

**A insuficiência cardíaca estabelecida em ratos Wistar adultos  
desnutridos está associada a dessensibilização adrenérgica:  
estudo do efeito do propranolol.**

**LUIZA VILLARINHO PEREIRA MENDES**

**Orientadoras:**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Lucienne da Silva Lara Morcillo**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Valéria do Monti Nascimento Cunha**

**Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do grau de doutor em ciências biológicas  
(Farmacologia).**

**RIO DE JANEIRO**

**MARÇO / 2015**

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e  
Química Medicinal

**A insuficiência cardíaca estabelecida em ratos Wistar adultos  
desnutridos está associada a dessensibilização adrenérgica:  
estudo do efeito do propranolol.**

**Luiza Villarinho Pereira Mendes**

Trabalho realizado no Laboratório de Farmacologia Bioquímica de Órgãos e  
Sistemas do Programa de Farmacologia Celular e Molecular do Instituto de Ciências  
Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação das Prof<sup>as</sup>  
Lucienne da Silva Lara Morcillo e Valéria do Monti Nascimento Cunha

Rio de Janeiro

Março/ 2015

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando a obtenção do grau de doutor em ciências biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:

---

Prof. Dr. Emiliano Horácio Medeiros, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

---

Prof. Dr. Leucio Duarte Vieira Filho, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco.

---

Prof. Dr. Newton Gonçalves de Castro, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Revisora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Cláudia Lúcia Martins Silva, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Suplente Interna: Prof. Dr<sup>a</sup>. Josiane Sabbadini Neves, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Suplente Externo: Prof. Dr. Wagner Seixas da Silva, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Rio de Janeiro

Março/ 2015

## Ficha Catalográfica

Mendes, LVP.

A INSUFICIÊNCIA CARDÍACA ESTABELECIDADA EM RATOS WISTAR ADULTOS DESNUTRIDOS ESTÁ ASSOCIADA A DESSENSIBILIZAÇÃO ADRENÉRGICA: ESTUDO DO EFEITO DO PROPRANOLOL./ Luiza Villarinho Pereira Mendes. Rio de Janeiro: UFRJ, ICB – PPGFQM, 2015.

xv, 107.

Orientador: Lucienne da Silva Lara Morcillo

Co-orientador: Valéria do Monti Nascimento Cunha

Tese de doutorado – UFRJ, ICB – PPGFQM, 2015.

Referências Bibliográficas: f. 86-107

1. Desnutrição. 2. Insuficiência Cardíaca. 3. Sinalização  $\beta$  adrenérgica. 4. Propranolol 5.  $Ca^{2+}$ -ATPases. i. Lara, Lucienne da Silva. ii. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. iii. Título.

Ao meu marido Sandro e meu filho Pedro por todo amor e paciência que recebi durante a confecção deste trabalho.

Aos meus pais, José Luiz e Mariza pelo apoio em todos os momentos de minha vida.

## **Agradecimentos**

À Deus, por trilhar meus caminhos.

Aos meus irmãos Luiz e Laiza pelo incentivo e companheirismo.

Às minha avós Marly e Conceição pelo amor que dedicaram a mim durante toda minha vida.

Às minha tias Sylvia e Shirley pelo apoio e por serem tão presentes em todas as etapas de minha vida.

Aos meus primos José Ricardo e João Pedro por trazerem alegria aos nossos dias.

À minha sogra Solange, aos meus pais José Luiz e Mariza e meu marido Sandro pela ajuda com meu filho Pedrinho.

Às professoras Lucienne e Valéria pela orientação, incentivo, amizade e por acreditarem em mim fazendo com que chegasse até aqui.

Aos amigos de laboratório: Alessandro, Sabrina e Humberto pelo agradável ambiente de trabalho e por me ajudarem no desenvolvimento desta tese.

Ao amigo Leonardo Maciel do Laboratório de Fisiologia cardíaca (IBCCF) pela colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Físico-Química Biológica (Biofísica) pela colaboração e amizade.

Ao professor Adalberto Vieyra, pelo incentivo durante a realização desta tese.

Aos professores Emiliano, Leucio, Newton, Wagner e Josiane por aceitarem ser membros da banca examinadora.

A professora Claudia Lúcia Martins por aceitar ser a revisora desta tese

Ao coordenador de pós-graduação professor Carlos Manssur.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal e Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPERJ pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

## Abreviaturas

Ang II	– Angiotensina II
ATP	– Adenosina trifosfato
ATPNa <sub>2</sub>	– Adenosina trifosfato sódica
β AR	– Receptor Beta adrenergico
CaM	– Calmodulina
CEUA	– Comissão de Etica com Uso de Animais
CE <sub>50</sub>	– Concentração do agonista necessária para obter 50% do efeito máximo
cTnl	– Troponina I
cMyBP-C	– Proteína c de ligação a miosina
CTRL	– Grupo controle
CTRLc	– Grupo controle tratado com propranolol
DBR	– Dieta Básica Regional
DBR-CR	– Grupo de desnutrição crônica
DBR-CRc	– Grupo de desnutrição crônica tratado com propranolol
DBR-IU	– Grupo de desnutrição intrauterina
DBR-IUc	– Grupo de desnutrição intrauterina tratado com propranolol
DC	– Débito Cardíaco
DTT	– Ditiotreitól
dP/dt	– Derivada da pressão em função do tempo
EDTA	– Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	– Ácido etileno glicol-bis-(β-amino-etil éter)N,N,N,N tetracético

$E_{\max}$	– Efeito máximo alcançado
EPM	– Erro padrão da média
FAO	– Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
HEPES	– Ácido(N[2-hidroxietilpiperazino-N-[2-etanosulfônico)
IBGE	– Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	– Insuficiência Cardíaca
IgG	– Imunoglobulina G
IP <sub>3</sub> R	– Receptor de inositol (1,4,5) trifosfato
ISO	– Isoproterenol
MDA	– Malondialdeído
ONU	– Organização das Nações Unidas
PDFVE	– Pressão Diastólica Final no Ventrículo Esquerdo
PDVE	– Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo
PKA	– Proteína cinase A
PKC	– Proteína cinase C
PLC	– Fosfolipase C
PMCA	– Ca <sup>2+</sup> ATPase de membrana plasmática
PMSF	– Fenilmetilsulfonil fluoreto
PS	– Pressão Sistólica
RE/RS	– Retículo endo(sarco)plasmático
RNAm	– Ácido Ribonucléico
ROS	– Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	– Rotação por minuto



- RyR – Receptor sensível a rianodina
- SERCA –  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco(endo)plasmático
- TBS-T – Solução Tris-salina com tween 20
- TBARs – Espécies reativas ao Ácido tiobarbitúrico
- Tg – Tapsigargina
- TTC – Cloreto de TrifenilTetrazólio

## Resumo

**A insuficiência cardíaca estabelecida em ratos Wistar adultos desnutridos está associada a dessensibilização adrenérgica: estudo do efeito do propranolol.** LuizaVillarinho Pereira Mendes. Orientadoras: Dr<sup>a</sup>. Lucienne da Silva Lara Morcillo e Dr<sup>a</sup>. Valéria do Monti Nascimento Cunha.

Resumo da tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em ciências.

Apesar de ser bem aceita a hipótese da programação fetal, pouco se sabe sobre como a desnutrição afeta os mecanismos moleculares adrenérgicos e dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  que regulam a função cardíaca. O objetivo desta tese foi avaliar o impacto da desnutrição promovida pela dieta básica regional em dois períodos de desenvolvimento – intrauterino (DBR-IU) e crônico (DBR-CR) – sobre a função cardíaca no rato Wistar adulto, correlacionando com alterações celulares que envolvem a manipulação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e a via de sinalização  $\beta$  adrenérgica. O tratamento com o  $\beta$  bloqueador propranolol foi avaliado através da análise dos parâmetros funcionais cardíacos. No grupo DBR-CR, observou-se atrofia muscular associada a infiltrado de células adiposas e colágeno, aumento de áreas isquêmicas e redução em 40% dos parâmetros basais: PDVE,  $+\text{dP}/\text{dt}$  e  $-\text{dP}/\text{dt}$ . A análise da curva de Frank-Starling demonstrou o deslocamento para a esquerda e diminuição em 30% da complacência ventricular. Isto associado a indícios de edema cardíaco e pulmonar indica a instauração de insuficiência cardíaca esquerda. A DBR-CR promoveu: (1) a diminuição da responsividade sistólica ao agonista  $\beta$  adrenérgico, isoproterenol (ISO), (2) a dessensibilização da via de sinalização mediada pela proteína cinase A (PKA) apesar do aumento do conteúdo do receptor  $\beta$ , (3) a sobrecarga da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática (PMCA) na remoção do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, associado ao aumento da atividade da proteína cinase C (PKC) e (4) o aumento do dano oxidativo lipídico e protéico. Na DBR-IU foi observada a perda da relação de Frank-Starling e aumento de 30% da complacência ventricular. Não foram observadas alterações na morfologia dos ventrículos e das funções basais do órgão. Apesar da similaridade da resposta ao ISO e dessensibilização da via, ao contrário da desnutrição crônica, observamos a baixa atividade de PKC e PKA que reflete na diminuição da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total, sendo o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  como principal mecanismo extrusor de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio intracelular. A diferença de ativação dos mecanismos moleculares ocorridos nas distintas janelas do desenvolvimento afetam a resposta do tratamento com propranolol. A insuficiência cardíaca na desnutrição intrauterina é resistente ao tratamento, enquanto na desnutrição crônica observa-se reversão dos mecanismos moleculares apesar da manutenção da perda dos mecanismos de Frank-Starling. **Palavras-chaves:** desnutrição, insuficiência cardíaca, sinalização  $\beta$  adrenérgica, propranolol,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases.

