sobrecarga de cálcio devido a ativação adrenérgica na IC (153). Em estudo usando miócitos isolados de cães com IC já instalada ocorreu maior probabilidade de abertura do poro, efeito esse bloqueado pela cyclosporine-A, sugerindo que a abertura do poro é parcialmente responsável pela disfunção mitocondrial descrita na IC (212).

Apesar da composição molecular do poro mitocondrial e sua estrutura ainda serem desconhecidas, existem evidências de que sua função seria influenciada pela composição dos fosfolipídios e das proteínas presentes na membrana (67; 179). A composição dos ácidos graxos presentes na membrana mitocondrial afeta sua função e conseqüentemente a apoptose. Esses efeitos são dependentes da

concentração de cardiolipina presente na membrana. A cardiolipina serve como uma âncora para o citocromo C na membrana interna da mitocôndria. Condições ideais previnem a abertura do mPTP e conseqüentemente a liberação do citocromo C para o citosol que desencadearia a apoptose (145; 169; 170; 239).

Em 1977, Palmer e colaboradores (172) padronizaram o método para isolamento dos dois tipos de subpopulações mitocondriais que são descritas de acordo com a localização celular. A subpopulação subsarcolemal (SSM) é conhecida por estar localizada logo abaixo do sarcolema e varia mais morfológicamente até quatro μm quando comparada a subpopulação interfibrilar (IFM), que fica localizada entre as miofibrilas. A subpopulação interfibrilar é mais empacotada e comprida atingindo até 2 μm de comprimento (172; 214).

Palmer e colaboradores (172) foram capazes de isolar com o auxílio de centrifugações e digestão com tripsina as duas subpopulações mitocondriais, IFM e SSM. Foi demonstrado que a subpopulação IFM possui maior atividade do complexo II e da citrato sintase; e que essa subpopulação oxida todos os substratos 1.5 vezes mais rápido que a subpopulação SSM. Estudos subseqüentes determinaram que a subpopulação SSM tem a matriz lameliforme ao passo que a subpopulação IFM possui uma mistura da matriz tubular e lameliforme. Tal diferença é importante já que a matriz tubular tem menor espaço entre os cristais, acumulando, portanto uma quantidade maior de prótons que levaria ao aumento da atividade da ATP sintase, permitindo melhor oxidação fosforilativa (188). Isso está de acordo com o que já foi descrito na literatura, a subpopulação IFM oxida 1.5 vezes mais rápido os substratos e produz 3 vezes mais ATP em relação a subpopulação SSM. A literatura sugere que a subpopulação SSM produz ATP para manter o transporte ativo de eletrólitos e metabólitos através da membrana celular ao passo

que a subpopulação IFM produz ATP a fim de manter a maquinaria contrátil funcionando devido a localização dessa subpopulação (172). Além disso, a subpopulação IFM capta mais cálcio, além de ser mais resistente a esse íon quando comparada a subpopulação SSM (11; 72; 103; 173).

Vários estudos foram capazes de demonstrar que as duas subpopulações respondem de forma diferente aos estímulos de natureza fisiológica ou patológica tais como: como envelhecimento, isquemia/reperfusão, exercício, restrição calórica, dieta rica em gordura e insuficiência cardíaca (3; 28; 31; 32; 46; 91; 101; 115; 117). Hoppel e colaboradores demonstraram redução em 50% da oxidação fosforilativa na subpopulação IFM de hamsters que desenvolveram insuficiência cardíaca após 4 meses (74). Outro estudo também demonstrou que existe uma redução da oxidação fosforilativa em ambas subpopulações após o desenvolvimento da IC com redução da atividade da cadeia respiratória mitocondrial (192). Além disso, existe uma redução do estado 3 de consumo de oxigênio quando o *substrato* palmitoil-carnitina é utilizado com concomitante redução da expressão das enzimas da via da beta oxidação. No modelo de insuficiência cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão, Bugger e colaboradores (24) demonstraram que a expressão das proteínas da via da beta oxidação encontra-se reduzida assim como a bioenergética mitocondrial. Além disso, Garnier e colaboradores demonstraram que a expressão gênica do PGC-1 α e β (Co-Ativador da transcrição gênica) estão reduzidas na IC. Ademais, a deficiência do PGC-1 β acelera a transição da hipertrofia cardíaca para a IC (186). O PGC-1 α e β exercem papel fundamental na biogênese mitocondrial. Eles são expressos em tecidos como coração, músculo esquelético e fígado e regulam a expressão gênica das enzimas do metabolismo na mitocôndria e proteínas que constituem a cadeia respiratória mitocondrial (186). PGC-1 α e β tem papel chave na

regulação da função mitocondrial e participam na transdução do estímulo fisiológico para a produção de energia no músculo cardíaco (52; 186; 198).

A capacidade mitocondrial precisa aumentar proporcionalmente ao crescimento celular a fim de manter as necessidades energéticas da célula. Quando o miocárdio se hipertrofia, a biogênese mitocondrial se adequa às necessidades da célula. Em corações hipertrofiados, já foi demonstrado que os principais marcadores da função mitocondrial como a citrato sintase, citocromo C oxidase e a expressão das enzimas da oxidação fosforilativa permanecem inalteradas (159; 189; 248).

Quando o ventrículo descompensa e a IC se instala, ocorrem alterações como redução da expressão de várias enzimas do ciclo do ácido cítrico, da cadeia respiratória e de fatores de transcrição como NFR (do inglês, Nuclear Respiratory Factors) e mtTFA (do inglês, mitochondrial transcription factor A) (52; 93; 207). Essas alterações culminam na queda da bioenergética e conseqüentemente na produção de ATP. Outro fato importante que ocorre com a instalação da IC é a degradação dos supercomplexos da cadeia respiratória mitocondrial. Os supercomplexos são estruturas formadas pela junção do complexo I, complexo III, uma cópia do complexo IV, Coenzima Q e citocromo C. Esse supercomplexo tem a função de transportar elétrons do NADH para o oxigênio e de acordo com o mapa dimensional, os complexos individuais interagem entre si, a fim de diminuir o espaço percorrido pelos elétrons na cadeia respiratória entre os complexos individuais. Essa teoria fornece suporte ao conceito de que quanto menor o espaço percorrido pelos elétrons, menor o vazamento de elétrons pelos complexos e conseqüentemente menor a formação de espécies reativas de oxigênio.

Normalmente o citocromo C catalisa a redução do oxigênio para a formação de água. Entretanto, quando o oxigênio é reduzido apenas com um elétron, o ânion

superóxido é formado. O ânion superóxido é catalisado a peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase (SOD) que está presente na mitocôndria (1; 136; 251).

Outro fator que afeta a formação de espécies reativas de oxigênio é a captação de cálcio pela mitocôndria. O íon cálcio é de extrema importância na regulação de sinais em processos fisiológicos e patológicos na mitocôndria. O cálcio induz a produção de ATP pela mitocôndria através de ativação de enzimas do ciclo do ácido cítrico e da oxidação fosforilativa (33; 143; 146). Esse efeito na elevação da produção de ATP acontece em situações fisiológicas e permite o ajuste da produção de ATP as demandas celulares. O processo pelo qual o cálcio é nocivo para a mitocôndria ainda é desconhecido. Sabe-se que esse processo envolve grandes quantidades desse íon e a produção excessiva de espécies reativas do oxigênio (2; 21; 47). O cálcio entra na mitocôndria através de um canal de cálcio chamado Uniporter que é dependente do gradiente eletroquímico. Além disso, a composição desse canal ainda é desconhecida, mas sabe-se que tem baixa afinidade pelo cálcio. A literatura também descreve a existência de um receptor de rianodina na mitocôndria cardíaca que facilitaria a entrada de cálcio através da membrana para dentro da matriz. A entrada de cálcio requer aumento do potencial de membrana mitocondrial e a saída depende do acoplamento do trocador sódio-cálcio e sódio-hidrogênio que também estão presentes na membrana mitocondrial (19; 25; 58; 220).

Em contraste aos efeitos benéficos da entrada de cálcio na mitocôndria, a abertura do poro mitocondrial ocorre quando grandes quantidades de cálcio são captadas. O mPTP exerce papel fundamental em processos patológicos como a IC.

Como descrito anteriormente, esse poro é extremamente sensível ao cálcio e as espécies reativas de oxigênio, e sua abertura desencadeia a apoptose.

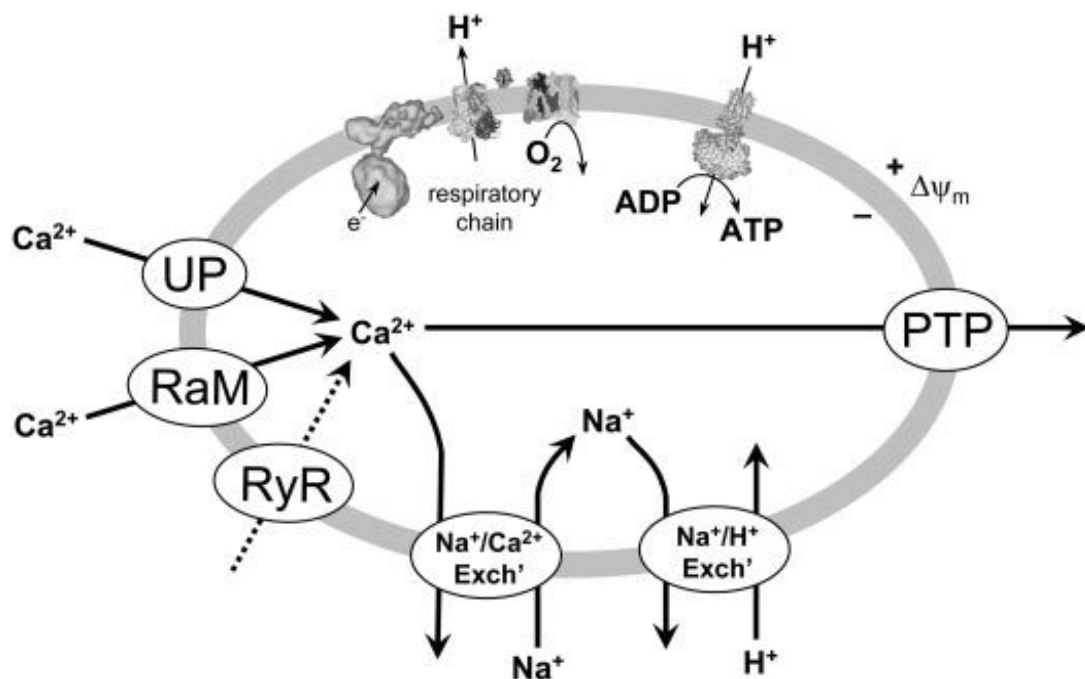


Figura III: Vias de captação e extrusão de cálcio na mitocôndria. UP – Uniporter; RaM – captação de cálcio modo rápido; RyR – receptor de rianodina mitocondrial; PTP – poro mitocondrial. Adaptado de Paul S. Brookes, Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle, *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817–C833, 2004

1.5 Papel da dieta na insuficiência cardíaca

A dieta e o estilo de vida são componentes estratégicos fundamentais para prevenção da doença cardiovascular, a maior causa de morbidade e mortalidade no mundo moderno. A *American Heart Association* desenvolve um plano estratégico e publica diretrizes com recomendações de dieta e estilo de vida para redução dos riscos das doenças cardiovasculares. As recomendações são apropriadas de maneira geral tanto para adultos quanto para crianças após dois anos de idade (123).

Sabe-se que múltiplos fatores da dieta influenciam no risco de desenvolvimento das doenças cardiovasculares. Estudos clínicos e observacionais demonstraram que uma dieta saudável reduz o risco e os fatores de risco de doenças do aparelho cardiovascular (9; 10; 106; 123; 124). Certa ênfase deve ser dada sobre a dieta como um todo e não somente aos componentes da mesma a fim de garantir a nutrição adequada e o balanço energético apropriado. Consistente com isso, a *American Heart Association*, recomenda uma dieta com uma variedade de frutas, grãos, produtos sem gordura ou com baixo teor de gordura, legumes, carne branca e peixe (123; 124).

O objetivo da diretriz da *American Heart Association* é definir uma dieta que tenha como objetivo manter o peso, perfil lipídico, pressão arterial e níveis normais de glicose ao longo da vida, considerando que a obesidade é um fator de risco independente para doenças do aparelho cardiovascular (182).

Apesar dessas recomendações, as diretrizes definem uma dieta para a prevenção das doenças cardiovasculares. Existe uma necessidade de desenvolvimento de dietas para pessoas que estão em risco de desenvolvimento da insuficiência cardíaca tão como para indivíduos que apresentam doença coronariana,

hipertensão, hipertrofia do ventrículo esquerdo, diabetes ou para pacientes que apresentam o quadro de insuficiência já instalado (221).

As diretrizes atuais não fornecem nenhuma informação a respeito da ingestão de carboidratos, lipídios ou proteína para pacientes que estão em risco ou que já tem quadro de insuficiência instalado. A *American Heart Association* recomenda que esses pacientes sigam as diretrizes para prevenção das doenças cardiovasculares (29; 45; 221).

Sabe-se que essa diretriz sofreu alterações após estudos epidemiológicos mostrarem que o baixo consumo de gordura não previne o surgimento das doenças do aparelho cardiovascular. A incidência de doenças cardiovasculares não está relacionada ao consumo de gordura (68; 76; 78; 221). Além disso, a redução do risco de doenças cardiovasculares foi observada em pessoas com alto consumo de gorduras insaturadas (68; 78; 113; 151) ao passo que a incidência foi maior na população que ingeria mais açúcares de rápida absorção (18; 68; 221). Portanto, houve uma mudança no paradigma em se tratando de prevenção das doenças cardiovasculares nos últimos anos. (figura 4)

A dieta é o determinante primário dos substratos utilizados no metabolismo cardíaco para suprir a alta demanda energética, a fim de manter a maquinaria contrátil funcionando. Primariamente, o miocárdio utiliza ácidos graxos e carboidratos como principal fonte energética. As diretrizes nos últimos 50 anos recomendaram um consumo maior de carboidratos a fim de reduzir o risco das doenças cardiovasculares. Desde a década de 60, acreditava-se que o baixo consumo de gordura e o alto consumo de carboidratos preveniriam o surgimento de doenças cardiovasculares. Entretanto, com o decorrer dos anos, notou-se que o alto consumo de carboidratos originados de comidas processadas e bebidas adoçadas

com açúcar aumentou a prevalência da obesidade e do diabetes tipo 2 (29; 78). (figura 4)

A glicose exerce efeitos tóxicos quando não existe um balanço entre a captação e oxidação. O alto consumo de açúcar ou a resistência à insulina expõem o coração à glicose, ativando cronicamente a sinalização da insulina, induzindo a síntese protéica e conseqüentemente a hipertrofia cardíaca (29; 210; 215; 221). A hiperglicemia crônica também aumenta o fluxo através da via da hexosamina, o que induz a resistência à insulina, hipertrofia do ventrículo esquerdo, apoptose, fibrose, além de aumentar a produção de espécies reativas do oxigênio (42; 50; 253). (figura 3)

Evidências tem mostrado que a substituição de carboidratos por gordura seria eficaz em protelar o desenvolvimento e a progressão da insuficiência cardíaca tanto em ratos SHR quanto após o infarto do miocárdio (43; 51; 164; 165; 209; 211). Além disso, essa substituição também seria eficaz na melhora do perfil lipídico e na redução da secreção de insulina (29; 149; 150).

A ingestão de proteína é outro fato que merece destaque. Pouco se sabe sobre a melhor fonte ou a quantidade de proteína que deve ser ingerida por pacientes nos estágios iniciais e/ou finais da insuficiência cardíaca. A maior causa da IC é a hipertrofia resultante da hipertensão crônica (121). Estudos epidemiológicos e intervencionais sugerem que a ingestão protéica por pacientes em condição estável de peso não afeta ou tem efeito mínimo sobre os fatores de risco de doença cardiovascular (70; 184; 250). Em contrapartida, um novo estudo epidemiológico sugere que a dieta hiperprotéica esta associada à maior incidência de doenças cardiovasculares em mulheres durante um período de 16 anos de

acompanhamento (110; 111) enquanto que o mesmo não foi observado em homens (180).

Evidências sugerem que o desenvolvimento e/ou progressão da insuficiência cardíaca seria afetada pela composição da dieta em termos de gordura e carboidratos (221). Estudos em animais sugerem que a substituição de carboidrato pela gordura teria efeitos benéficos sobre o coração insuficiente. Tanto a gordura saturada, monossaturada ou poli-insaturada teriam efeitos benéficos sobre a função do ventrículo esquerdo embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos. Além disso, existe na literatura uma carência de trabalhos em humanos mostrando os efeitos dessas dietas sobre a função cardíaca de pacientes com IC já instalada. A maior parte dos trabalhos mostra os efeitos das dietas e o risco de desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

Diante dos fatos expostos acima e considerando a falta de dados na literatura sobre o papel da dieta hiperprotéica no desenvolvimento e progressão da IC, o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos da dieta hiperprotéica sobre o desenvolvimento e progressão da insuficiência cardíaca e a função mitocondrial desses animais.

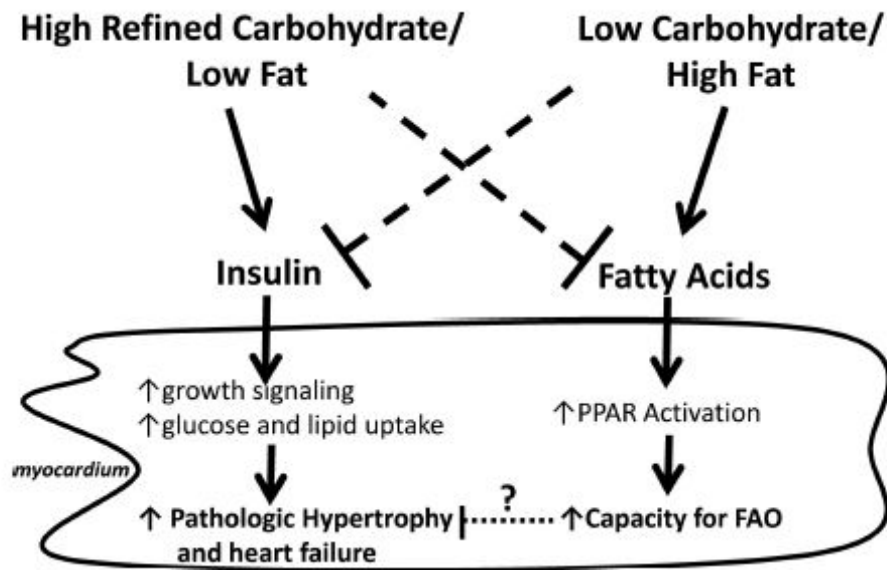


Figura IV: Representação esquemática dos efeitos da dieta composta de gordura e carboidratos sobre o cardiomiócito. Adaptado de Stanley et al, Circ Res. 2012;110:764-776.

OBJETIVOS

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da dieta hiperprotéica sobre a função mitocondrial de ratos com e sem insuficiência cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão após 14 e 22 semanas de dieta.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel da dieta hiperprotéica sobre a mortalidade de ratos com insuficiência cardíaca ao longo de 22 semanas de dieta
- Avaliar o papel da dieta hiperprotéica sobre a função cardíaca medida pelo ecocardiograma de animais com e sem insuficiência cardíaca após 14 e 22 semanas de dieta.
- Avaliar as alterações ponderais induzidas pela dieta hiperprotéica após 14 e 22 semanas de dieta.
- Avaliar o efeito da dieta hiperprotéica, sobre a bioenergética mitocondrial após 14 e 22 semanas de dieta.
- Investigar possíveis alterações da função da cadeia respiratória mitocondrial com a utilização de substratos específicos para os complexos I, III e IV
- Avaliar a resistência mitocondrial ao cálcio (Swelling)
- Medir a captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial de ratos com e sem insuficiência cardíaca após receberem dieta hiperprotéica por 14 e 22 semanas
- Medir a expressão protéica do canal Uniporter pela técnica de western blot de ratos com e sem insuficiência cardíaca após 14 e 22 semanas de dieta

MATERIAL E MÉTODOS

III MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais experimentais

Neste estudo, foram utilizados ratos normotensos da linhagem Sprague-dawley, machos com idade aproximada de 4 semanas, pesando aproximadamente entre 35 a 50g. Esses animais foram adquiridos da companhia Charles River, Germantown, Maryland, USA. Os animais foram mantidos em gaiolas, sob controle de temperatura, umidade e ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à água e ração. A investigação foi feita em conformidade com a *“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”* publicada pela *“US National Institutes of Health”* (NIH Publications No. 85-23, revisada em 1996) e aprovada pelo comitê de ética institucional da University of Maryland.

3.2 Cirurgia de Coartação da aorta

A cirurgia de coartação da aorta foi realizada como descrita na literatura (254). Os animais foram anestesiados com isoflurano 5 % diluído em oxigênio 95% e em seguida foram entubados e ventilados com auxílio de um ventilador para roedores (Harvard apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Foi realizada uma esternotomia para localização e dissecação do arco aórtico. Em seguida um clipe de tântalo com diâmetro interno de 0.45 mm foi colocado entre o tronco braquiocefálico e a artéria carótida comum esquerda. Após a colocação do clipe, a esternotomia foi fechada com auxílio de um fio de sutura e os animais passaram a receber 100% de oxigênio até completa recuperação. Os animais controle (SHAM) passaram pelo mesmo procedimento com exceção do clipe que não foi colocado. A sobrevivência da cirurgia após 48 horas foi de 100% para o grupo SHAM e de 68.6% para o grupo TAC.

TAC

SHAM



Figura V: Fotografia ilustrativa mostrando a cirurgia de coarctação aórtica. Animais Insuficientes (TAC) à esquerda e animais SHAM à direita. Um clipe de tântalo com diâmetro interno de 0.45 mm foi colocado entre o tronco braquiocéfálico e a artéria carótida comum esquerda. Adaptado de Hu et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H1261–H1269, 2003.

3.3 Dieta Hiperprotéica

Os animais foram alocados em gaiolas e três dias após a cirurgia começaram a receber a dieta hiperprotéica. Foram desenvolvidos dois protocolos experimentais considerando o tempo de duração da dieta. O primeiro protocolo foi de 14 semanas de dieta e o segundo foi de 22 semanas. Para os grupos avaliados de 14 e 22 semanas, foram utilizados 20 animais para os grupos TAC e 12 animais para o grupo SHAM.

A ração foi adquirida da Research Diets, New Brunswick, NJ, USA e os ingredientes utilizados para confecção eram de alta pureza. A dieta controle basicamente continha 20% de energia de proteína (caseína + L-cisteína), 68 % da energia de carboidratos (maltodextrina correspondia a 12% e 55% de milho) e 12 % de energia de gordura (mistura de banha de porco, manteiga de cacau e óleo de soja). A dieta hiperprotéica foi modificada com um aumento de 10% de caseína e uma diminuição na mesma proporção de carboidrato.

3.4 Análise da função ventricular por ecocardiografia

A ecocardiografia foi realizada uma semana antes do sacrifício dos animais a fim de avaliar a função ventricular *in vivo* como já descrito na literatura e padronizado no laboratório (51; 104; 177; 178). Após anestesia com isoflurano (2.5% diluído em oxigênio), foi realizada uma tricotomia da face anterior do tórax e os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo sobre uma plataforma com aquecimento que mantinha temperatura constante a 37°C. O exame foi realizado com aparelho Vevo 2100 (VisualSonics, Ontario, Canada) com transdutor MS200 de frequência de 15 MHz que permitiu obter imagens do ventrículo esquerdo em tempo real nos modos mono e bidimensional, além da velocidade de fluxo. As imagens em cortes transversais do VE foram gravadas no próprio aparelho para posterior análise. As imagens foram obtidas da janela paraesternal esquerda (longitudinal e transversal). As medidas do eixo longo foram combinadas com as medidas de 4 níveis diferentes do eixo curto para calcular o volume diastólico (EDV, end-diastolic volume) e volume sistólico final (ESV, end-systolic volume) de acordo com a equação de Simpson. A fração de ejeção foi calculada com a seguinte fórmula $SV = EDV - ESV / EDV$ onde SV corresponde a stroke volume, ESV corresponde a end-systolic volume e EDV

corresponde a end-diastolic volume. A análise do eixo curto no modo monodimensional no nível do músculo papilar foi usada para avaliar a contratilidade cardíaca em termos de fração de encurtamento (FS, fractional shortening) baseado nas dimensões do ventrículo esquerdo na diástole (LVIDd) e na sístole (LVIDs).

3.5 Purificação mitocondrial

Os animais foram anestesiados com isoflurano 5% e uma punção no ventrículo esquerdo foram feitas para coleta de soro e plasma. Os órgãos foram removidos, pesados, congelados rapidamente em nitrogênio líquido e mantidos a -80°C para posterior análise. O coração foi removido, as câmaras cardíacas pesadas e mantidas em tampão Chappel-Perry no gelo até o momento da extração da mitocôndria.

As duas subpopulações mitocondriais (SSM) e (IFM) foram isoladas do ventrículo esquerdo de acordo com o protocolo descrito por Palmer et al. (172). Os ventrículos foram lavados, picados e homogeneizados em 22.5 mL do tampão Chappel-Perry contendo 100 mM KCl, 50 mM Mops, 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mM EGTA, 1 mM ATP, pH 7.4 at 4°C . Em seguida o homogeneizado foi centrifugado a 2200 rpm por 10 minutos a 4°C . Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi filtrado com auxílio de uma gaze e transferido para um novo tubo. O pellet foi resuspenso em 7.5 mL do mesmo tampão e novamente centrifugado a 2200 rpm por 10 min. O segundo sobrenadante foi combinado com o primeiro e o respectivo pellet da segunda centrifugação foi mantido. Em seguida o sobrenadante foi novamente centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4°C . O pellet remanescente a essa centrifugação corresponde a subpopulação SSM. O pellet remanescente da segunda centrifugação foi resuspenso em 9 mL de tampão Chappel-Perry e adicionou-se 5 mg de tripsina por grama de tecido dissolvido em 1 mL do mesmo tampão. Após a adição de

tripsina, foi feita uma segunda homogeneização e as amostras foram agitadas com o auxílio de um agitador magnético por 10 min. Após agitação constante, foram adicionados 10 mL de tampão Chappel-Perry contendo albumina bovina (Fracao V-fatty acid free) 2 mg/mL e as amostras foram novamente homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm por 7 min a 4°C. O pelet foi novamente resuspenso em 7.5 mL do tampão Chappel-Perry e centrifugado a 2200 rpm por 7 min a 4°C. O sobrenadante desta última centrifugação foi filtrado com auxílio de gaze e novamente centrifugado a 5000 rpm por 7 min. O pellet final corresponde a subpopulação interfibrilar. Os pellets correspondentes a subpopulação SSM e IFM foram lavados duas vezes em tampão KME contendo 100 mM KCl, 50 mM Mops e 1 mM EGTA e novamente centrifugados a 5000 rpm por 10 min. Os pellets foram resuspenso em 200 µl de tampão KME e a concentração protéica foi determinada pelo método de Lowry.

3.6 Análise funcional da cadeia respiratória mitocondrial – oxidação fosforilativa

A análise funcional dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial foi avaliada com o auxílio de um transdutor para medida de oxigênio (Clark electrode, Qubit system, Canada). Ambas as subpopulações (200 µg) foram incubadas em um tampão para respiração mitocondrial contendo 100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA and 1mg/mL BSA/Fraction V, pH 7.4 como descrito por Palmer et al (172). O estado III e IV de consumo de oxigênio foram medidos com glutamato + malato (10 e 5 mM, respectivamente), Palmitoil-carnitina (40 µM) e Rotenona + Succinato (7.5 µM e 20 mM, respectivamente). Após a adição dos

substratos, foi adicionado ADP para atingir uma concentração final de 2 mM e observou-se um aumento do consumo de oxigênio em função do tempo. Após completa depleção do ADP, observado pelo surgimento do estado IV, adicionou-se oligomycin, inibidor do complexo V da cadeia respiratória. O State III, IV, IV + oligomycin, RCR e razão ADP:O foram calculados posteriormente.

3.7 Medidas do potencial de membrana e tamanho da mitocôndria

A medida do potencial de membrana foi feita utilizando citometria de fluxo (Facscan , Becton Dickinson) como descrito na literatura (32). Ambas as subpopulações (SSM e IFM) foram incubadas em tampão KME com um marcador para potencial de membrana da mitocôndria 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol carbocyanine iodide (300 nM JC-1; Invitrogen) ou MitoTracker Deep Red 633 por 15 min a 37°C. Ambos os marcadores se difundem pela membrana intacta da mitocôndria e são seletivos porque dependem do potencial para emitir fluorescência verde. Com a perda do potencial de membrana, o marcador deixa de emitir fluorescência verde e passa a emitir fluorescência vermelha. Cada parâmetro foi detectado usando um laser específico e 100000 eventos foram medidos por amostra fresca. Os resultados foram expressos como a razão da fluorescência vermelha pela verde. Para as medidas de tamanho, o aparelho era calibrado com micro esferas (Invitrogen) que permitiam medir exatamente o tamanho da mitocôndria. Os dados foram expressos em unidades arbitrárias.

3.8 Captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial

A probabilidade de abertura do poro mitocondrial foi determinada em ambas as subpopulações mitocondriais como descrito na literatura (51; 178). 500 µg de proteína foram incubados em 2 mL de tampão cálcio free contendo 100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH₂PO₄, 5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 5 mM glutamato, and 5 mM malato a 37°C em um fluorímetro com monitoramento constante da fluorescência. Em seguida, foi adicionado um marcador de cálcio (calcium green-5N, Invitrogen) com excitação e emissão de 488 e 530, respectivamente. Após a adição do marcador para cálcio, foi adicionado cálcio ao meio para avaliar a captação de cálcio pela mitocôndria e em seguida foi feita a infusão de peróxido de hidrogênio (400 mM) com fluxo constante de 0.2 µL/ min ate a obtenção de um platô. A probabilidade de abertura do poro mitocondrial foi corrigida pela quantidade de cálcio captada uma vez que o aumento do cálcio no interior do poro pode induzir a abertura do mesmo.

3.9 Estudo da expressão de proteína pelo método de Western Blot

A expressão do canal Uniporter foi determinada através da técnica de *Western Blot*. Para isso, as amostras foram solubilizadas em solução tampão RIPA (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0.) e a concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry (135).

3.9.1 Eletroforese e transferência das amostras

Alíquotas do homogeneizado, 20 µg de proteína foram diluídas em solução de Nupage LDS sample buffer 4X (Invitrogen) e em seguida aplicadas no Bis-Tris gel com gradiente de concentração de 4-20% (Bio-rad). As amostras foram submetidas a uma eletroforese com tampão MOPS (50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, pH 7.7) em um sistema Criterion Cell (BioRad) durante 1 hora, aplicando uma corrente constante de 140 V (Power Pac 200, BioRad).

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de polivinil difluorida (PVDF, Transfer Membrane, Hybond P, Amersham Life Science), previamente ativada com metanol. Para a transferência, o gel, a membrana e papel Whatman foram colocados em um sistema semi-dry (Bio-rad) contendo a solução de transferência (50 mM MOPS, 50 mM Tris Base, 1 mM EDTA e Metanol 20 %). O sistema foi submetido a uma corrente de 20v durante 1 hora.

3.9.1.2 Incubação com o anticorpo e detecção da proteína

As membranas foram incubadas durante 60 minutos, à temperatura ambiente, com uma solução bloqueante (leite desnatado 5 % Tris- 25 mM, NaCl 137 mM e Tween 20 0,2 %) para evitar a união não específica com reativos não imunológicos. Em seguida estas mesmas membranas foram incubadas durante a noite, sob agitação com solução bloqueante contendo o anticorpo primário monoclonal de camundongo para CBARA 1:1000 (Sigma). Após este procedimento, as membranas foram lavadas com solução de TBS-T (Tris 10 mM, NaCl 100 mM e Tween 20 0,1 %) por 60 minutos, sob agitação. Posteriormente, foram incubadas por 60 minutos, à temperatura ambiente e sob agitação, com anticorpo secundário 1:3000 (Cell Signaling). Após expor as membranas, as mesmas foram incubadas com Ponceau

staining por 15 min para verificar a uniformidade do carregamento protéico e o mesmo foi utilizado como fator de correção das expressões protéicas investigadas. A proteína foi detectada por uma reação de quimiluminescência, utilizando um sistema de detecção (ECL, ThermoScientific) incubando as membranas por 5 minutos. As membranas foram colocadas em foto documentador sensível à quimiluminescência (Bio-rad). As bandas das proteínas foram quantificadas mediante análise densitométrica. A análise das bandas foi feita através de um programa de análise de imagens (NIH Image 1.61).

3.10 Resistência ao cálcio

O teste de tolerância ao cálcio foi realizado como descrito na literatura (30; 177). A mitocôndria foi resuspendida em tampão cálcio free (contendo 100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 5 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 5 mM glutamato, and 5 mM malato, pH 7.4) com concentração final de 2 mg/ml de proteína em uma placa de 96 poços. Em seguida, a placa foi inserida em um leitor de placas (Molecular Devices, USA) e aquecida a 37°C. Após atingir 37°C, foi feita uma leitura de absorvância a 540 nm por 2 min a fim de se obter valores basais de absorvância. Após essa leitura, foi adicionado cloreto de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM e nova leitura foi realizada por 20 min.

3.11 Expressão dos resultados e análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Os valores de “n” representam o número de animais utilizados em cada protocolo experimental.

A análise estatística dos resultados foi realizada por análise de variância (ANOVA), uma ou duas vias, medidas repetidas ou completamente randomizada. Quando a ANOVA apresentava significância estatística o teste *post-hoc* de Bonferroni era realizado (GraphPad Prism Software, San Diego, CA, E.U.A). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para valores de $P < 0,05$.

3.13 Fármacos e reagentes utilizados

- Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA) (Sigma)
- Ácido Etilenoglicoltetracético (Sigma)
- Albumina bovina Fraction V (Sigma)
- Anticorpo de camundongo anti-CBARA (Sigma)
- Anti-imunoglobulina G de camundongo (Cell Signaling)
- Azul brilhante de Coomassie G (BioRad)
- Azul brilhante de Coomassie R (Sigma)
- Cloreto de cálcio (Sigma)
- Cloreto de potássio (Sigma)
- Cloreto de sódio (Sigma)
- DL-Ditiotreitol (DTT) (Sigma)
- Etanol absoluto (Sigma)
- Fosfato de potássio (Sigma)
- Fosfato de sódio (Merck)
- Leite desnatado (Bio-Rad)
- Metanol (Sigma)

- 3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)
- Reagente para detecção de Western Blot (ECL) (Thermo Scientific)
- Sulfato de Magnésio
- Adenosine 5'-triphosphate (ATP)
- Hidroxido de Potássio (Sigma)
- dihidrogenofosfato de potássio (Sigma)
- Cloreto de Magnésio (Sigma)
- Glutamato (Sigma)
- Malato (Sigma)
- Rotenona (Sigma)
- Succinato (Sigma)

RESULTADOS

IV RESULTADOS

4.1 Curva de sobrevida

Com o intuito de analisar os efeitos da dieta hiperprotéica sobre a sobrevida de animais com hipertrofia cardíaca, foi avaliada a mortalidade dos animais TAC e TAC Proteína ao longo de 22 semanas. Os dados mostram, claramente, que a dieta hiperprotéica aumentou a mortalidade no grupo TAC Proteína após 50 dias (figura 1).