Rio de Janeiro

Março de 2015

## Abstract

**Heart failure established in malnourished adult Wistar rats is associated with adrenergic desensitization: study of the effect of propranolol.** LuizaVillarinho Pereira Mendes. Supervisor: Dr<sup>a</sup>. Lucienne da Silva Lara Morcillo e Dr<sup>a</sup>.Valéria do MontiNascimento Cunha.

Abstract da tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em ciências.

Although it has been accepted the programming fetal hypothesis, little is known about how undernutrition affects the adrenergic signaling and  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent mechanism that regulates cardiac function. The objective of this thesis was to evaluate the impact of undernutrition imposed by the basic regional diet – intrauterine (RBD-IU) and chronic (RBD-CR) – on the cardiac function in the adult Wistar rat, correlating with alterations in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  handling and in the  $\beta$  adrenergic signaling. The treatment with the  $\beta$  blocker propranolol was also evaluated. In the RBD-CR, it was observed muscular atrophy associated to adipocytes infiltration and collagen, increase of ischemic areas and a 40% reduction of the basal parameters: PDVE, + dP/dt –dP/dt. The Frank-Starling curve demonstrated a shift to the left and a decrease in 30% of ventricular complacence. These findings associated to a cardiac and pulmonary edema indicated the establishment of left heart failure. RBD-CR promoted: (1) a decrease in the systolic response to the  $\beta$  agonist isoproterenol (ISO), (2) down regulation of the protein kinase A (PKA) -mediated signaling pathway, besides the increase in the  $\beta$  adrenergic receptor, (3) over activity of plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) in  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion, due to increase in protein kinase C (PKC) activity and (4) an increase in lipid and protein oxidative stress. In the RBD-IU, it was not observed the Frank-Starling relationship and the increase in the complacence (30%). It was not observed alterations in morphology and basal function of the heart. Although similarities in the response to ISO and down regulation of the pathway, contrary to chronic undernutrition, we observed low PKA and PKC leading to decreased total  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity, being the  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange the principal mechanism of  $\text{Ca}^{2+}$  extrusion. Differences in molecular mechanisms occurring in distinct windows of the development affect the response to the treatment to propranolol. The cardiac failure in the intrauterine undernutrition is resistant to the treatment, while chronic undernutrition returns the molecular mechanism, but the Frank-Starling relation shift still persists. **Key Words:** malnutrition, heart failure,  $\beta$  adrenergic signaling, propranolol,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases.

Rio de Janeiro

March, 2015

## Índice

Abreviaturas .....	VII
Resumo .....	X
Abstract .....	XI
Introdução.....	1
1.1. O panorama da desnutrição: onde o Brasil se enquadra atualmente no cenário mundial?.....	1
1.2. As marcas deixadas pela desnutrição.....	4
1.3. Os 25 anos da Dieta Básica Regional: o que aprendemos com ela? ....	9
1.4. O coração .....	12
1.4.1. Avaliação do desempenho cardíaco .....	12
1.4.2. A inervação do coração .....	14
1.4.3. Mecanismos moleculares envolvidos na insuficiência cardíaca..	18
1.4.3.a. Homeostasia intracelular de $Ca^{2+}$ no coração insuficiente .....	18
1.4.3.b. Correlação entre proteínas cinases e insuficiência cardíaca.....	22
1.4.3.c. Espécies reativas de oxigênio como alvo de proteínas cinases na lesão cardíaca.....	27
1.5. O coração como órgão alvo da desnutrição .....	31

1.6. Resultados preliminares que geraram a hipótese desta tese .....	32
2. OBJETIVOS.....	34
2.1. Objetivos Específicos .....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	35
3.1. Animais e tratamento com propranolol.....	35
3.2. Dieta .....	36
3.3. Avaliação do conteúdo de água retida nos órgãos .....	37
3.4. Análise Histológica .....	38
3.5. Ensaio ex vivo .....	39
3.6. Observação da área isquêmica cardíaca .....	40
3.7. Obtenção da preparação de ultracentrifugado total ventricular.....	41
3.9. Medida das atividades $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total, $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de retículo endo(sarco) plasmático (SERCA) e $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica de membrana plasmática (PMCA) .....	42
3.10. Atividade das proteínas cinases C e A (PKC e PKA) .....	42
3.11 Fosforilação regulatória da PMCA .....	43
3.12. Eletroforese e imunodeteção .....	44

3.13. Quantificação do estresse oxidativo .....	45
3.13.1. Medida dos níveis de TBARs.....	45
3.13.2. Dosagem de sulfidrilas livres.....	45
3.14. Análise estatística .....	46
3.15. Reagentes .....	46
4. RESULTADOS.....	47
4.1. Avaliação do impacto da desnutrição sobre os parâmetros morfométricos do coração e dos principais órgãos afetados pela falência cardíaca e o efeito do tratamento com propranolol .....	45
4.2. Identificação de áreas isquêmicas no coração dos ratos submetidos à desnutrição crônica.....	50
4.3. Avaliação da função cardíaca sistólica e diastólica dos ratos jovens submetidos à desnutrição.....	51
4.4. Delineamento da relação pressão vs volume, através das curvas de Frank-Starling dos ratos jovens submetidos à desnutrição comparando com os ratos controles.....	58
4.5. Identificação de processos de estresse oxidativo lipídico e protéico no coração dos ratos submetidos à desnutrição.....	62

4.6. Determinação de alterações na sinalização  $\beta$  adrenérgica impactadas pela desnutrição e reversão com tratamento em longo prazo com o propranolol.....63

4.7. Determinação de recuperação por propranolol da homeostasia intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  e da via de sinalização associada durante o processo de desnutrição.67

5. DISCUSSÃO .....75

5.1. Impacto da desnutrição crônica na função cardíaca do rato adulto: o estudo das respostas adaptativas e a sensibilidade ao tratamento com propranolol.....76

5.2. Impacto da desnutrição intrauterina na função cardíaca do rato adulto: a hipótese da programação e a sensibilidade ao tratamento com propranolol .....82

6. CONCLUSÃO .....85

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....86

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. O panorama da desnutrição: onde o Brasil se enquadra atualmente no cenário mundial?**

Fome e desnutrição – ainda que estejam inter-relacionadas, configurando um único e grande problema, constituem diferentes categorias conceituais que se configuram em condições sócio-econômicas diferentes. Por definição, a fome ocorre quando a alimentação diária, habitual, não propicia ao indivíduo energia suficiente para a manutenção do seu organismo e para o desempenho de suas atividades cotidianas (MONTEIRO, 2003). Já a desnutrição pode ser definida como uma condição clínico-social decorrente de uma deficiência ou excesso de um ou mais nutrientes essenciais (MALINA et al., 2004).

A desnutrição pode apresentar caráter primário, secundário ou terciário dependendo da causa que a promoveu (MONTE, 2000). As causas primárias são situações onde a ingestão de nutrientes e calorias é qualitativamente ou quantitativamente insuficiente. O indivíduo desnutrido se alimenta pouco ou ingere alimentos de baixa qualidade nutricional. As causas secundárias abrangem situações onde há insuficiência na ingestão de alimentos em função de um aumento na necessidade energética, não estando relacionado com o alimento em si. Nestes casos, os indivíduos se tornam desnutridos em consequência de verminoses, intolerância alimentar, câncer, absorção deficiente de nutrientes e o desmame precoce. Este último é o maior causador de desnutrição entre crianças de 0 a 2 anos, quando principalmente em famílias de baixo poder aquisitivo a introdução de alimentos substitutos ao leite materno é insuficiente para satisfazer as necessidades nutricionais dos lactentes (Biblioteca Virtual do Ministério da Saúde -



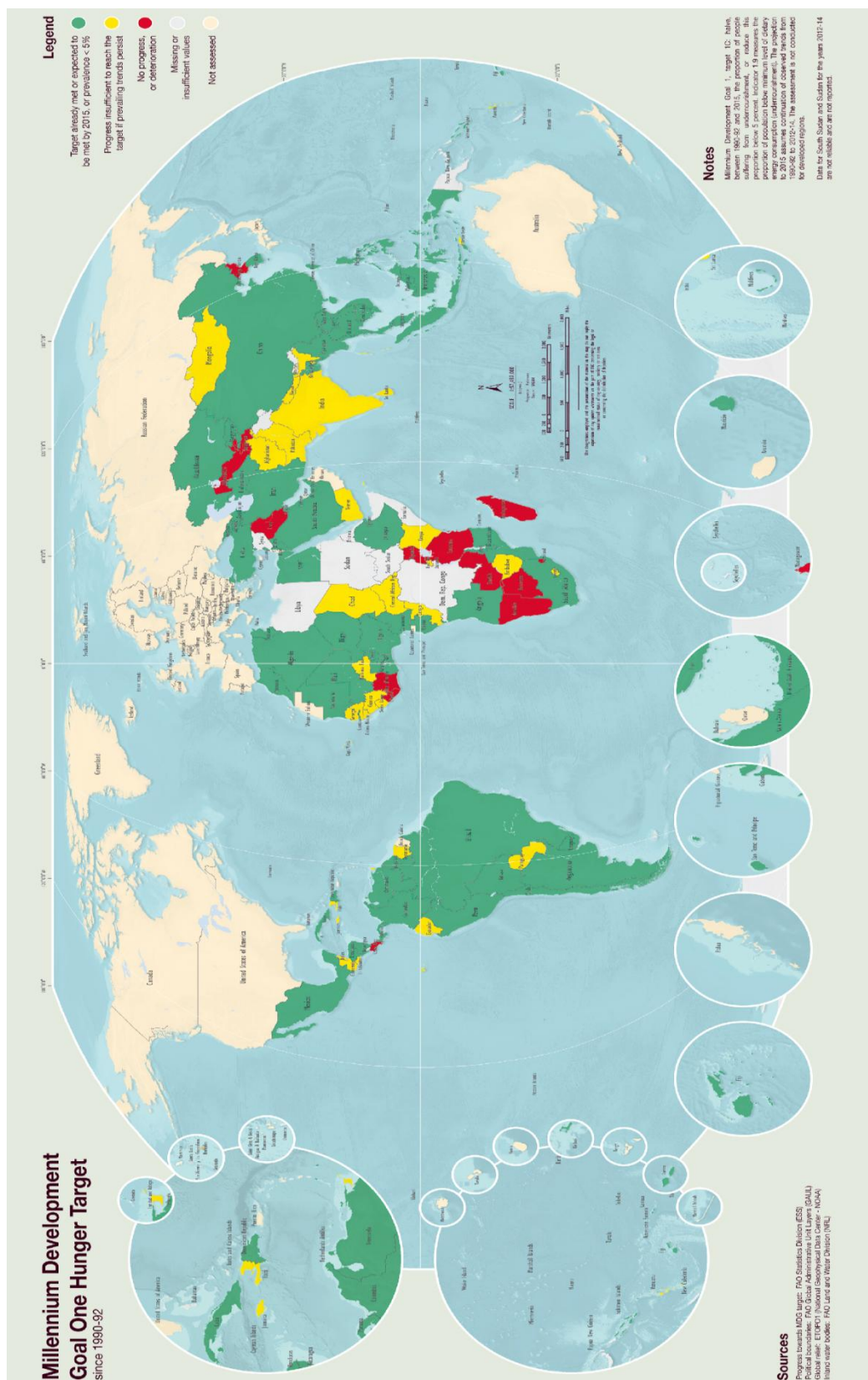
<http://bvsmms.saude.gov.br>, acesso em agosto de 2014). Em países desenvolvidos, tem sido demonstrado um terceiro quadro de desnutrição, denominado fome oculta, resultante da alimentação excessiva, mas com baixo teor de nutrientes essenciais (MALINA et al., 2004). Dois tipos principais de desnutrição são descritos como prevalentes nos tempos atuais: (a) o baixo peso para estatura (referente ao termo inglês: *wasting*) e (b) a baixa estatura para idade (referente ao termo inglês: *stunting*), sendo o segundo ainda mais comum do que o primeiro (Biblioteca Virtual do Ministério da Saúde - <http://bvsmms.saude.gov.br>, acesso em agosto de 2014).

Em um estudo realizado pela Organização das Nações Unidas (ONU) em abril de 2013 foi mostrado que, apesar da redução no índice de desnutrição (19% em 1992 para 12% em 2013), cerca de 2 bilhões de pessoas sofrem deficiências de micronutrientes. Dentre estas, 840 milhões de pessoas já se encontram cronicamente subnutridas, destacando-se as 160 milhões de crianças menores de 5 anos em período crucial para o desenvolvimento da função plena de órgãos e sistemas (Figura 1) (Organização das Nações Unidas - <http://www.onu.org.br>, acesso em agosto de 2014).

No Brasil, aproximadamente 13 milhões de pessoas passam fome ou sofrem com desnutrição, dentre as quais cerca de 1 milhão são crianças abaixo dos 5 anos (Portal Vencendo a Desnutrição - <http://urlm.com.br/www.desnutricao.org.br>, acesso em agosto de 2014). Com o intuito de se reduzir o impacto sócio-econômico da desnutrição e suas consequências, o Brasil e outros países, criaram junto à ONU as Metas de Desenvolvimento do Milênio – entre as se quais prevê a diminuição pela metade em até 2015 do número de pessoas que passam fome em relação a década de 90. Segundo documento divulgado pela Organização das Nações Unidas para a

Alimentação e a Agricultura (FAO), o Brasil e mais 37 países já atingiram essa meta (Figura 1).

A redução no número de pessoas que passam fome no Brasil que chegou a



**Figura 1: O Mapa da fome no mundo destacando o grau de adequação dos países as metas do milênio. Grandes diferenças regionais ainda prevalecem. América Latina e Sudeste da Ásia foram as regiões de maior sucesso, enquanto o oeste da Ásia é a única região que efetivamente regrediu. África Subsaariana tem mais de 1/4 da população mundial de desnutridos crônicos e o sul da África tem o maior índice de fome crônica (meio bilhão de pessoas). Verde: países que já alcançaram a meta ou que se espera alcançar a meta em 2015; Amarelo: progresso insuficiente se os indicadores persistirem; Vermelho: sem progresso ou regressão dos indicadores; Cinza: indicadores insuficientes ou faltando; Bege: não acessado. Retirado de: [http://www.fao.org/fileadmm/templates/ess/foodsecurity/poster\\_web\\_001\\_MDG.jpg](http://www.fao.org/fileadmm/templates/ess/foodsecurity/poster_web_001_MDG.jpg)**

54% na década de 90 reduziu para 15% em 2013 e atualmente se encontra em 6,9% (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, acesso em agosto de 2014). De acordo com os últimos dados apresentados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2009, 8,5% da população brasileira (16,27 milhões de pessoas) ainda se encontram em situação de extrema pobreza (definida pelo ganho mensal inferior a R\$ 70,00) onde 2,7 milhões de pessoas estão no Sudeste, 2,6 milhões na região Norte, 715 mil na região Sul e 557 mil na região Centro-Oeste (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - <http://www.ibge.gov.br/home>, acesso em agosto de 2014).

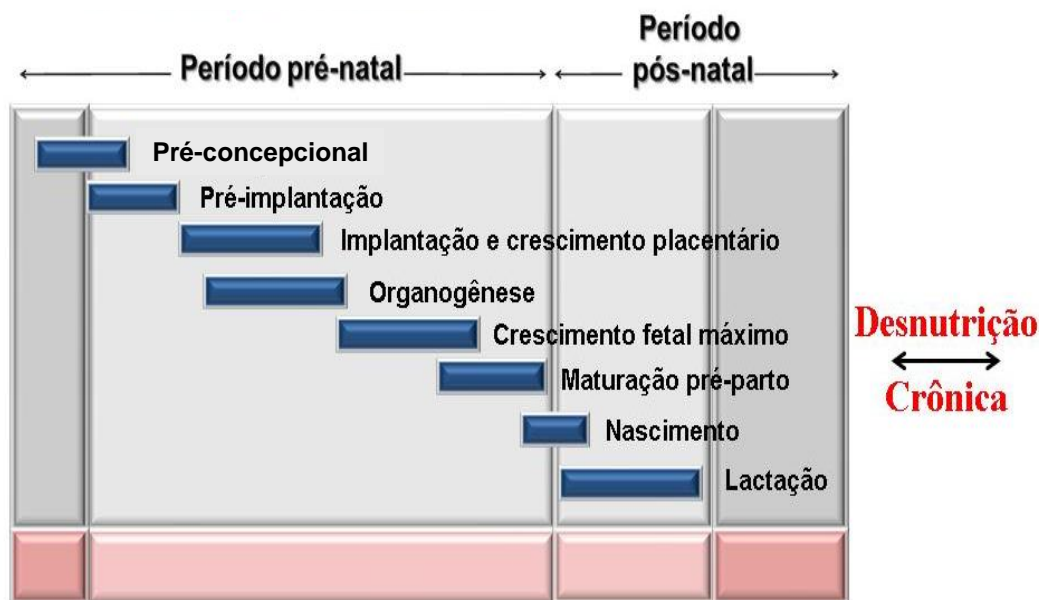
## **1.2. As marcas deixadas pela desnutrição**

Foi no final da década de 80 e no início da década de 90 que os temas nutrição e saúde obtiveram uma nova dimensão através da noção de que eventos ocorridos durante o período fetal e pós-natal podem ser considerados críticos para determinar alterações metabólicas permanentes durante a vida adulta. Uma das primeiras descrições deste fenômeno foi realizada por David J.P. Barker (29/06/1938 – 27/08/2013), médico e epidemiologista, e ficou conhecida como a “Hipótese de Barker” ou “Hipótese da Programação Fetal” (Barker, 1993). Esta hipótese propõe que o ambiente do feto e da criança - determinada pela nutrição da mãe e da exposição do bebê a adversidades após o nascimento - determina as doenças da vida adulta. Barker acreditava que a medicina de saúde pública estava falhando e que a sua prioridade deveria ser a proteção da nutrição de mulheres jovens. Numa das primeiras publicações, Barker e colaboradores (1989) acompanharam até a idade adulta, 5654 homens nascidos durante 1911-1930 (períodos da primeira guerra mundial e da crise da bolsa de Nova Iorque) em 6

distritos de Hertfordshire, Inglaterra. Deste total, 92% foram amamentados, mas homens com menor peso ao nascimento até um ano apresentaram taxas de mortalidade mais elevadas de doença isquêmica do coração. Este estudo foi amplificado para outros grupos que demonstraram também a pré-disposição ao desenvolvimento de doenças crônicas como hipertensão, cardiopatias e síndrome metabólica (BARKER et al., 1993; BARKER, 1994; BARKER, 2002). Em um de seus últimos discursos públicos, Barker afirmou: “A próxima geração não tem que sofrer com doenças cardíacas ou osteoporose. Estas doenças não são determinadas pelo genoma humano. Elas raramente existiam há 100 anos atrás. Nós podemos preveni-las se tivermos a vontade” (BARKER et al., 1989).