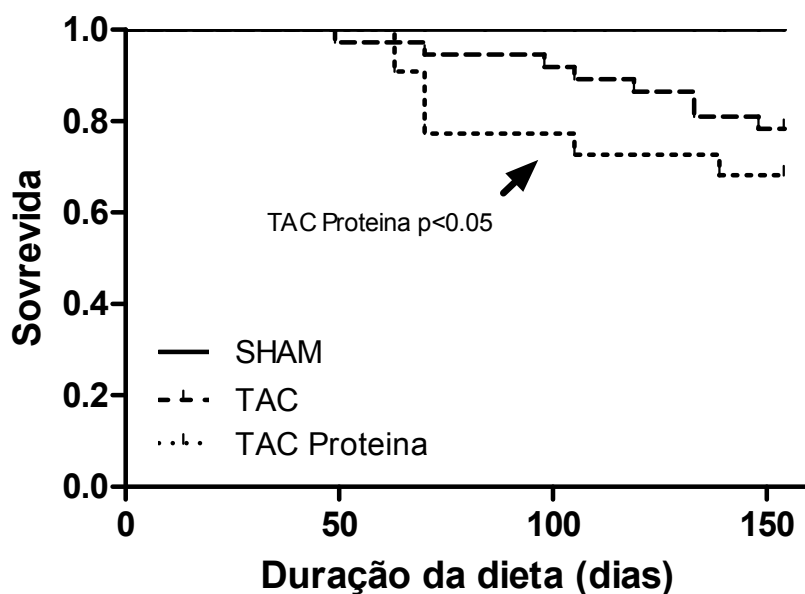


Figura 1: Curva de sobrevida em função do tempo de duração da dieta hiperprotéica. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão da média. $P < 0,05$ pelo teste de Mantel-Cox. $n = 12-15$

4.2 Análise ponderal após 14 semanas de dieta

A dieta hiperprotéica somada à hipertrofia cardíaca foi capaz de induzir significativa perda de peso em relação aos animais SHAM. Com relação ao peso do pulmão, átrio, ventrículos direito e esquerdo, notou-se que esses valores aumentaram, mas que esse aumento foi devido à hipertrofia induzida pela cirurgia e, que a dieta hiperprotéica, não foi capaz de alterá-los.

Em se tratando da gordura retroperitoneal, da gordura em volta do epidídimo e do peso dos rins, observou-se que esses valores encontram-se reduzidos devido à hipertrofia induzida pela cirurgia e que a dieta hiperprotéica não foi capaz de alterá-los.

Tabela 1 – Dados ponderais dos animais SHAM e TAC após dieta normal e hiperprotéica durante 14 semanas

	Dieta padrão		Dieta hiperprotéica	
	SHAM	TAC	SHAM	TAC
Peso corporal (g)	408 ± 8	390 ± 7	419 ± 9	375 ± 7*
Pulmão(g)	1.47 ± 0.05	5.23 ± 0.18*	1.48 ± 0.05	4.96 ± 0.42*
Peso do atrio (mg)	57.29 ± 5.15	212.94 ± 12.80*	59.66 ± 6.31	196.85 ± 18.44*
Peso do ventrículo direito (g)	0.19 ± 0.006	0.41 ± 0.01*	0.19 ± 0.007	0.40 ± 0.01*
Razãoventrículo direito/peso corporal (mg/g)	0.48 ± 0.01	1.06 ± 0.02*	0.46 ± 0.01	1.07 ± 0.049*
Razão ventrículo direito/tibia (mg/mm)	5.01 ± 0.15	10.49 ± 0.29*	4.57 ± 0.36	10.26 ± 0.42*
Peso ventrículo esquerdo (mg)	876 ± 18	1282 ± 33*	926 ± 24	1294 ± 44*
Razão ventrículo esquerdo/peso corporal (mg/g)	2.13 ± 0.02	3.28 ± 0.07*	2.21 ± 0.03	3.46 ± 0.1*
Razão ventrículo esquerdo/tibia (mg/mm)	22.13 ± 0.41	32.53 ± 0.75*	23.49 ± 0.52	33.38 ± 1.11*
Gordura retroperitoneal (g)	3.63 ± 0.31	2.15 ± 0.16*	3.88 ± 0.21	2.12 ± 0.11*
Gordura epidídimo (g)	4.48 ± 0.28	3.35 ± 0.16*	4.47 ± 0.25	2.97 ± 0.13*
Fígado (g)	12.05 ± 0.23	12.67 ± 0.27	12.57 ± 0.41	12.11 ± 0.34
Rins (g)	2.53 ± 0.06	1.94 ± 0.04*	2.68 ± 0.06	2.10 ± 0.05 *
Razão massa renal/peso corporal (mg/g)	6.13 ± 0.09	4.99 ± 0.09*	6.41 ± 0.14	5.61 ± 0.13*#

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. *P<0.05 vs respectivo SHAM.

ANOVA 2 vias e post hoc de Bonferroni.n= 12-15

4.3 Avaliação ecocardiográfica após 14 semanas de dieta

Com o intuito de avaliar os efeitos da dieta hiperprotéica sobre o desenvolvimento e progressão da hipertrofia cardíaca neste modelo estudado, foi feita uma avaliação ecocardiográfica, uma semana antes do sacrifício dos animais, a fim de avaliar, principalmente, a presença de dilatação da câmara ventricular esquerda, e, também, a possível queda da fração de ejeção e de encurtamento. De acordo com a tabela 2, podemos verificar que não houve diferença na frequência e débito cardíaco, e do volume sistólico entre os grupos estudados.

Em contrapartida, verificamos que após 13 semanas de tratamento, houve um aumento do volume sistólico, volume diastólico e volume sistólico final nos grupos TAC que receberam dieta padrão e hiperprotéica. Além disso, verificamos que os animais TAC, que receberam dieta padrão e/ou hiperprotéica, apresentaram queda da fração de ejeção, além da fração de encurtamento em relação ao grupo SHAM.

Tabela 2 - Avaliação ecocardiográfica dos animais SHAM e TAC após dieta padrão e hiperprotéica durante 14 semanas.

	Dieta padrão		Dieta hiperprotéica	
	SHAM	TAC	SHAM	TAC
Frequência cardíaca (bpm)	359 ± 7	342 ± 5	349 ± 12	337 ± 5
Debito cardíaco (ml/min)	144 ± 9	142 ± 14	127 ± 14	144 ± 15
Volume sistólico (ml)	0.4 ± 0.02	0.41 ± 0.04	0.36 ± 0.03	0.42 ± 0.04
Volume diastólico (ml)	0.5 ± 0.03	0.64 ± 0.05*	0.45 ± 0.04	0.64 ± 0.06*
Volume sistólico final (ml)	0.09 ± 0.009	0.22 ± 0.02*	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.03*
Fração de ejeção (%)	82 ± 1.3	64 ± 2.2*	80 ± 2.3	67 ± 2.9*
Fração de encurtamento (%)	44 ± 1.6	30 ± 1.5*	42 ± 2.3	32 ± 2*

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. *P<0.05 vs SHAM. ANOVA 2 vias e post hoc de Bonferroni. n = 12-15

4.4 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado III

A fim de avaliar os efeitos da dieta hiperprotéica sobre bioenergética mitocondrial da fração interfibrilar de ratos SHAM e TAC, principalmente sobre o estado III, no qual o consumo de oxigênio é máximo com reação limitada pela quantidade de ADP adicionado, foi feita uma avaliação funcional dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial utilizando-se os substratos clássicos descritos na literatura. De acordo com a figura 2, durante 14 semanas pode-se verificar que nem a hipertrofia, nem a dieta hiperprotéica, ou a combinação de ambas, alteraram o estado III de consumo de oxigênio pela mitocôndria.

Para efeito de teste, foi utilizado glutamato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória (Figura 2 A), rotenona + succinato como substrato para avaliação do complexo III (Figura 2 C) e palmitoil-carnitina como substrato para avaliação da beta oxidação (Figura 2 B).

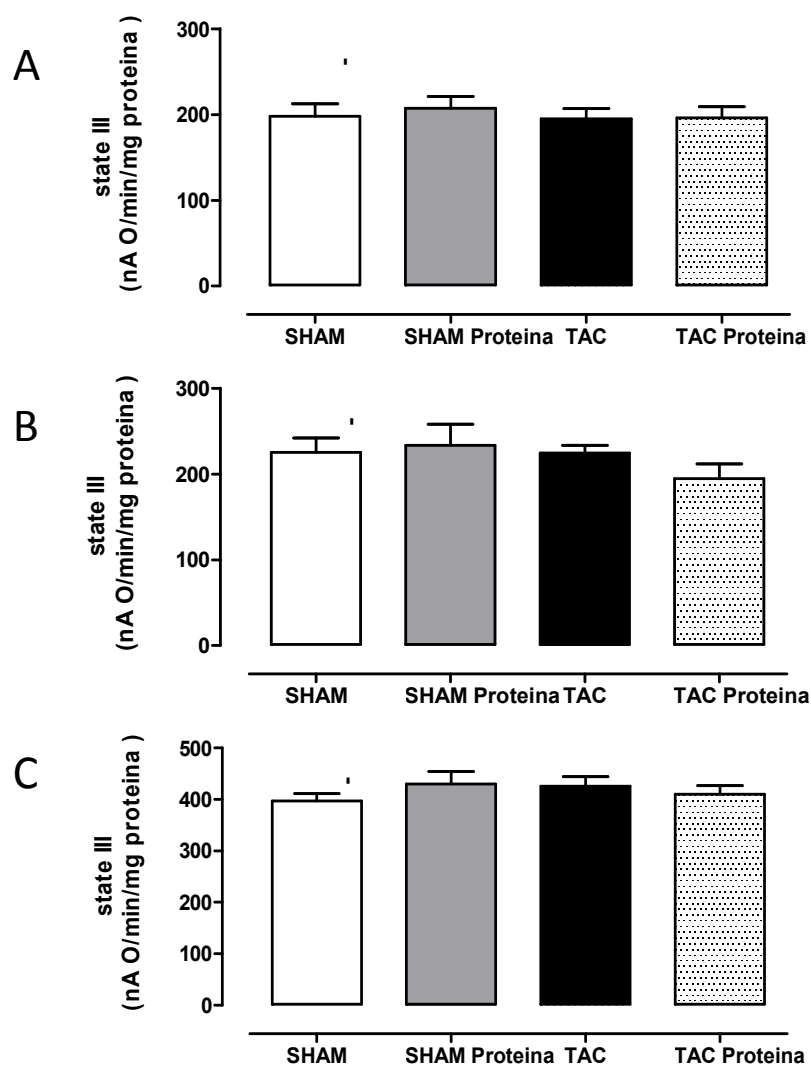


Figura 2. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado III de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado III de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado III de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.5 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado IV

Objetivando avaliar os efeitos da dieta hiperprotéica sobre a cadeia respiratória mitocondrial da fração interfibrilar de ratos SHAM e TAC, principalmente sobre o estado IV de consumo de oxigênio, o qual representa o estado de “repouso” pelo baixo consumo de oxigênio na ausência de ADP, foi feita uma avaliação funcional dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial utilizando-se os substratos clássicos descrito na literatura. De acordo com a figura 3, pode-se verificar, durante 14 semanas, que nem a hipertrofia, nem a dieta hiperprotéica ou a combinação de ambas, alteraram o estado IV de consumo de oxigênio da mitocondria. Para essa análise, foi utilizado glutamato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória (Figura 3 A), rotenona + succinato como substrato para avaliação do complexo III (Figura 3 C) e palmitoil-carnitina como substrato para avaliação da beta oxidação (Figura 3 B).

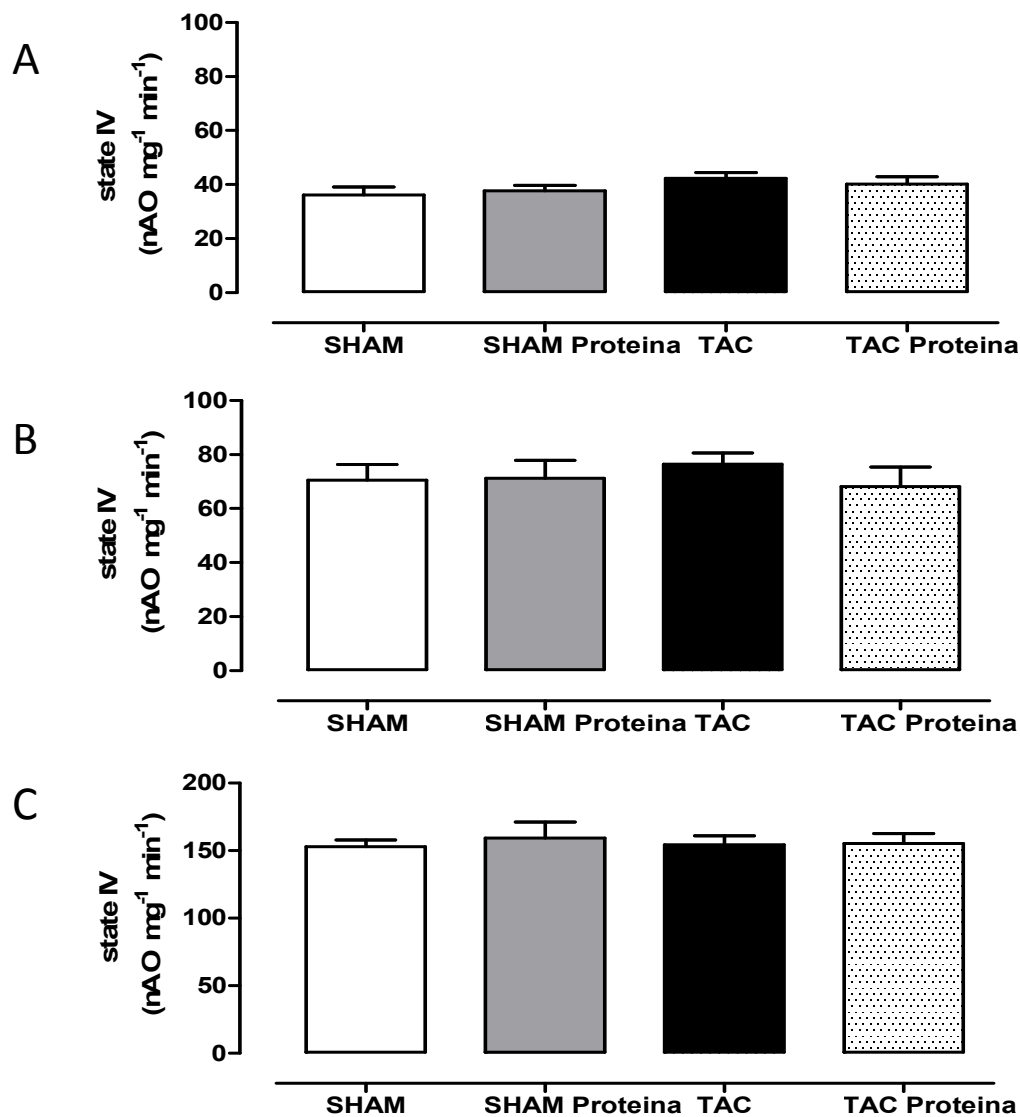


Figura 3. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0.05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.6 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado IV + Oligomicina

Um dos marcadores da disfunção mitocondrial é o consumo de oxigênio sem a produção de ATP devido ao desacoplamento dos complexos da cadeia respiratória. Para verificar um possível vazamento dos elétrons pelo complexo I e III, foi adicionado Oligomicina, um inibidor do complexo V da cadeia respiratória. Quando o complexo V é inibido, o consumo de oxigênio não é interrompido, porém, verifica-se que existe uma queda nesse consumo e o ATP não é sintetizado. Logo, conclui-se que se houver um consumo maior de oxigênio após a inibição do complexo V, percebe-se um possível desacoplamento dos complexos da cadeia respiratória. Os dados apresentados na figura 4 sugerem que não houve desacoplamento da cadeia respiratória, uma vez que não houve diferença entre os grupos estudados.

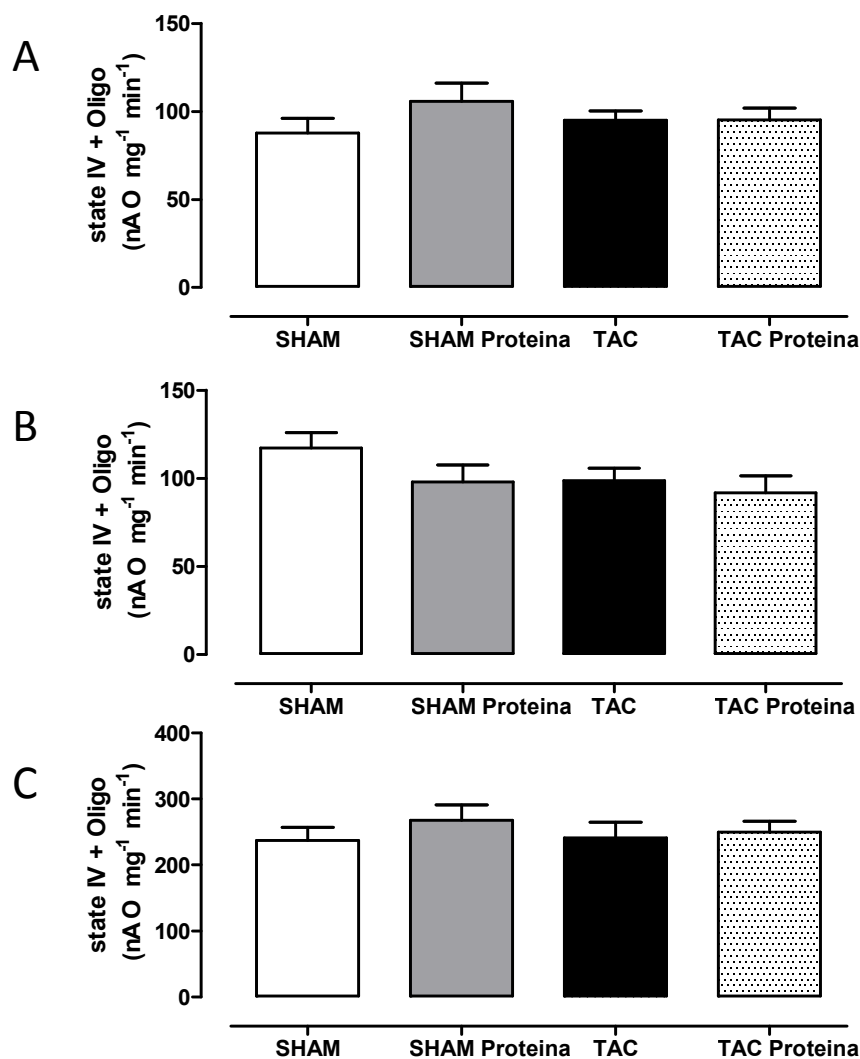


Figura 4. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato + Oligomicina. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina + Oligomicina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato+ Oligomicina. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.7 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – RCR

O RCR é definido como a razão do estado III pelo Estado IV de consumo de oxigênio. É um índice para verificar o “acoplamento” ou “eficiência” da cadeia respiratória mitocondrial. O valor do RCR pode sofrer alterações caso ocorra vazamento de elétrons pelos complexos mitocondriais, o que geraria a elevação do estado IV, e por conseguinte a diminuição do índice e, no caso de uma redução do estado III, também ocorreria uma redução do índice.

Os dados apresentados sugerem que a dieta hiperprotéica durante 14 semanas não foi capaz de alterar os valores de RCR, tanto em animais do grupo controle quanto em animais do grupo TAC (figura 5).

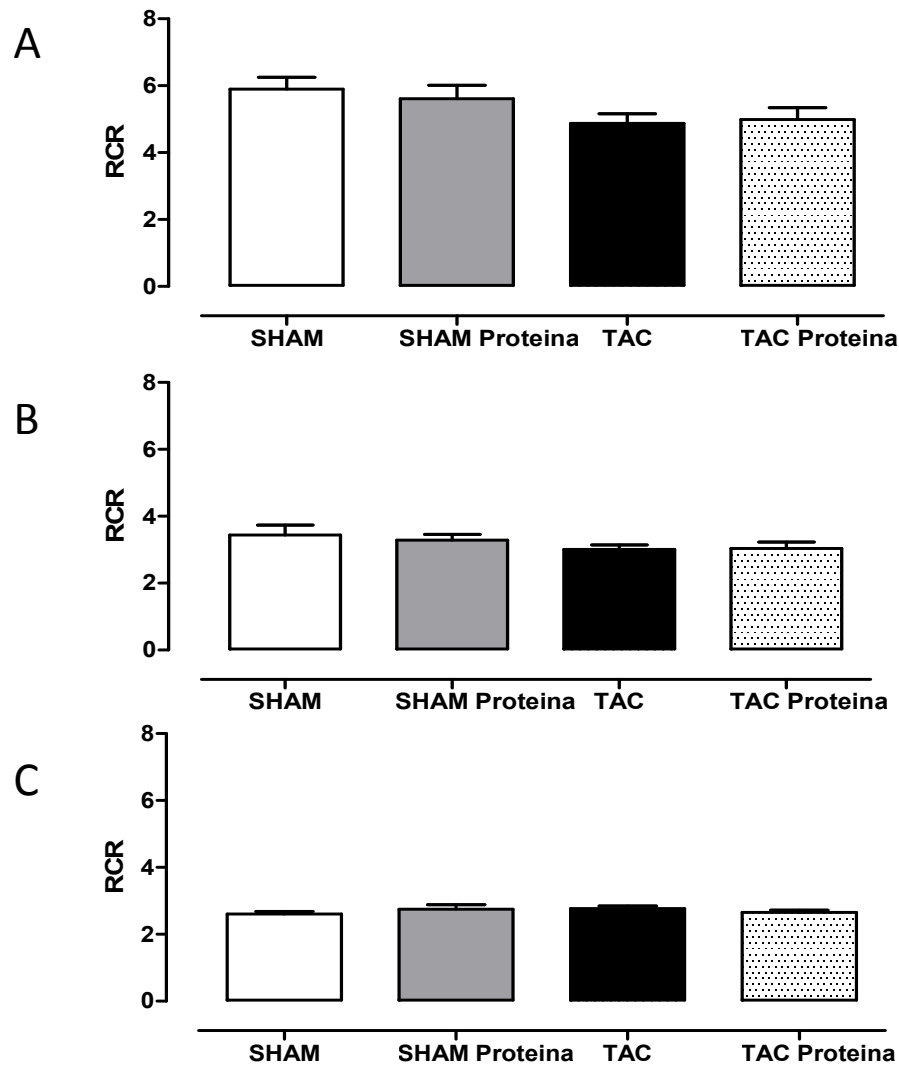


Figura 5. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e TAC tratados com dieta normal e hiper protéica por 14 semanas. (A) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.8 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Razão fosfato/oxigênio - ADP:O

A razão fosfato/oxigênio (ADP:O) é um indicativo de quanto oxigênio é reduzido na fosforilação para cada ADP consumido. Os dados apresentados sugerem que a dieta hiperprotéica durante 14 semanas não foi capaz de alterar a razão ADP:O, tanto em animais do grupo controle quanto em animais do grupo TAC (figura 6).

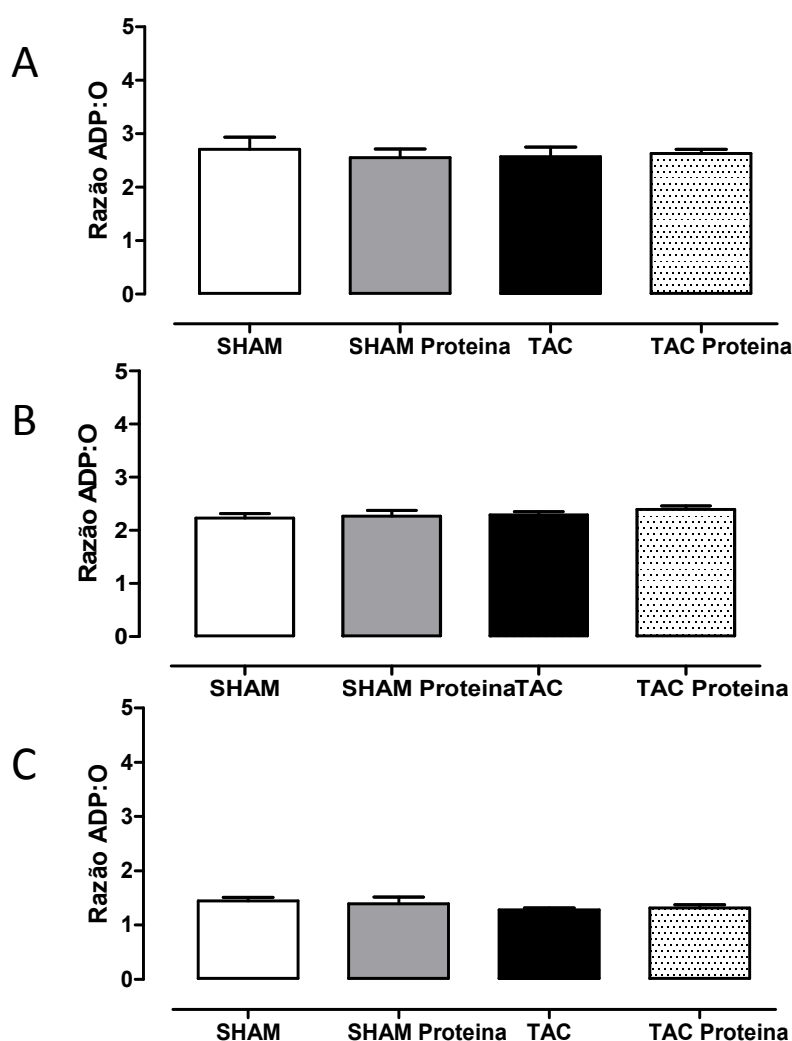


Figura 6. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Razão fosfato/Oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão fosfato/Oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão fosfato/Oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.9 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado III

Para avaliar os efeitos da dieta hiperprotéica sobre a cadeia respiratória mitocondrial da fração subsarcolemal de ratos SHAM e TAC, principalmente sobre o estado III, no qual o consumo de oxigênio é máximo com reação limitada pela quantidade de ADP adicionado, foi feita uma avaliação funcional dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial utilizando-se os substratos clássicos descrito na literatura.

De acordo com a figura 6, pode-se verificar que nem a hipertrofia, nem a dieta hiperprotéica, ou a combinação de ambas durante 14 semanas alteraram o estado III de consumo de oxigênio pela mitocôndria.

Para avaliá-lo, utilizou-se o glutamato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória (Figura 7 A) e rotenona + succinato como substrato para avaliação do complexo III (Figura 7 C).

Quando comparado ao grupo SHAM, o estado III foi menor no grupo TAC Proteína com a utilização de palmitoil-carnitina como substrato para avaliação da beta oxidação (Figura 7 B).

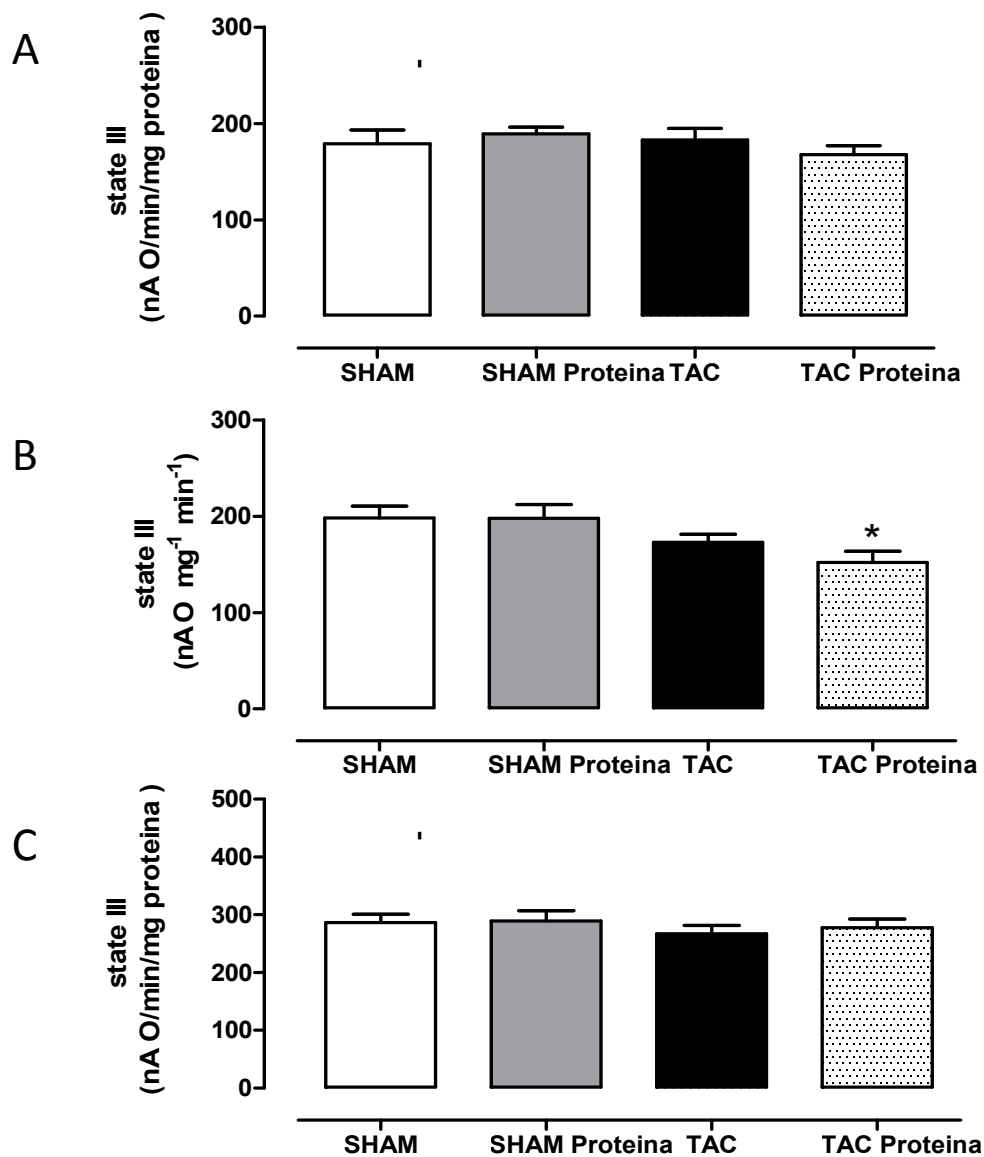


Figura 7. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Estado III de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado III de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado III de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ ANOVA 2 vias seguido de post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

4.10 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado IV

Com o objetivo de avaliar os efeitos da dieta hiperprotéica sobre a cadeia respiratória mitocondrial da fração subsarcolemal de ratos SHAM e TAC, principalmente sobre o estado IV de consumo de oxigênio, o qual representa o estado de “repouso” pelo baixo consumo de oxigênio na ausência de ADP, foi feita uma avaliação funcional dos complexos da cadeia respiratória mitocondrial utilizando-se os substratos clássicos descrito na literatura. De acordo com a figura 8, pode-se verificar que nem a hipertrofia, nem a dieta hiperprotéica, ou a combinação de ambos, durante 14 semanas, alteraram o estado IV de consumo de oxigênio da mitocondria. Utilizou-se glutamato + malato como substrato para avaliação do complexo I da cadeia respiratória (Figura 8 A), rotenona + succinato como substrato para avaliação do complexo III (Figura 8 C) e palmitoil-carnitina como substrato para avaliação da beta oxidação (Figura 8 B).

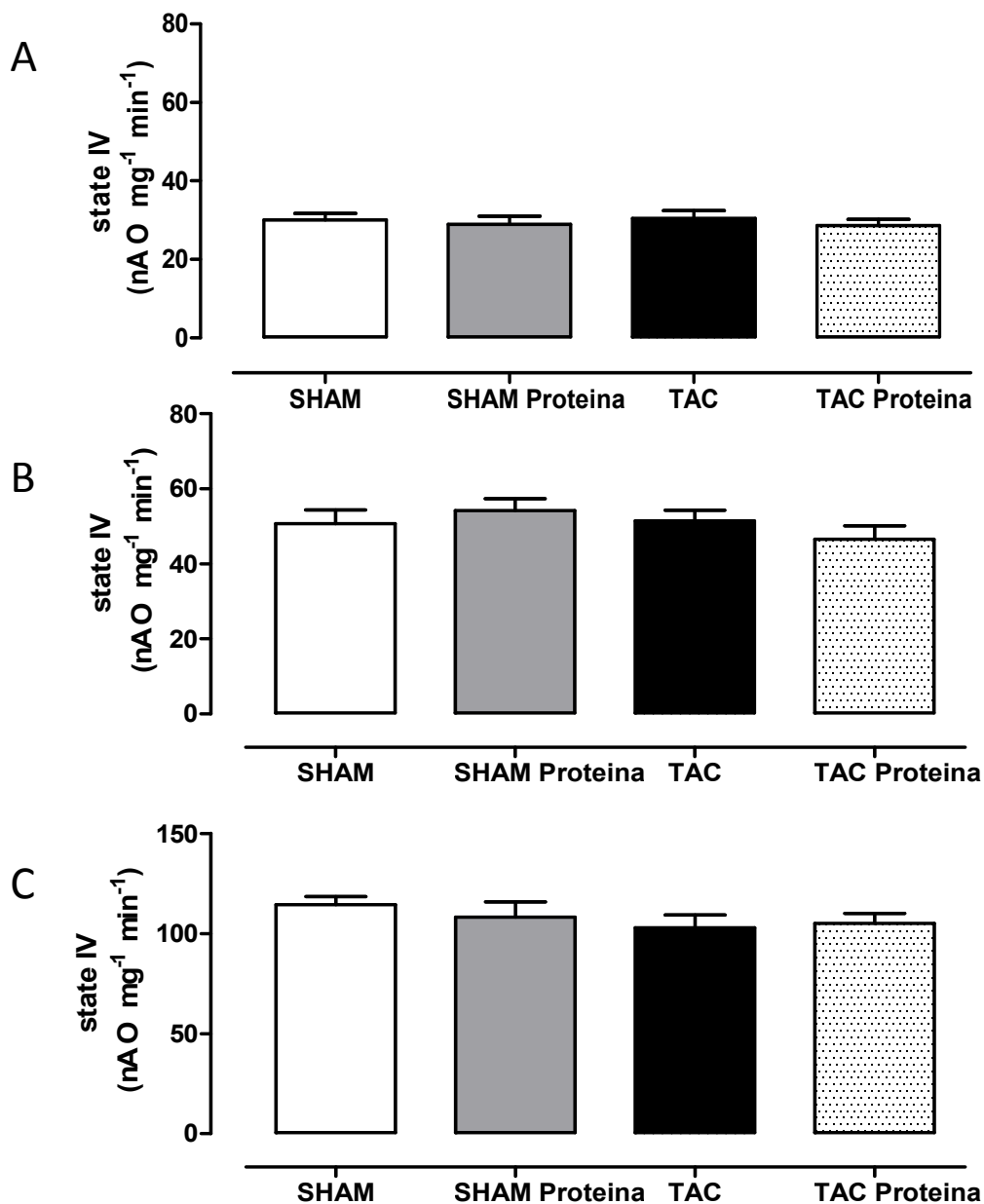


Figura 8. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiper protéica por 14 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.11 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado IV + Oligomicina

Um dos marcadores da disfunção mitocondrial é o consumo de oxigênio sem a produção de ATP devido ao desacoplamento dos complexos da cadeia respiratória. Esse “vazamento” de elétrons ocorre principalmente pelo complexo I e III. Com a adição de Oligomicina, um inibidor do complexo V da cadeia respiratória, o consumo de oxigênio não é interrompido, porém, verifica-se que existe uma queda do consumo de ATP, sugerindo que, se houver um consumo maior de oxigênio após a inibição do complexo V, verifica-se um possível desacoplamento dos complexos da cadeia respiratória.

Os dados apresentados na figura 9 indicam que não houve desacoplamento da cadeia respiratória, já que não houve diferença entre os grupos estudados.