Nesta afirmação Barker se referia ao conceito de que insultos de natureza não genética ocorridos durante a fase inicial da vida, em destaque a má qualidade da nutrição, disparam eventos de forma a organizar os sistemas fisiológicos mas que ao longo da vida determinam doenças de implantação silenciosa. Estes eventos são as “marcas” deixadas mesmo após a melhora da qualidade da nutrição e por isso denominadas como “programação” ou “impressão metabólica” (LUCAS, 1998; WATERLAND & GARZA, 1999). As fases iniciais da vida são as fases de desenvolvimento pré- e pós-natal, que podem ser denominadas janelas de desenvolvimento (Figura 2).

## Desnutrição Intra-Uterina Desnutrição Perinatal



**Figura 2: Ilustração geral dos períodos de desenvolvimento.** O período pré-natal compreende todas as etapas de crescimento fetal, nessas etapas a desnutrição pode atingir o indivíduo de maneira catastrófica, pois é onde existe o desenvolvimento de muitos órgãos e sistemas. O período pós-natal compreende todas as etapas até o desmame, a nutrição é, portanto, assim como no pré-natal somente influenciada pela nutrição materna. O período crônico ocorre após o desmame e dependendo do tempo de permanência do quadro de desnutrição nesse período os danos podem ser irreversíveis (Adaptado de FOWDEN et al., 2006).

Algumas relações entre o tipo de insulto na janela de desenvolvimento e as doenças na idade adulta foram selecionadas na Tabela 1. Por todo o exposto, o período e o tempo de exposição a estímulos ou insultos nutricionais nas diferentes janelas de desenvolvimento podem determinar o aparecimento, a progressão e a gravidade de uma doença. Em mamíferos, apesar da maior parte do desenvolvimento com intensa divisão celular e organogênese ocorrer na vida intra-uterina, em alguns órgãos (como por exemplo, o rim e o coração) este desenvolvimento continua após o nascimento, demonstrando que não só o período pré-natal, mas também a fase de desenvolvimento pós-natal (lactação) e infantil até o quinto ano de vida são cruciais para o correto funcionamento do organismo quando adulto (BENABE & MARTINEZ-MALDONADO, 1998; NYIRENDA et al., 1998).

**Tabela 1:** Principais insultos ocorridos na vida adulta em decorrência da desnutrição em uma determinada janela de desenvolvimento.

Janela do Desenvolvimento	Insulto	Referências
Desnutrição Pré-Natal (intrauterina)	Hipertensão arterial, intolerância à glicose e aumento da sensibilidade à insulina associados ao excesso de glicocorticóides circulantes in útero.	NYRIENDA et al., 1998 WHORWOOD et al., 2001
	Diminuição do número de néfrons, distúrbios no transporte renal de Na <sup>+</sup> , doença renal crônica.	VIEIRA-FILHO et al., 2014 LUYCKX & BRENNER, 2015
	Alteração do processo reprodutivo.	HERNÁNDEZ-JULIÁN et al., 2014
	Comportamento e desenvolvimento neurológico.	AKITAKE et al., 2015
	Aumento da expressão dos receptores beta adrenérgicos no coração, indícios de remodelamento e insuficiência cardíaca na idade adulta	FERNANDEZ-TWINN et al., 2006
Desnutrição Pós-Natal (restrição nutricional protéica enquanto filhotes, lactacional)	Distúrbios no metabolismo de carboidratos e na regulação da pressão arterial na vida adulta em modelos animais.	WHORWOOD et al., 2001 LANGLEY-EVANS, 2009
	Aumento de catecolaminas circulantes e redução da contratilidade cardíaca.	LANGLEY-EVANS et al., 1996 PETRY et al., 2000 VICKERS et al., 2000 LANGLEY-EVANS, 2009
	Diminuição do número de néfrons, deposição de colágeno, alteração do transporte renal de Na <sup>+</sup>	LUZARDO et al., 2011
Desnutrição Pós-Natal (desnutrição crônica)	Elevação da pressão arterial	LANGLEY-EVANS et al., 1996 TONKISS et al., 1998
	Alteração da função renal, modificação da resposta renal a Angiotensina II, doença crônica renal.	FOWDEN et al., 2006 COSTA-SILVA et al., 2009 SILVA et al., 2014a
	Alteração do processo reprodutivo.	MUZI-FILHO et al., 2013
	Cardiopatia	RICH-EDWARDS et al., 1997 FORSEN et al., 1999

As pessoas acometidas pela desnutrição em algum período da vida apresentam elevada frequência de sequelas físicas e mentais, de implantação silenciosa, que podem se manifestar de forma aguda ou crônica (MONTE, 2000).

Tais sequelas por vezes levam a morte do indivíduo e em outras situações a quadros mórbidos que passam a onerar o Estado principalmente na área de saúde pública. Segundo dados da FAO, a apatia e fraqueza causadas pela desnutrição reduzem o desempenho no trabalho afetando o desenvolvimento econômico principalmente dos países emergentes. As estimativas indicam que a desnutrição ocasione uma perda de até 5% da renda global por ano, em termos de perda de produtividade e despesas governamentais com saúde (Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, acesso em agosto de 2014).

No caso das doenças cardiovasculares, foco desta tese de doutorado, a ONU vem destacando que países antes pobres e hoje considerados emergentes, apresentam oito vezes mais mortes associados a fatores de riscos cardiovasculares do que os países desenvolvidos (Organização das Nações Unidas, acesso em Agosto de 2014). No Brasil a taxa de mortalidade causada por doenças cardiovasculares ascendeu em torno de 25% em 2008 (período em que programas governamentais de combate a fome e a desnutrição começaram a ser implementados) evidenciando uma relação entre doenças cardiovasculares e mudança na condição nutricional (Ministério da Saúde – DATASUS Plano Nacional de Saúde, 2012). O portal do Ministério da Saúde brasileiro mostra que a prevalência estimada de portadores de doenças cardíacas é de 17 milhões de pessoas. São atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) 12,8 milhões destes pacientes sendo a maioria proveniente das regiões norte e nordeste (Ministério da Saúde – DATASUS Plano Nacional de Saúde 2008/2009-2011), regiões que conhecidamente apresentam altos índices de desnutrição. Outro estudo com uma população adulta beneficiária do programa Bolsa Família no município de Curitiba mostrou que cerca de 48% dos indivíduos que mudaram sua condição nutricional

após a implementação do programa apresentaram aumentada circunferência abdominal e risco de desenvolvimento de doença cardiovascular (LIMA et al., 2011). Por todo o exposto, podemos considerar que a mudança da qualidade nutricional também pode promover doença na idade adulta.

### **1.3. Os 25 anos da Dieta Básica Regional: o que aprendemos com ela?**

Apesar de diversos modelos experimentais atestarem a ocorrência de doenças associadas à desnutrição infantil, a maioria dos trabalhos não utiliza dietas que refletem a inadequação dos regimes alimentares característicos de áreas de desnutrição endêmica do Brasil. Pensando nisso, pesquisadores da Universidade Federal de Pernambuco buscaram uma aproximação com a realidade do país. Desta forma, TEODÓSIO e colaboradores (1990) elaboraram a Dieta Básica Regional (DBR) utilizando alimentos muito consumidos pela população do nordeste brasileiro especificamente na região de cultivo de cana-de-açúcar do estado de Pernambuco. A dieta é composta por quatro principais alimentos consumidos por essa população: o feijão mulatinho (*Phaseolus vulgaris*), a batata doce (*Iponea batatas*), a farinha de mandioca (*Manihot esculenta*) e o charque (carne bovina salgada e prensada). A análise nutricional dessa dieta demonstrou um baixo conteúdo e qualidade de proteínas (apenas 8% do total quando o recomendado é 25%), escassez de aminoácidos essenciais, baixo conteúdo de gordura e grande quantidade de carboidratos (TEODÓSIO et al., 1990). Apesar de ser isocalórica quando comparada as dietas padrão, na DBR a maior parte do conteúdo energético é obtido dos carboidratos da batata doce e da farinha de mandioca. Os níveis de vitamina C, biotina, tiamina, riboflavina, PABA, piroxidina, inositol, cianocobalamina e colina são muito baixos. O nível extremamente baixo de vitamina A,



provavelmente pode ser consequência da ausência de frutas e vegetais, da baixa qualidade do ingrediente de origem animal e o fato de que a batata doce é comumente ingerida sem casca. Vale a pena ressaltar, que como resultado da ingestão crônica da DBR, o conteúdo plasmático de aminoácidos dos ratos acometidos pela desnutrição sofre alterações importantes: aumento de L-serina, L-treonina, L-histidina, L-alanina e L-glutamina e o decréscimo de L-valina e L-leucina, sugerindo uma proteólise tecidual como tentativa de compensar a baixa qualidade das proteínas ingeridas (SILVA et al., 2014b). Por conta destas características, esta dieta também abrange a realidade nutricional de países da África, Ásia e América Latina, bem como das regiões da periferia dos grandes centros urbanos (SAWAYA et al., 1995).

Nestes 25 anos, muitos foram os conhecimentos adquiridos com a utilização da DBR como modelo de má-nutrição, destacando-se duas grandes linhas de pesquisa. A primeira, liderada pelo próprio grupo da Profa. Naide Teodósio e do Prof. Rubem Guedes (Universidade Federal de Pernambuco) em colaboração com o Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, acerca dos efeitos da má-nutrição sobre a formação do sistema nervoso, na mielinização e organização do nervo óptico (ANDRADE et al., 1990; ALMEIDA et al., 2005; BARROS et al., 2006). A segunda linha, liderada pelo grupo da Profa. Eridan de Medeiros Coutinho sobre os estudos epidemiológicos e anatomo-patológico da relação hospedeiro-parasito na esquistossomose mansônica em função da má-nutrição (COUTINHO et al., 1992; FERREIRA et al., 1993; NEVES et al., 2001). Outros estudos também demonstraram a influência da desnutrição multifatorial em processos de cicatrização da pele, onde observou-se uma reduzida

expressão de fibronectina em animais desnutridos (DE SOUZA et al., 2014) e defeitos de reprodução em ratos adultos machos (MUZI-FILHO et al., 2013).