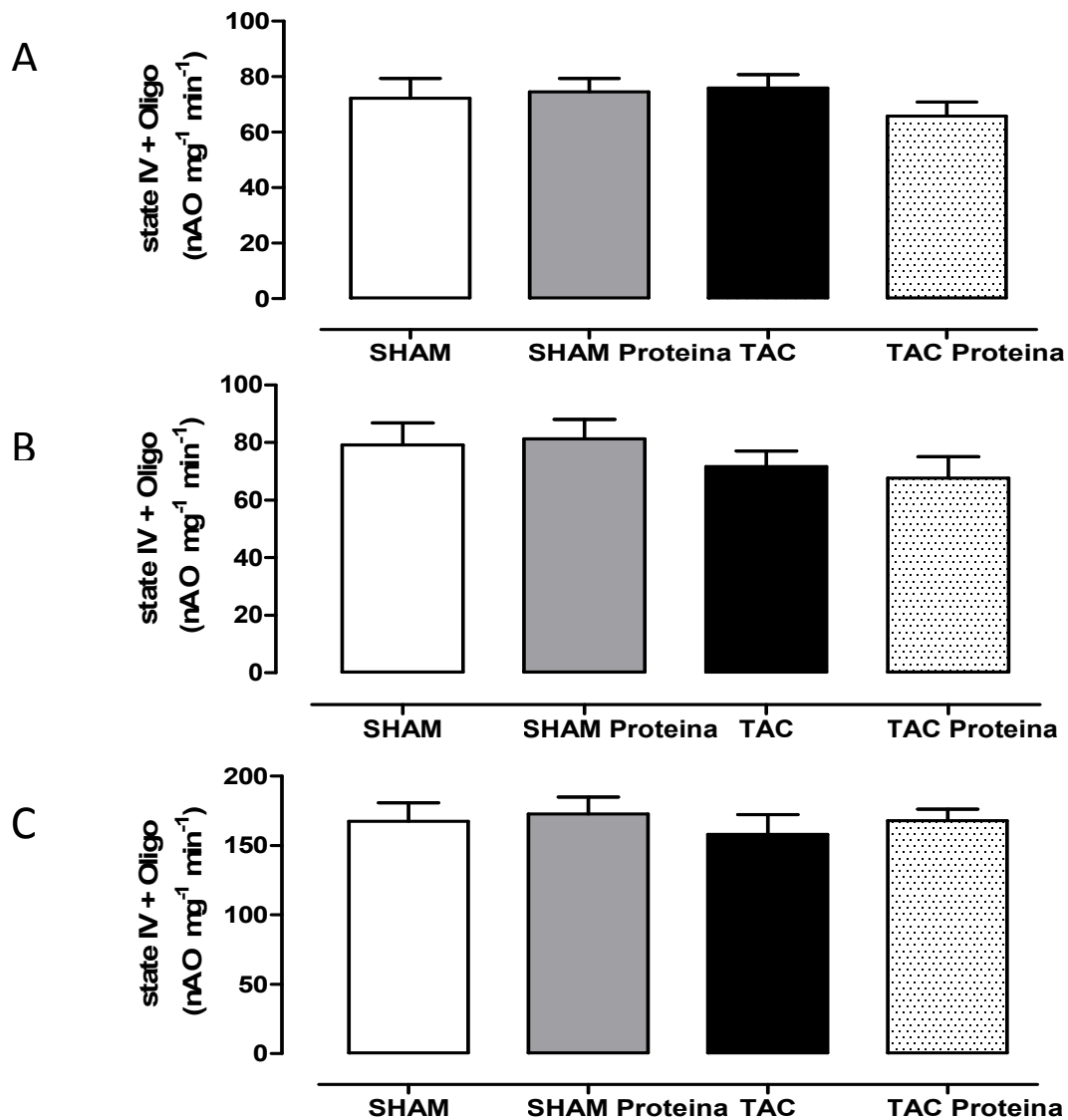


Figura 9. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiper protéica por 14 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato + Oligomicina. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina + Oligomicina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato+ Oligomicina. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.12 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – RCR

A razão controle respiratório (RCR) é definida como a razão do estado III pelo estado IV de consumo de oxigênio e é um índice para verificar o “acoplamento” ou “eficiência” da cadeia respiratória mitocondrial, já que um possível “vazamento” de elétrons pelos complexos mitocondriais elevaria os valores do estado IV, conseqüentemente levando a redução desse índice. Outro fato que poderia gerar a redução deste índice seria uma possível diminuição do estado III de consumo de oxigênio.

Os dados apresentados sugerem que a dieta hiperprotéica, durante 14 semanas, não foi capaz de alterar os valores de RCR, tanto em animais do grupo controle quanto em animais do grupo TAC (figura 10).

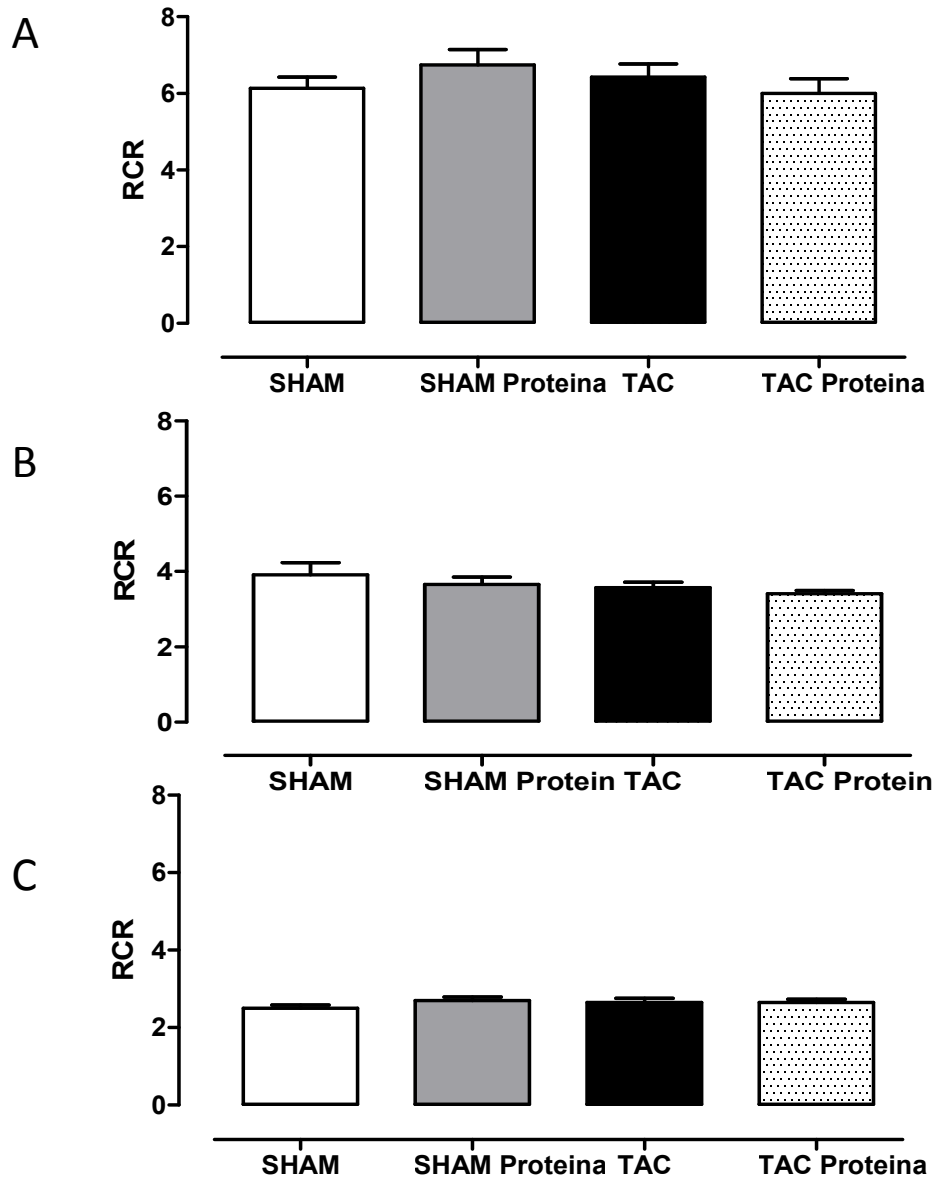


Figura 10. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.13 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Razão fosfato/oxigênio - ADP:O

A razão fosfato/oxigênio (ADP:O) é um indicativo de quanto oxigênio é reduzido na fosforilação de cada ADP. Os dados apresentados sugerem que a dieta hiperprotéica, durante 14 semanas, não foi capaz de alterar a razão ADP:O, tanto em animais do grupo controle quanto em animais do grupo TAC (figura 11).

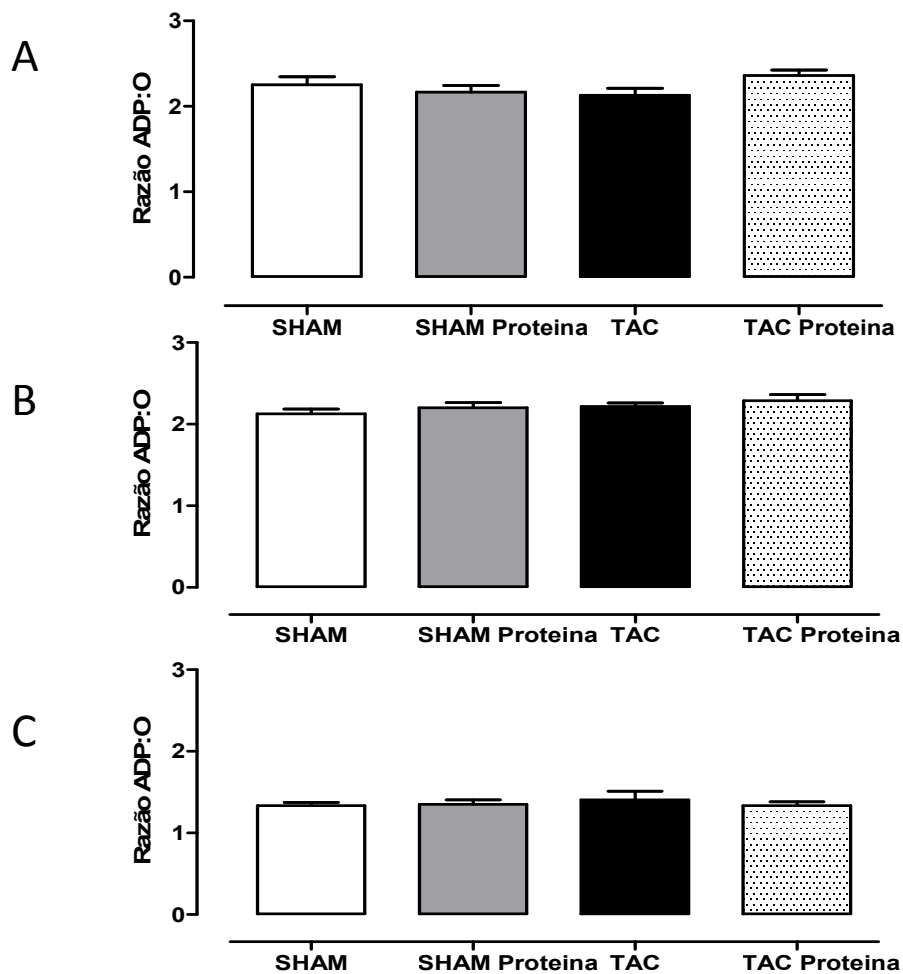


Figura 11. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 14 semanas. (A) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

4.14 Análise da resistência ao cálcio

A análise de resistência ao cálcio foi feita com a incubação da mitocôndria em uma solução sem cálcio na presença dos substratos glutamato + malato.

Após a incubação da mitocôndria no tampão cálcio free, foi feita uma leitura durante 2 minutos, a fim de estabelecer valores basais de absorbância. Em seguida, foi adicionado cloreto de cálcio nas concentrações finais de 1 e 5 mM seguido de nova leitura por 20 minutos, a 37 graus Celsius. Quando a concentração de cálcio no meio extramitocondrial aumenta a níveis supra fisiológicos, a mitocôndria começa a captar cálcio com subsequente abertura do poro mitocondrial. De acordo com a figura 12, pode-se observar que a dieta hiperprotéica não alterou a resistência ao cálcio de ambas as subpopulações mitocondriais em animais SHAM ou TAC.

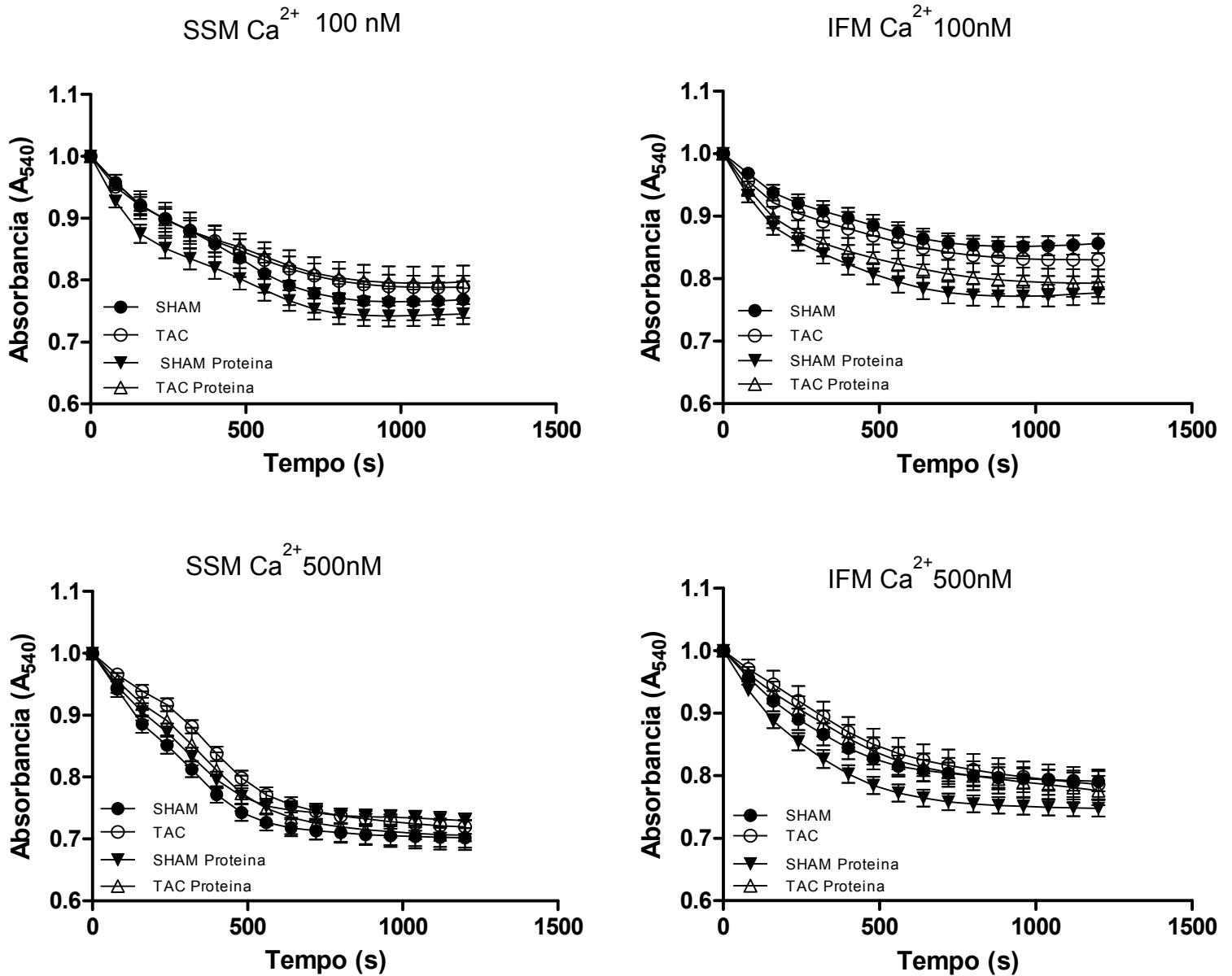


Figura 12. Queda da absorbância após adição de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM em ambas as subpopulações mitocondriais de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 14 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 2 vias. $n = 12-15$

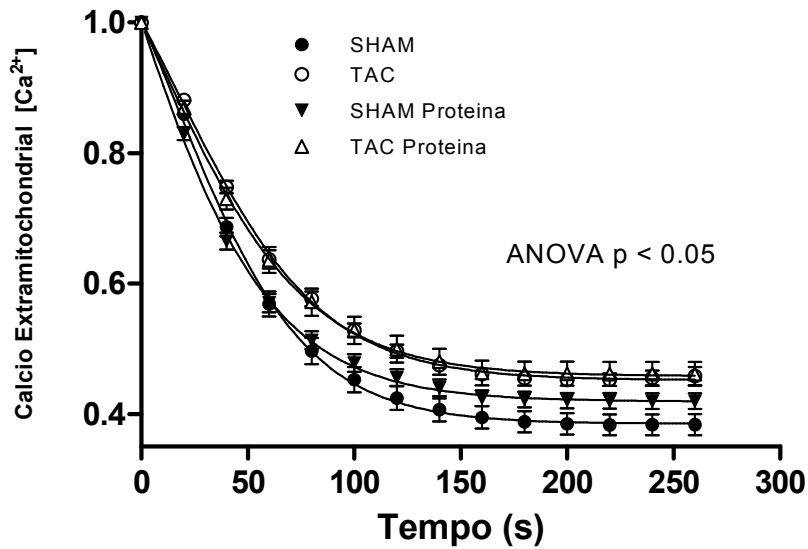
4.15 Análise da captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial – Fração interfibrilar

Para avaliar a captação de cálcio e abertura do poro pela mitocôndria entre os grupos estudados, a mitocôndria foi novamente incubada em um tampão cálcio free na presença do marcador de cálcio (calciumgreen 5N), o qual emite fluorescência verde na presença de cálcio livre. Em seguida, foi adicionado cálcio e a captação foi medida pela queda da fluorescência com o decorrer do tempo. Após a estabilização, iniciou-se a perfusão de peróxido de hidrogênio (400mM) em um fluxo de 0.2 µl/min para indução da abertura do poro mitocondrial.

Como já era esperado, de acordo com a figura 13 A e B, observa-se que a hipertrofia cardíaca promoveu uma diminuição da captação de cálcio e um aumento da probabilidade de abertura do poro mitocondrial.

Pode-se observar que, a dieta hiperprotéica não alterou o aumento da captação de cálcio e a abertura do poro mitocondrial, que foi induzido pela hipertrofia cardíaca na subpopulação interfibrilar no decorrer de 14 semanas.

A



B

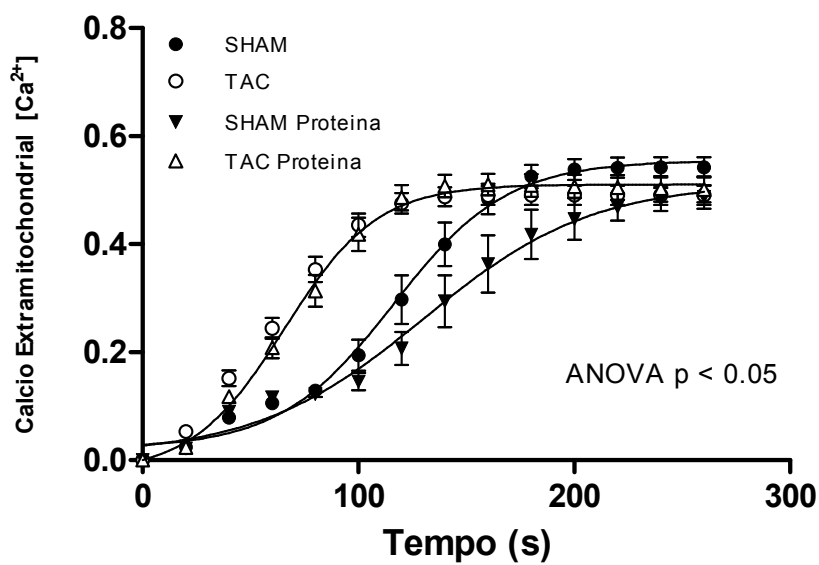
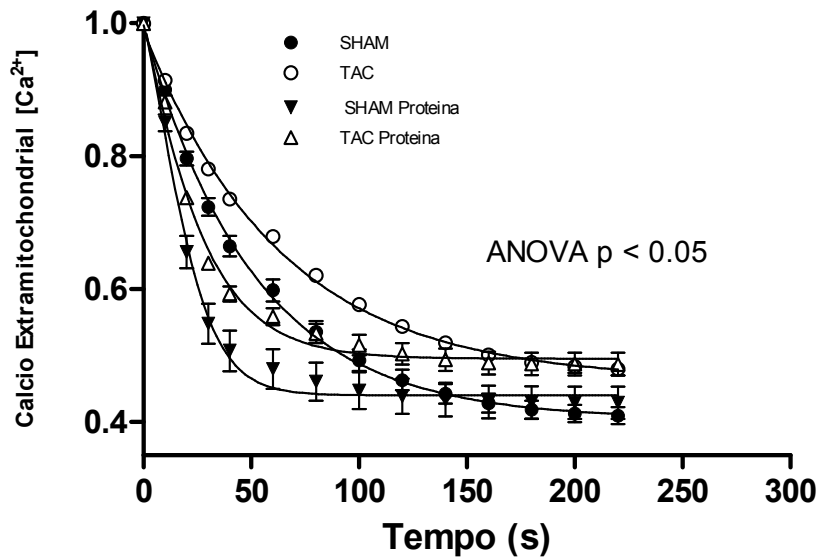


Figura 13. Captação de cálcio (A) e probabilidade de abertura do poro mitocondrial (B) da fração interfibrilar de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 14 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias seguido de post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

4.16 Análise da captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial – Fração subsarcolemal

Quando a subpopulação subsarcolemal foi avaliada, observou-se que a dieta hiperprotéica aumentou a captação de cálcio em ratos SHAM e TAC (figura 14 A). Além disso, foi observado que a probabilidade de abertura do poro mitocondrial também está aumentada nos ratos TAC que receberam a dieta hiperprotéica quando comparados aos animais TAC que somente receberam dieta padrão. A dieta hiperprotéica não alterou a probabilidade de abertura do poro mitocondrial em ratos SHAM (figura 14 B).

A



B

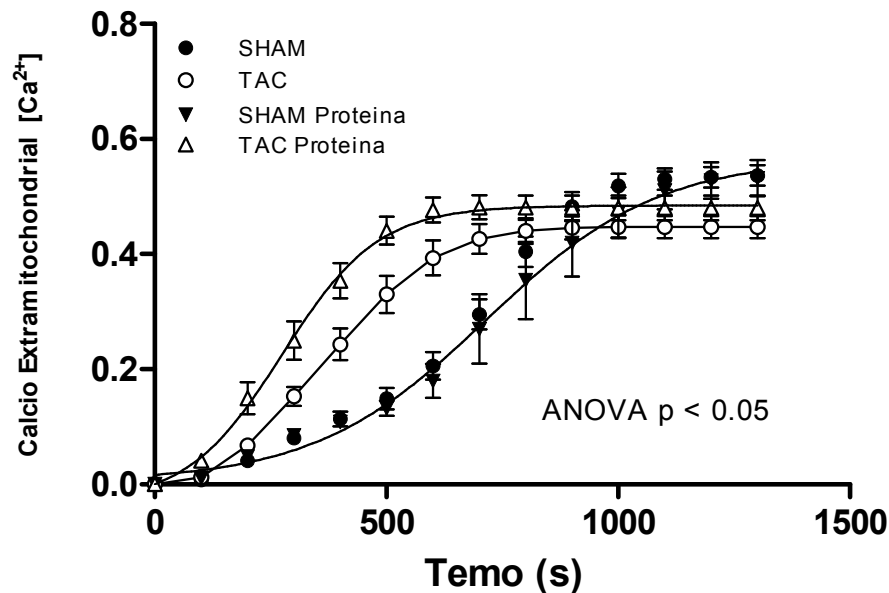


Figura 14. Captação de cálcio (A) e probabilidade de abertura do poro mitocondrial (B) da fração subsarcolemal de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 14 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias seguido de post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

4.17 Expressão protéica do canal Uniporter em ambas subpopulações mitocondriais

Como a captação de cálcio pela mitocôndria foi maior nos grupos que receberam a dieta hiperprotéica, foi avaliada a expressão protéica no canal uniporter. Esse canal desempenha papel fundamental na entrada de cálcio na mitocôndria. Ele desempenha um papel similar ao canal de cálcio do tipo L presente na membrana externa da célula. Toda a entrada de cálcio ocorre através dele.

Em relação à subpopulação IFM, a expressão do canal não foi estatisticamente significativa quando comparado ao grupo SHAM. Embora os valores nos grupos SHAM Proteína, TAC e TAC Proteína dobraram no decorrer de 14 semanas (figura 15 A)

Em relação à subpopulação SSM, a expressão do canal foi maior no grupo TAC quando comparado ao grupo SHAM. Embora os demais grupos apresentem valores maiores, a expressão deste canal não foi estatisticamente significativa.

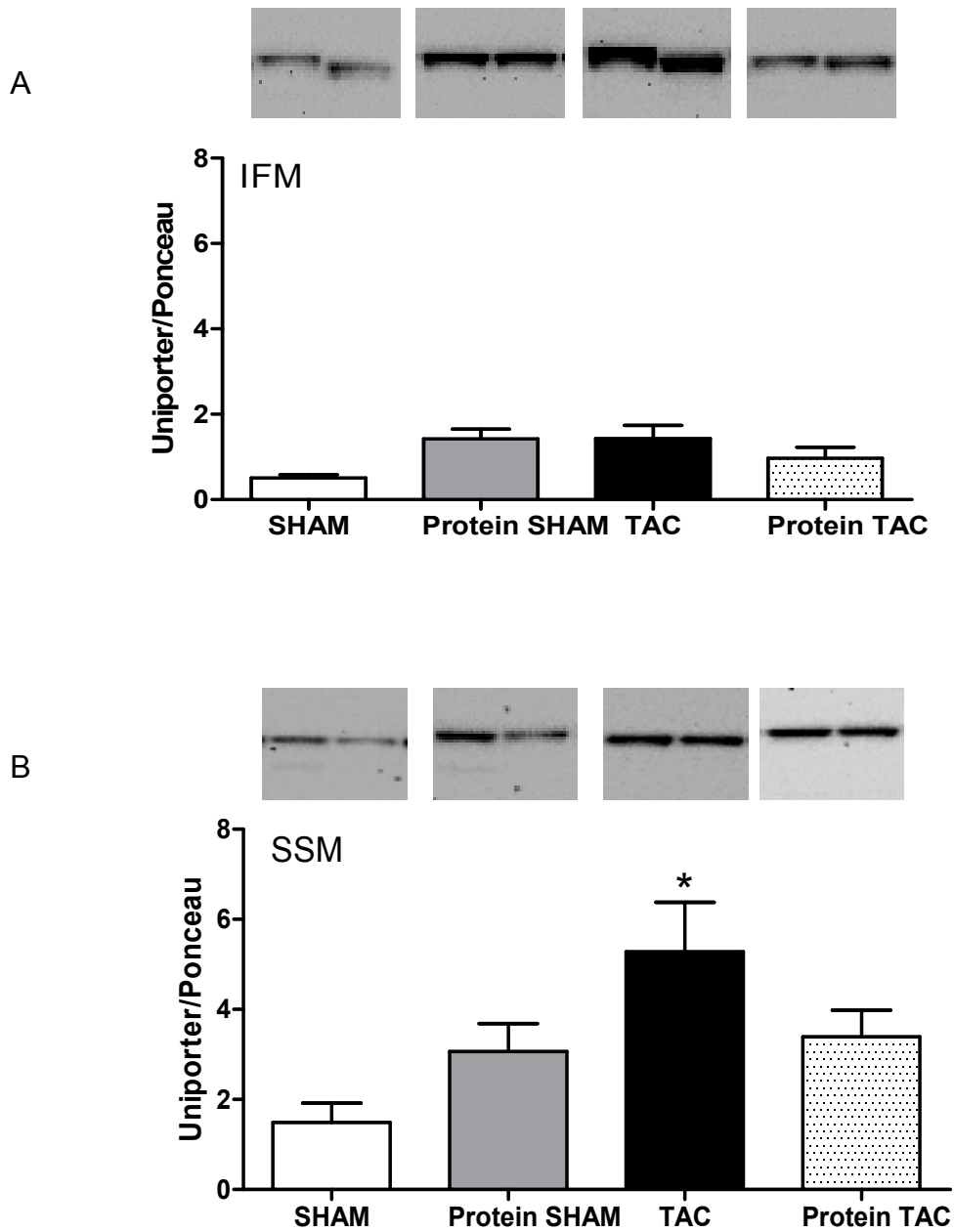


Figura 15. Análise densitométrica de Western Blot para expressão protéica do canal uniporter em ambas subpopulações mitocondriais de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 14 semanas de tratamento. As fotos acima mostram as bandas representativas da expressão do canal da fração interfibrilar (A) e subsarcolemal (B). Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias seguido de post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

4.18 Análise ponderal após 22 semanas de tratamento

Como este modelo de insuficiência cardíaca depende tanto do tamanho do clipe quanto do tempo, foi realizado um segundo estudo para verificar se a dieta hiperprotéica teria um papel maior ao longo do tempo. Os dados mostram que, após 14 semanas de tratamento, os animais TAC apresentaram hipertrofia tanto da câmara ventricular direita quanto da câmara ventricular esquerda, e que a dieta hiperprotéica novamente não foi capaz de alterar esses valores. Em relação ao peso corporal, não foi observado nenhuma alteração tanto pela cirurgia quanto pela dieta no decorrer de 22 semanas. Com relação ao peso do pulmão e átrio, notou-se que esses valores apresentaram aumentados, mas que esse aumento foi devido à hipertrofia induzida pela cirurgia e que a dieta hiperprotéica não foi capaz de alterá-los. Em se tratando da gordura retroperitoneal, da gordura em volta do epidídimo e do peso dos rins, observou-se que esses valores encontram-se reduzidos devido à hipertrofia induzida pela cirurgia e que a dieta hiperprotéica não foi capaz de alterá-los.

Tabela 3 - Dados ponderais dos animais SHAM e TAC após dieta normal e hiperprotéica durante 22 semanas

	Dieta padrão		Dieta hiperprotéica	
	SHAM	TAC	TAC	TAC
Peso corporal (g)	450 ± 10	424 ± 11		423 ± 9
Pulmão (g)	1.70 ± 0.03	3.75 ± 0.26*		4.06 ± 0.29*
Peso do atrio (mg)	81.9 ± 4.3	294 ± 17*		256 ± 23.4*
Peso do ventrículo direito (g)	0.21 ± 0.006	0.396 ± 0.02*		0.424 ± 0.02*
Razão ventrículo direito/peso corporal (mg/g)	0.46 ± 0.009	0.94 ± 0.05*		1.00 ± 0.06*
Razão ventrículo direito /tibia (mg/mm)	5.14 ± 0.13	9.72 ± 0.53*		10.46 ± 0.65*
Peso ventrículo esquerdo (mg)	984 ± 22	1411 ± 46*		1477 ± 52*
Razão ventrículo esquerdo/peso corporal (mg/g)	2.19 ± 0.04	3.33 ± 0.07*		3.50 ± 0.11*
Razão ventrículo esquerdo /tibia (mg/mm)	24.01 ± 0.48	34.63 ± 1.06*		36.42 ± 1.29*
Gordura retroperitoneal (g)	5.08 ± 0.26	3.41 ± 0.32*		2.81 ± 0.34*
Gordura epidídimo (g)	5.44 ± 0.39	4.30 ± 0.22*		3.88 ± 0.30*
Peso fígado (g)	12.63 ± 0.30	12.72 ± 0.48		13.32 ± 0.38
Peso rins (g)	2.74 ± 0.05	2.16 ± 0.07*		2.33 ± 0.06*
Razão massa renal/peso corporal (mg/g)	6.11 ± 0.11	4.95 ± 0.12*		5.52 ± 0.17*

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. *P<0.05 vs SHAM. ANOVA1 via e post hoc de Bonferroni.n = 12-15

4.19 Avaliação ecocardiográfica após 22 semanas de tratamento

A análise ecocardiográfica mostrou que os animais TAC e TAC Proteína apresentaram menor frequência cardíaca, fração de ejeção e fração de encurtamento e maior volume diastólico final após 22 semanas (tabela 4).

Tabela 4 - Avaliação ecocardiográfica dos animais SHAM e TAC após dieta padrão e hiperprotéica durante 22 semanas

	Dieta padrão		Dieta hiperprotéica	
	SHAM	TAC	SHAM	TAC
Frequência cardíaca (bpm)	366 ± 5	330 ± 6*	366 ± 5	327 ± 7*
Debito cardíaco (ml/min)	86.1 ± 9.3	81.4 ± 9.2	86.1 ± 9.3	84.7 ± 12.8
Volume sistólico (ml)	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.03
Volume diastólico (ml)	0.29 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.29 ± 0.03	0.44 ± 0.06
Volume sistólico final (ml)	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.02*	0.05 ± 0.01	0.18 ± 0.03*
Fração de ejeção (%)	84.5 ± 1.9	63.1 ± 2.6*	84.5 ± 1.9	58.9 ± 3.1*
Fração de encurtamento (%)	48.2 ± 2.7	28.9 ± 7.1*	48.2 ± 2.7	26.2 ± 1.9*

Os valores estão expressos em média ± erro padrão da média. *P<0.05 vs SHAM. ANOVA 2 vias e post hoc de Bonferroni. n = 12-15

4.20 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado III

A análise da cadeia respiratória após 22 semanas revelou que houve redução similar do estado III de consumo de oxigênio, da fração interfibrilar nos grupos TAC e TAC Proteína, quando o substrato palmitoil-carnitina foi utilizado (figura 16 B). Quando os complexos I e III foram avaliados, não foram encontradas alterações nos mesmos com a utilização de glutamato + malato para análise do complexo I e rotenona + succinato para análise do complexo III (figura 16 A e C).

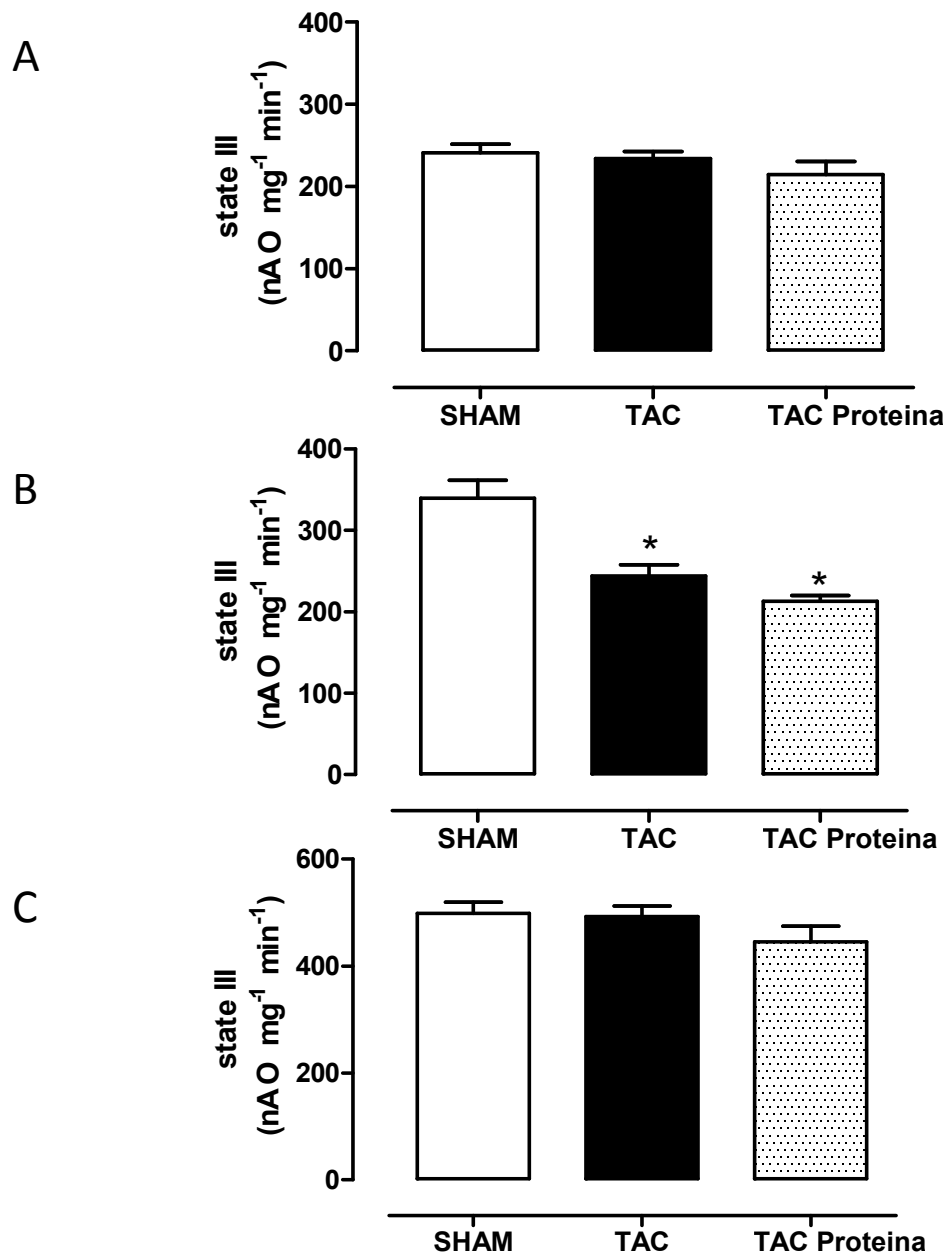


Figura 16. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiper protéica por 22 semanas. (A) Estado III de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado III de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado III de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. *P<0,05 ANOVA 1 via.n = 12-15

4.21 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado IV

A análise do estado IV de consumo de oxigênio após 22 semanas mostrou que não houve diferença entre os grupos avaliados (figura 17 A, B e C).