Através da colaboração iniciada em 2006 entre as Universidades Federal do Rio de Janeiro e a Federal de Pernambuco no marco dos projetos “Casadinho-CNPq” e “PROCAD-CAPEs”, a investigação a cerca dos mecanismos moleculares envolvidos no trinômio desnutrição–hipertensão–rim foi estabelecida. Foi demonstrado que, independente da janela do desenvolvimento onde ocorre a desnutrição, o manejo de  $\text{Na}^+$  no túbulo proximal é alterado: a atividade da ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ) ATPase sensível a ouabaína é aumentada em detrimento da diminuição da atividade da  $\text{Na}^+$ -ATPase, insensível a ouabaína (COSTA-SILVA et al., 2009; VIEIRA-FILHO et al., 2009). Foi observado ainda aumento do estresse oxidativo e insensibilidade à Ang II associados ao desbalanço das atividades das proteínas cinases C (PKC) e A (PKA) (CABRAL et al., 2012; SILVA et al., 2014b). Na desnutrição crônica foi demonstrado que o aumento da reabsorção proximal de  $\text{Na}^+$  (COSTA-SILVA et al., 2009) leva a expansão do volume plasmático, desempenhando um papel central na hipertensão de origem renal (SILVA et al., 2014a; SILVA et al., 2014b). É sabido que a doença renal pode ser tanto causa como consequência da doença cardiovascular. Portanto, é de se esperar que os distúrbios renais provocados pela desnutrição possam impactar o sistema cardiovascular e este afetar o sistema renal, tornando-se um ciclo vicioso e agravando o estado clínico do paciente.

Para o entendimento das questões de como a desnutrição pode acarretar na vida adulta doenças cardíacas, serão discutidos inicialmente alguns pontos-chaves para o entendimento dos aspectos fisiológicos e da avaliação da função cardíaca.

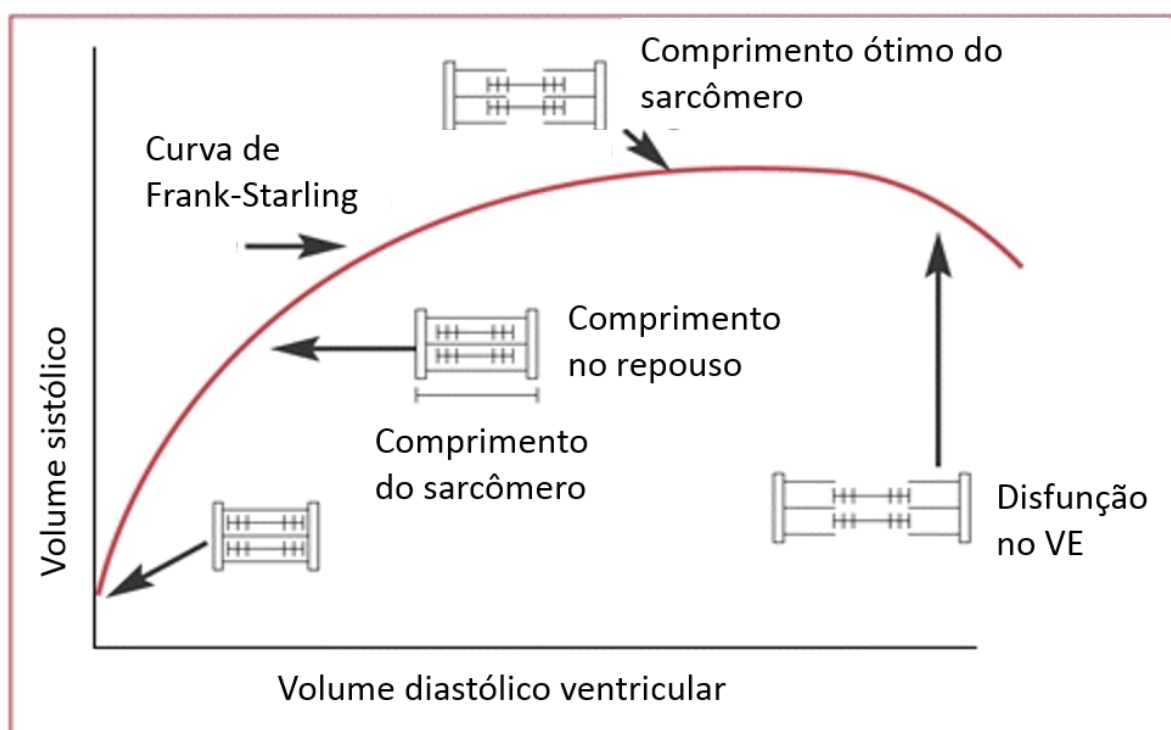
## **1.4. O coração**

O aparelho cardiovascular funciona para fornecer e manter suficiente e contínuo o fluxo sanguíneo aos diversos tecidos do organismo, segundo as suas necessidades metabólicas para o desempenho das funções que devem cumprir diante das diversas exigências funcionais a que o organismo está sujeito. O coração é um órgão muscular, localizado na região mediastínica, que possui quatro cavidades (duas auriculares e duas ventriculares) e um sistema de válvulas – que garantem a ejeção de sangue em uma só direção. O conteúdo sanguíneo que chega ao átrio direito do coração proveniente dos tecidos periféricos é então ejetado ao ventrículo direito e posteriormente aos pulmões onde é oxigenado e enriquecido configurando a circulação pulmonar. Após as trocas gasosas, o sangue retorna ao átrio esquerdo sendo propelido pelo ventrículo esquerdo para os demais tecidos configurando a circulação sistêmica (BERNE et al., 2009).

### **1.4.1. Avaliação do desempenho cardíaco**

As células miocárdicas possuem elementos contráteis responsáveis pelo seu encurtamento e conseqüentemente redução do volume das câmaras cardíacas levando à propulsão do sangue a cada ciclo cardíaco. Cada célula muscular cardíaca é composta de sarcômeros contendo um arranjo linear de filamentos espessos (contendo miosina) e finos (contendo actina). Atrélada ao filamento fino existe uma família de proteínas chamada troponina. Mudanças no comprimento do sarcômero alteram a relação geométrica entre os filamentos espessos e finos, de forma que se obtém a maior força quando ocorre a sobreposição ideal entre estes filamentos. Esta relação é empregada para caracterizar as propriedades contráteis sistólica (contração) e diastólica (relaxamento) do coração evidenciadas na curva de

Frank-Starling (OKOSH & TUCCI, 1996; SHIELS & WHITE, 2008; BERNE et al., 2009). A relação de Frank-Starling é, portanto, uma propriedade intrínseca do miocárdio, no qual o aumento do comprimento ou do volume ventricular resulta em aumento da *performance* durante a contração subsequente (FUCHS & SMITH, 2001) (Figura 3).



**Figura 3: Gráfico ilustrativo demonstrando a relação entre incrementos do volume ventricular diastólico final, relacionado ao retorno venoso (Ventricular end-diastolic volume) e aumento da capacidade responsiva do débito cardíaco (Stroke volume)** A Lei de Frank-Starling define que existe uma relação proporcional entre o volume diastólico final e o débito cardíaco dentro de certos limites. Estes limites dependem da correta interação entre os miofilamentos de actina e miosina. Quando ocorre o comprometimento dessa relação é instaurada a insuficiência cardíaca, onde o coração não responde com aumento de força de contração ao aumento na pré carga (disfunção no ventrículo esquerdo - VE) (BERNE et al., 2009).

De uma forma geral a insuficiência cardíaca pode apresentar diferentes formas de manifestação sendo as disfunções sistólica e diastólica as mais comuns. A falha do mecanismo de Frank-Starling pode ser observada em ambas. Na insuficiência cardíaca sistólica a incapacidade em responder ao mecanismo compensatório (pré

carga aumentada) gera um déficit no débito cardíaco e na fração de ejeção (VASAN et al., 1999; MESQUITA et al., 2004; FIGUEROA & PETERS, 2006). A insuficiência cardíaca diastólica é caracterizada por uma função sistólica e débito cardíaco preservados e distúrbios de relaxamento miocárdico com complacência ventricular reduzida (MESQUITA et al., 2004; LOFREDO et al., 2014).