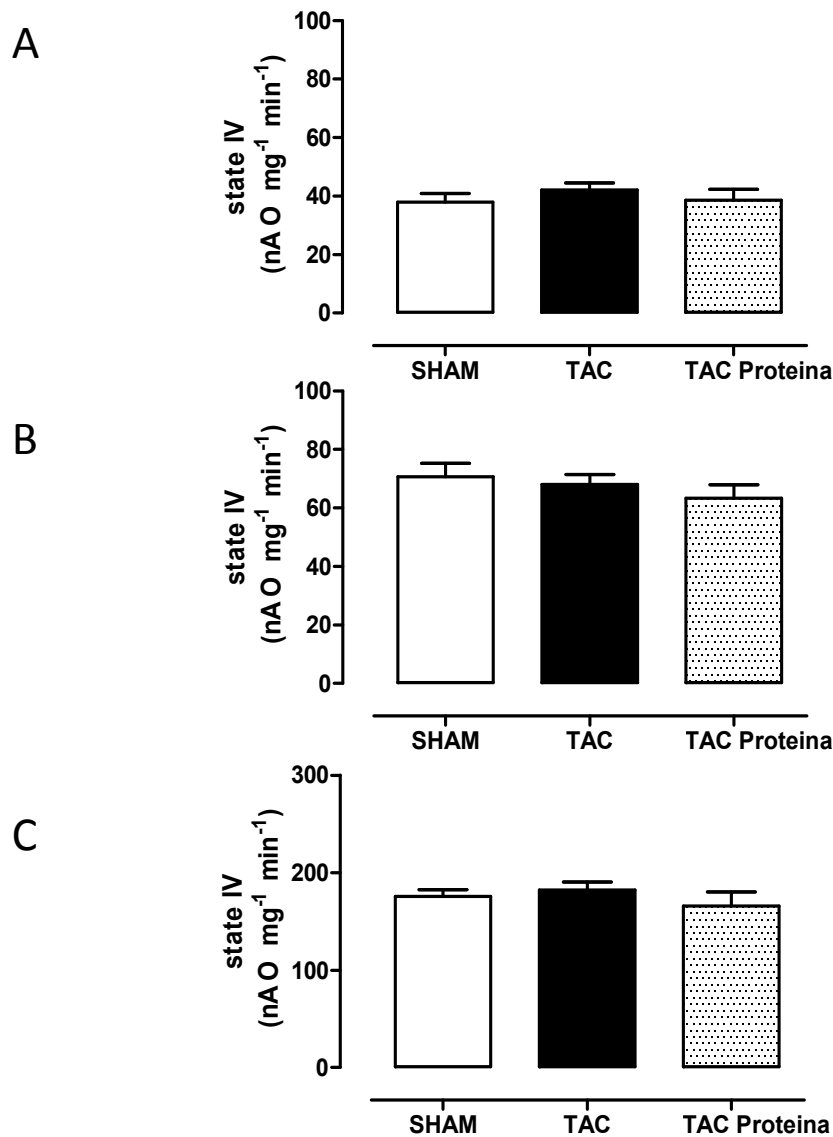


Figura 17. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiper protéica por 22 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$

4.22 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Estado IV + Oligomicina

O aumento do consumo de oxigênio com a inibição do complexo V com oligomicina é um indicativo de desacoplamento mitocondrial. Com o intuito de avaliar um possível desacoplamento da cadeia respiratória após 22 semanas de tratamento, foi adicionado Oligomicina ao final do estado IV. Os dados mostram que não houve diferença entre os grupos estudados (figura 18 A, B e C).

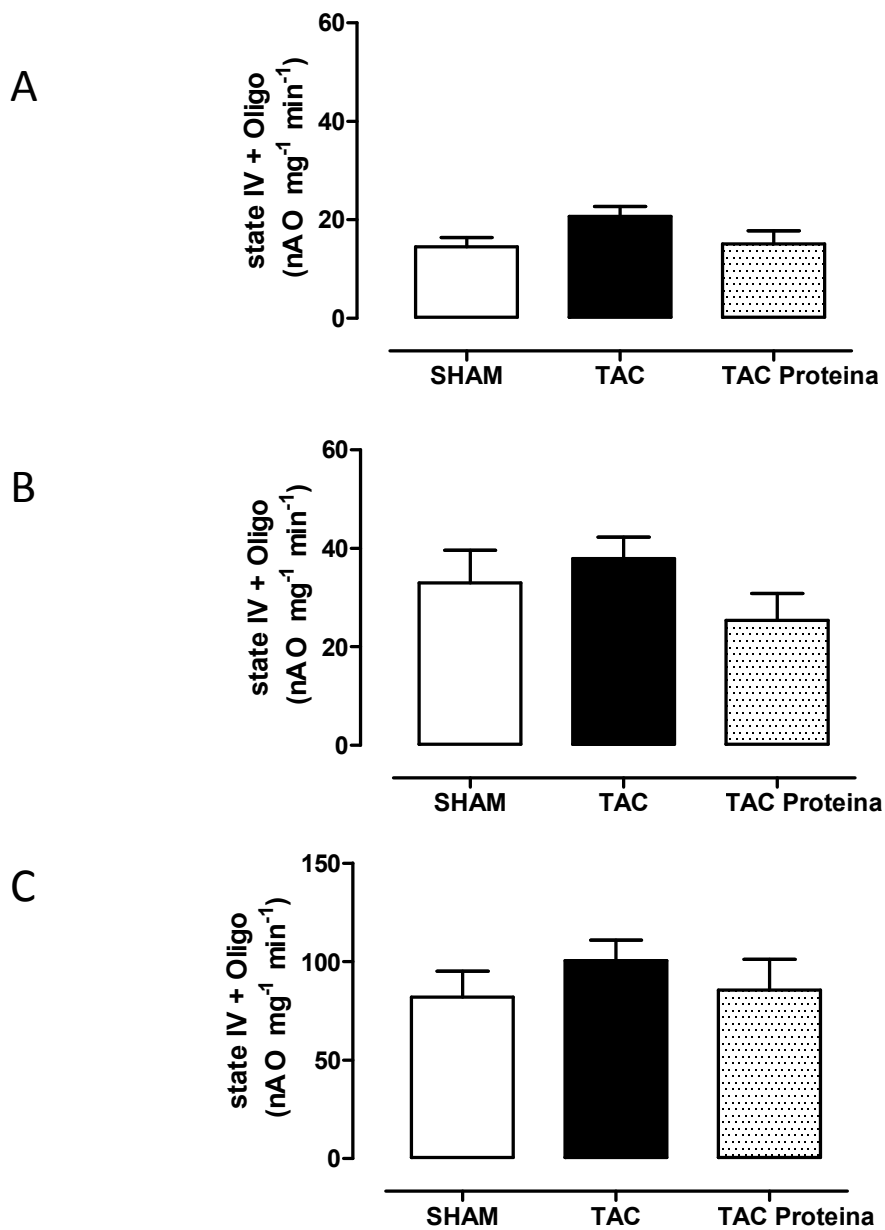


Figura 18. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficientes (TAC) tratados com dieta normal e hiper protéica por 22 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato + Oligomicina. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina + Oligomicina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato+ Oligomicina. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$

4.23 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – RCR

A razão controle respiratório (RCR) é definida como a razão do estado III pelo estado IV de consumo de oxigênio e é um índice para verificar o “acoplamento” ou “eficiência” da cadeia respiratória mitocondrial, já que um possível “vazamento” de elétrons pelos complexos mitocondriais elevaria os valores do estado IV, conseqüentemente reduzindo esse índice. A análise após 22 semanas de tratamento revelou que o RCR foi menor nos grupos TAC e TAC Proteína com a utilização do substrato palmitoil-carnitina (figura 19 B).

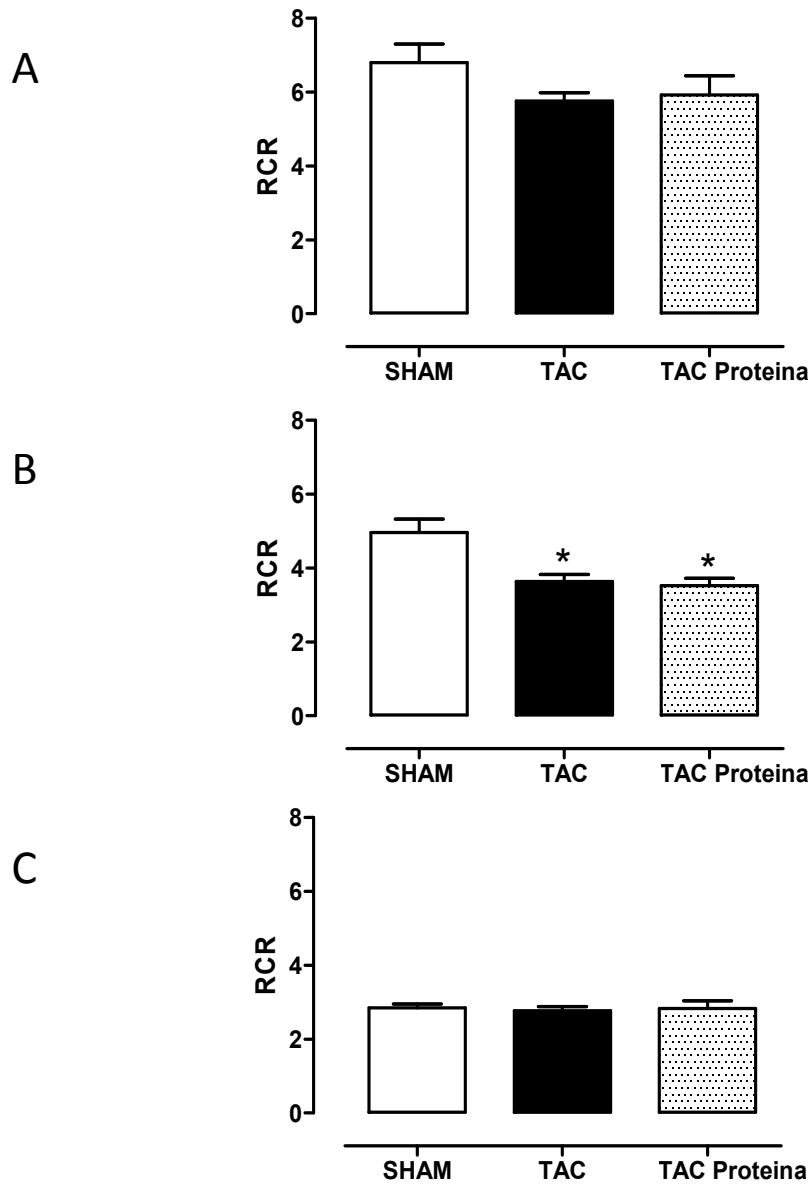


Figura 19. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiper protéica por 22 semanas. (A) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$

4.24 Análise funcional da fração interfibrilar mitocondrial – Razão fosfato/oxigênio - ADP:O

A razão fosfato/oxigênio (ADP:O) é um indicativo de quanto oxigênio é reduzido na fosforilação de cada ADP. Os dados de 22 semanas mostraram que não houve diferença na razão ADP:O entre os grupos avaliados com a utilização dos substratos clássicos descritos na literatura (figura 20 A, B e C).

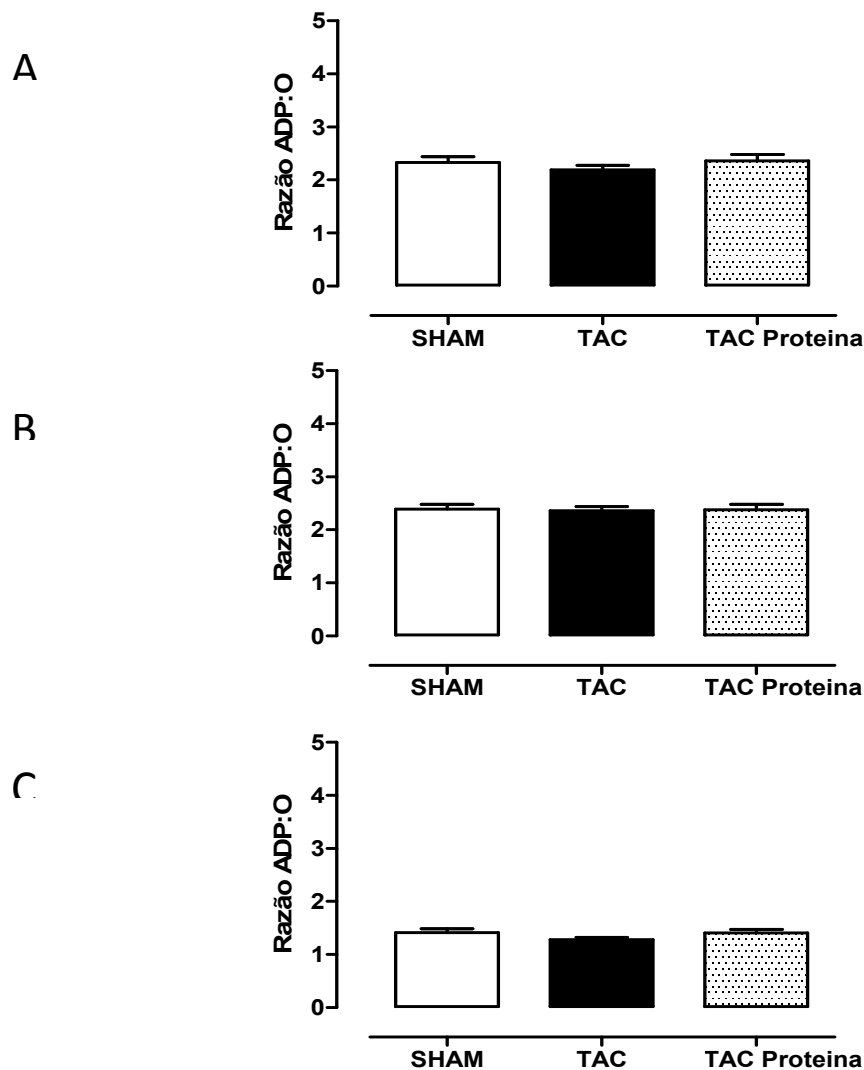


Figura 20. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial interfibrilar isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0.05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$

4.25 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado III

Quando comparado ao grupo controle, após 22 semanas de tratamento houve uma redução do estado III de consumo de oxigênio no grupo TAC Proteína com a utilização de glutamato + malato como substrato (figura 21A). Além disso, o Estado III de consumo de oxigênio também está reduzido com a utilização de palmitoil-carnitina como substrato (figura 21 B).

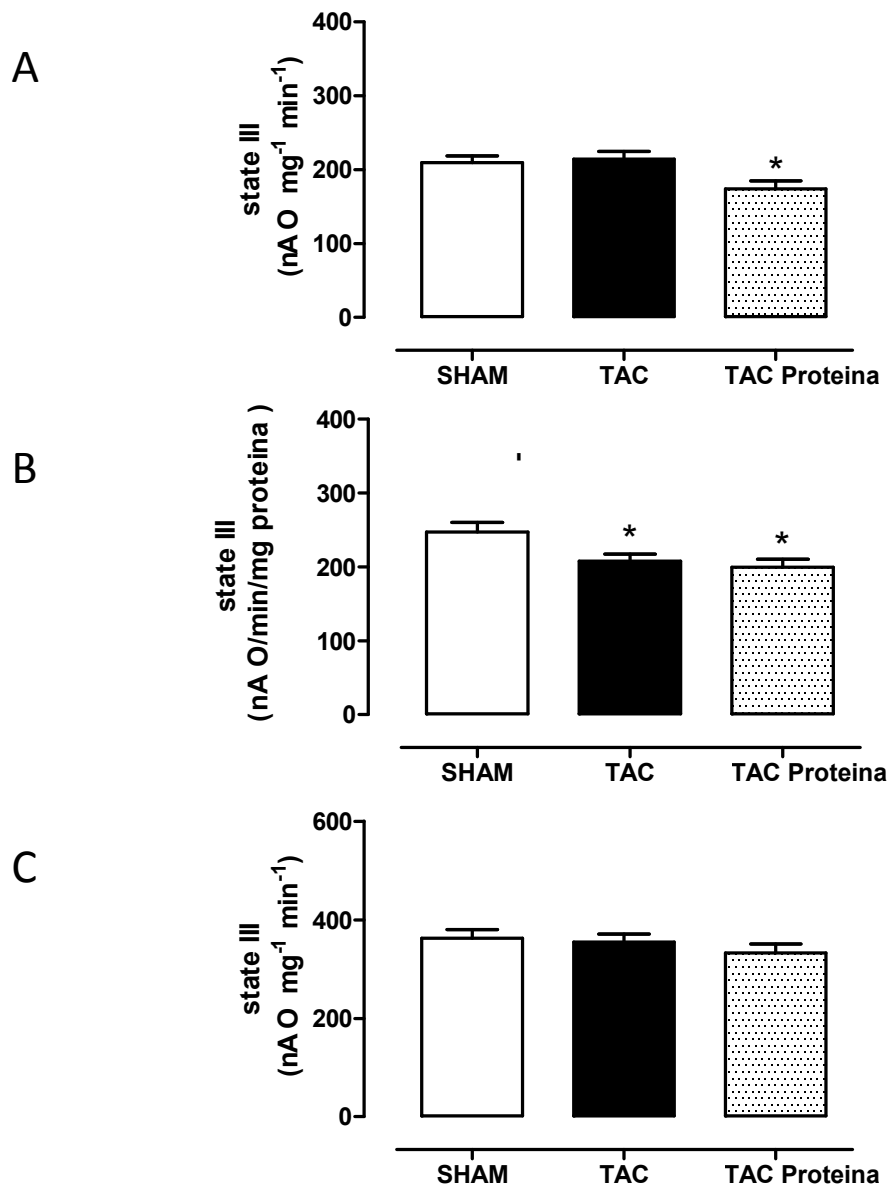


Figura 21. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado III de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado III de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado III de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ ANOVA 1 via e post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

4.26 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado IV

Quando foi avaliado o estado IV de consumo de oxigênio, não foi observada diferença estatística entre os grupos estudados com a utilização dos substratos clássicos para avaliação do consumo de oxigênio descrito na literatura (figura 22 A, B e C).

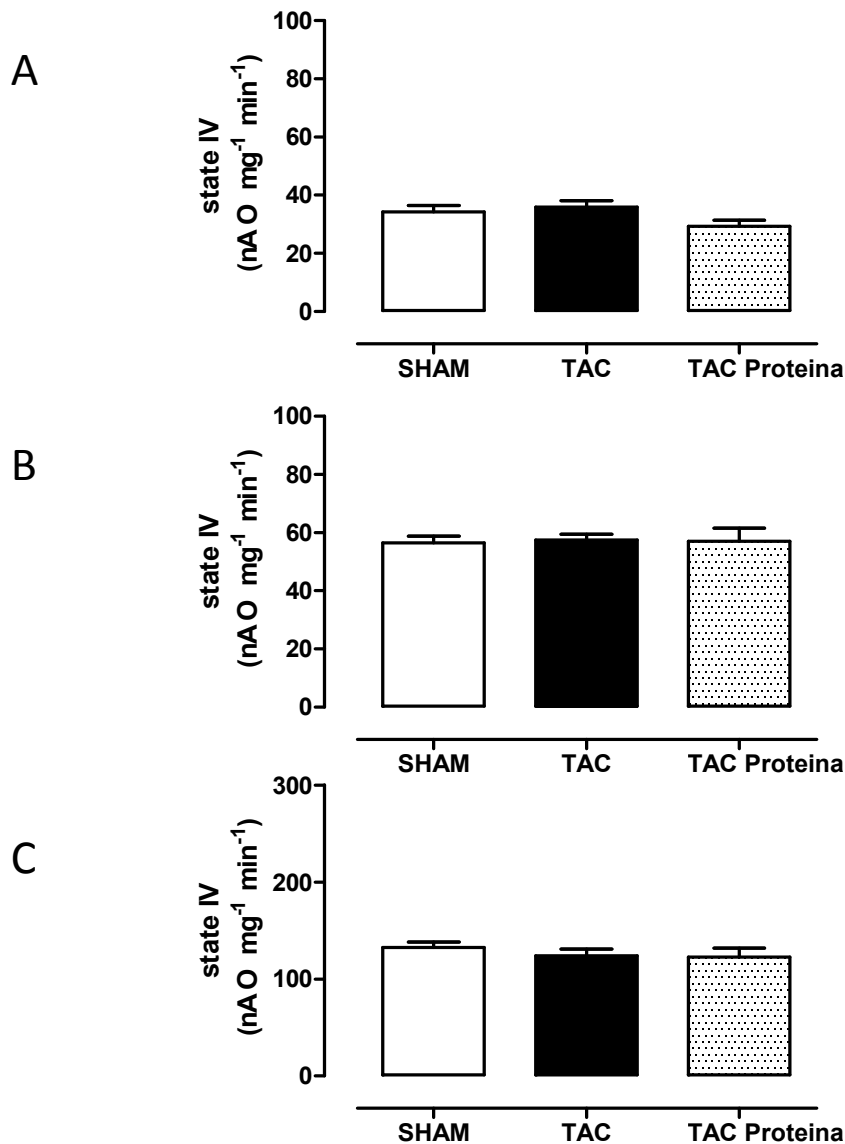


Figura 22. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$

4.27 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Estado IV + Oligomicina

O bloqueio do complexo V pelo Oligomicina mostrou que não houve um aumento do consumo de oxigênio nos grupos TAC e TAC Proteína quando comparados ao grupo SHAM com a utilização dos substratos clássicos da literatura (figura 23 A, B e C).

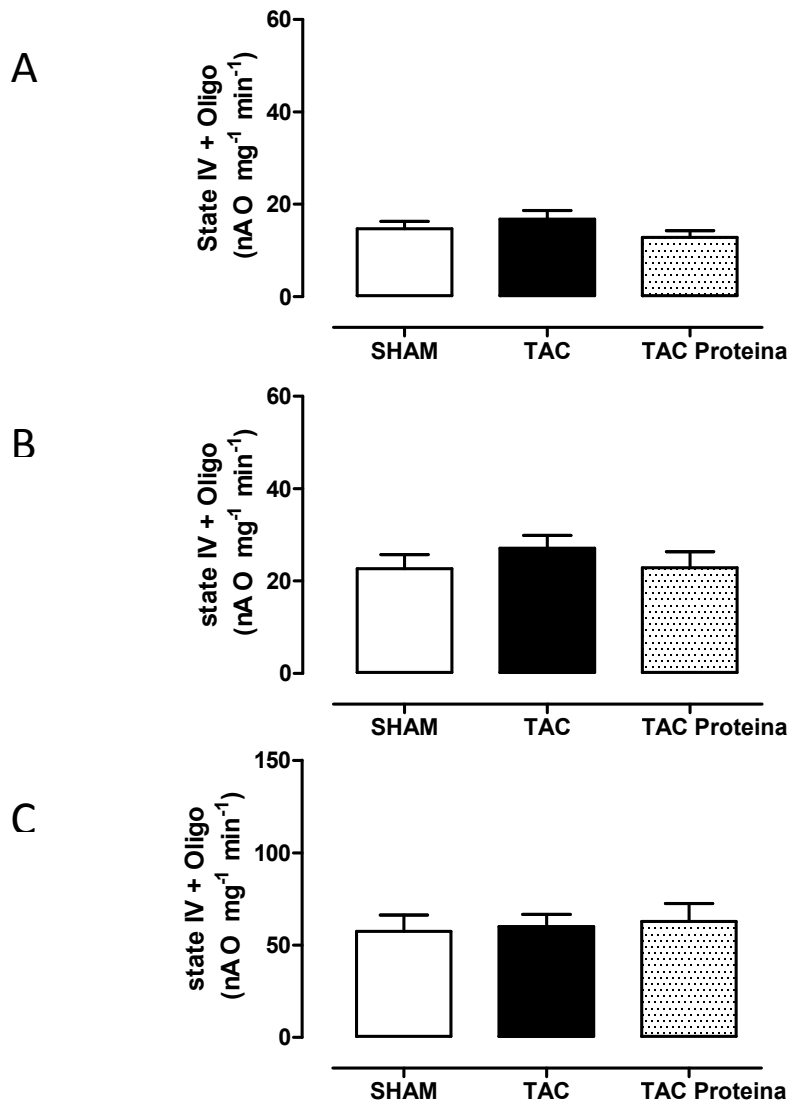


Figura 23. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato + Oligomicina. (B) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina + Oligomicina. (C) Estado IV de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato + Oligomicina. Valores expressos em nanomol de oxigênio atômico/min/mg de proteína. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$

4.28 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – RCR

A análise após 22 semanas de tratamento mostrou que os valores de RCR encontram-se reduzidos nos grupos TAC e TAC Proteína com a utilização de palmitoil-carnitina como substrato (figura 24 B).

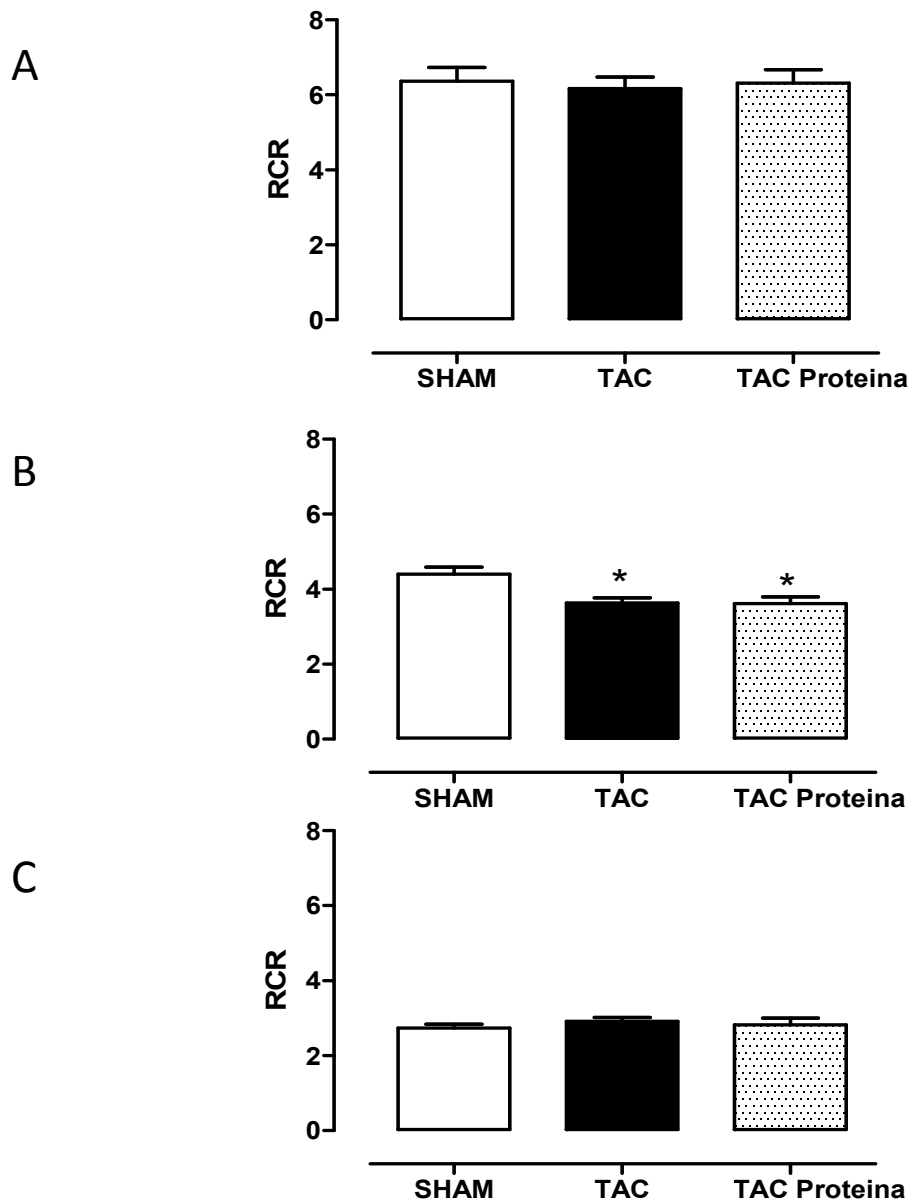


Figura 24. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão de controle respiratório (RCR) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. *P < 0,05 ANOVA 1 via e *post hoc* de Bonferroni. n = 12-15

4.29 Análise funcional da fração subsarcolemal mitocondrial – Razão fosfato/oxigênio ADP:O

A razão fosfato/oxigênio ADP:O não foi diferente entre os grupos estudados após 22 semanas de tratamento. Foram utilizados os principais substratos para avaliar este dado na subpopulação subsarcolemal (figura 25 A, B e C).

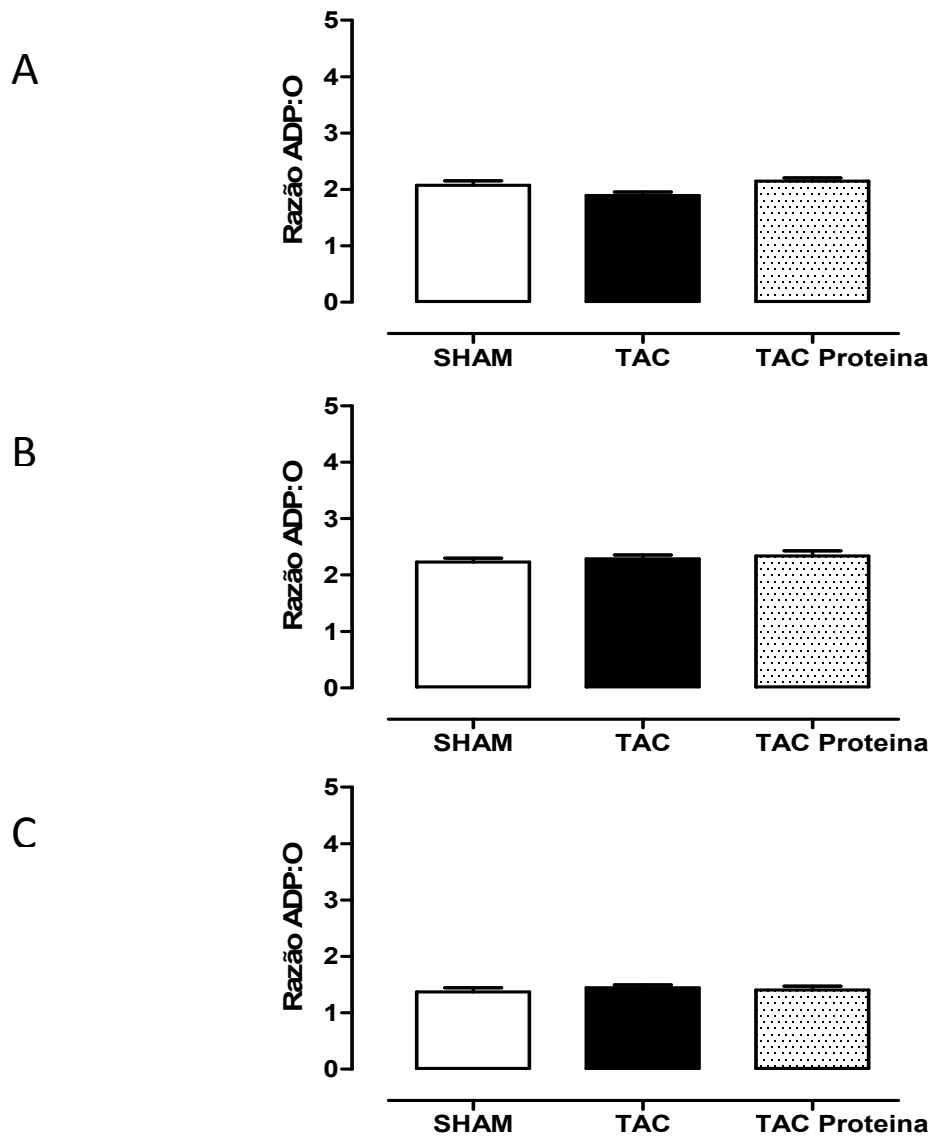


Figura 25. Avaliação funcional da cadeia respiratória mitocondrial subsarcolemal isolada de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) tratados com dieta normal e hiperprotéica por 22 semanas. (A) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato malato + glutamato. (B) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato palmitoil-carnitina. (C) Razão fosfato/oxigênio (ADP:O) de consumo de oxigênio com substrato rotenona + succinato. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P > 0,05$ ANOVA 1 via. $n = 12-15$

4.30 Análise da resistência ao cálcio

A resistência ao cálcio foi avaliada com a incubação da mitocôndria em um tampão Ca^{2+} free com os substratos glutamato + malato a 37°C . Após a leitura da absorbância em 540 nm por 2 minutos, foi adicionado cloreto de cálcio para atingir uma concentração final de 100 e 500 nM em ambas as subpopulações mitocondriais. Após a adição de cálcio ao meio, a mitocôndria começa a captar cálcio para a matriz mitocondrial. Com o aumento de cálcio no interior da mitocôndria (níveis normais e supra fisiológicos neste caso), o poro mitocondrial começa a abrir e o processo de ruptura das membranas mitocondriais se inicia. A ruptura da membrana é marcada com a queda da absorbância em 540 nm. A análise da resistência ao cálcio mostrou que após 22 semanas de tratamento, ambas subpopulações mitocondriais dos grupos TAC e TAC proteína se tornaram menos resistente ao cálcio, em ambas as concentrações estudadas (figura 26). A dieta hiperprotéica não alterou a resistência ao cálcio.

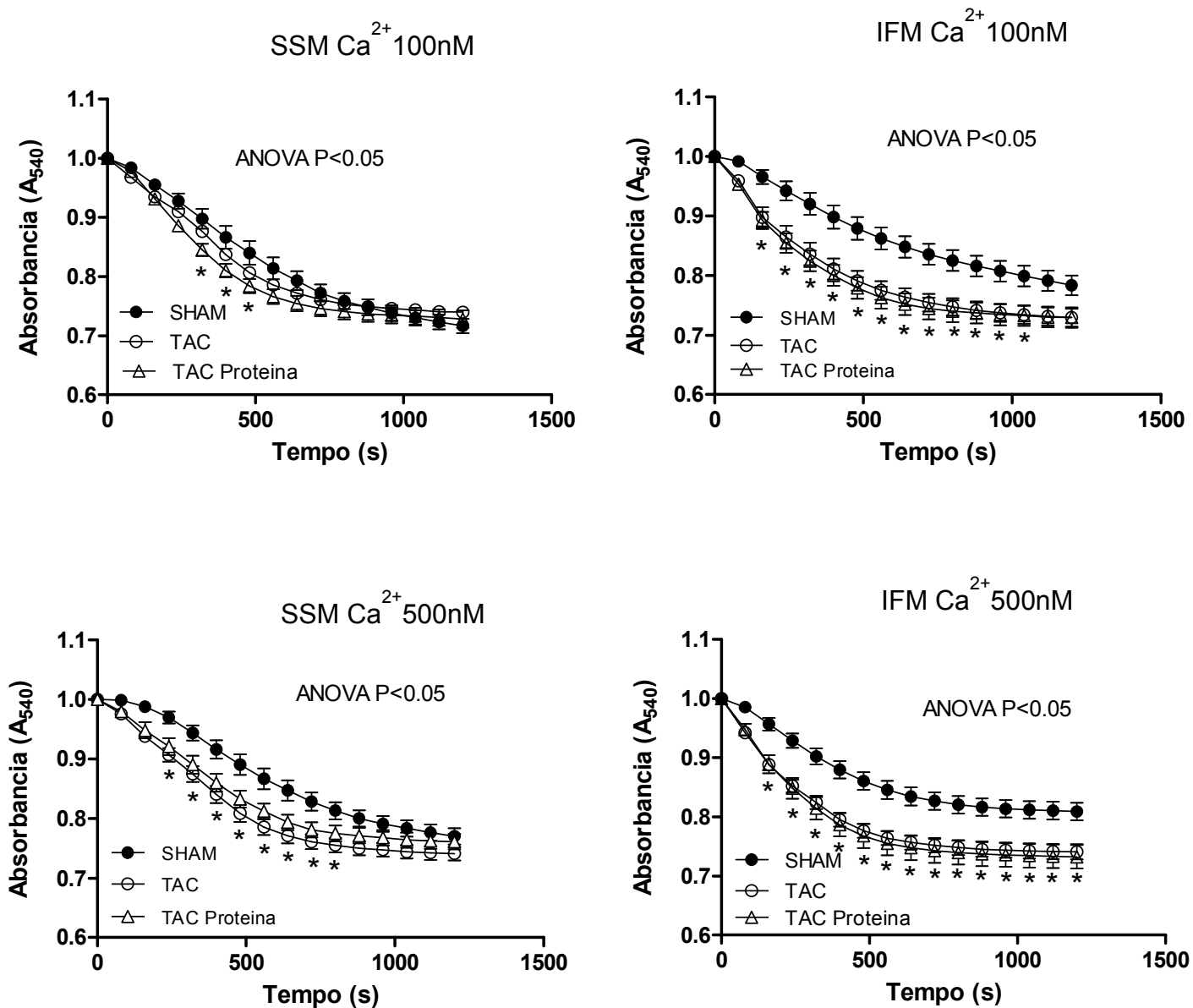


Figura 26. Queda da absorbância após adição de cálcio na concentração final de 100 e 500 nM em ambas as subpopulações mitocondriais de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) com dieta normal e hiper protéica após 22 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. * $P < 0,05$ ANOVA 2 vias post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

4.31 Análise da captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial – Fração subsarcolemal

Ao contrário do que foi observado após 14 semanas de tratamento, os animais TAC ou TAC Proteína não apresentaram diferença estatística na captação de cálcio pela subpopulação subsarcolemal (figura 27). Além disso, não foi observada diferença estatística na abertura do poro mitocondrial entre os grupos TAC e TAC Proteína, mas a diferença entre o grupo TAC e SHAM permaneceu a mesma no grupo de 22 semanas. Aparentemente, a dieta hiperprotéica parece não afetar mais a fração subsarcolemal após 22 semanas de dieta (figura 27).

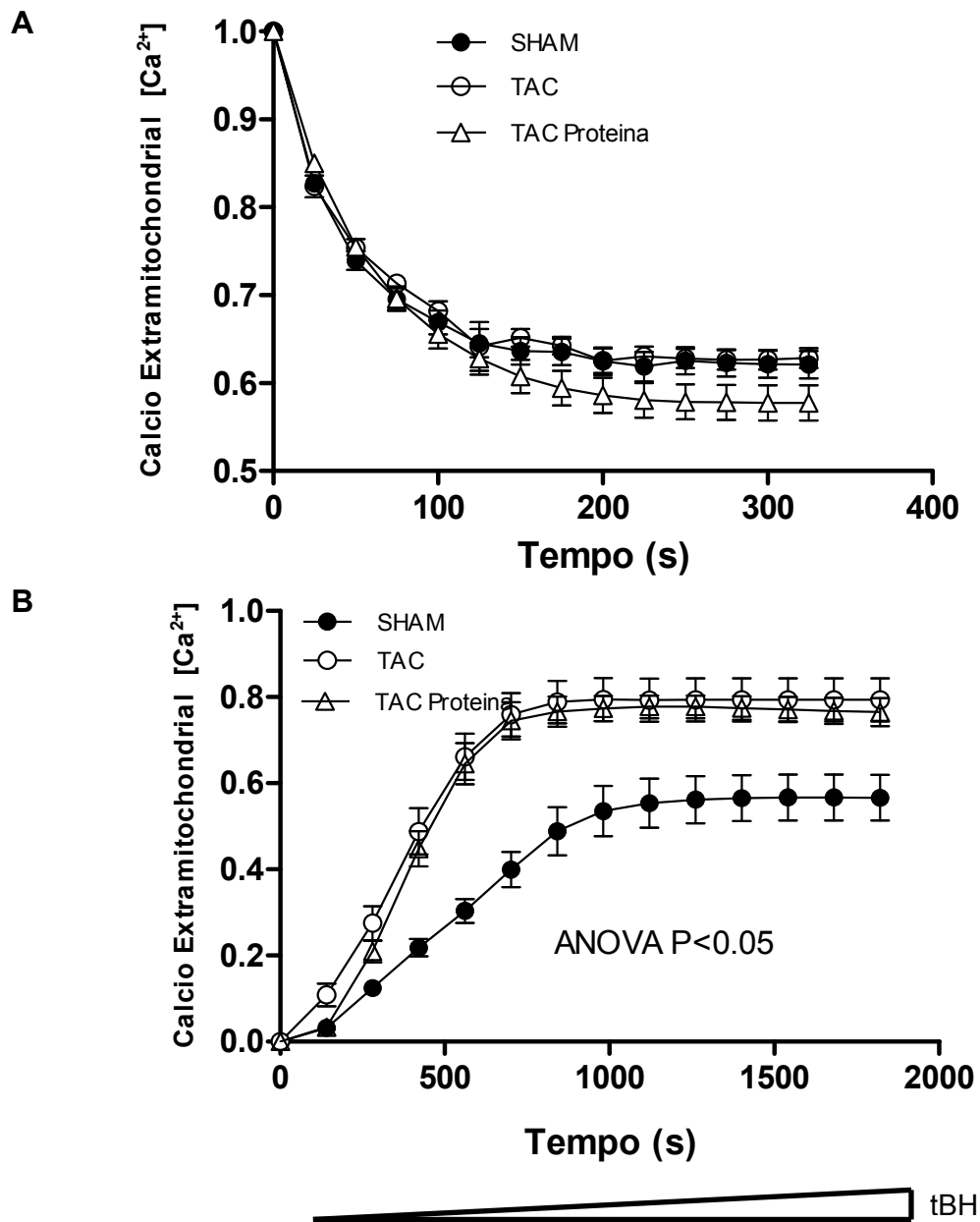


Figura 27. Captação de cálcio (A) e probabilidade de abertura do poro mitocondrial (B) da fração subsarcolemal de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 22 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias e post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

4.32 Análise da captação de cálcio e probabilidade de abertura do poro mitocondrial – Fração interfibrilar

Após 22 semanas de tratamento, a fração interfibrilar mitocondrial dos animais TAC e TAC Proteína não apresentaram diferença estatística na captação de cálcio (figura 28). Além disso, não foi observada diferença estatística na abertura do poro mitocondrial entre os grupos TAC e TAC Proteína, mas a diferença entre o grupo TAC e SHAM permaneceu a mesma, como observado no grupo de 14 semanas. Aparentemente, a dieta hiperprotéica parece não afetar a fração interfibrilar após 22 semanas de dieta (figura 28).

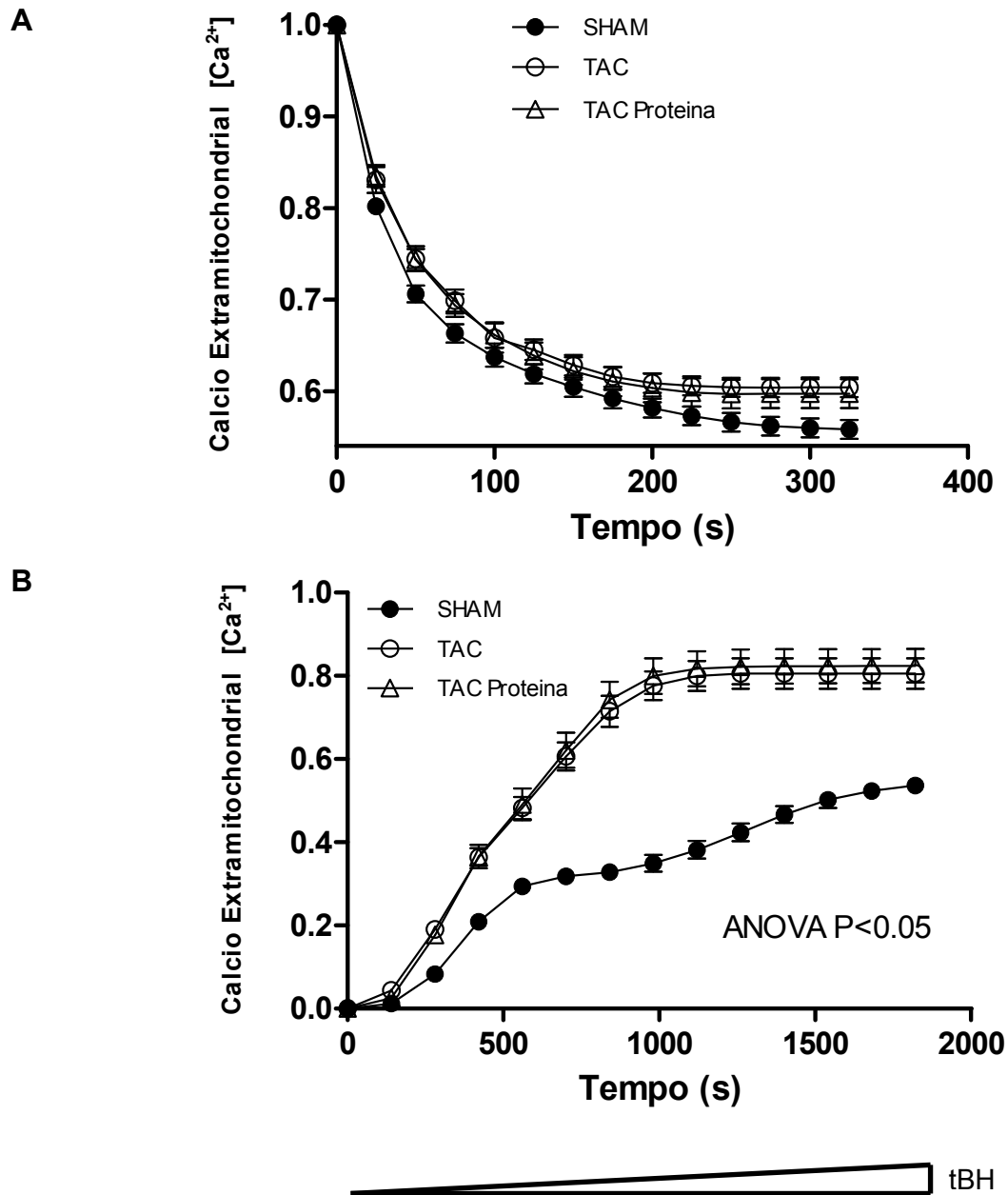


Figura 28. Captação de cálcio (A) e probabilidade de abertura do poro mitocondrial (B) da fração interfibrilar de ratos SHAM e Insuficiente (TAC) com dieta normal e hiperprotéica após 22 semanas de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. $P < 0,05$ ANOVA 2 vias e post hoc de Bonferroni. $n = 12-15$

DISCUSSÃO e CONCLUSÕES

V DISCUSSÃO

Nesse estudo mostramos, pela primeira vez, os efeitos da dieta hiperprotéica durante 14 e 22 semanas sobre a mortalidade, função cardíaca e função mitocondrial em ambas as subpopulações (IFM e SSM) de ratos normais e com insuficiência cardíaca. Vimos que a dieta hiperprotéica foi capaz de alterar o desfecho dos animais com insuficiência cardíaca ao passo que não foi capaz de modificar a maior parte dos parâmetros avaliados em animais saudáveis. Encontramos que a dieta hiperprotéica aumentou a mortalidade de ratos com insuficiência cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão. Ao analisarmos a função mitocondrial, vimos que a dieta hiperprotéica foi capaz de reduzir a bioenergética (β -oxidação), aumentar a captação de cálcio pela mitocôndria e ao mesmo tempo aumentar a probabilidade de abertura do poro mitocondrial induzida pelo peróxido de hidrogênio, efeito esse visto somente após 14 semanas de dieta. Embora a função mitocondrial estivesse alterada após 14 semanas, a dieta hiperprotéica não foi capaz de alterar a função cardíaca analisada pelo ecocardiograma, tanto no grupo SHAM Proteína quanto no grupo TAC Proteína quando comparada aos respectivos controles. Além disso, observamos que a dieta hiperprotéica induziu uma perda de peso corporal no grupo TAC Proteína após 14 semanas, sem alterar os demais parâmetros ponderais nos grupos restantes. Tal fato não ocorreu após 22 semanas de dieta. Os animais TAC Proteína de 22 semanas não apresentaram perda de peso como o grupo de 14 semanas.

O modelo de sobrecarga de pressão, usado no presente estudo, já é bem consolidado na literatura como um modelo de insuficiência cardíaca que caracteriza bem as repercussões clínicas (cardíacas e sistêmicas) encontradas em pacientes

com insuficiência cardíaca decorrente da hipertensão. Esse modelo experimental já é bem conhecido e foi desenvolvido graças aos trabalhos publicados na década de 70, com os dados oriundos do estudo de Framingham (96; 133).

O modelo de sobrecarga de pressão induz hipertrofia cardíaca que depende diretamente do diâmetro do clipe usado. Além disso, sabe-se que a posição do clipe influencia diretamente o surgimento da IC. Outros trabalhos mostraram que a estenose na aorta ascendente induz hipertrofia, mas a fase descompensada demora em torno de 20 semanas para surgir (48; 128). O modelo do presente estudo, assim como em outros trabalhos na literatura, usando o mesmo método, mostrou que a transição da hipertrofia para a fase descompensada aconteceu mais rápida, com apenas 14 semanas de estenose (254).

Esse modelo mimetiza bem o “stress” ou “sobrecarga” hemodinâmico que varia conforme a espécie, idade e o grau de estenose aplicada. Além disso, o modelo estudado é útil para avaliar a transição da hipertrofia para a insuficiência cardíaca. Essa transição ainda não é bem conhecida e sabe-se que o miocárdio passa por varias alterações com a instalação da insuficiência per se (37; 94; 254).

Apesar do diagnostico precoce e de novos tratamentos, a insuficiência cardíaca ainda permanece um fardo sobre o sistema publico de saúde. A idéia de desenvolver uma dieta ideal para prevenção ou para quem já tenha insuficiência cardíaca instalada é particularmente atrativa, como um efeito aditivo ao tratamento já utilizado na clinica. Ate o momento, pouco se sabe sobre o impacto da composição de macro nutrientes da dieta na insuficiência cardíaca. O efeito da composição da dieta sobre a função mitocondrial é importante porque o desacoplamento da oxidação fosforilativa mitocondrial aumenta progressivamente, diminuindo a

produção de energia e conseqüentemente acelerando a progressão da insuficiência cardíaca (81; 134).

Estudos populacionais mostram que a incidência de IC decorrente da hipertensão é menor em pacientes que aderem à dieta para prevenir a hipertensão - DASH (do inglês, Dietary Approaches to Stop Hypertension). Essa dieta é composta de baixo teor de gordura saturada, alto teor de gordura poli-insaturada, carboidratos complexos, frutas e verduras (119; 120).

Estudos recentes mostram que a substituição de carboidratos por gorduras poli-insaturadas é eficaz em protelar ou atenuar o desenvolvimento da IC (221). Em contrapartida, não foram encontrados indícios na literatura sobre os efeitos da dieta hiperprotéica sobre a função cardíaca de animais com hipertrofia ou estudos em humanos mostrando o papel da proteína sobre o desenvolvimento da IC. Deve se levar em conta que a fonte de proteína utilizada é importante na análise dos resultados. Existem vários trabalhos na literatura mostrando o papel da proteína da soja sobre a função cardíaca de animais e humanos, entretanto, devemos considerar que a soja tem fito estrogênio em sua composição, outro fator que deve ser levado em conta na análise dos dados (62; 231; 241).

De fato, pouco se sabe sobre o papel da dieta hiperprotéica sobre a função cardíaca e mitocondrial em modelos de insuficiência cardíaca. Estudos clínicos sugerem que a dieta hiperprotéica teria papel benéfico sobre parâmetros cardiovasculares, como a redução do risco da doença isquêmica do coração (77; 100) ou a redução da pressão arterial sistêmica em pacientes hipertensos (70). Além disso, a dieta hiperprotéica é eficaz na redução de peso em pacientes obesos e na melhora do perfil lipídico quando comparada a dieta rica em carboidratos (142; 217).

Neste estudo, verificamos que a dieta hiperprotéica não afetou a função cardíaca tanto de animais saudáveis quanto de animais com hipertrofia. Corroborando os dados encontrados na literatura (103; 160; 206; 254), os animais TAC do presente estudo apresentaram os sinais de insuficiência cardíaca já definidos, principalmente por apresentarem hipertrofia do ventrículo esquerdo em torno de 45%, queda da fração de ejeção, aumento do peso do pulmão (3.5 vezes maior em relação ao grupo SHAM) e dilatação da câmara. Esses achados foram vistos tanto após 14 semanas quanto após 22 semanas de estenose. Vale ressaltar que o tempo de dieta não foi um fator determinante nas repercussões analisadas em termos da função cardíaca.

A hipótese inicial do presente estudo foi de que a dieta hiperprotéica teria papel protetor sobre a função cardíaca já que a literatura mostra aspectos benéficos dessa dieta sobre parâmetros cardiovasculares. Em contrapartida, verificou-se que a dieta provocou perda de peso e aumento da mortalidade nos animais TAC. Vale ressaltar que somente o grupo TAC que recebeu dieta hiperprotéica apresentou piora no desfecho. O grupo SHAM que recebeu a dieta hiperprotéica não teve nenhuma alteração quando comparado ao grupo que recebeu dieta padrão. Isso nos permite concluir que os animais com insuficiência cardíaca parecem ser mais susceptíveis aos efeitos da dieta hiperprotéica.

A perda de peso na insuficiência cardíaca esta diretamente relacionada com baixa sobrevida e degradação total de proteínas do corpo (7). Confirmando os resultados encontrados pelo presente estudo, a perda de peso encontrada nos animais TAC Proteína de 14 semanas poderia estar relacionada com menor síntese protéica e/ou aumento da degradação protéica pelos músculos, considerando que o consumo de ração medido semanalmente foi igual entre os grupos estudados (216;

234; 235). Além disso, foi observado em outro trabalho que animais saudáveis que receberam dieta hiperprotéica por longo período cresceram de forma mais lenta em relação ao controle (236). Tudo indica que os dois fatores citados acima poderiam concomitantemente contribuir para a perda de peso que foi observada no grupo TAC Proteína.

Durante a fase de hipertrofia, a produção energética aumenta para suprir as necessidades metabólicas das células hipertrofiadas, não existindo impacto negativo sobre a contratilidade do miocárdio. Já na fase descompensada, surge a disfunção contrátil, e conseqüentemente a insuficiência cardíaca na qual a célula não consegue suprir as necessidades metabólicas. A produção de ATP não é suficiente para suprir as necessidades da célula devido ao aumento exacerbado da demanda energética (189-192; 206). Algumas alterações importantes acontecem no miocárdio que culminam no surgimento da IC. Sabe-se que a disfunção mitocondrial é uma delas. A mitocôndria tem importante papel na produção de energia para manter a maquinaria contrátil e a bomba do retículo sarcoplasmático funcionando já que como citado anteriormente, a maior parte do ATP produzido é utilizado por esses dois componentes (23; 24; 53; 118; 192; 222; 225).

Estudos em animais e em humanos mostram uma variedade de alterações mitocondriais na insuficiência cardíaca como defeitos na cadeia respiratória mitocondrial (139; 140; 156; 157; 222; 255; 256) e queda da fosforilação oxidativa (129). Os dados na literatura mostram que existe disfunção mitocondrial na insuficiência cardíaca severa, embora, os dados a respeito da insuficiência moderada são controversos (222). Essa controvérsia poderia estar relacionada aos diferentes métodos usados para analisar a função mitocondrial (54) ou ao fato de que a insuficiência cardíaca afeta diferentemente as duas subpopulações

mitocondriais cardíacas (206). Vale ressaltar que mesmo em estudos recentes, as duas subpopulações não são separadas e alguns autores avaliam somente a subpopulação SSM ou uma mistura de ambas. Isso por muitas vezes leva a conclusões erradas ao comparar trabalhos publicados por autores diferentes. Esses fatores citados devem ser levados em conta na interpretação dos dados.

De acordo com Schwarzer e colaboradores (206), a fosforilação oxidativa é menor na subpopulação IFM na insuficiência cardíaca induzida pela sobrecarga de pressão quando comparada a subpopulação SSM, embora, ambas as subpopulações estivessem com função prejudicada neste modelo. Além disso, corroborando com os achados do presente estudo, Schwarzer e colaboradores viram que a subpopulação IFM de ratos controle tem maior atividade funcional em relação à subpopulação SSM. Esses achados ainda são contraditórios na literatura e ainda permanece uma questão de debate (92; 172).

Gong e colaboradores (54) mostraram que a disfunção mitocondrial somente aparecia nos estágios finais da insuficiência cardíaca. Esses dados corroboram com os dados encontrados no presente estudo em relação à fosforilação oxidativa. Após 14 semanas de coartação da aorta, os animais TAC não apresentaram alterações na fosforilação oxidativa com os substratos para complexo I, III e para a beta oxidação. Entretanto, vimos que a dieta hiperprotéica, foi capaz de reduzir o estado III de consumo de oxigênio, com o substrato para beta oxidação, somente na subpopulação SSM de animais TAC. Isso nos permite concluir que a dieta hiperprotéica afeta a função mitocondrial da subpopulação SSM de animais TAC, especialmente a beta oxidação, diminuindo o consumo de oxigênio após 14 semanas de dieta.

Os dados do presente estudo mostram que a fosforilação oxidativa encontra-se reduzida em animais TAC somente no estágio final da insuficiência cardíaca. Pode-se observar que 14 semanas de hipertrofia não foram suficientes para causar danos a fosforilação oxidativa já que o consumo de oxigênio permaneceu inalterado com a utilização dos substratos clássicos descritos na literatura (172). Os dados sugerem que após 14 semanas, a cadeia respiratória não sofreu desacoplamento pelo fato do RCR e o estado IV de consumo de oxigênio permanecerem o mesmo entre os grupos.

Estudos recentes em pacientes, cachorros e ratos com insuficiência cardíaca mostraram que as taxas de oxidação de carboidratos e ácidos graxos estão normais na insuficiência cardíaca moderada (167; 183; 194), entretanto, a literatura relata que a oxidação de ácidos graxos está dramaticamente reduzida nos estágios finais da insuficiência cardíaca. Existe queda da oxidação de ácidos graxos e a oxidação de glicose não aumenta para suprir a demanda metabólica. Nos estágios finais, a expressão protéica e gênica das enzimas da β -oxidação estão reduzidas (183; 194), o que corrobora os dados do presente estudo. Os dados do presente estudo sugerem que a via da β -oxidação encontra-se reduzida após 22 semanas de estenose. Um fato importante que deve ser considerado é que a dieta hiperprotéica acelerou o decaimento da utilização de ácidos graxos em ratos TAC após 14 semanas, efeito abolido após 22 semanas de dieta. Foi observado também que a atividade da enzima MCAD encontra-se reduzida tanto após 14 semanas quanto após 22 semanas de estenose. Entretanto, a dieta não foi capaz de alterar a atividade dessa enzima, um marcador da β -oxidação. Esses dados nos permitem concluir que a queda da atividade da MCAD após 14 semanas não é suficiente para reduzir a β -oxidação, entretanto, após 22 semanas de dieta, notou-se uma redução

da β -oxidação em ambas as subpopulações. Além disso, no estágio inicial da hipertrofia (14 semanas) não houve alteração da oxidação de carboidratos, verificado pela utilização de glutamato + malato como substrato ao passo que após 22 semanas de dieta, foi encontrado uma redução do complexo I causado pela dieta hiperprotéica na subpopulação subsarcolemal de ratos TAC. Esses dados sugerem que tanto a dieta hiperprotéica quanto a hipertrofia afetam a oxidação fosforilativa mitocondrial após 14 e 22 semanas. Ademais, verificou-se que a função mitocondrial está prejudicada principalmente em animais TAC que receberam a dieta hiperprotéica. Isso nos permite concluir que os animais TAC são mais susceptíveis a dieta hiperprotéica quando comparado aos animais SHAM.

A dieta hiperprotéica parece ter papel relevante na exacerbação da IC, sem alterar a função cardíaca, diminuindo a oxidação fosforilativa mitocondrial tanto após 14 semanas quanto após 22 semanas de dieta. Os dados sugerem que após 22 semanas de dieta há queda da oxidação fosforilativa pelo complexo I com o uso do substrato glutamato + malato. Aparentemente, a estenose e a dieta hiperprotéica exercem efeitos negativos sobre a oxidação fosforilativa após 22 semanas já que os dados mostram que tanto a fração interfibrilar quanto a fração subsarcolemal apresentaram queda do estado III de consumo de oxigênio. Vale ressaltar que a subpopulação SSM é mais susceptível aos efeitos da dieta hiperprotéica quando comparada a subpopulação IFM ao passo que a subpopulação IFM é mais susceptível a estenose quando comparada a subpopulação SSM. Os dados indicam que as duas subpopulações foram afetadas de forma diferente, cada uma por um fator diferente, o que poderia ter contribuído para a exacerbação da disfunção mitocondrial encontrada no presente estudo.

A literatura relata que na insuficiência severa existe alteração na utilização de substratos. O miocárdio que basicamente utiliza ácidos graxos como principal fonte de energia passa a utilizar glicose. Entretanto, a queda da utilização de ácidos graxos não é compensada com a utilização de glicose. O termo muito usado por alguns autores é que o miocárdio se comportaria como um órgão “faminto” na insuficiência (154; 185).

Sabe-se que a fosforilação oxidativa é diretamente reduzida pela ativação da proteína cinase C, cálcio calmodulina cinase II (CAMKII) e calcineurina (131; 161; 163; 200), proteínas que a atividade ou expressão protéica estão aumentadas na insuficiência cardíaca (6; 20) e a ativação das mesmas ocorre por fatores neuro-humorais como a noradrenalina, adrenalina e endotelina (4; 252; 257).

Como mencionado anteriormente, com a elevação dos fatores neuro-humorais na insuficiência cardíaca e conseqüentemente ativação dessas proteínas intracelulares, ocorreria a redução da fosforilação oxidativa, corroborando os dados encontrados após 22 semanas de estenose do presente estudo. Vale ressaltar que além da ativação de proteínas intracelulares, ocorre ativação do stress oxidativo que induz o desacoplamento da cadeia respiratória.

Inúmeras são as fontes de espécies reativas de oxigênio no coração insuficiente, incluindo a cadeia respiratória mitocondrial e a NADPH oxidase. Em circunstâncias fisiológicas, pequenas quantidades de ânion superóxido são formadas pelo vazamento de um único elétron pelo complexo I ou III, o que pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase presente na mitocôndria. Entretanto, sabe-se que na insuficiência cardíaca ocorre ativação da NADPH oxidase e que a NADPH oxidase pode desencadear o desacoplamento da cadeia respiratória mitocondrial através da produção de espécies reativas de

oxigênio, formando um mecanismo de retroalimentação positiva, levando a queda da fosforilação oxidativa e disfunção mitocondrial (41; 82; 112; 237; 238).

A medida de espécies reativas de oxigênio não foi realizada para todos os grupos do presente estudo. Mas dados não mostrados sugerem que a produção de radical hidroxil é maior em ratos TAC quando comparados ao grupo SHAM. Esse aumento foi visto tanto em 14 semanas quanto após 22 semanas de estenose, em ambas as subpopulações mitocondriais, embora esse efeito fosse maior na subpopulação IFM.

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio poderia ter contribuído de forma significativa para a disfunção mitocondrial de acordo com os dados apresentados. Entretanto, não foi medida a produção de espécies reativas de oxigênio nos grupos que receberam dieta hiperprotéica. Não se pode afirmar se a dieta hiperprotéica alteraria a formação de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, os dados indicam que a subpopulação SSM de ratos TAC que receberam dieta hiperprotéica aparenta ser mais susceptível ao stress oxidativo já que a probabilidade de abertura do poro mitocondrial foi maior nesse grupo.

Como mencionado anteriormente na introdução, outra hipótese que deve ser considerada para melhor compreender os mecanismos pelos quais ocorre redução da fosforilação oxidativa é a reprogramação metabólica. Acredita-se que o HIF-1 seria o responsável pela reprogramação metabólica a fim de proteger o miocárdio. Pouco se sabe sobre essas alterações, entretanto, a expressão desse fator encontra-se elevada pelo fato da fibrose funcionar como uma barreira na passagem de oxigênio para célula (181; 183; 232).

Dentre os dados discutidos acima, vimos que a fosforilação oxidativa sofreu grande impacto pela estenose e pela dieta hiperprotéica. Outros resultados que

também se encontram alterados seriam a captação de cálcio e a probabilidade de abertura do poro mitocondrial.

A contração cardíaca é regulada batimento-a-batimento pela elevação de cálcio no citosol por um processo denominado de acoplamento excitação-contração. Esse processo é ativado pela entrada de cálcio através do canal de cálcio do tipo L presente na membrana da célula. A entrada de cálcio ativa a liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático, mecanismo conhecido como liberação de cálcio, cálcio-induzida. Subseqüente a este processo, ocorre o relaxamento que consiste na retirada de cálcio do citosol. A maior parte do cálcio é removida pela bomba do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), via trocador sódio-cálcio presente na membrana da célula e pela cálcio ATPase (16; 17).

A mitocôndria foi descoberta nos últimos anos como outro caminho na extrusão de cálcio do citosol. A mitocôndria cardíaca possui um sistema para captação e armazenamento de grandes quantidades de cálcio. Ela tem a capacidade de captar cálcio e de alterar o transiente de cálcio, contribuindo na regulação da contração (5; 35; 36; 60; 80).

Vários mecanismos já foram descritos e propostos a fim de elucidar a captação de cálcio pela mitocôndria. O canal Uniporter e o receptor de ryanodina mitocondrial são os mais aceitos até o momento (34; 58; 59; 89; 199). Embora a literatura descreva outros mecanismos, o mais estabelecido e caracterizado é o canal Uniporter. Esse canal é voltagem dependente e pode ser ativado ou inibido por uma série de moduladores, dentre eles a cálcio camoldulina cinase II. Essa proteína é capaz de ativar ou aumentar a captação de cálcio pela mitocôndria através do canal Uniporter (90).

Em contrapartida a captação, a maior parte da extrusão de cálcio da matriz mitocondrial ocorre de forma que depende do sódio via trocador sódio-cálcio mitocondrial (mNCX) (174; 175) . O acúmulo de sódio intracelular que ocorre na insuficiência cardíaca pode causar alteração no equilíbrio de pirimidinas, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio, o que tem efeitos deletérios sobre a mitocôndria, diminuindo a produção energética (107; 130; 137). Além disso, a captação excessiva de cálcio pela mitocôndria e o acúmulo desse íon aumentam o risco de abertura do poro mitocondrial, possivelmente levando a morte celular (35).

Os dados do presente estudo sugerem que a insuficiência cardíaca induzida pela estenose diminui a captação de cálcio pela mitocôndria após 14 semanas, em ambas as subpopulações mitocondriais, entretanto, após 22 semanas de estenose, não foi observada tal alteração. Além disso, observou-se que a dieta hiperprotéica de alguma forma induziu o aumento da captação de cálcio, na subpopulação SSM, após 14 semanas de dieta. Essa alteração não foi observada na subpopulação IFM ou em ambas as subpopulações após 22 semanas de dieta. Verificou-se que a expressão do canal Uniporter está aumentada na subpopulação SSM do grupo TAC após 14 semanas de estenose e que a dieta hiperprotéica não alterou a expressão desse canal, indicando que só houve alteração na atividade desse canal.

Os dados também sugerem que a probabilidade de abertura do poro mitocondrial é maior na subpopulação SSM de ratos TAC que receberam dieta hiperprotéica após 14 semanas. Esse dado poderia de alguma forma estar ligado à alta na mortalidade encontrada por volta de 14 semanas de dieta. Foi observado que os animais TAC Proteína tiveram pior desfecho em comparação ao grupo TAC e ao grupo controle.

A literatura descreve que a abertura do poro mitocondrial funciona como passo limitante no desencadeamento da apoptose. Já foi observado que a probabilidade de abertura do poro mitocondrial é maior na isquemia/reperfusão e na insuficiência cardíaca (66; 88; 226). Esse poro é sensível às alterações na concentração de cálcio, espécies reativas de oxigênio e peroxinitrito (63; 102). Como demonstrado neste estudo e por outros estudos na literatura, o peróxido de hidrogênio é capaz de induzir a abertura do poro mitocondrial (178).

Existe evidência de que a desregulação do transiente de cálcio que ocorre na insuficiência cardíaca, i.e. queda da $[Ca^{2+}]$ sistólico e elevação da $[Ca^{2+}]$ diastólico, resultando na redução da contração sistólica e prolongamento do relaxamento diastólico, afetaria a captação de cálcio pela mitocôndria, aumentando a tensão diastólica (75; 187). Tem sido proposto que o acúmulo de cálcio no citosol induziria a hipertrofia e aumentaria a captação de cálcio pela mitocôndria, com aumento da produção de espécies reativas do oxigênio e queda da fosforilação oxidativa (71; 249).

Esses achados vão de encontro dos dados deste trabalho. Os dados sugerem que de alguma forma a dieta hiperprotéica ativa a captação de cálcio pela mitocôndria, diminuindo a fosforilação oxidativa e aumentando a probabilidade de abertura do poro mitocondrial induzida pelo stress oxidativo. Como o stress oxidativo está aumentado na insuficiência cardíaca e o aumento da captação de cálcio também eleva a produção de espécies reativas de oxigênio (2; 21; 48; 64; 67; 103; 162), esses dois fatores poderiam contribuir para o desfecho encontrado após 14 semanas de dieta.

Portanto, a dieta hiperprotéica parece afetar a função mitocondrial da subpopulação SSM de ratos com insuficiência cardíaca após 14 semanas de dieta.

Vimos que a dieta hiperprotéica foi capaz de alterar o desfecho dos animais com insuficiência cardíaca ao passo que não foi capaz de modificar a maior parte dos parâmetros avaliados em animais saudáveis. Os dados sugerem que a dieta e a insuficiência cardíaca afetam de forma diferente as subpopulações mitocondriais sem alterar a função cardíaca analisada *in vivo* pelo ecocardiograma. Além disso, os dados sugerem que a dieta afeta a bioenergética mitocondrial, diminuindo a β -oxidação.

REFERÊNCIAS

1. **Adam-Vizi V and Starkov AA.** Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S413-S426, 2010.
2. **Adam-Vizi V and Starkov AA.** Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2: S413-S426, 2010.
3. **Adhihetty PJ, Ljubicic V, Menzies KJ and Hood DA.** Differential susceptibility of subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria to apoptotic stimuli. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C994-C1001, 2005.
4. **Ago T, Yang Y, Zhai P and Sadoshima J.** Nifedipine inhibits cardiac hypertrophy and left ventricular dysfunction in response to pressure overload. *J Cardiovasc Transl Res* 3: 304-313, 2010.
5. **Akar FG and O'Rourke B.** Mitochondria are sources of metabolic sink and arrhythmias. *Pharmacol Ther* 131: 287-294, 2011.
6. **Anderson ME, Brown JH and Bers DM.** CaMKII in myocardial hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 51: 468-473, 2011.
7. **Anker SD, Negassa A, Coats AJ, Afzal R, Poole-Wilson PA, Cohn JN and Yusuf S.** Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the

-
- effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet* 361: 1077-1083, 2003.
8. **Anversa P, Ricci R and Olivetti G.** Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J Am Coll Cardiol* 7: 1140-1149, 1986.
 9. **Appel LJ, Moore TJ, Obarzanek E, Vollmer WM, Svetkey LP, Sacks FM, Bray GA, Vogt TM, Cutler JA, Windhauser MM, Lin PH and Karanja N.** A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. DASH Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 336: 1117-1124, 1997.
 10. **Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, Obarzanek E, Swain JF, Miller ER, III, Conlin PR, Erlinger TP, Rosner BA, Laranjo NM, Charleston J, McCarron P and Bishop LM.** Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial. *JAMA* 294: 2455-2464, 2005.
 11. **Asemu G, O'Connell KA, Cox JW, Dabkowski ER, Xu W, Ribeiro RF, Shekar KC, Hecker PA, Rastogi S, Sabbah HN, Hoppel CL and Stanley WC.** Enhanced Resistance to Permeability Transition in Interfibrillar Cardiac Mitochondria in Dogs: Effects of Aging and Long Term Aldosterone Infusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012.