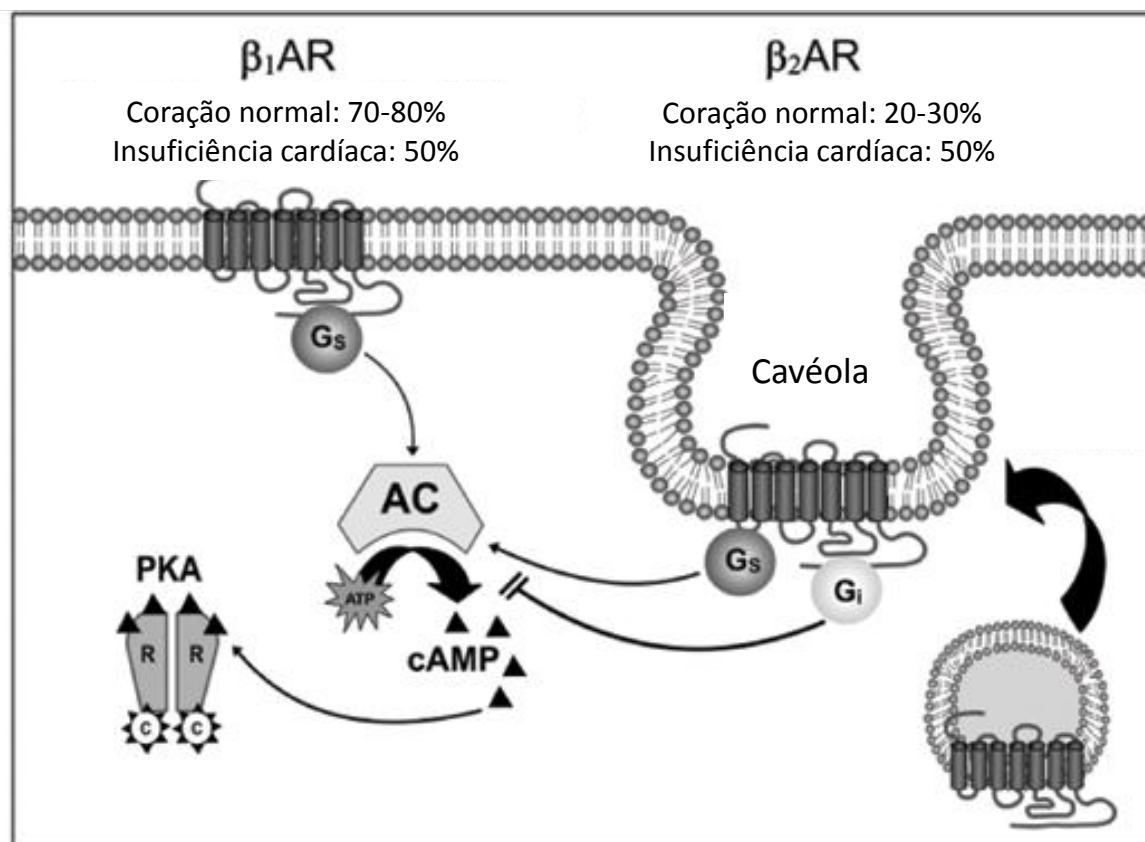
Em termos gerais, o desempenho cardíaco pode ser avaliado através de quatro pilares: pré-carga, pós-carga, contratilidade e frequência cardíaca. A pré-carga, que se refere ao grau de estiramento dos sarcômeros logo antes do início da sístole, geralmente é definida para o ventrículo como a pressão diastólica final ou volume diastólico final – dois parâmetros que se inter-relacionam pela relação de Frank-Starling. A pós-carga se refere às forças físicas que precisam ser superadas (refletidas pela resistência vascular periférica) para os miócitos se encurtarem fazendo com que o ventrículo ejete o sangue. A contratilidade é a força intrínseca do músculo cardíaco independente das condições externas impostas, ou pela pré-carga ou pela pós-carga, e pode ser medida através das funções sistólica (pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo: PDVE e velocidade de contração:  $+dP/dT$ ) e diastólica (velocidade de relaxamento:  $-dP/dT$ ). Já a frequência cardíaca é importante para a regulação do débito cardíaco – que é a quantidade de sangue ejetado a cada batimento cardíaco e regulada pelo sistema nervoso autônomo (GUYTON & HALL, 2011).

#### **1.4.2. A inervação do coração**

Cada ciclo se inicia com a geração de potenciais espontâneos no nodo sinusal, sendo propagados pelos átrios e posteriormente para os ventrículos. A eficiência do bombeamento cardíaco é ainda garantida por nervos simpáticos e

parassimpáticos. Assim, para cada valor de pressão atrial, o débito cardíaco pode ser aumentado por mais de 100% pela estimulação simpática e reduzido para até zero, ou quase zero, pela estimulação vagal (GUYTON & HALL, 2011). Basicamente os receptores constituintes do sistema simpático e parassimpático cardíacos respondem a flutuações na pressão arterial, sendo ativados e ativando funções no coração que corrijam possíveis alterações pressóricas identificadas. Três grupos de receptores são ativados por mudança de pressão nas câmaras cardíacas. Os receptores no endocárdio (nas junções das veias cava superior e inferior com o átrio direito e de veias pulmonares com o átrio esquerdo) são conectados ao sistema nervoso central por fibras vagais mielinizadas. Os receptores distribuídos em todas as câmaras do coração são conectados ao sistema nervoso central por fibras vagais não mielinizadas, e os receptores difusamente distribuídos por todas as câmaras cardíacas conectados à medula espinhal o fazem por fibras mielinizadas e não mielinizadas trafegando com os nervos simpáticos (MICHELINI, 2000; IRIGOYEN et al., 2001).

A estimulação simpática no coração se dá em grande parte por receptores adrenérgicos do tipo  $\beta$  ( $\beta$ -AR), desencadeando os efeitos inotrópicos e cronotrópicos positivos das catecolaminas (GUIMARÃES & MOURA, 2001). Os receptores  $\beta$ , classicamente são conhecidos por atuarem através da estimulação da adenilato ciclase a partir da ativação da proteína Gs (G estimulatória), elevando a formação de AMPc e estimulando a atividade dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-dependentes (GUIMARÃES & MOURA, 2001) (Figura 4).



**Figura 4: Vias de sinalização distintas e localização celular dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  em cardiomiócitos saudáveis e insuficientes.**  $\beta_1$ AR medeia efeitos cronotrópicos e inotrópicos via catecolaminas e estímulo de proteína Gs.  $\beta_2$ AR é normalmente confinado em caveolas e medeia o nível de contração dos cardiomiócitos via Gs, entretanto também acopla proteína Gi o que resulta em efeitos antiapoptóticos. (AC- adenilato ciclase; cAMP- AMP cíclico). Retirado de BRUM et al., 2006.

No coração sadio, as principais isoformas dos  $\beta$ -AR são as do tipo 1 e 2 expressas na razão 70:30 (BRUM et al., 2006). Em estudos mais recentes, parecem exercer algumas ações similares e ao mesmo tempo inversas no coração. Ambos possuem ações contráteis embora os receptores  $\beta_1$  estimulem a apoptose de cardiomiócitos em situações de sobrecarga enquanto os receptores  $\beta_2$  possuem efeitos cardíacos antiapoptóticos (SALAZAR et al., 2013). Os  $\beta_1$ AR medeiam os efeitos cronotrópicos e inotrópicos das catecolaminas através da proteína Gs. (GUIMARÃES & MOURA, 2001; SALAZAR et al., 2013). Os  $\beta_2$ AR estão normalmente confinados em cavéolas das membranas plasmáticas dos cardiomiócitos e a sua localização é essencial

para a sua via de sinalização. Quando acoplado a proteína Gs, ocorre o aumento transiente da contração e, acoplado a proteína Gi apresenta efeitos anti-apoptóticos (BRUM et al., 2006; LYMPEROPOULOS et al., 2013). Vale a pena ressaltar que os  $\beta_2$ AR mantêm contratilidade cardíaca em indivíduos com insuficiência cardíaca (SALAZAR et al., 2013). Nessa condição, a relação de expressão entre  $\beta_1$ AR e  $\beta_2$ AR passa para 50:50, uma vez que  $\beta_1$ AR se dessensibiliza e a inibição da proteína cinase reguladora de proteína G (GRK2), que fosforila  $\beta_2$ AR, aumenta a capacidade contrátil e diminui a apoptose tecidual (Figura 4) (BRUM et al., 2006; SALAZAR et al., 2013). Já, em menor proporção,  $\beta_3$ AR induzem inotropismo e cronotropismo negativos (GAUTHIER et al., 1996).

A hiperatividade simpática tem sido associada a diversas doenças cardiovasculares tais como aterosclerose (LEIMBACH et al., 1986), síncope ou morte súbita (ZYSKO et al., 2007), hipertensão (GRASSI, 1998), insuficiência cardíaca (LYMPEROPOULOS et al., 2013), bem como as doenças comumente associadas a esses quadros como hiperglicemia e diabetes mellitus (HUGGETT et al., 2003), obesidade e síndrome metabólica (GRASSI et al., 2007), e a doença renal (MASUO et al., 2010). Durante a insuficiência cardíaca outros mecanismos neurohumorais são superativados como o sistema renina-angiotensina-aldosterona configurando um quadro de elevação de angiotensina II circulante adicionada à elevação das catecolaminas (VON LUEDER & KRUM, 2013). Tais mecanismos são principalmente necessários para compensar a disfunção cardíaca como previsto pela lei de Frank-Starling já descrita anteriormente. No entanto, em permanecendo o insulto, esses mecanismos podem piorar o trabalho cardíaco por gerar progressivas adaptações negativas (como hipertrofia cardíaca) e conduzir à fase de



insuficiência cardíaca descompensada, levando ao óbito (COHN et al., 1984; LYMPEROPOULOS, 2013).