-
12. **Baines CP, Kaiser RA, Sheiko T, Craigen WJ and Molkenin JD.** Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* 9: 550-555, 2007.
 13. **Bashore TM, Magorien DJ, Letterio J, Shaffer P and Unverferth DV.** Histologic and biochemical correlates of left ventricular chamber dynamics in man. *J Am Coll Cardiol* 9: 734-742, 1987.
 14. **Beer M, Seyfarth T, Sandstede J, Landschutz W, Lipke C, Kostler H, von Kienlin M, Harre K, Hahn D and Neubauer S.** Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and failing human myocardium measured noninvasively with ³¹P-SLOOP magnetic resonance spectroscopy. *J Am Coll Cardiol* 40: 1267-1274, 2002.
 15. **Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA and Hill JA.** Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H8-H16, 2005.
 16. **Bers DM.** Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205, 2002.
 17. **Bers DM and Guo T.** Calcium signaling in cardiac ventricular myocytes. *Ann N Y Acad Sci* 1047: 86-98, 2005.
 18. **Beulens JW, de Bruijne LM, Stolk RP, Peeters PH, Bots ML, Grobbee DE and van der Schouw YT.** High dietary glyceemic load and glyceemic index

- increase risk of cardiovascular disease among middle-aged women: a population-based follow-up study. *J Am Coll Cardiol* 50: 14-21, 2007.
19. **Beutner G, Sharma VK, Lin L, Ryu SY, Dirksen RT and Sheu SS.** Type 1 ryanodine receptor in cardiac mitochondria: transducer of excitation-metabolism coupling. *Biochim Biophys Acta* 1717: 1-10, 2005.
 20. **Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ and Molkentin JD.** PKC alpha regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2). *J Cell Biol* 156: 905-919, 2002.
 21. **Brookes PS, Yoon Y, Robotham JL, Anders MW and Sheu SS.** Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287: C817-C833, 2004.
 22. **Buchwald A, Till H, Unterberg C, Oberschmidt R, Figulla HR and Wiegand V.** Alterations of the mitochondrial respiratory chain in human dilated cardiomyopathy. *Eur Heart J* 11: 509-516, 1990.
 23. **Bugger H, Chen D, Riehle C, Soto J, Theobald HA, Hu XX, Ganesan B, Weimer BC and Abel ED.** Tissue-specific remodeling of the mitochondrial proteome in type 1 diabetic akita mice. *Diabetes* 58: 1986-1997, 2009.
 24. **Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, Nguyen TD, Mohr FW, Khalimonchuk O, Weimer BC and Doenst T.**

-
- Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 85: 376-384, 2010.
25. **Buntinas L, Gunter KK, Sparagna GC and Gunter TE.** The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1504: 248-261, 2001.
26. **Capetanaki Y.** Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med* 12: 339-348, 2002.
27. **Casademont J and Miro O.** Electron transport chain defects in heart failure. *Heart Fail Rev* 7: 131-139, 2002.
28. **Chen Q, Moghaddas S, Hoppel CL and Lesnefsky EJ.** Ischemic defects in the electron transport chain increase the production of reactive oxygen species from isolated rat heart mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol* 294: C460-C466, 2008.
29. **Chess DJ and Stanley WC.** Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc Res* 79: 269-278, 2008.
30. **Clarke SJ, McStay GP and Halestrap AP.** Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of

- the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J Biol Chem* 277: 34793-34799, 2002.
31. **Dabkowski ER, Baseler WA, Williamson CL, Powell M, Razunguzwa TT, Frisbee JC and Hollander JM.** Mitochondrial dysfunction in the type 2 diabetic heart is associated with alterations in spatially distinct mitochondrial proteomes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299: H529-H540, 2010.
 32. **Dabkowski ER, Williamson CL, Bukowski VC, Chapman RS, Leonard SS, Peer CJ, Callery PS and Hollander JM.** Diabetic cardiomyopathy-associated dysfunction in spatially distinct mitochondrial subpopulations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 296: H359-H369, 2009.
 33. **Das AM and Harris DA.** Control of mitochondrial ATP synthase in heart cells: inactive to active transitions caused by beating or positive inotropic agents. *Cardiovasc Res* 24: 411-417, 1990.
 34. **De SD, Raffaello A, Teardo E, Szabo I and Rizzuto R.** A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476: 336-340, 2011.
 35. **Dedkova EN and Blatter LA.** Mitochondrial Ca²⁺ and the heart. *Cell Calcium* 44: 77-91, 2008.
 36. **Dedkova EN and Blatter LA.** Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 52: 48-61, 2012.

-
37. **del MF, Butler K, Boecker W, Gwathmey JK and Hajjar RJ.** Novel technique of aortic banding followed by gene transfer during hypertrophy and heart failure. *Physiol Genomics* 9: 49-56, 2002.
 38. **Depre C, Vanoverschelde JL, Melin JA, Borgers M, Bol A, Ausma J, Dion R and Wijns W.** Structural and metabolic correlates of the reversibility of chronic left ventricular ischemic dysfunction in humans. *Am J Physiol* 268: H1265-H1275, 1995.
 39. **Di LF and Bernardi P.** Mitochondria and ischemia-reperfusion injury of the heart: fixing a hole. *Cardiovasc Res* 70: 191-199, 2006.
 40. **Di LF, Canton M, Menabo R, Kaludercic N and Bernardi P.** Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail Rev* 12: 249-260, 2007.
 41. **Dikalov S.** Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med* 51: 1289-1301, 2011.
 42. **Du XL, Edelstein D, Rossetti L, Fantus IG, Goldberg H, Ziyadeh F, Wu J and Brownlee M.** Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 12222-12226, 2000.
 43. **Duda MK, O'shea KM, Lei B, Barrows BR, Azimzadeh AM, McElfresh TE, Hoit BD, Kop WJ and Stanley WC.** Low-carbohydrate/high-fat diet attenuates

-
- pressure overload-induced ventricular remodeling and dysfunction. *J Card Fail* 14: 327-335, 2008.
44. **Endo T, Yamamoto H and Esaki M.** Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J Cell Sci* 116: 3259-3267, 2003.
45. **Ershow AG and Costello RB.** Dietary guidance in heart failure: a perspective on needs for prevention and management. *Heart Fail Rev* 11: 7-12, 2006.
46. **Fannin SW, Lesnefsky EJ, Slabe TJ, Hassan MO and Hoppel CL.** Aging selectively decreases oxidative capacity in rat heart interfibrillar mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 372: 399-407, 1999.
47. **Feissner RF, Skalska J, Gaum WE and Sheu SS.** Crosstalk signaling between mitochondrial Ca²⁺ and ROS. *Front Biosci* 14: 1197-1218, 2009.
48. **Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE and Lorell BH.** Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* 73: 184-192, 1993.
49. **Ford LE.** Heart size. *Circ Res* 39: 297-303, 1976.

-
50. **Fulop N, Marchase RB and Chatham JC.** Role of protein O-linked N-acetylglucosamine in mediating cell function and survival in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 73: 288-297, 2007.
 51. **Galvao TF, Brown BH, Hecker PA, O'Connell KA, O'shea KM, Sabbah HN, Rastogi S, Daneault C, des RC and Stanley WC.** High intake of saturated fat, but not polyunsaturated fat, improves survival in heart failure despite persistent mitochondrial defects. *Cardiovasc Res* 93: 24-32, 2011.
 52. **Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V and Ventura-Clapier R.** Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 551: 491-501, 2003.
 53. **Gibbs CL.** Cardiac energetics. *Physiol Rev* 58: 174-254, 1978.
 54. **Gong G, Liu J, Liang P, Guo T, Hu Q, Ochiai K, Hou M, Ye Y, Wu X, Mansoor A, From AH, Ugurbil K, Bache RJ and Zhang J.** Oxidative capacity in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H541-H548, 2003.
 55. **Goodwin GW, Taylor CS and Taegtmeyer H.** Regulation of energy metabolism of the heart during acute increase in heart work. *J Biol Chem* 273: 29530-29539, 1998.

-
56. **Grossman W, Jones D and McLaurin LP.** Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56-64, 1975.
57. **Grossman W, Jones D and McLaurin LP.** Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest* 56: 56-64, 1975.
58. **Gunter TE, Buntinas L, Sparagna G, Eliseev R and Gunter K.** Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium* 28: 285-296, 2000.
59. **Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS and Gavin CE.** Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* 267: C313-C339, 1994.
60. **Gunter TE and Sheu SS.** Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca(2+) transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1291-1308, 2009.
61. **Gustafsson AB and Gottlieb RA.** Heart mitochondria: gates of life and death. *Cardiovasc Res* 77: 334-343, 2008.
62. **Hagen MK, Lehenbauer-Ludke AR, Paludo AC, Schenkel P, Goncalves L, Fernandes TG, Caron R, Llesuy S, Mill JG and Bello-Klein A.** Diet with isolated soy protein reduces oxidative stress and preserves ventricular function in rats with myocardial infarction. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 19: 91-97, 2009.

-
63. **Halestrap AP.** Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J* 278 (Pt 3): 715-719, 1991.
64. **Halestrap AP.** A pore way to die: the role of mitochondria in reperfusion injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 38: 841-860, 2010.
65. **Halestrap AP, Clarke SJ and Javadov SA.** Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61: 372-385, 2004.
66. **Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S and Woodfield KY.** Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1366: 79-94, 1998.
67. **Halestrap AP and Pasdois P.** The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1787: 1402-1405, 2009.
68. **Halton TL, Willett WC, Liu S, Manson JE, Albert CM, Rexrode K and Hu FB.** Low-carbohydrate-diet score and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med* 355: 1991-2002, 2006.
69. **Hartford M, Wikstrand J, Wallentin I, Ljungman S, Wilhelmsen L and Berglund G.** Diastolic function of the heart in untreated primary hypertension. *Hypertension* 6: 329-338, 1984.

-
70. **He J, Wofford MR, Reynolds K, Chen J, Chen CS, Myers L, Minor DL, Elmer PJ, Jones DW and Whelton PK.** Effect of dietary protein supplementation on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 124: 589-595, 2011.
71. **Heineke J and Molkentin JD.** Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 589-600, 2006.
72. **Hofer T, Servais S, Seo AY, Marzetti E, Hiona A, Upadhyay SJ, Wohlgemuth SE and Leeuwenburgh C.** Bioenergetics and permeability transition pore opening in heart subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria: effects of aging and lifelong calorie restriction. *Mech Ageing Dev* 130: 297-307, 2009.
73. **Honda HM and Ping P.** Mitochondrial permeability transition in cardiac cell injury and death. *Cardiovasc Drugs Ther* 20: 425-432, 2006.
74. **Hoppel CL, Tandler B, Parland W, Turkaly JS and Albers LD.** Hamster cardiomyopathy. A defect in oxidative phosphorylation in the cardiac interfibrillar mitochondria. *J Biol Chem* 257: 1540-1548, 1982.
75. **Houser SR, Piacentino V, III and Weisser J.** Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1595-1607, 2000.
76. **Howard BV, Van Horn L, Hsia J, Manson JE, Stefanick ML, Wassertheil-Smoller S, Kuller LH, LaCroix AZ, Langer RD, Lasser NL, Lewis CE,**

- Limacher MC, Margolis KL, Mysiw WJ, Ockene JK, Parker LM, Perri MG, Phillips L, Prentice RL, Robbins J, Rossouw JE, Sarto GE, Schatz IJ, Snetselaar LG, Stevens VJ, Tinker LF, Trevisan M, Vitolins MZ, Anderson GL, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black HR, Brunner RL, Brzyski RG, Caan B, Chlebowski RT, Gass M, Granek I, Greenland P, Hays J, Heber D, Heiss G, Hendrix SL, Hubbell FA, Johnson KC and Kotchen JM. Low-fat dietary pattern and risk of cardiovascular disease: the Women's Health Initiative Randomized Controlled Dietary Modification Trial. *JAMA* 295: 655-666, 2006.
77. **Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Rimm E, Colditz GA, Speizer FE, Hennekens CH and Willett WC.** Dietary protein and risk of ischemic heart disease in women. *Am J Clin Nutr* 70: 221-227, 1999.
78. **Hu FB and Willett WC.** Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA* 288: 2569-2578, 2002.
79. **Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Jessup M, Konstam MA, Mancini DM, Michl K, Oates JA, Rahko PS, Silver MA, Stevenson LW, Yancy CW, Antman EM, Smith SC, Jr., Adams CD, Anderson JL, Faxon DP, Fuster V, Halperin JL, Hiratzka LF, Jacobs AK, Nishimura R, Ornato JP, Page RL and Riegel B.** ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure):

- developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation* 112: e154-e235, 2005.
80. **Huser J, Blatter LA and Sheu SS.** Mitochondrial calcium in heart cells: beat-to-beat oscillations or slow integration of cytosolic transients? *J Bioenerg Biomembr* 32: 27-33, 2000.
81. **Huss JM and Kelly DP.** Mitochondrial energy metabolism in heart failure: a question of balance. *J Clin Invest* 115: 547-555, 2005.
82. **Ide T, Tsutsui H, Kinugawa S, Utsumi H, Kang D, Hattori N, Uchida K, Arimura K, Egashira K and Takeshita A.** Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res* 85: 357-363, 1999.
83. **Ingwall JS.** *ATP and the Heart.* 2001,
84. **Ingwall JS.** Transgenesis and cardiac energetics: new insights into cardiac metabolism. *J Mol Cell Cardiol* 37: 613-623, 2004.
85. **Ingwall JS and Weiss RG.** Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res* 95: 135-145, 2004.
86. **Jarreta D, Orus J, Barrientos A, Miro O, Roig E, Heras M, Moraes CT, Cardellach F and Casademont J.** Mitochondrial function in heart muscle from

- patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res* 45: 860-865, 2000.
87. **Javadov S and Karmazyn M.** Mitochondrial permeability transition pore opening as an endpoint to initiate cell death and as a putative target for cardioprotection. *Cell Physiol Biochem* 20: 1-22, 2007.
88. **Jennings RB and Reimer KA.** The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 42: 225-246, 1991.
89. **Jiang D, Zhao L and Clapham DE.** Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter. *Science* 326: 144-147, 2009.
90. **Joiner ML, Koval OM, Li J, He BJ, Allamargot C, Gao Z, Luczak ED, Hall DD, Fink BD, Chen B, Yang J, Moore SA, Scholz TD, Strack S, Mohler PJ, Sivitz WI, Song LS and Anderson ME.** CaMKII determines mitochondrial stress responses in heart. *Nature* 491: 269-273, 2012.
91. **Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T and Leeuwenburgh C.** Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J* 19: 419-421, 2005.
92. **Judge S, Jang YM, Smith A, Hagen T and Leeuwenburgh C.** Age-associated increases in oxidative stress and antioxidant enzyme activities in

- cardiac interfibrillar mitochondria: implications for the mitochondrial theory of aging. *FASEB J* 19: 419-421, 2005.
93. **Jullig M, Hickey AJ, Chai CC, Skea GL, Middleditch MJ, Costa S, Choong SY, Philips AR and Cooper GJ.** Is the failing heart out of fuel or a worn engine running rich? A study of mitochondria in old spontaneously hypertensive rats. *Proteomics* 8: 2556-2572, 2008.
94. **Kagaya Y, Hajjar RJ, Gwathmey JK, Barry WH and Lorell BH.** Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with fasinopril improves depressed responsiveness to Ca²⁺ in myocytes from aortic-banded rats. *Circulation* 94: 2915-2922, 1996.
95. **Kannel WB.** Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 5: 167-173, 2000.
96. **Kannel WB, Castelli WP, McNamara PM, McKee PA and Feinleib M.** Role of blood pressure in the development of congestive heart failure. The Framingham study. *N Engl J Med* 287: 781-787, 1972.
97. **Karbowska J, Kochan Z and Smolenski RT.** Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha Is Downregulated In The Failing Human Heart. *Cell Mol Biol Lett* 8: 49-53, 2003.
98. **Katz AM.** Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med* 322: 100-110, 1990.

-
99. **Katz AM and Katz PB.** Diseases of the heart in the works of Hippocrates. *Br Heart J* 24: 257-264, 1962.
100. **Kelemen LE, Kushi LH, Jacobs DR, Jr. and Cerhan JR.** Associations of dietary protein with disease and mortality in a prospective study of postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 161: 239-249, 2005.
101. **Kelley DE, He J, Menshikova EV and Ritov VB.** Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 2944-2950, 2002.
102. **Kerr PM, Suleiman MS and Halestrap AP.** Reversal of permeability transition during recovery of hearts from ischemia and its enhancement by pyruvate. *Am J Physiol* 276: H496-H502, 1999.
103. **Khairallah RJ, O'shea KM, Brown BH, Khanna N, des RC and Stanley WC.** Treatment with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, delays Ca²⁺-induced mitochondria permeability transition in normal and hypertrophied myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 335: 155-162, 2010.
104. **Khairallah RJ, Kim J, O'Shea KM, O'Connell KA, BBH, Galvao TDRC, Polster BM, Hoppel CL and Stanley WC.** Improved mitochondrial function with diet-induced increase in either docosahexaenoic acid or arachidonic acid in membrane phospholipids . *PLoS One* 2012.
105. **Kim SJ, Peppas A, Hong SK, Yang G, Huang Y, Diaz G, Sadoshima J, Vatner DE and Vatner SF.** Persistent stunning induces myocardial

-
- hibernation and protection: flow/function and metabolic mechanisms. *Circ Res* 92: 1233-1239, 2003.
106. **Knoops KT, de Groot LC, Kromhout D, Perrin AE, Moreiras-Varela O, Menotti A and van Staveren WA.** Mediterranean diet, lifestyle factors, and 10-year mortality in elderly European men and women: the HALE project. *JAMA* 292: 1433-1439, 2004.
107. **Kohlhaas M, Liu T, Knopp A, Zeller T, Ong MF, Bohm M, O'Rourke B and Maack C.** Elevated cytosolic Na⁺ increases mitochondrial formation of reactive oxygen species in failing cardiac myocytes. *Circulation* 121: 1606-1613, 2010.
108. **Korvald C, Elvenes OP and Myrnes T.** Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H1345-H1351, 2000.
109. **Kroemer G, Galluzzi L and Brenner C.** Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87: 99-163, 2007.
110. **Lagiou P, Sandin S, Lof M, Trichopoulos D, Adami HO and Weiderpass E.** Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women: prospective cohort study. *BMJ* 344: e4026, 2012.

-
111. **Lagiou P, Sandin S, Weiderpass E, Lagiou A, Mucci L, Trichopoulos D and Adami HO.** Low carbohydrate-high protein diet and mortality in a cohort of Swedish women. *J Intern Med* 261: 366-374, 2007.
112. **Lambeth JD.** NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol* 4: 181-189, 2004.
113. **Lavie CJ, Milani RV, Mehra MR and Ventura HO.** Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *J Am Coll Cardiol* 54: 585-594, 2009.
114. **Lee WC, Chavez YE, Baker T and Luce BR.** Economic burden of heart failure: a summary of recent literature. *Heart Lung* 33: 362-371, 2004.
115. **Leeuwenburgh C, Gurley CM, Strotman BA and Dupont-Versteegden EE.** Age-related differences in apoptosis with disuse atrophy in soleus muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1288-R1296, 2005.
116. **Lei B, Lionetti V, Young ME, Chandler MP, D' Agostino C, Kang E, Altarejos M, Matsuo K, Hintze TH, Stanley WC and Recchia FA.** Paradoxical downregulation of the glucose oxidation pathway despite enhanced flux in severe heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 36: 567-576, 2004.
117. **Lesnefsky EJ, Chen Q, Slabe TJ, Stoll MS, Minkler PE, Hassan MO, Tandler B and 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* 287: H258-H267, 2004.

-
118. **Lesnefsky EJ, Moghaddas S, Tandler B, Kerner J and Hoppel CL.** Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1065-1089, 2001.
119. **Levitan EB, Wolk A and Mittleman MA.** Consistency with the DASH diet and incidence of heart failure. *Arch Intern Med* 169: 851-857, 2009.
120. **Levitan EB, Wolk A and Mittleman MA.** Relation of consistency with the dietary approaches to stop hypertension diet and incidence of heart failure in men aged 45 to 79 years. *Am J Cardiol* 104: 1416-1420, 2009.
121. **Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB and Ho KK.** The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 275: 1557-1562, 1996.
122. **Liao R, Nascimben L, Friedrich J, Gwathmey JK and Ingwall JS.** Decreased energy reserve in an animal model of dilated cardiomyopathy. Relationship to contractile performance. *Circ Res* 78: 893-902, 1996.
123. **Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M and Wylie-Rosett J.** Diet and lifestyle recommendations revision 2006: a scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation* 114: 82-96, 2006.
124. **Lichtenstein AH, Appel LJ, Brands M, Carnethon M, Daniels S, Franch HA, Franklin B, Kris-Etherton P, Harris WS, Howard B, Karanja N, Lefevre**

-
- M, Rudel L, Sacks F, Van Horn L, Winston M and Wylie-Rosett J.** Summary of American Heart Association Diet and Lifestyle Recommendations revision 2006. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 2186-2191, 2006.
125. **Lionetti V, Stanley WC and Recchia FA.** Modulating fatty acid oxidation in heart failure. *Cardiovasc Res* 90: 202-209, 2011.
126. **Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS and Schaffer JE.** Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3077-3082, 2003.
127. **Listenberger LL, Han X, Lewis SE, Cases S, Farese RV, Jr., Ory DS and Schaffer JE.** Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3077-3082, 2003.
128. **Litwin SE, Katz SE, Morgan JP and Douglas PS.** Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation* 89: 345-354, 1994.
129. **Liu J, Wang C, Murakami Y, Gong G, Ishibashi Y, Prody C, Ochiai K, Bache RJ, Godinot C and Zhang J.** Mitochondrial ATPase and high-energy phosphates in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1319-H1326, 2001.

-
130. **Liu T and O'Rourke B.** Enhancing mitochondrial Ca²⁺ uptake in myocytes from failing hearts restores energy supply and demand matching. *Circ Res* 103: 279-288, 2008.
131. **Liu X, Godwin ML and Nowak G.** Protein kinase C-alpha inhibits the repair of oxidative phosphorylation after S-(1,2-dichlorovinyl)-L-cysteine injury in renal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: F64-F73, 2004.
132. **Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, de SG, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Roger VL, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND and Wylie-Rosett J.** Heart disease and stroke statistics--2010 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 121: e46-e215, 2010.
133. **Lloyd-Jones DM, Larson MG, Leip EP, Beiser A, D'Agostino RB, Kannel WB, Murabito JM, Vasan RS, Benjamin EJ and Levy D.** Lifetime risk for developing congestive heart failure: the Framingham Heart Study. *Circulation* 106: 3068-3072, 2002.
134. **Lopaschuk GD, Ussher JR, Folmes CD, Jaswal JS and Stanley WC.** Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90: 207-258, 2010.

-
135. **LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL and RANDALL RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951.
136. **Maack C and Bohm M.** Targeting mitochondrial oxidative stress in heart failure throttling the afterburner. *J Am Coll Cardiol* 58: 83-86, 2011.
137. **Maack C, Cortassa S, Aon MA, Ganesan AN, Liu T and O'Rourke B.** Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circ Res* 99: 172-182, 2006.
138. **Marcil M, Ascah A, Matas J, Belanger S, Deschepper CF and Burelle Y.** Compensated volume overload increases the vulnerability of heart mitochondria without affecting their functions in the absence of stress. *J Mol Cell Cardiol* 41: 998-1009, 2006.
139. **Marin-Garcia J, Goldenthal MJ and Moe GW.** Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing- induced cardiac failure. *Cardiovasc Res* 52: 103-110, 2001.
140. **Marin-Garcia J, Goldenthal MJ and Moe GW.** Mitochondrial pathology in cardiac failure. *Cardiovasc Res* 49: 17-26, 2001.
141. **Matas J, Tien Sing YN, Bourcier-Lucas C, Ascah A, Marcil M, Deschepper CF and Burelle Y.** Increased expression and intramitochondrial translocation of cyclophilin-D associates with increased vulnerability of the permeability

- transition pore to stress-induced opening during compensated ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2008.
142. **McAuley KA, Hopkins CM, Smith KJ, McLay RT, Williams SM, Taylor RW and Mann JI.** Comparison of high-fat and high-protein diets with a high-carbohydrate diet in insulin-resistant obese women. *Diabetologia* 48: 8-16, 2005.
143. **McCormack JG and Denton RM.** The effects of calcium ions and adenine nucleotides on the activity of pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex. *Biochem J* 180: 533-544, 1979.
144. **McCutcheon LJ, Cory CR, Nowack L, Shen H, Mirsalami M, Lahucky R, Kovac L, O'Grady M, Horne R and O'Brien PJ.** Respiratory chain defect of myocardial mitochondria in idiopathic dilated cardiomyopathy of Doberman pinscher dogs. *Can J Physiol Pharmacol* 70: 1529-1533, 1992.
145. **McMillin JB and Dowhan W.** Cardiolipin and apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1585: 97-107, 2002.
146. **Mildaziene V, Baniene R, Nauciene Z, Bakker BM, Brown GC, Westerhoff HV and Kholodenko BN.** Calcium indirectly increases the control exerted by the adenine nucleotide translocator over 2-oxoglutarate oxidation in rat heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 324: 130-134, 1995.

-
147. **Mill JG, Stefanon I, dos SL and Baldo MP.** Remodeling in the ischemic heart: the stepwise progression for heart. *Braz J Med Biol Res* 44: 890-898, 2011.
148. **Montgomery C, Hamilton N and Ianuzzo CD.** Energy status of the rapidly paced canine myocardium in congestive heart failure. *J Appl Physiol* 73: 2363-2367, 1992.
149. **Mozaffarian D, Appel LJ and Van HL.** Components of a cardioprotective diet: new insights. *Circulation* 123: 2870-2891, 2011.
150. **Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC and Hu FB.** Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med* 364: 2392-2404, 2011.
151. **Mozaffarian D and Wu JH.** Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. *J Am Coll Cardiol* 58: 2047-2067, 2011.
152. **Muraski JA, Rota M, Misao Y, Fransioli J, Cottage C, Gude N, Esposito G, Delucchi F, Arcarese M, Alvarez R, Siddiqi S, Emmanuel GN, Wu W, Fischer K, Martindale JJ, Glembotski CC, Leri A, Kajstura J, Magnuson N, Berns A, Beretta RM, Houser SR, Schaefer EM, Anversa P and Sussman MA.** Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nat Med* 13: 1467-1475, 2007.

-
153. **Nakayama H, Chen X, Baines CP, Klevitsky R, Zhang X, Zhang H, Jaleel N, Chua BH, Hewett TE, Robbins J, Houser SR and Molkenin JD.** Ca²⁺- and mitochondrial-dependent cardiomyocyte necrosis as a primary mediator of heart failure. *J Clin Invest* 117: 2431-2444, 2007.
154. **Neglia D, De CA, Marraccini P, Natali A, Ciardetti M, Vecoli C, Gastaldelli A, Ciociaro D, Pellegrini P, Testa R, Menichetti L, L'Abbate A, Stanley WC and Recchia FA.** Impaired myocardial metabolic reserve and substrate selection flexibility during stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293: H3270-H3278, 2007.
155. **Neubauer S, Beer M, Landschutz W, Sandstede J, Seyfarth T, Lipke C, Kostler H, Pabst TW, Meininger M, von Kienlin M, Horn M, Harre K and Hahn D.** Absolute quantification of high energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied and failing human myocardium. *MAGMA* 11: 73-74, 2000.
156. **Neubauer S, Horn M, Cramer M, Harre K, Newell JB, Peters W, Pabst T, Ertl G, Hahn D, Ingwall JS and Kochsiek K.** Myocardial phosphocreatine-to-ATP ratio is a predictor of mortality in patients with dilated cardiomyopathy. *Circulation* 96: 2190-2196, 1997.
157. **Neubauer S, Horn M, Naumann A, Tian R, Hu K, Laser M, Friedrich J, Gaudron P, Schnackerz K, Ingwall JS and .** Impairment of energy metabolism in intact residual myocardium of rat hearts with chronic myocardial infarction. *J Clin Invest* 95: 1092-1100, 1995.

-
158. **Neubauer S, Krahe T, Schindler R, Horn M, Hillenbrand H, Entzeroth C, Mader H, Kromer EP, Riegger GA, Lackner K and .** ³¹P magnetic resonance spectroscopy in dilated cardiomyopathy and coronary artery disease. Altered cardiac high-energy phosphate metabolism in heart failure. *Circulation* 86: 1810-1818, 1992.
159. **Nishio ML, Ornatsky OI, Craig EE and Hood DA.** Mitochondrial biogenesis during pressure overload induced cardiac hypertrophy in adult rats. *Can J Physiol Pharmacol* 73: 630-637, 1995.
160. **Norton GR, Woodiwiss AJ, Gaasch WH, Mela T, Chung ES, Aurigemma GP and Meyer TE.** Heart failure in pressure overload hypertrophy. The relative roles of ventricular remodeling and myocardial dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 39: 664-671, 2002.
161. **Nowak G.** Protein kinase C- α and ERK1/2 mediate mitochondrial dysfunction, decreases in active Na⁺ transport, and cisplatin-induced apoptosis in renal cells. *J Biol Chem* 277: 43377-43388, 2002.
162. **O'shea KM, Khairallah RJ, Sparagna GC, Xu W, Hecker PA, Robillard-Frayne I, des RC, Kristian T, Murphy RC, Fiskum G and Stanley WC.** Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca²⁺-induced permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 47: 819-827, 2009.

-
163. **Ogbi M, Chew CS, Pohl J, Stuchlik O, Ogbi S and Johnson JA.** Cytochrome c oxidase subunit IV as a marker of protein kinase Cepsilon function in neonatal cardiac myocytes: implications for cytochrome c oxidase activity. *Biochem J* 382: 923-932, 2004.
164. **Okere IC, Chess DJ, McElfresh TA, Johnson J, Rennison J, Ernsberger P, Hoit BD, Chandler MP and Stanley WC.** High-fat diet prevents cardiac hypertrophy and improves contractile function in the hypertensive dahl salt-sensitive rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 825-831, 2005.
165. **Okere IC, Young ME, McElfresh TA, Chess DJ, Sharov VG, Sabbah HN, Hoit BD, Ernsberger P, Chandler MP and Stanley WC.** Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. *Hypertension* 48: 1116-1123, 2006.
166. **Opie LH.** *The Heart: Physiology and Metabolism.* New York: Raven Press, 1991, p. p. 208-276.
167. **Osorio JC, Stanley WC, Linke A, Castellari M, Diep QN, Panchal AR, Hintze TH, Lopaschuk GD and Recchia FA.** Impaired myocardial fatty acid oxidation and reduced protein expression of retinoid X receptor-alpha in pacing-induced heart failure. *Circulation* 106: 606-612, 2002.
168. **Osterholt M, Nguyen TD, Schwarzer M and Doenst T.** Alterations in mitochondrial function in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart Fail Rev* 2012.

-
169. **Ostrander DB, Sparagna GC, Amoscato AA, McMillin JB and Dowhan W.** Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 276: 38061-38067, 2001.
170. **Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B and Orrenius S.** Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1259-1263, 2002.
171. **Ozcan C, Bienengraeber M, Hodgson DM, Mann DL and Terzic A.** Mitochondrial tolerance to stress impaired in failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 35: 1161-1166, 2003.
172. **Palmer JW, Tandler B and Hoppel CL.** Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* 252: 8731-8739, 1977.
173. **Palmer JW, Tandler B and Hoppel CL.** Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol* 250: H741-H748, 1986.
174. **Palty R, Hershinkel M and Sekler I.** Molecular identity and functional properties of the mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger. *J Biol Chem* 287: 31650-31657, 2012.

-
175. **Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananshvili D and Sekler I.** NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 436-441, 2010.
176. **Paolisso G, Gambardella A, Galzerano D, D'Amore A, Rubino P, Verza M, Teasuro P, Varricchio M and D'Onofrio F.** Total-body and myocardial substrate oxidation in congestive heart failure. *Metabolism* 43: 174-179, 1994.
177. **Papanicolaou KN, Khairallah RJ, Ngoh GA, Chikando A, Luptak I, O'shea KM, Riley DD, Lugus JJ, Colucci WS, Lederer WJ, Stanley WC and Walsh K.** Mitofusin-2 maintains mitochondrial structure and contributes to stress-induced permeability transition in cardiac myocytes. *Mol Cell Biol* 31: 1309-1328, 2011.
178. **Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro RF, Stanley WC and Walsh K.** Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011.
179. **Petrosillo G, Casanova G, Matera M, Ruggiero FM and Paradies G.** Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Lett* 580: 6311-6316, 2006.

-
180. **Preis SR, Stampfer MJ, Spiegelman D, Willett WC and Rimm EB.** Dietary protein and risk of ischemic heart disease in middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 92: 1265-1272, 2010.
181. **Rajabi M, Kassiotis C, Razeghi P and Taegtmeyer H.** Return to the fetal gene program protects the stressed heart: a strong hypothesis. *Heart Fail Rev* 12: 331-343, 2007.
182. **Rashid MN, Fuentes F, Touchon RC and Wehner PS.** Obesity and the risk for cardiovascular disease. *Prev Cardiol* 6: 42-47, 2003.
183. **Razeghi P, Young ME, Alcorn JL, Moravec CS, Frazier OH and Taegtmeyer H.** Metabolic gene expression in fetal and failing human heart. *Circulation* 104: 2923-2931, 2001.
184. **Rebholz CM, Reynolds K, Wofford MR, Chen J, Kelly TN, Mei H, Whelton PK and He J.** Effect of soybean protein on novel cardiovascular disease risk factors: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 67: 58-63, 2013.
185. **Recchia FA, McConnell PI, Bernstein RD, Vogel TR, Xu X and Hintze TH.** Reduced nitric oxide production and altered myocardial metabolism during the decompensation of pacing-induced heart failure in the conscious dog. *Circ Res* 83: 969-979, 1998.
186. **Riehle C, Wende AR, Zaha VG, Pires KM, Wayment B, Olsen C, Bugger H, Buchanan J, Wang X, Moreira AB, Doenst T, Medina-Gomez G, Litwin SE,**

-
- Lelliott CJ, Vidal-Puig A and Abel ED.** PGC-1beta deficiency accelerates the transition to heart failure in pressure overload hypertrophy. *Circ Res* 109: 783-793, 2011.
187. **Ritter O and Neyses L.** The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol Med* 9: 313-321, 2003.
188. **Riva A, Tandler B, Loffredo F, Vazquez E and Hoppel C.** Structural differences in two biochemically defined populations of cardiac mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H868-H872, 2005.
189. **Rosca MG and Hoppel CL.** Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res* 88: 40-50, 2010.
190. **Rosca MG and Hoppel CL.** Mitochondrial dysfunction in heart failure. *Heart Fail Rev* 2012.
191. **Rosca MG, Tandler B and Hoppel CL.** Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 55: 31-41, 2013.
192. **Rosca MG, Vazquez EJ, Kerner J, Parland W, Chandler MP, Stanley W, Sabbah HN and Hoppel CL.** Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res* 80: 30-39, 2008.

-
193. **Rosenberg P.** Mitochondrial dysfunction and heart disease. *Mitochondrion* 4: 621-628, 2004.
194. **Sack MN, Rader TA, Park S, Bastin J, McCune SA and Kelly DP.** Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 94: 2837-2842, 1996.
195. **Sadoshima J and Izumo S.** Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. *EMBO J* 12: 1681-1692, 1993.
196. **Sadoshima J and Izumo S.** The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol* 59: 551-571, 1997.
197. **Sadoshima J, Jahn L, Takahashi T, Kulik TJ and Izumo S.** Molecular characterization of the stretch-induced adaptation of cultured cardiac cells. An in vitro model of load-induced cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 267: 10551-10560, 1992.
198. **Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW and Allard MF.** Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart Fail Rev* 7: 161-173, 2002.
199. **Santo-Domingo J and Demarex N.** Calcium uptake mechanisms of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1797: 907-912, 2010.

-
200. **Sayen MR, Gustafsson AB, Sussman MA, Molкетин JD and Gottlieb RA.** Calcineurin transgenic mice have mitochondrial dysfunction and elevated superoxide production. *Am J Physiol Cell Physiol* 284: C562-C570, 2003.
201. **Scheubel RJ, Tostlebe M, Simm A, Rohrbach S, Prondzinsky R, Gellerich FN, Silber RE and Holtz J.** Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *J Am Coll Cardiol* 40: 2174-2181, 2002.
202. **Schocken DD, Benjamin EJ, Fonarow GC, Krumholz HM, Levy D, Mensah GA, Narula J, Shor ES, Young JB and Hong Y.** Prevention of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association Councils on Epidemiology and Prevention, Clinical Cardiology, Cardiovascular Nursing, and High Blood Pressure Research; Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group; and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 117: 2544-2565, 2008.
203. **Schwartzkopff B, Frenzel H, Dieckerhoff J, Betz P, Flasshove M, Schulte HD, Mundhenke M, Motz W and Strauer BE.** Morphometric investigation of human myocardium in arterial hypertension and valvular aortic stenosis. *Eur Heart J* 13 Suppl D: 17-23, 1992.
204. **Schwartzkopff B, Motz W, Vogt M and Strauer BE.** Heart failure on the basis of hypertension. *Circulation* 87: IV66-IV72, 1993.

-
205. **Schwarzer M, Schrepper A, Amorim PA, Osterholt M and Doenst T.** Pressure overload differentially affects respiratory capacity in interfibrillar and subsarcolemmal mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 304: H529-H537, 2013.
206. **Sebastiani M, Giordano C, Nediani C, Travaglini C, Borch E, Zani M, Feccia M, Mancini M, Petrozza V, Cossarizza A, Gallo P, Taylor RW and d'Amati G.** Induction of mitochondrial biogenesis is a maladaptive mechanism in mitochondrial cardiomyopathies. *J Am Coll Cardiol* 50: 1362-1369, 2007.
207. **Serizawa T, Mirsky I, Carabello BA and Grossman W.** Diastolic myocardial stiffness in gradually developing left ventricular hypertrophy in dog. *Am J Physiol* 242: H633-H637, 1982.
208. **Sharma N, Okere IC, Barrows BR, Lei B, Duda MK, Yuan CL, Previs SF, Sharov VG, Azimzadeh AM, Ernsberger P, Hoit BD, Sabbah H and Stanley WC.** High-sugar diets increase cardiac dysfunction and mortality in hypertension compared to low-carbohydrate or high-starch diets. *J Hypertens* 26: 1402-1410, 2008.
209. **Sharma N, Okere IC, Duda MK, Chess DJ, O'shea KM and Stanley WC.** Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res* 73: 257-268, 2007.
210. **Sharma N, Okere IC, Duda MK, Johnson J, Yuan CL, Chandler MP, Ernsberger P, Hoit BD and Stanley WC.** High fructose diet increases

-
- mortality in hypertensive rats compared to a complex carbohydrate or high fat diet. *Am J Hypertens* 20: 403-409, 2007.
211. **Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M and Goldstein S.** Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol* 148: 141-149, 1996.
212. **Shen W, Asai K, Uechi M, Mathier MA, Shannon RP, Vatner SF and Ingwall JS.** Progressive loss of myocardial ATP due to a loss of total purines during the development of heart failure in dogs: a compensatory role for the parallel loss of creatine. *Circulation* 100: 2113-2118, 1999.
213. **Shimada T, Horita K, Murakami M and Ogura R.** Morphological studies of different mitochondrial populations in monkey myocardial cells. *Cell Tissue Res* 238: 577-582, 1984.
214. **Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, Rosenzweig A, Kahn CR, Abel ED and Walsh K.** Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem* 277: 37670-37677, 2002.
215. **Simonini A, Massie BM, Long CS, Qi M and Samarel AM.** Alterations in skeletal muscle gene expression in the rat with chronic congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 28: 1683-1691, 1996.

-
216. **Skov AR, Toubro S, Ronn B, Holm L and Astrup A.** Randomized trial on protein vs carbohydrate in ad libitum fat reduced diet for the treatment of obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 23: 528-536, 1999.
217. **Smith VE, Schulman P, Karimeddini MK, White WB, Meeran MK and Katz AM.** Rapid ventricular filling in left ventricular hypertrophy: II. Pathologic hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 5: 869-874, 1985.
218. **Smith VE, Schulman P, Karimeddini MK, White WB, Meeran MK and Katz AM.** Rapid ventricular filling in left ventricular hypertrophy: II. Pathologic hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 5: 869-874, 1985.
219. **Sparagna GC, Gunter KK, Sheu SS and Gunter TE.** Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem* 270: 27510-27515, 1995.
220. **Stanley WC, Dabkowski ER, Ribeiro RF, Jr. and O'Connell KA.** Dietary fat and heart failure: moving from lipotoxicity to lipoprotection. *Circ Res* 110: 764-776, 2012.
221. **Stanley WC, Recchia FA and Lopaschuk GD.** Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 85: 1093-1129, 2005.
222. **Strauer BE.** Myocardial oxygen consumption in chronic heart disease: role of wall stress, hypertrophy and coronary reserve. *Am J Cardiol* 44: 730-740, 1979.

-
223. **Strauer BE.** Ventricular function and coronary hemodynamics in hypertensive heart disease. *Am J Cardiol* 44: 999-1006, 1979.
224. **Suga H.** Ventricular energetics. *Physiol Rev* 70: 247-277, 1990.
225. **Suleiman MS, Halestrap AP and Griffiths EJ.** Mitochondria: a target for myocardial protection. *Pharmacol Ther* 89: 29-46, 2001.
226. **Swynghedauw B.** Remodelling of the heart in response to chronic mechanical overload. *Eur Heart J* 10: 935-943, 1989.
227. **Taegtmeyer H.** Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol* 19: 59-113, 1994.
228. **Taegtmeyer H.** Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation* 110: 894-896, 2004.
229. **Taegtmeyer H.** Glycogen in the heart--an expanded view. *J Mol Cell Cardiol* 37: 7-10, 2004.
230. **Teede HJ, Giannopoulos D, Dalais FS, Hodgson J and McGrath BP.** Randomised, controlled, cross-over trial of soy protein with isoflavones on blood pressure and arterial function in hypertensive subjects. *J Am Coll Nutr* 25: 533-540, 2006.

-
231. **Tekin D, Dursun AD and Xi L.** Hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) and cardioprotection. *Acta Pharmacol Sin* 31: 1085-1094, 2010.
232. **Tian R, Nascimben L, Kaddurah-Daouk R and Ingwall JS.** Depletion of energy reserve via the creatine kinase reaction during the evolution of heart failure in cardiomyopathic hamsters. *J Mol Cell Cardiol* 28: 755-765, 1996.
233. **Toth MJ and Matthews DE.** Whole-body protein metabolism in chronic heart failure: relationship to anabolic and catabolic hormones. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 30: 194-201, 2006.
234. **Toth MJ, Matthews DE, Ades PA, Tischler MD, Van Buren P, Previs M and LeWinter MM.** Skeletal muscle myofibrillar protein metabolism in heart failure: relationship to immune activation and functional capacity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E685-E692, 2005.
235. **Toyomizu M and Clandinin MT.** Effects of dietary protein and fat level on oxidative phosphorylation in rat heart mitochondria. *Br J Nutr* 69: 97-102, 1993.
236. **Tsutsui H, Ide T and Kinugawa S.** Mitochondrial oxidative stress, DNA damage, and heart failure. *Antioxid Redox Signal* 8: 1737-1744, 2006.
237. **Tsutsui H, Kinugawa S and Matsushima S.** Oxidative stress and heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301: H2181-H2190, 2011.

-
238. **Tuominen EK, Wallace CJ and Kinnunen PK.** Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J Biol Chem* 277: 8822-8826, 2002.
239. **Unverferth DV, Lee SW and Wallick ET.** Human myocardial adenosine triphosphatase activities in health and heart failure. *Am Heart J* 115: 139-146, 1988.
240. **Vasdev S and Stuckless J.** Antihypertensive effects of dietary protein and its mechanism. *Int J Angiol* 19: e7-e20, 2010.
241. **Weber KT.** Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol* 13: 1637-1652, 1989.
242. **Weber KT, Anversa P, Armstrong PW, Brilla CG, Burnett JC, Jr., Cruickshank JM, Devereux RB, Giles TD, Korsgaard N, Leier CV and .** Remodeling and reparation of the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* 20: 3-16, 1992.
243. **Weber KT and Brilla CG.** Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 83: 1849-1865, 1991.
244. **Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM and Bashey RI.** Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res* 62: 757-765, 1988.

-
245. **Weber KT, Pick R, Silver MA, Moe GW, Janicki JS, Zucker IH and Armstrong PW.** Fibrillar collagen and remodeling of dilated canine left ventricle. *Circulation* 82: 1387-1401, 1990.
246. **Weiss JN, Korge P, Honda HM and Ping P.** Role of the mitochondrial permeability transition in myocardial disease. *Circ Res* 93: 292-301, 2003.
247. **Wiesner RJ, Aschenbrenner V, Ruegg JC and Zak R.** Coordination of nuclear and mitochondrial gene expression during the development of cardiac hypertrophy in rats. *Am J Physiol* 267: C229-C235, 1994.
248. **Wilkins BJ and Molkentin JD.** Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun* 322: 1178-1191, 2004.
249. **Wofford MR, Rebholz CM, Reynolds K, Chen J, Chen CS, Myers L, Xu J, Jones DW, Whelton PK and He J.** Effect of soy and milk protein supplementation on serum lipid levels: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 66: 419-425, 2012.
250. **Wold LE, Ceylan-Isik AF and Ren J.** Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy. *Acta Pharmacol Sin* 26: 908-917, 2005.
251. **Wu X, Zhang T, Bossuyt J, Li X, McKinsey TA, Dedman JR, Olson EN, Chen J, Brown JH and Bers DM.** Local InsP₃-dependent perinuclear Ca²⁺ signaling in cardiac myocyte excitation-transcription coupling. *J Clin Invest* 116: 675-682, 2006.

-
252. **Zachara NE and Hart GW.** O-GlcNAc a sensor of cellular state: the role of nucleocytoplasmic glycosylation in modulating cellular function in response to nutrition and stress. *Biochim Biophys Acta* 1673: 13-28, 2004.
253. **Zaha V, Grohmann J, Gobel H, Geibel A, Beyersdorf F and Doenst T.** Experimental model for heart failure in rats--induction and diagnosis. *Thorac Cardiovasc Surg* 51: 211-215, 2003.
254. **Zhang J, Merkle H, Hendrich K, Garwood M, From AH, Ugurbil K and Bache RJ.** Bioenergetic abnormalities associated with severe left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest* 92: 993-1003, 1993.
255. **Zhang J, Wilke N, Wang Y, Zhang Y, Wang C, Eijgelshoven MH, Cho YK, Murakami Y, Ugurbil K, Bache RJ and From AH.** Functional and bioenergetic consequences of postinfarction left ventricular remodeling in a new porcine model. MRI and ³¹P-MRS study. *Circulation* 94: 1089-1100, 1996.
256. **Zhu W, Zou Y, Shiojima I, Kudoh S, Aikawa R, Hayashi D, Mizukami M, Toko H, Shibasaki F, Yazaki Y, Nagai R and Komuro I.** Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 275: 15239-15245, 2000.

ANEXOS

**Effects of a High Protein Diet on Development of Heart Failure in Response to Pressure
Overload**

By: Rogerio F. Ribeiro, Jr^{1,2}, Erinne R. Dabkowski¹, Kelly A. O'Connell¹, Wenhong Xu¹,
Tatiana de Fatima Galvao^{1,3}, Peter A. Hecker¹, Kadambari C. Shekar¹, Ivanita
Stefanon² and William C. Stanley^{1,4}

From: ¹Division of Cardiology, Department of Medicine, University of Maryland, Baltimore,
MD, USA

²Department of Physiological Sciences, Federal University of Espirito Santo, Vitoria, ES,
Brazil.

³Intensive Care Unit, Hospital Israelita Albert Einstein, Sao Paulo, Brazil

⁴Discipline of Physiology, University of Sydney, Sydney, Australia

Running Title: Protein Intake and Heart Failure

Correspondence: William C. Stanley, Ph.D.
Professor and Chair of Cardiovascular Physiology
Discipline of Physiology
University of Sydney
Anderson Stuart Building (F13)
Sydney 2006, NSW, Australia
Email: wstanley@usyd.edu.au
Phone: (+61) 02 9351 4603

Abstract

Heart failure treatment guidelines provide no recommendations regarding the intake of protein, though it has been proposed that increasing protein intake may result in clinical improvement. High protein intake might improve protein synthesis and cell function, and prevent deterioration in mitochondrial and left ventricular function. We assessed the effects of a high protein diet on the development of heart failure characterized by cardiac hypertrophy, impaired mitochondrial oxidative metabolism and contractile dysfunction induced by transverse aortic constriction in rats. A standard diet with 18% of energy intake from protein was compared to a high protein diet (30% of energy intake). First we evaluated the effects of protein intake on the development of heart failure during 14 weeks of aortic constriction, and found similar cardiac hypertrophy, contractile dysfunction, ventricular dilation, and decreased cardiac mitochondrial oxidative capacity with both 18% and 30% protein. We then assessed more advanced heart failure, with 22 weeks of aortic constriction. We again saw no difference in cardiac mass, left ventricular volume, mitochondrial oxidative capacity or resistance to permeability transition between the 18% and 30% protein diets. There was a modest but significant decrease in survival with heart failure with the 30% protein diet compared to 18% protein ($p < 0.003$). In conclusion, consumption of a high protein diet did not affect cardiac mass, left ventricular volumes or ejection fraction, or myocardial mitochondrial oxidative capacity in rats with pressure overload induced heart failure, but significantly decreased survival.

Key Words: congestive heart failure, dietary protein, mitochondria, nutrition, mitochondrial permeability transition

Introduction

Heart failure is a major public health problem in the industrialized world and despite aggressive treatment with current pharmacotherapies, prognosis for these patients remains poor. It has recently been suggested that the amount and composition of dietary macronutrients may affect the symptoms and outcomes in heart failure patients (1-3). Specifically, it has been suggested that a high protein diet might be beneficial in the advanced stages of heart failure. Current heart failure treatment guidelines provide no recommendations regarding the intake of protein, fat and carbohydrate (4;5). In the advanced stages of heart failure patients frequently experience a progressive loss of muscle and fat mass, termed “cardiac cachexia”, which is a strong predictor of worsening heart failure and poor clinical outcome (6). It has been proposed that increasing protein and/or total energy intake in cachexic heart failure patients may prevent or reverse cachexia, but this remains to be definitively established (7;8).

Less is known about the impact of protein intake on the development and progression of heart failure. This is particularly relevant to heart failure due to arterial hypertension, where there is cardiac hypertrophy and a transient net protein accumulation in the heart. Healthy people subjected to resistance exercise training exhibit greater skeletal muscle hypertrophy when given dietary protein supplements (9). While this may be beneficial for skeletal muscle, a similar response in the myocardium to high protein intake in hypertension would be detrimental, as hypertension-induced left ventricle (LV) hypertrophy is a long established predictor of new onset heart failure and poor outcomes (10). Advanced heart failure due to hypertension induced LV hypertrophy is associated with disruption of cellular processes essential to maintain normal cardiac function, specifically impairment of mitochondrial function and decreased capacity for myocardial oxygen consumption and ATP generation (11-13). High protein intake could be detrimental if it accelerates net protein

synthesis in the myocardium and increases the extent of cardiac hypertrophy. On the other hand, a high protein diet could maintain optimal protein synthesis and prevent deterioration in mitochondrial and LV function. Epidemiological and interventional studies suggest that a high intake of protein under conditions of stable body mass has either minor effects or no effect on cardiovascular disease risk factors (e.g. serum lipids and blood pressure) in people without heart failure (14). On the other hand, a recent epidemiological study in middle age women found that high protein intake was associated with a greater incidence of cardiovascular disease over a 16 year follow-up period(15;16), though this was not observed in a similar analysis in a population of men(17). The effects of high protein intake on the development and progression of heart failure have not been reported.

In the present investigation we assessed the effects of a high protein diet on the development of cardiac hypertrophy, LV chamber remodeling, contractile dysfunction and survival in response to chronic aortic pressure overload induced by constriction of the thoracic aorta in rats. We hypothesized that high protein intake (30% of energy intake from protein) would accelerate LV hypertrophy and the development of heart failure, and decrease survival compared to a normal protein intake (18% of energy intake from protein). Further, the adverse effects of high protein intake in heart failure would manifest in a lower capacity for cardiac energy transfer, a hallmark of heart failure. This latter effect would result in impaired mitochondrial function, and increased susceptibility of mitochondria to undergo permeability transition, a catastrophic event associated with loss of ATP production and cell death. Studies were performed in a well characterized rat model of heart failure caused by constriction of the transverse aorta to generate in LV hypertrophy, LV chamber expansion, and mitochondrial and contractile dysfunction (18-20). We compared a standard diet with 18% of energy intake from protein to a high protein diet (30% of energy intake). Two series were performed: first we evaluated the effects of protein intake during the initial 14 weeks following aortic

constriction, and then in a subsequent study we assessed more advanced heart failure out to 22 weeks following constriction.

Methods

Experimental design. Experiments were conducted according to the Guideline for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH publication 85-23) and were approved by the University of Maryland School of Medicine Institutional Animal Care and Use Committee. Two experimental protocols were performed, and in both protocols the dietary treatment was initiated three days after surgery. In Protocol 1 the effects of protein intake (18% or 30% of energy intake as protein) on left ventricular mass, chamber size, contractile function, and mitochondrial physiology were assessed. Protocol 1 was a 2 by 2 design comparing sham or aortic constriction surgery and either a normal protein or high protein diet. Dietary treatment was initiated three days following sham or aortic constriction surgery to induced heart failure, and continued for 14 weeks. At the time of assignment to diet the group sizes were 15 and 20 for the sham and heart failure groups, respectively, for animals receiving 18% of energy intake as protein, and 14 and 20 for the sham and heart failure animals with 30% protein.

In Protocol 2 we assessed the effects of more prolonged dietary treatment (22 weeks) to allow for development of more advanced failure. Protocol 2 had a single sham group that was fed the 18% protein diet, and two groups with heart failure fed either 18% or 30% protein. At the time of assignment to diet the group sizes were 16 for the sham group, and 32 and 20 for heart failure animals fed 18% or 30% protein, respectively.

Transverse Aortic Constriction Surgery. Heart failure was induced by constricting the transverse aorta with a surgically implanted tantalum clip. Male Sprague-Dawley rats (6-7 weeks old, 70-90g, Harlan, Indianapolis, IN) were anesthetized with isoflurane (5%), intubated, and mechanically ventilated with 1.5-2.5% isoflurane in oxygen to effect. A partial median sternotomy was performed and the thymus was resected. After dissection of the aortic arch, a tantalum clip (0.50 mm internal diameter hemostasis clip) was placed on the aorta between

the brachiocephalic trunk and the left common carotid artery as previously described in detail(21). Age-matched Sham-operated animals underwent the same procedure without clip application.

Diets.The two diets were custom manufactured using purified ingredients (Research Diets, New Brunswick, NJ, USA), and they both contained 14% of energy from fat (lard and soybean oil), and were free of sugar (Table 1). The standard normal protein diet contained 18% of total energy from protein (casein + L-cystine) and 68% from carbohydrate as maltodextrin and corn starch. The high protein diet had 30% of total energy from protein and 56% from carbohydrate. Diets were matched for the content of vitamins, minerals and cellulose (Table 1).

Echocardiography.Left ventricular function was assessed by echocardiography with a high-resolution small animal imaging systems (VisualSonics Inc., Toronto, Canada). Animals were anesthetized (1.5% isoflurane by mask), the chest shaved, and images acquired with the rat in the supine position on a warming platform as previously described(22). In Protocol 1 we used a Vevo 770 system, with transducer model RMV 716, and in Protocol 2 we used a Vevo 2100 High-Resolution Imaging System with a MS250 transducer.

Tissue Harvest.After 14 weeks(Protocol 1) or 22 weeks (Protocol 2) of treatment, the animals were anaesthetized with 5.0% isoflurane between 3 and 6 h after initiation of the light phase while given free access to food. The thorax was opened and blood was collected from the left ventricle and immediately placed on ice, and centrifuged to obtain serum. The heart was removed, and sections of the left ventricle free wall were taken for biochemical analysis

and stored at -80°C , and the remainder was used for mitochondrial isolation as described below.

Mitochondrial Isolation. Cardiac mitochondria reside in two spatially distinct subpopulations: subsarcolemmal mitochondria (SSM) found in the outer region of the cell, and interfibrillar mitochondria (IFM) embedded between the myofibrils(23). Early studies found functional differences between IFM and SSM, with a greater maximal rate of respiration and resistance to stress-induced MPT in IFM than SSM(23-25) thus it is important to assess the two populations separately. SSM and IFM were isolated according to the method of Palmer et al(23) with minor modification(26). Briefly, the LV was rinsed in ice cold Chappel-Perry buffer (100mM KCl, 50mM MOPS, 5mM MgSO₄, 1mM ATP, 1mM EGTA, 2mg/ml BSA), blotted dry and then weighed. The ventricles were minced and homogenized in 1:10 (wt/vol) ice cold Chappel-Perry buffer. The homogenates were centrifuged at $700 \times g$ for 10 min. The supernatant containing SSM was extracted and centrifuged again at 10,000 g to isolate SSM. The remaining pellet from the 700-g spin was resuspended in KCl-MOPS-EGTA buffer containing 100 mM KCl, 50mM MOPS, and 0.5 mM EGTA at pH 7.4, and treated with trypsin (5 mg/g) for 10 min at 4°C . The samples were incubated with trypsin inhibitor and spun down at 700 g for 10 min. The IFM-containing supernatant was spun down at 10000 g for 10 min. The pellets were washed twice and spun down at 10000 g for 10 min and then resuspended in ice cold Chappel-Perry buffer. The concentration of mitochondrial protein was measured by the Lowry method using bovine serum albumin as standard.

Mitochondrial Respiration. Mitochondrial respiration was assessed in both IFM and SSM as described previously (26). Isolated mitochondria (0.20 mg/mL) were respired in respiration buffer containing 100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH₂PO₄, 1 mM EGTA and 1mg/mL BSA/Fraction V. States III and IV were measured with glutamate + malate (10 and 5 mM,

respectively), palmitoylcarnitine(40 μM) and succinate (20 mM) with rotenone (7.5 μM). Respiratory control ratio (RCR) was calculated as state 3/state 4, and the ADP/O ratio as the total oxygen used during state 3 divided by the amount of ADP added to the chamber.

Assessment of Mitochondrial Tolerance to Stress. The ability of SSM and IFM to tolerate either Ca^{2+} or oxidative stress was evaluated using established assays as previously described(27). In brief, mitochondria (500 μg) were resuspended in 2.0 ml assay medium containing 100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 5 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 5 mM glutamate, and 5 mM malate. Mitochondrial Ca^{2+} uptake was measured at 37°C from the fluorescence of the Ca^{2+} indicator calcium green-5N (CaGN-5N; Molecular Probes) with an excitation and emission of 488 and 530 nm. Ca^{2+} uptake was taken from the fall in extramitochondrial Ca^{2+} following a bolus injection of 3 μL of 15 mM Ca^{2+} (30 nmoles Ca^{2+} /mg mitochondrial protein). After stabilization (6 to 8 minutes) a continuous infusion of tert-butyl hydrogen peroxide (tBH: 400 mM) was initiated into the cuvette at a rate of 0.2 $\mu\text{L}/\text{min}$ (53 nmol tBH \cdot mg mitochondrial protein⁻¹ \cdot min⁻¹), and the concentration of free Ca^{2+} in the medium was monitored. Extra-mitochondrial Ca^{2+} concentration was also monitored without infusion of tBH or Ca^{2+} , which established that MPT did not occur without addition of tBH (data not shown).

Ca^{2+} -induced mitochondrial swelling, as inferred from the fall in absorbance of isolated mitochondria, was evaluated as previously described (28). Briefly, mitochondria were resuspended in buffer containing 100 mM KCl, 50 mM MOPS, 5 mM KH_2PO_4 , 5 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 5 mM glutamate, and 5 mM malate. Using a 96 well plate reader, 50 μg of mitochondrial protein was added to 200 μL of calcium free buffer and monitored at 540 nm for 2 minutes to obtain a baseline, then either 100 or 500 nmoles Ca^{2+} /mg mitochondrial protein was added and the absorbance monitored for 15 minutes.

Statistical analysis

Values are shown as mean \pm standard error of the mean (SEM). Treatment effects were evaluated using a 2-way ANOVA comparing surgery and diet for Protocol 1 and a 1-way ANOVA for protocol 2, with the Bonferroni's *post hoc* test to assess differences among groups. Survival between heart failure groups was compared using the Kaplan-Meier method. The assessment of mitochondrial Ca^{2+} -induced swelling and Ca^{2+} uptake and tBH-induced Ca^{2+} release were assessed with a 2-way ANOVA for repeated measures. A *P* value of less than 0.05 was considered significant.

Results

Protocol 1 - 14 weeks of Treatment

Neither diet or aortic banding significantly affected survival with the standard diet at 14 weeks, with 100% (15/15) and 79% (11/14) survival in sham rats fed the 18% and 30% protein diets, respectively, and 95% (19/20) and 85% (17/20) survival in the heart failure rats fed the 18% and 30% protein diets, respectively. Heart failure animals had a lower body mass than their respective sham when fed 30% proteins, but not with 18% protein. Liver mass and tibia length were similar among all groups (Table 2). The heart failure groups had cardiac hypertrophy, as seen in a significant increase in the mass of the atria and the left and right ventricles compared to sham animals, with no effect of diet (Table 2, Figure 1). Retroperitoneal and epididymal fat pad masses and kidney were lower in heart failure animals in both diet groups compared to sham animals (Table 2). The reduction in kidney mass suggests the possibility of renal dysfunction however assessment of serum creatinine concentration found no effect of diet or heart failure (Table 2).

Cardiac Function. The heart failure groups both had increased left ventricle end systolic and end diastolic volumes and decreased ejection fraction compared to sham groups, with no differences between 18% and 30% protein intake (Table 2, Figure 1).

Mitochondrial Enzymes and Function. The expected decrease in mitochondrial oxidative capacity was observed with the 18% protein diet, as seen in the decrease in a lower yield of both SSM and IFM from the myocardium, and significant reductions in the activities of the citric acid cycle enzymes citrate synthase and aconitase, and the fatty acid β -oxidation enzyme medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (Table 3). Increasing protein intake did not affect the heart failure-induced decline in mitochondrial oxidative capacity, as a similar

decline in these parameters was seen in with the heart protein diet. We also measured the activity of these enzymes in isolated mitochondria, and observed minimal effect, finding only lower activity of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase in the SSM subpopulation with the 18% protein diet (Table 3). The respiration of isolated SSM and IFM was generally not affected by heart failure or protein intake as assessed with a wide range of substrates, with the exception being a decrease in state 3 in the SSM subpopulation with palmitoylcarnitine as substrate in animals fed 30% protein (Table 3). Taken together, these findings suggests that 1) heart failure decreased myocardial oxidative capacity by decreasing the mass of mitochondria, with minimal effect on the function of mitochondria isolated from the myocardium, and 2) these parameters were only minimally effected by high protein intake.

Ca²⁺-induced Mitochondrial Swelling. The decrease in absorbance at 540 nm following the addition of Ca²⁺ to isolated mitochondria, an index of mitochondrial swelling, was used as a measure of MPT. Two different Ca²⁺ concentrations were used to assess mitochondrial tolerance to Ca²⁺, and both showed no difference among groups (Table 2).

Protocol 2 - 22 weeks of Treatment

At 22 weeks of treatment there was 100% survival of the sham rats fed the 18% protein diet (Figure 3). Comparison of the two heart failure groups revealed a significantly lower survival in the 30% protein group compared to the 18% protein heart failure groups (Figure 1). There were no significant differences body mass (Table 4). Compare to the sham group there was clear cardiac hypertrophy, as seen by a significant increase in atria, left and right ventricle masses, with no difference between the 18% and 30% protein diet groups (Table 4, Figure 4). Retroperitoneal and epididymal fat pad masses were lower in heart failure compared to the sham group, with no difference between the 18% and 30% protein

diets (Table 4). Kidney mass was lower in the heart failure groups compared to sham, with no effect of dietary protein intake, and serum creatinine was not different among groups, suggesting no gross impairment in renal function.

Cardiac Function. Heart failure decreased heart rate, increased left ventricle end systolic diameter, and decrease ejection fraction at 22 weeks post-surgery, with no effect of dietary protein intake (Table 4, Figure 4).

Mitochondrial enzymes and function

At 22 weeks, citrate synthase and medium-chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) activity were reduced in failing myocardium, with no effect of diet (Table 5). Aconitase activity was reduced in heart failure animals fed the 30% protein diet compared to the sham group, while the heart failure group on the 18% protein diet were not different from either sham or the 30% protein heart failure group (Table 5). Mitochondrial yield was significantly decreased in both heart failure groups in IFM, and trended lower in SSM, with no effect of protein intake. Mitochondrial oxidative capacity with lipid substrate, as reflected in state 3 respiration with palmitoylcarnitine, was significantly decrease by heart failure in both IFM and SSM, with no differences between the 18% and 30% protein diets. Further, there were no differences in state 4 respiration, which in IFM resulted in a significant decrease in the respiratory control ratio (RCR; state 3/state4) (Table 5).

Ca²⁺-induced Mitochondrial Swelling. At 22 weeks mitochondrial from heart failure animals displayed a greater decrease in absorbance than sham animals following addition of Ca²⁺, with no difference between 18% and 30% protein intake (Figure 5). This suggests that

heart failure induces a greater susceptibility to MPT, which is unaffected by a high protein diet.

Mitochondrial Ca²⁺ uptake and ROS-Induced MPT

ROS-induce MPT was assess by loading isolated mitochondria with Ca²⁺, and then inducing MPT by exposing the mitochondria to progressively high concentration of tBH and assessing the rise in extra-mitochondrial Ca²⁺ concentration(27). At 22 weeks, there was no difference in extra-mitochondrial calcium uptake or in tert-butyl-induced pore opening (Figure 6).

Discussion

High protein diets have been proposed for patients in the advanced stages of heart failure(7;8), or as a component of a weight loss diet in obese heart failure patients (29), but they have not been assessed in terms of their effects on the development of cardiac hypertrophy, LV dysfunction and the progression of heart failure. Current treatment guidelines for heart failure or hypertension provide no recommendations regarding protein intake (4;30), though it has been proposed that a high protein diet could either accelerate or prevent cardiac disease in an “at risk” population (14-17). Thus in the present investigation we assessed the effects of a high protein diet on the development of heart failure in response to aortic pressure overload, which is characterized by cardiac hypertrophy, impaired mitochondrial oxidative metabolism and contractile dysfunction. First, we found that a high protein diet had no effect on the development of cardiac hypertrophy, contractile dysfunction and ventricular dilation, and decreased cardiac mitochondrial oxidative capacity induced by 14 weeks of aortic constriction in rats. We then assessed more prolonged heart failure with 22 weeks of aortic constriction, and again observed no difference in cardiac enlargement, contractile dysfunction, or mitochondrial abnormalities between a normal and a high protein diet. On the other hand, we observed a significant decrease in survival with heart failure with the high protein diet. Thus we provide the first evidence that a high protein diet does not prevent or accelerate development of cardiac hypertrophy or LV chamber expansion in response to pressure overload, and may decrease survival.

We postulated that high protein intake could accelerate net protein synthesis in the myocardium under conditions of pressure overload, as is observed with skeletal muscle growth in humans subjected to resistance exercise training with dietary protein supplementation(9). In contrast, we observed no effect of high protein intake on myocardial mass in either normal sham operated rats or rats with aortic pressure overload. This lack of effect occurred despite

marked myocardial hypertrophy, as evidenced by increases of 1.5-fold, 2.0-fold and 3.6-fold in the masses of the LV, right ventricle and atria, respectively. Further, the high protein diet did not affect development of LV remodeling or contractile dysfunction in response to aortic pressure overload, as seen in a similar degree of enlargement of LV end systolic and diastolic volumes and fall in ejection fraction. Lastly, the deterioration in myocardial oxidative capacity and mitochondrial function was largely unaffected by protein intake. Taken together, a high protein diet did not appear to have any major effect on the development of pathological cardiac hypertrophy and heart failure in this model.

There was a modest but significant decline in survival with the 30% protein diet compared to 18% protein over 22 weeks of treatment. One should use caution in interpreting this result, and one would optimally perform this assessment with a greater sample size and more prolonged treatment to obtain near 100% mortality, as in our recent studies with other dietary interventions in heart failure (31-33). While we observed a significant decrease in survival, at the point the study was terminated the difference between the curves appeared to be narrowing. Thus, future studies should consider carrying out treatment until near complete mortality is achieved. Further, it may be preferable to assess mortality in a model that does not involve pressure overload, such as the rat infarct model (34) or cardiomyopathic hamsters (31-33).

There are several issues that arise from the present investigation that need to be addressed. First, we assessed the effects of dietary protein content on prevention of heart failure induced by pressure overload and cardiac hypertrophy, and thus the ability of a high protein diet to treat established or end stage heart failure was not assessed. Previous work by other groups focused on the potential benefits of a high protein diet in the advanced stages of heart failure, where increasing protein and/or total energy intake in cachectic heart failure patients may prevent or reverse cachexia (7;8). This important issue remains unresolved and

is clearly worthy of additional investigation. Second, we assessed relatively short term treatment in young rats. Clinical heart failure is largely a disease in the elderly, thus it is important to assess the impact of dietary protein in animals with advanced age. Lastly, as most human heart failure presents after years of hypertension that is frequently combined with coronary artery disease and comorbidities such as obesity and diabetes, consideration should be given to evaluating the long term effects of dietary protein in a heart failure model of with myocardial infarction in combination with more modest hypertension and/or diabetes.

In conclusion, consumption of a high protein diet did not affect cardiac mass, left ventricular volumes or ejection fraction, or myocardial mitochondrial oxidative capacity in rats with pressure overload induced heart failure. There was a modest but significant decrease in survival with heart failure with the high protein diet compared to normal protein intake.

Funding:

This work was supported by the National Institutes of Health, Grant numbers HL074237, HL101434 and HL072751.

Conflict of Interest: none

Reference List

- (1) Chess DJ, Stanley WC. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc Res* 2008 Jul 15;79(2):269-78.
- (2) Kalantar-Zadeh K, Anker SD, Horwich TB, Fonarow GC. Nutritional and anti-inflammatory interventions in chronic heart failure. *Am J Cardiol* 2008 Jun 2;101(11A):89E-103E.
- (3) Ershow AG, Costello RB. Dietary guidance in heart failure: a perspective on needs for prevention and management. *Heart Fail Rev* 2006 Mar;11(1):7-12.
- (4) Lindenfeld J, Albert NM, Boehmer JP, Collins SP, Ezekowitz JA, Givertz MM, et al. HFSA 2010 Comprehensive Heart Failure Practice Guideline. *J Card Fail* 2010 Jun;16(6):e1-194.
- (5) Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur Heart J* 2008 Oct;29(19):2388-442.
- (6) Anker SD, Negassa A, Coats AJ, Afzal R, Poole-Wilson PA, Cohn JN, et al. Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study. *Lancet* 2003 Mar 29;361(9363):1077-83.
- (7) Rozentryt P, von HS, Lainscak M, Nowak JU, Kalantar-Zadeh K, Polonski L, et al. The effects of a high-caloric protein-rich oral nutritional supplement in patients with chronic heart failure and cachexia on quality of life, body composition, and inflammation markers: a randomized, double-blind pilot study. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2010 Sep;1(1):35-42.
- (8) Aquilani R, Opasich C, Gualco A, Verri M, Testa A, Pasini E, et al. Adequate energy-protein intake is not enough to improve nutritional and metabolic status in muscle-depleted patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2008 Nov;10(11):1127-35.
- (9) Cermak NM, Gibala MJ, van Loon LJ. Nitrate supplementation's improvement of 10-km time-trial performance in trained cyclists. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 2012 Feb;22(1):64-71.
- (10) Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *JAMA* 1996 May 22;275(20):1557-62.
- (11) Mann DL, Bristow MR. Mechanisms and models in heart failure: the biomechanical model and beyond. *Circulation* 2005 May 31;111(21):2837-49.
- (12) Neubauer S. The failing heart--an engine out of fuel. *N Engl J Med* 2007 Mar 15;356(11):1140-51.

- (13) Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev* 2005 Jul;85(3):1093-129.
- (14) He J, Wofford MR, Reynolds K, Chen J, Chen CS, Myers L, et al. Effect of dietary protein supplementation on blood pressure: a randomized, controlled trial. *Circulation* 2011 Aug 2;124(5):589-95.
- (15) Lagiou P, Sandin S, Lof M, Trichopoulos D, Adami HO, Weiderpass E. Low carbohydrate-high protein diet and incidence of cardiovascular diseases in Swedish women: prospective cohort study. *BMJ* 2012;344:e4026.
- (16) Lagiou P, Sandin S, Weiderpass E, Lagiou A, Mucci L, Trichopoulos D, et al. Low carbohydrate-high protein diet and mortality in a cohort of Swedish women. *J Intern Med* 2007 Apr;261(4):366-74.
- (17) Preis SR, Stampfer MJ, Spiegelman D, Willett WC, Rimm EB. Dietary protein and risk of ischemic heart disease in middle-aged men. *Am J Clin Nutr* 2010 Nov;92(5):1265-72.
- (18) Bugger H, Schwarzer M, Chen D, Schrepper A, Amorim PA, Schoepe M, et al. Proteomic remodelling of mitochondrial oxidative pathways in pressure overload-induced heart failure. *Cardiovasc Res* 2010 Jan 15;85(2):376-84.
- (19) Doenst T, Pytel G, Schrepper A, Amorim P, Farber G, Shingu Y, et al. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovasc Res* 2010 Jun 1;86(3):461-70.
- (20) Garnier A, Fortin D, Delomenie C, Momken I, Veksler V, Ventura-Clapier R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J Physiol* 2003 Sep 1;551(Pt 2):491-501.
- (21) Zaha V, Grohmann J, Gobel H, Geibel A, Beyersdorf F, Doenst T. Experimental model for heart failure in rats--induction and diagnosis. *Thorac Cardiovasc Surg* 2003 Aug;51(4):211-5.
- (22) Duda MK, O'shea KM, Tintinu A, Xu W, Khairallah RJ, Barrows BR, et al. Fish oil, but not flaxseed oil, decreases inflammation and prevents pressure overload-induced cardiac dysfunction. *Cardiovasc Res* 2009 Feb 1;81(2):319-27.
- (23) Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Biochemical properties of subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria isolated from rat cardiac muscle. *J Biol Chem* 1977 Dec 10;252(23):8731-9.
- (24) Palmer JW, Tandler B, Hoppel CL. Heterogeneous response of subsarcolemmal heart mitochondria to calcium. *Am J Physiol* 1986 May;250(5 Pt 2):H741-H748.
- (25) Asemu G, O'Connell KA, Cox JW, Dabkowski ER, Xu W, Ribeiro RF, et al. Enhanced Resistance to Permeability Transition in Interfibrillar Cardiac Mitochondria in Dogs: Effects of Aging and Long Term Aldosterone Infusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012 Dec 15;304:H514-H528.

- (26) O'shea KM, Khairallah RJ, Sparagna GC, Xu W, Hecker PA, Robillard-Frayne I, et al. Dietary omega-3 fatty acids alter cardiac mitochondrial phospholipid composition and delay Ca²⁺-induced permeability transition. *J Mol Cell Cardiol* 2009 Dec;47(6):819-27.
- (27) Papanicolaou KN, Ngoh GA, Dabkowski ER, O'Connell KA, Ribeiro RF, Stanley WC, et al. Cardiomyocyte deletion of mitofusin-1 leads to mitochondrial fragmentation and improves tolerance to ROS-induced mitochondrial dysfunction and cell death. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012 Oct 28;302(1):H167-H179.
- (28) Khairallah RJ, Sparagna GC, Khanna N, O'shea KM, Hecker PA, Kristian T, et al. Dietary supplementation with docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, dramatically alters cardiac mitochondrial phospholipid fatty acid composition and prevents permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 2010 Aug;1797(8):1555-62.
- (29) Evangelista LS, Heber D, Li Z, Bowerman S, Hamilton MA, Fonarow GC. Reduced body weight and adiposity with a high-protein diet improves functional status, lipid profiles, glycemic control, and quality of life in patients with heart failure: a feasibility study. *J Cardiovasc Nurs* 2009 May;24(3):207-15.
- (30) Rosendorff C, Black HR, Cannon CP, Gersh BJ, Gore J, Izzo JL, Jr., et al. Treatment of hypertension in the prevention and management of ischemic heart disease: a scientific statement from the American Heart Association Council for High Blood Pressure Research and the Councils on Clinical Cardiology and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2007 May 29;115(21):2761-88.
- (31) Galvao TF, Brown BH, Hecker PA, O'Connell KA, O'shea KM, Sabbah HN, et al. High intake of saturated fat, but not polyunsaturated fat, improves survival in heart failure despite persistent mitochondrial defects. *Cardiovasc Res* 2012 Jan 1;93(1):24-32.
- (32) Hecker PA, Galvao TF, O'shea KM, Brown BH, Henderson R, Jr., Riggle H, et al. High-sugar intake does not exacerbate metabolic abnormalities or cardiac dysfunction in genetic cardiomyopathy. *Nutrition* 2012 May;28(5):520-6.
- (33) Galvao TF, Khairallah RJ, Dabkowski ER, Brown BH, Hecker PA, O'Connell KA, et al. Marine n3 Polyunsaturated Fatty Acids Enhance Resistance to Mitochondrial Permeability Transition in Heart Failure, but Do Not Improve Survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013 Jan 15;73(1):H12-H21.
- (34) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985 Aug;72(2):406-12.

Table 1. Composition of the diets.

<u>Ingredient (g per kg of diet)</u>	<u>Standard Diet (18% of energy from Protein)</u>	<u>High Protein Diet (30% of energy from Protein)</u>
Casein	174	291
L-Cystine	2.6	4.2
Corn Starch	538	429
Maltodextrin 10	121	121
Cellulose	48	48
Lard	51	51
Soybean Oil	10	10
Minerals and Vitamins	55	55

Table 2. Body and tissue masses, and echocardiographic data at 14 weeks in Protocol 1.

	18% Protein Diet		30% Protein Diet	
	Sham (n=15)	Heart Failure (n=19)	Sham (n=11)	Heart Failure (n=17)
Final body mass (g)	408 ± 8	390 ± 7	419 ± 9	375 ± 7*
Tibia Length (mm)	39.6±0.2	39.4±0.2	39.4±0.3	39.1±0.2
Atria mass (mg)	57 ± 5	213 ± 13*	60 ± 6	197 ± 18*
RV mass (mg)	198 ± 6	413 ± 11*	192 ± 6	402 ± 17*
LV mass (mg)	876 ± 18	1282 ± 33*	926 ± 24	1294 ± 44*
Retroperitoneal fat pad mass (g)	3.63 ± 0.31	2.15 ± 0.16*	3.88 ± 0.21	2.12 ± 0.11*
Epididymal fat pad mass (g)	4.48 ± 0.28	3.35 ± 0.16*	4.47 ± 0.25	2.97 ± 0.13*
Liver mass (g)	12.0 ± 0.2	12.7 ± 0.3	12.6 ± 0.4	12.1 ± 0.3
Kidney mass (g)	2.53 ± 0.06	1.94 ± 0.04*	2.68 ± 0.06	2.10 ± 0.05 *
Serum Creatinine(mg/dl)	1.40 ± 0.08	1.37 ± 0.10	1.30 ± 0.08	1.34 ± 0.06
Echocardiography:				
Heart rate (bpm)	359 ± 7	342 ± 5	349 ± 12	337 ± 5
End Diastolic volume (mL)	0.50 ± 0.03	0.64 ± 0.05*	0.45 ± 0.04	0.64 ± 0.06*
End Systolic volume (mL)	0.09 ± 0.010	0.22 ± 0.02*	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.03*

*p<0.05 compared to sham group within the same diet. There were no significant differences between the two diet groups.

Table 3. Mitochondrial enzyme activities, yield and respiratory function at 14 weeks in Protocol 1.

	18% Protein Diet		30% Protein Diet	
	Sham (n=14)	Heart Failure (n=17)	Sham (n=9)	Heart Failure (n=14)
Mitochondrial Enzyme Activities in Whole Tissue				
Citrate synthase activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{g wet}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	160.9 \pm 6.4	115.5 \pm 6.7*	144.2 \pm 7.4	94.2 \pm 8.7*
MCAD activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{g wet}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	12.6 \pm 0.4	9.3 \pm 0.6*	11.4 \pm 0.9	7.7 \pm 0.6*
Aconitase activity ($\text{mmol}\cdot\text{g wet}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	15.4 \pm 0.8	10.2 \pm 0.8*	15.9 \pm 0.6	10.9 \pm 1.3*
Subsarcolemmal mitochondria				
Yield (mg mitochondrial protein/g wet mass)	16.5 \pm 0.6	14.1 \pm 0.5*	16.4 \pm 0.4	14.3 \pm 0.3*
Citrate synthase activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	1.9 \pm 0.08	1.7 \pm 0.05	1.9 \pm 0.12	1.8 \pm 0.08
MCAD activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	0.15 \pm 0.010	0.12 \pm 0.010*	0.15 \pm 0.01	0.14 \pm 0.010
Aconitase activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	38.8 \pm 5.2	42.2 \pm 3.5	53.4 \pm 6.1	46.5 \pm 4.8
Respiration:				
Glutamate + malate: State 3	197.4 \pm 13	193.4 \pm 10.9	207.4 \pm 13.4	167.5 \pm 9.2
Glutamate + malate: State 4	29.9 \pm 1.7	31.2 \pm 2.1	28.9 \pm 2	28.6 \pm 1.5
Glutamate + malate: RCR	6.1 \pm 0.3	6.4 \pm 0.3	6.7 \pm 0.4	6.0 \pm 0.4
Glutamate + malate: ADP:O	2.2 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.1 \pm 0.1	2.3 \pm 0.06
Palmitoylcarnitine: State 3	198 \pm 12	172 \pm 8.9	197 \pm 9.1	152 \pm 11*
Palmitoylcarnitine: State 4	49.3 \pm 3.7	52.7 \pm 2.9	54.1 \pm 3.2	46.5 \pm 3.5
Palmitoylcarnitine: RCR	3.9 \pm 0.3	3.5 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2	3.4 \pm 0.1
Palmitoylcarnitine: ADP:O	2.1 \pm 0.1	2.2 \pm 0.0	2.2 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1
Rotenone + Succinate: State 3	289.7 \pm 15.4	267.3 \pm 14.6	289.3 \pm 17.4	299.3 \pm 0.5
Rotenone + Succinate: State 4	114.4 \pm 4	102.9 \pm 6.4	108 \pm 7.9	105 \pm 5
Rotenone + Succinate: RCR	2.50 \pm 0.08	2.64 \pm 0.11	2.69 \pm 0.09	2.65 \pm 0.08
Rotenone + Succinate: P:O	1.3 \pm 0.0	1.4 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1	1.3 \pm 0.1
Interfibrillar mitochondria				
Yield (mg mitochondrial protein/g wet mass)	13.0 \pm 0.7	10.4 \pm 0.4*	14.5 \pm 0.8	9.5 \pm 0.5*
Citrate synthase activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	2.6 \pm 0.1	2.7 \pm 0.2	2.7 \pm 0.1	2.4 \pm 0.1
MCAD activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	0.18 \pm 0.01	0.14 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	0.15 \pm 0.01
Aconitase activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	49.9 \pm 5.5	62.7 \pm 3.9	68.7 \pm 6.2	52.8 \pm 3.5
Respiration:				
Glutamate + malate: State 3	204.6 \pm 14	205 \pm 11	207.4 \pm 13.5	194 \pm 12.6
Glutamate + malate: State 4	35.9 \pm 3.1	43.2 \pm 2.4	37.6 \pm 2.1	40.1 \pm 2.7
Glutamate + malate: RCR	5.9 \pm 0.3	4.88 \pm 0.3	5.6 \pm 0.4	4.99 \pm 0.3
Glutamate + malate: ADP:O	2.7 \pm 0.2	2.5 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1	2.6 \pm 0.1
Palmitoylcarnitine: State 3	240.6 \pm 5.4	231.1 \pm 8.8	250.4 \pm 20.4	194.5 \pm 17.1
Palmitoylcarnitine: State 4	70.8 \pm 6.3	78.7 \pm 4.3	71.3 \pm 6.6	68 \pm 7.4
Palmitoylcarnitine: RCR	3.4 \pm 0.3	3 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1	3 \pm 0.2

Palmitoylcarnitine: ADP:O	2.2 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.1	2.4 ± 0.1
Rotenone + Succinate: State 3	393.8±14.5	425.5 ± 19	415.5 ± 21.2	410 ± 17
Rotenone + Succinate: State 4	152.8 ± 5	154.4 ± 6.4	159.3 ± 11.9	155.2 ± 7.4
Rotenone + Succinate: RCR	2.6 ± 0.07	2.76 ± 0.08	2.74 ± 0.13	2.65 ± 0.06
Rotenone + Succinate: ADP:O	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.0	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1

*p<0.05 compared to sham group within the same diet. There were no significant differences between the two diet groups

Table 4. Body and tissue masses, and left ventricular volumes and function in Protocol 2 taken at 22 weeks following surgery.

	<u>18% Protein Diet</u>		<u>30% Protein Diet</u>
	<u>Sham</u> (n=16)	<u>Heart Failure</u> (n=24)	<u>Heart Failure</u> (n=13)
Final body mass (g)	450 ± 10	424 ± 11	423 ± 9
Atria mass (mg)	81.9 ± 4.3	294 ± 17*	256 ± 23.4*
RV mass (mg)	210 ± 6.3	396 ± 22.1*	424 ± 27*
LV mass (mg)	984 ± 22	1411 ± 46*	1477 ± 52*
Retroperitoneal fat pad mass (g)	5.08 ± 0.26	3.41 ± 0.32*	2.81 ± 0.34*
Epididymal fat pad mass (g)	5.44 ± 0.39	4.30 ± 0.22*	3.88 ± 0.30*
Liver mass (g)	12.63 ± 0.30	12.72 ± 0.48	13.32 ± 0.38
Kidney mass (g)	2.74 ± 0.05	2.16 ± 0.07*	2.33 ± 0.06*
Serum Creatinine (mg/dL)	1.76±0.20	1.24±0.10	1.21±0.20
Echocardiography:			
Heart rate (bpm)	366 ± 5	330 ± 6*	327 ± 7*
End Diastolic volume (mL)	0.29 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.44 ± 0.06
End Systolic volume (mL)	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.02*	0.18 ± 0.03*

* p<0.05 compared to the sham group. There were no significant differences between the two heart failure groups.

Table 5. Mitochondrial enzyme activities, yield and respiratory function at 22 weeks following surgery in Protocol 2.

Mitochondrial Function	18% Protein Diet		30% Protein Diet
	Sham (n=16)	Heart Failure (n=21)	Heart Failure (n=13)
Mitochondrial Enzyme Activities in Whole Tissue			
Citrate synthase activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{g wet}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	132.2 \pm 8.3	95.9 \pm 7.3*	91.5 \pm 6.7*
MCAD activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{g wet}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	13.1 \pm 0.8	8.9 \pm 0.7*	8.4 \pm 0.5*
Aconitase activity ($\text{mmols}\cdot\text{g wet}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	13.3 \pm 1.3	10.6 \pm 0.8	8.7 \pm 0.6*
Subsarcolemmal Mitochondria			
Yield (mg mitochondrial protein/g wet mass)	16.3 \pm 0.9	13.3 \pm 1	14.5 \pm 0.6
Citrate synthase activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	2.4 \pm 0.2	2.2 \pm 0.1	2.4 \pm 0.2
MCAD activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	0.18 \pm 0.02	0.17 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02
Aconitase activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	50.1 \pm 3.7	52.2 \pm 4	59.6 \pm 4.19
Respiration:			
Glutamate + malate: State 3	207.1 \pm 9.7	214.3 \pm 11.4	180 \pm 12.1
Glutamate + malate: State 4	34.2 \pm 2.3	36 \pm 2.4	29.3 \pm 2.3
Glutamate + malate: RCR	6.3 \pm 0.4	6.2 \pm 0.3	6.3 \pm 0.4
Glutamate + malate: ADP:O	2.03 \pm 0.08	1.89 \pm 0.07	2.15 \pm 0.06
Palmitoylcarnitine: State 3	247.2 \pm 13.8	207.9 \pm 10.2*	199.6 \pm 11.4*
Palmitoylcarnitine: State 4	56.4 \pm 2.7	57.4 \pm 2.1	57 \pm 4.8
Palmitoylcarnitine: RCR	4.4 \pm 0.2	3.6 \pm 0.1	3.6 \pm 0.2
Palmitoylcarnitine: ADP:O	2.23 \pm 0.07	2.29 \pm 0.08	2.34 \pm 0.09
Rotenone + Succinate: State 3	368 \pm 18.3	355 \pm 17	332 \pm 19.5
Rotenone + Succinate: State 4	133 \pm 5.6	124 \pm 7	123 \pm 9.6
Rotenone + Succinate: RCR	2.7 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1	2.8 \pm 0.2
Rotenone + Succinate: P:O	1.37 \pm 0.08	1.45 \pm 0.06	1.40 \pm 0.07
Interfibrillar Mitochondria			
Yield (mg mitochondrial protein/g wet mass)	13.5 \pm 0.5	8.5 \pm 0.3*	8.4 \pm 0.9*
Citrate synthase activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	2.7 \pm 0.2	2.5 \pm 0.1	2.5 \pm 0.1
MCAD activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	0.25 \pm 0.02	0.19 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02
Aconitase activity ($\mu\text{mols}\cdot\text{mg prot.}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	47.2 \pm 3.6	50.8 \pm 4.5	53 \pm 3.4
Respiration:			
Glutamate + malate: State 3	242.5 \pm 11	234 \pm 9.1	214.5 \pm 16.6
Glutamate + malate: State 4	38.1 \pm 3.2	42.1 \pm 2.6	38.7 \pm 3.9
Glutamate + malate: RCR	6.8 \pm 0.5	5.8 \pm 0.2	5.9 \pm 0.5
Glutamate + malate: ADP:O	2.35 \pm 0.12	2.19 \pm 0.09	2.36 \pm 0.12
PalmitoylCarnitine: State 3	339.3 \pm 23.8	243.7 \pm 15.2*	213.1 \pm 7.5*
PalmitoylCarnitine: State 4	70.4 \pm 4.8	68.1 \pm 3.6	63.4 \pm 4.7

PalmitoylCarnitine: RCR	5.0 ± 0.4	3.6 ± 0.2*	3.5 ± 0.2*
PalmitoylCarnitine: ADP:O	2.39 ± 0.1	2.36 ± 0.08	2.38 ± 0.11
Rotenone + Succinate: State 3	498 ± 21.5	493 ± 21	444.5 ± 30.8
Rotenone + Succinate: State 4	176 ± 6.7	182 ± 9	166 ± 15
Rotenone + Succinate: RCR	2.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.2
Rotenone + Succinate: ADP:O	1.42 ± 0.07	1.28 ± 0.05	1.41 ± 0.07

* p<0.05 compared to the sham group. There were no significant differences between the two heart failure groups.

Figure Legends

Figure 1. Left ventricle and atria masses, and LV ejection fraction (LVEF) after 14 weeks of treatment in Protocol 1. *P < 0.05 compared with respective sham. The group sizes were 15 and 19 for sham and heart failure, respectively, with 18% protein, and 11 and 16 for sham and heart failure, respectively, with 30% protein.

Figure 2. Effect of diet on Ca²⁺ induced swelling of isolated mitochondria as assessed from the change in absorbance at 540nm, after 14 weeks of treatment in Protocol 1. There were no significant differences among groups. The group sizes were 15 and 19 for sham and heart failure, respectively, with the 18% protein diet, and 11 and 16 for sham and heart failure, respectively, with 30% protein.

Figure 3. Survival plotted as a function of duration of dietary treatment for Protocol 2. Rats initiated dietary treatment 3 days after surgery. The initial group sizes were 16 for the sham group, and 32 and 15 heart failure groups with 18% and 30% protein, respectively.

Figure 4. Left ventricle and atria mass, and LV ejection fraction (LVEF) after 22 weeks of treatment in Protocol 2. *P < 0.05 compared to sham. There were no significant differences between the two heart failure groups. The group sizes were 16 for the sham group, and 24 and 13 heart failure groups with 18% and 30% protein, respectively.

Figure 5. Effect of diet on mitochondrial Ca²⁺ induced swelling, as assessed from the relative change in absorbance at 540nm, after 22 weeks of treatment in Protocol 2. * denotes p<0.05 for heart failure with 18% protein compared to sham, and # p<0.05 for heart failure with 30% protein compared to sham. The group sizes were 16 for the sham group, and 21 and 13 heart failure groups with 18% and 30% protein, respectively.

Figure 6. Left Panels: Extramitochondrial Ca^{2+} concentration following an injection of 30 nmols Ca^{2+} /mg mitochondrial protein at time = 0. **Right Panels:** Response of extramitochondrial Ca^{2+} concentration to a progressive rise in tert-butyl hydrogen peroxide (tBH), and index of ROS-induced MPT. Data are from Protocol 2 after 22 weeks of treatment. * denotes $p < 0.05$ for heart failure with 18% protein compared to sham, # $p < 0.05$ for heart failure with 30% protein compared to sham, † $p < 0.05$ for the heart failure with 30% protein vs. both sham and 18% protein. The group sizes were 16 for the sham group, and 21 and 13 heart failure groups with 18% and 30% protein, respectively.

Figure 1

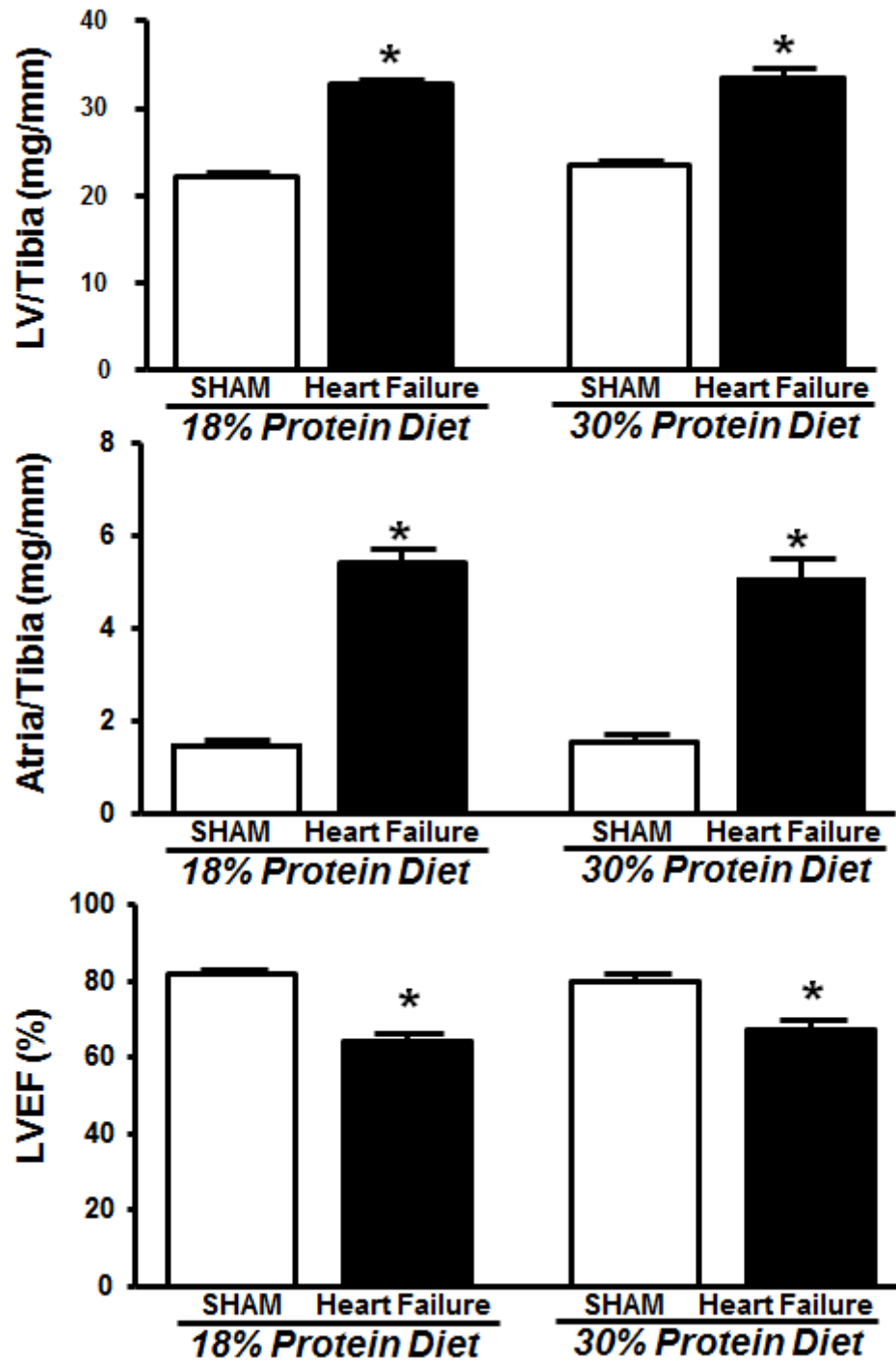


Figure 2.

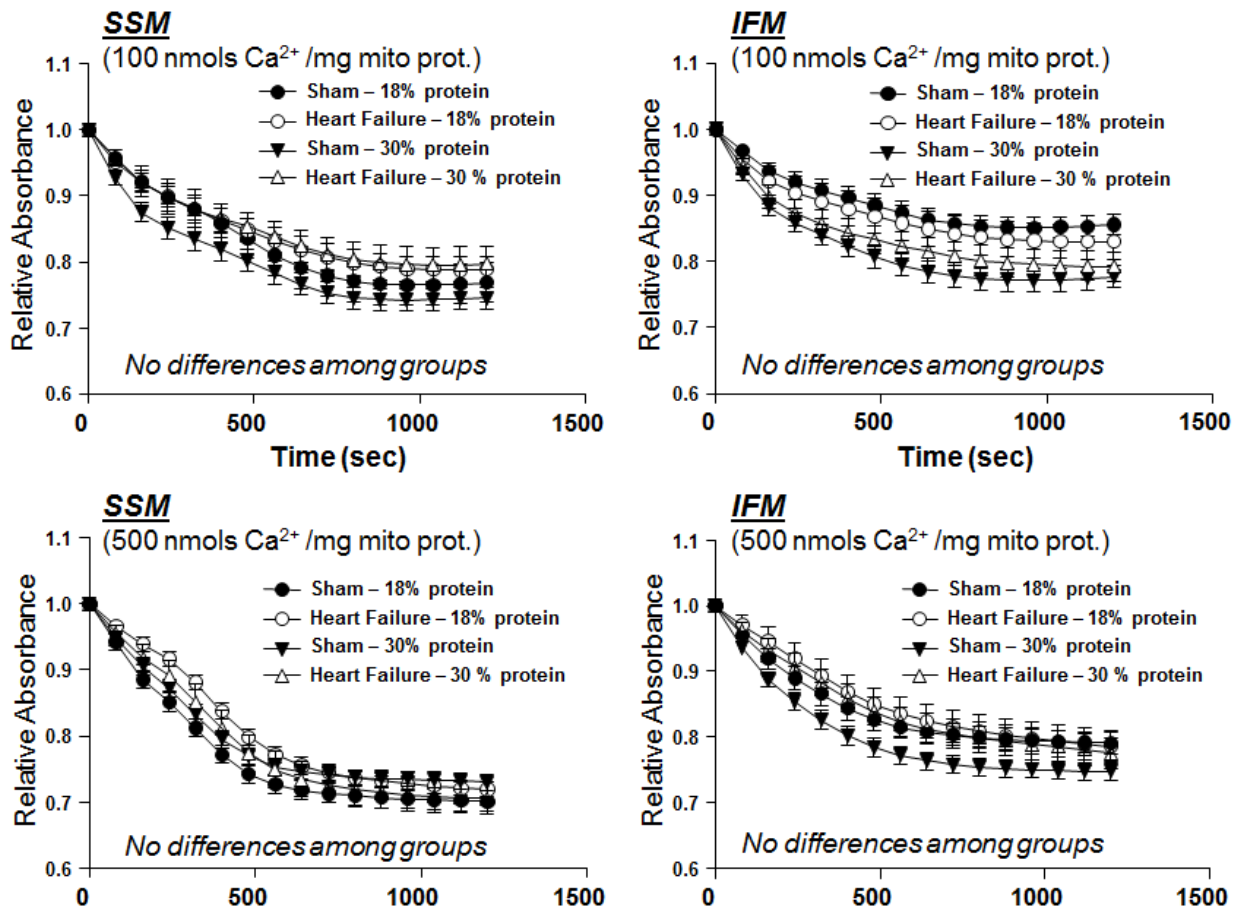


Figure 3

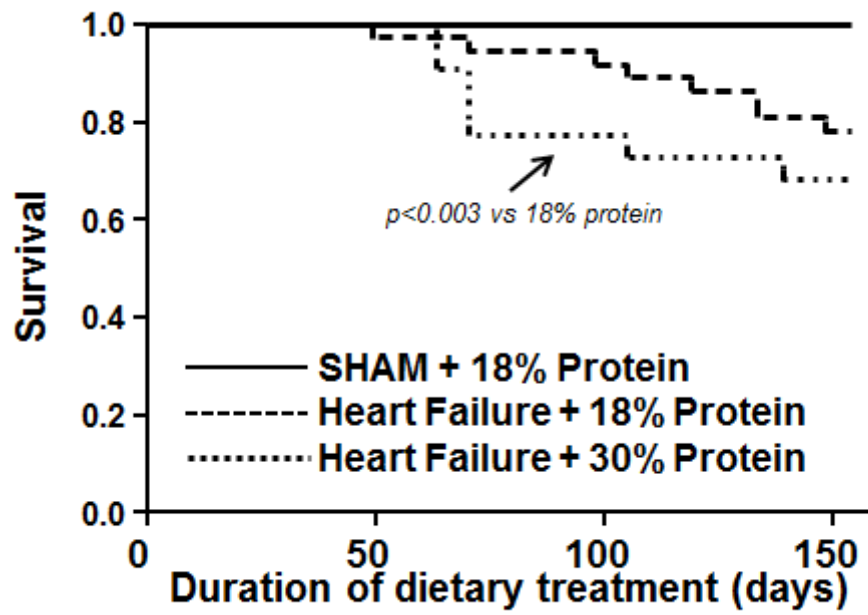


Figure 4

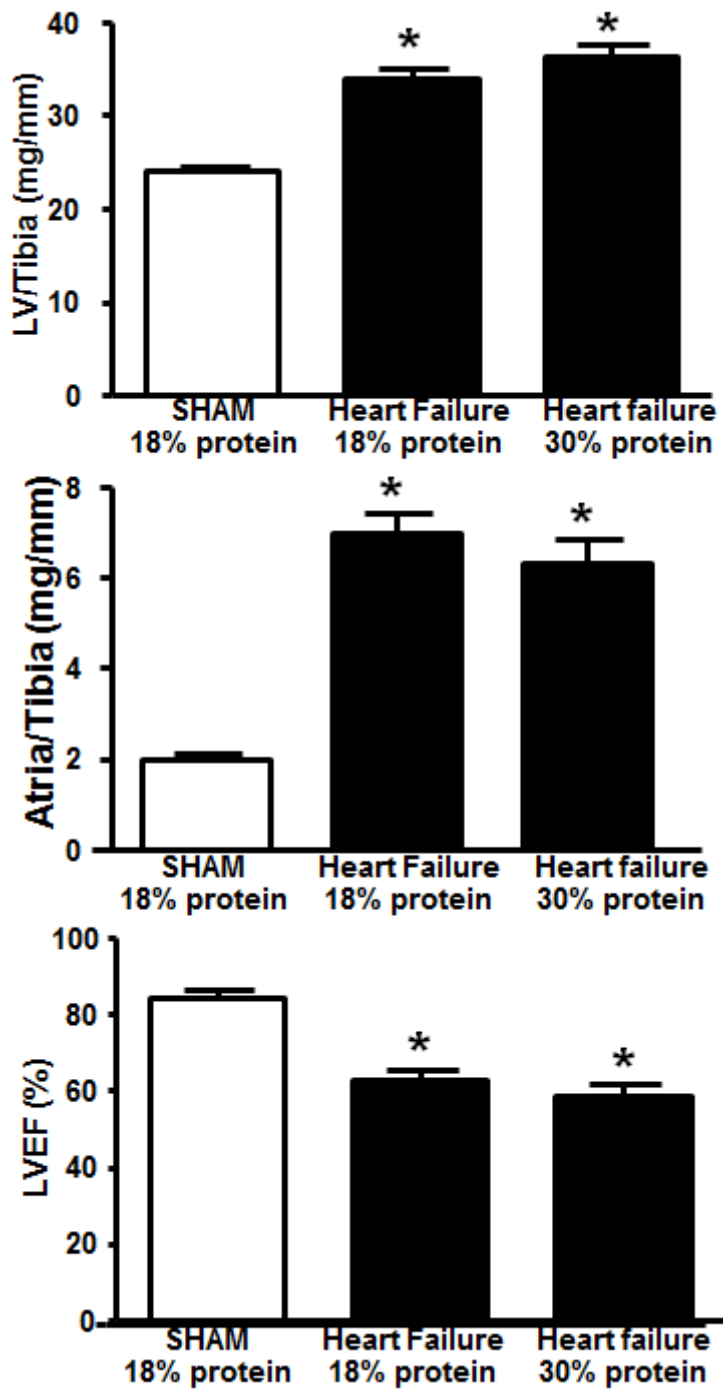


Figure 5

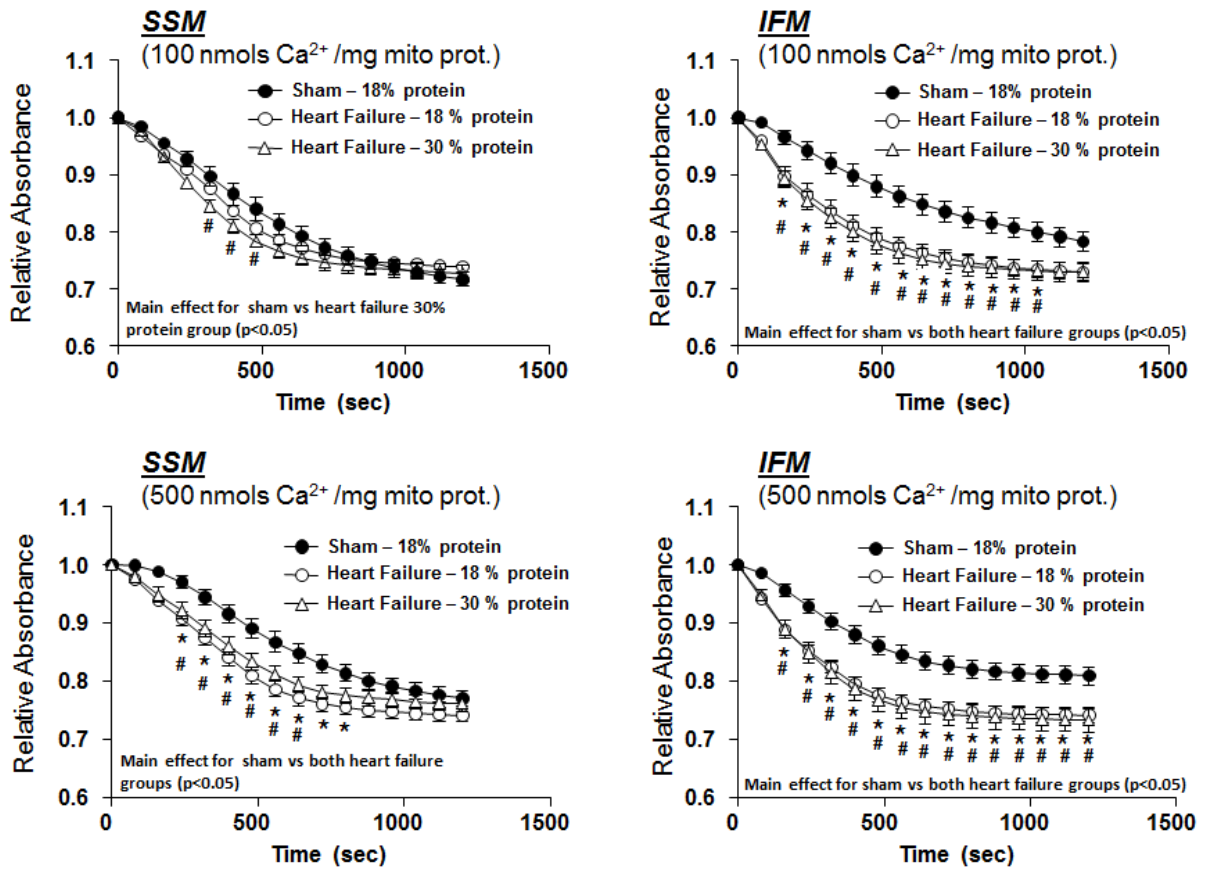


Figure 6