### **1.4.3. Mecanismos moleculares envolvidos na insuficiência cardíaca**

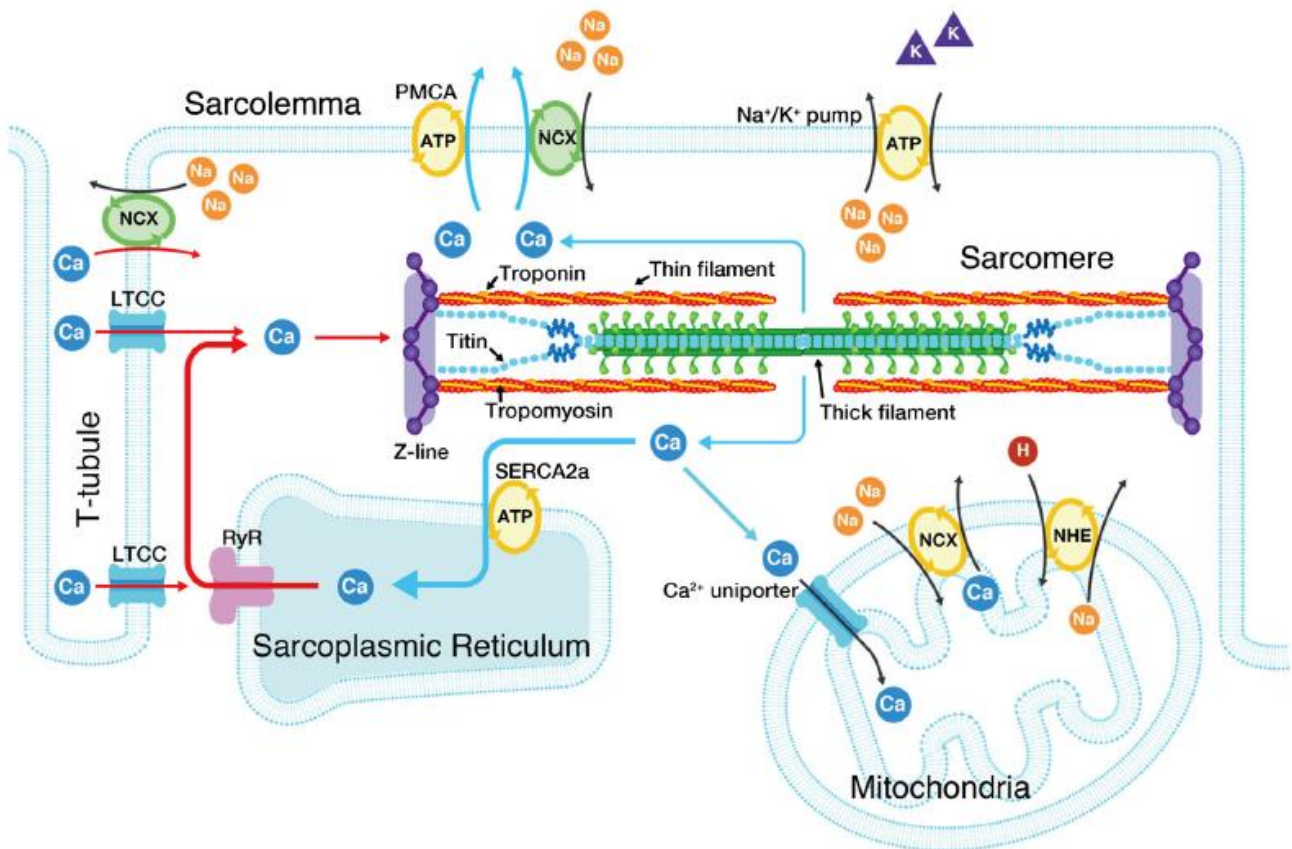
Conforme já introduzido anteriormente, os estímulos patofisiológicos para a progressão da insuficiência cardíaca incluem forças mecânicas (pressão e volume) e neuro-hormonais (com destaque para o sistema nervoso simpático). Estes estímulos convergem para uma sinalização intracelular alterada e que envolvem o distúrbio na homeostasia intracelular do íon  $\text{Ca}^{2+}$  e modificações da atividade de proteínas cinases, que podem modificar o nível de espécies reativas de oxigênio (KAJIWARA et al., 2000; MESQUITA et al., 2004; CHO et al., 2014).

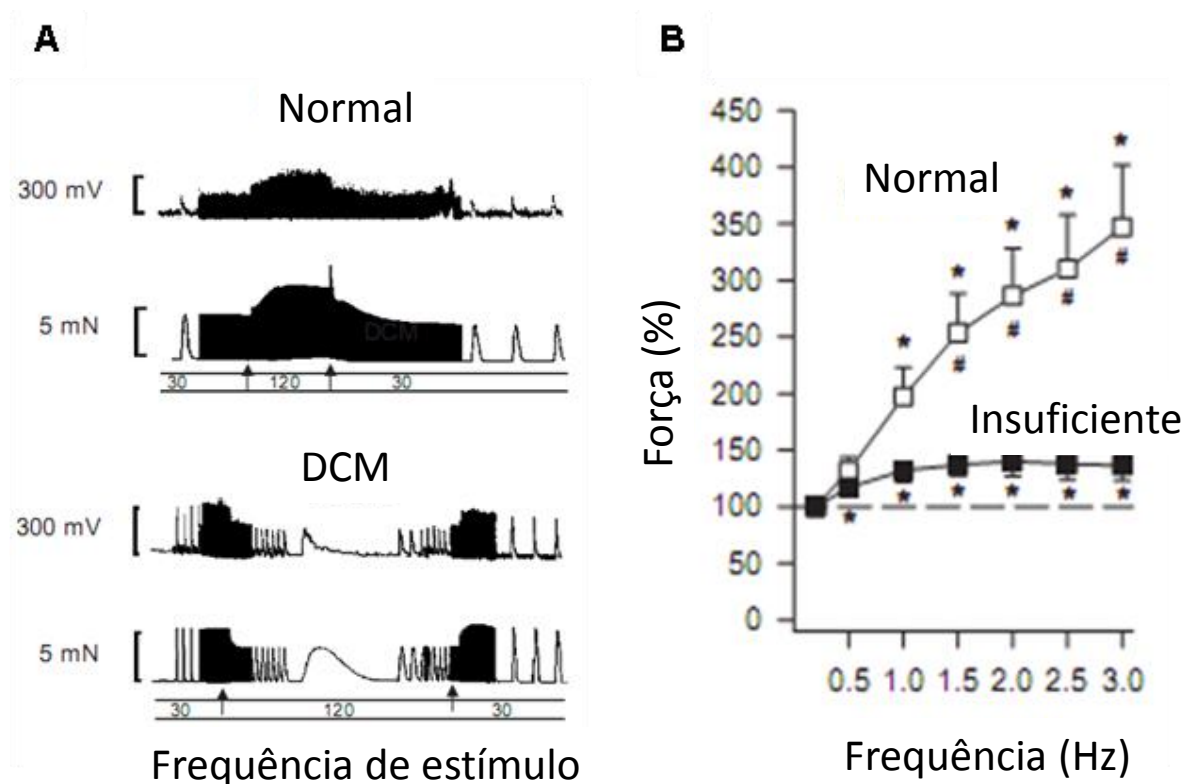
#### **1.4.3.a. Homeostasia intracelular de $\text{Ca}^{2+}$ no coração insuficiente**

O relaxamento cardíaco ocorre com a progressiva queda das concentrações de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares no qual basicamente quatro sistemas estão envolvidos: (1) sequestro do  $\text{Ca}^{2+}$  pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA 2a); (2) efluxo pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ ; (3) extrusão pela  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática (PMCA1 e PMCA4) e (4) entrada na mitocôndria por transportador uniporte (BERS, 2001; KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA et al., 2014) (Figura 5). Além da reduzida sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  que será discutida mais adiante, a própria corrente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular está comprometida na insuficiência cardíaca. PIESKE e colaboradores (1995) utilizando uma fotoproteína bioluminescente, demonstraram que o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta proporcionalmente ao aumento da frequência estimulatória em corações normais e diminui em corações insuficientes. Da mesma forma, foi mostrado que frente a um aumento na taxa de estimulação de miocárdio

normal há um proporcional aumento na taxa de captação  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo, e isso não ocorre no miocárdio insuficiente (PIESKE et al., 1999). Isso indica um incorreto estoque de  $\text{Ca}^{2+}$  no retículo sarcoplasmático presente na insuficiência cardíaca, apontando para uma deficiência da SERCA (Figura 6).

**Figura 5: Ilustração esquemática indicando a estrutura do sarcômero cardíaco associado com tubulos-T.** O influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do fluido intersticial durante a excitação causa liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático (SR). Esse  $\text{Ca}^{2+}$  é importante para sístole ou contração cardíaca. O relaxamento ocorre como resultado da entrada do  $\text{Ca}^{2+}$  no SR pela  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases de retículo (SERCA) e de membrana (PMCA); por extrusão pelo trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) e pela mitocôndria. Retirado de KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA et al., 2014.





**Figura 6:** (A) Relação entre a força e frequência de estímulo em miocárdio humano normal (nonfaling) e insuficiente (DCM). Sinal da luz da fotoproteína em mV e sinal da força isométrica em mN são dados por níveis de estimulação de 30 batimentos/minuto e 120 batimentos/minuto (Retirado de PIESKE et al., 1995). (B) Dependência da frequência na força isométrica na contratura de miocárdio humano normal (nonfaling) e insuficiente (faling). A contratura do miocárdio reflete o conteúdo de  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo sarcoplasmático; significativamente diferente a apartir de 0.5 Hz (Retirado de PIESKE et al., 1999).

Em modelo de rato com infarto no miocárdio, a redução da expressão da enzima SERCA foi correlacionada com o progressivo aumento da severidade da insuficiência cardíaca (ZARAIN-HERZBERG et al., 1996), similarmente uma redução nos níveis de RNAm da SERCA foi observada em miocárdio ventricular esquerdo de ratos com insuficiência (FELDMAN et al., 1997). A redução da expressão da enzima também foi observada em corações de porcos com insuficiência cardíaca compensada e nesse caso os animais não manifestaram sinais clínicos do quadro (KISS et al., 1995). Em humanos há estudos que

demonstram a redução da expressão da mesma na insuficiência cardíaca associada inclusive à redução na sua atividade (LIMAS et al., 1987; SCHWINGER et al., 1995).

O trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  é outro elemento responsável pela homeostasia intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  que tem seu transporte alterado na insuficiência cardíaca (HASENFUSS & PIESKE, 2002). É um transportador voltagem-dependente e reverte seu modo transportador durante todo o potencial de ação (SCHULZE & LEDERER, 1997; RUKNUDIN et al., 1997). Em corações normais é o principal mecanismo extrusor de  $\text{Ca}^{2+}$  no miocárdio, retirando um íon  $\text{Ca}^{2+}$  a cada três íons  $\text{Na}^+$  inserido no citoplasma. Quando a frequência cardíaca aumenta, em resposta ao estímulo  $\beta$  adrenérgico, por exemplo, a concentração intracelular de  $\text{Na}^+$  aumenta, isso favorece a lentificação do trocador ou até mesmo o seu modo reverso de transporte, favorecendo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e saída de  $\text{Na}^+$ . Em corações insuficientes esse mecanismo parece não acontecer, uma vez que já foi descrito um significativo aumento na concentração de  $\text{Na}^+$  intracelular em momentos distintos de estímulo e aumento de frequência nesses corações (HASENFUSS & PIESKE, 2002). Desta forma, o trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  não responde ao aumento do potencial de ação com a retirada do  $\text{Na}^+$  e influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  durante a sístole. Tal incapacidade poderia ainda estar relacionada a uma alteração na expressão ou atividade da enzima  $(\text{Na}^+/\text{K}^+)\text{ATPase}$  (SHAMRAJ et al., 1993; SCHWINGER et al., 1999). Em diferentes modelos animais (utilizando cães, porcos, coelhos e ratos) de insuficiência cardíaca, o aumento da expressão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  foi detectado (O'ROURKE et al., 1999; LITWIN & BRIDGE, 1997; AHMMED et al., 2000; HOBAL & O'ROURKE, 2000; SIPIDO et al., 2000; POGWIZD et al., 2001). Em humanos já foi observado aumento na expressão do trocador em insuficiência cardíaca e

associado a isso uma redução na função diastólica ventricular (HASENFUSS et al., 1999). Todos esses estudos demonstram o aumento da expressão do trocador com intenções compensatórias, na tentativa de reparar o dano diastólico instaurado.

De maneira interessante alguns trabalhos tentam correlacionar alterações nos trocadores com as observadas na SERCA em diferentes estágios da insuficiência cardíaca. HASENFUSS & PIESKE (2002) calcularam a razão entre a expressão do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e a da SERCA na insuficiência cardíaca terminal. Observaram uma razão absoluta de três entre a expressão do trocador e da SERCA, atestando que em estágios finais da insuficiência cardíaca o trocador passa a assumir grande parte da responsabilidade na extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  quando comparado a SERCA (HASENFUSS & PIESKE, 2002). Ainda nesse contexto, e analisando diferentes estudos o autor identificou dois possíveis fenótipos para insuficiência cardíaca terminal: (1) aumento da expressão do trocador com expressão da SERCA inalterada e (2) expressão inalterada do trocador e redução na expressão da SERCA. No primeiro grupo, a função diastólica encontrou-se preservada (grande capacidade em eliminar o  $\text{Ca}^{2+}$ ) e a sistólica prejudicada (recaptação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o retículo é mínima); no segundo grupo uma reduzida capacidade em extrair e recaptar o  $\text{Ca}^{2+}$  foi observada gerando, portanto um quadro de intenso prejuízo sistólico e diastólico. Em ambos os casos, a função cardíaca tornou-se comprometida.

#### **1.4.3.b. Correlação entre proteínas cinases e insuficiência cardíaca**

É conhecido que a proteína cinase C (PKC) modula a função cardíaca através da fosforilação de proteínas do miofilamento como a troponina I (cTnI) e a proteína C de ligação a miosina (cMyBP-C). O resultado final gerado posterior a essa

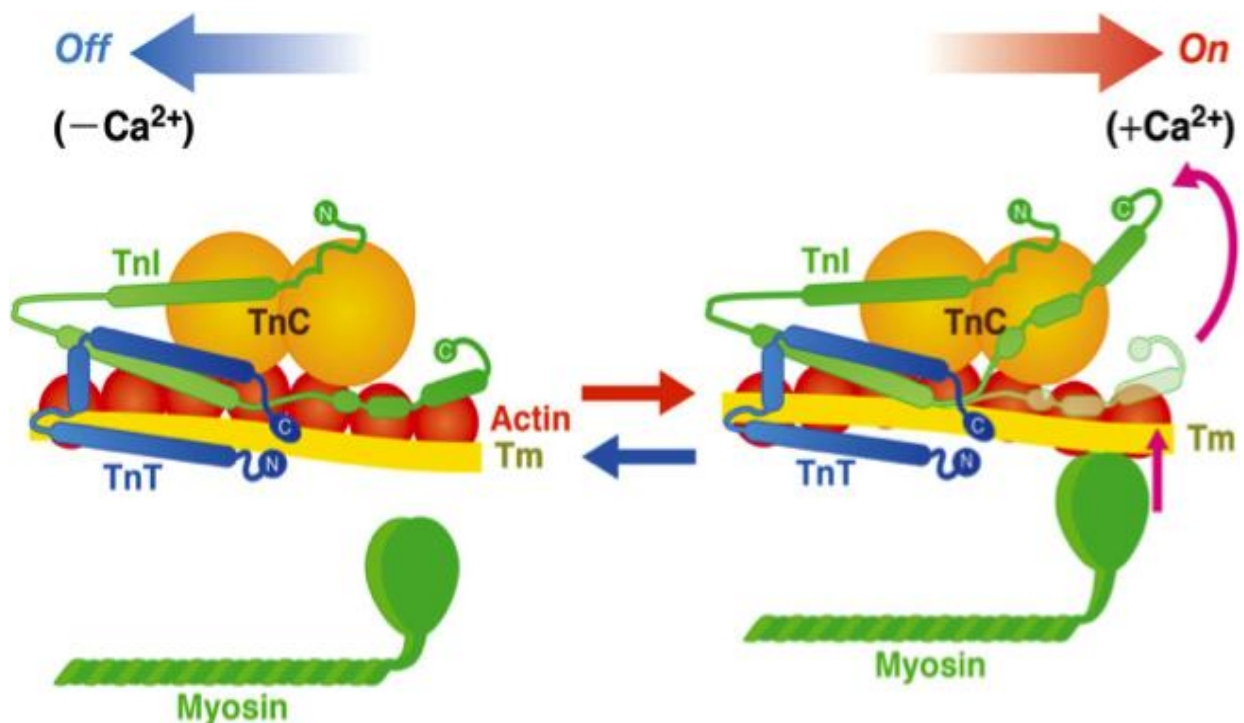
fosforilação parece ser diferente de acordo com o insulto que a gerou: compensatório ou patológico. Alguns estudos demonstram uma velocidade de encurtamento mais rápida e maior poder das fibras associada a um aumento na atividade da PKC gerando um efeito inotrópico positivo como mecanismo compensatório a alguma patologia (PI & WALKER, 2000; HUANG et al., 2001). Outros estudos demonstram um efeito inibitório sobre a contratilidade, com redução na atividade das ATPases das miofibrilas e atenuação da ativação exercida pela proteína cinase A (PKA), reduzindo em torno de 62% a produção de força pela miofibrila, sendo essa característica estabelecida como a causa dos eventos patológicos observados (NOLAND & KUO 1991; NOLAND et al., 1991; JIDEAMA et al., 1996; SUMANDEA et al., 2003; BELIN et al., 2007; HINKEN et al., 2012).

Da mesma forma, ainda não existe uma correlação clara entre a PKC (e suas diferentes isoformas) com as doenças cardiovasculares, e ainda entender quando elas atuam como causa ou consequência dessas doenças. LIU & MOLKENTIN (2010) demonstraram o aumento da expressão das PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  (isoformas de PKC da família clássica: dependentes de Ca<sup>2+</sup> e diacilglicerol, DAG) e PKC $\epsilon$  (isoforma de PKC da família “novel”: dependente apenas de DAG) com hipertrofia, cardiomiopatia dilatada, injúria isquêmica cardíaca e infarto do miocárdio. As isoformas de PKC  $\alpha$  e  $\beta$  são normalmente expressas em corações de fetos e neonatos sendo ausentes em corações adultos de ratos (BOWLING et al., 1999). Nesse contexto apenas em ratos adultos com hipertrofia cardíaca e diabetes a expressão dessa isoforma parece existir (INOBUCHI et al., 1992; WAKASAKI et al., 1997). Em relação à insuficiência cardíaca especificamente, já foi observado “*up-regulation*” da expressão das isoformas PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , and PKC $\epsilon$  (STRASSER et al., 1996; BOWLING et al., 1999; INOBUCHI et al., 2004) em ratos adultos. Em

corações humanos estudos demonstram a presença de expressão das isoformas PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I, PKC $\beta$ II, and PKC $\epsilon$ , entretanto, em corações insuficientes há um aumento dessa expressão e seguindo a análise, a atividade total das PKC citadas parece aumentar significativamente em estágio terminal da insuficiência cardíaca (BOWLING et al., 1999). Além disso, estudos demonstram aumento da atividade e expressão da isoforma PKC $\epsilon$  em corações de ratos com função de Frank-Starling deprimida (característica de insuficiência cardíaca) (MONTGOMERY et al., 2005, KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA et al., 2014). É importante ressaltar que a PKC $\epsilon$  já foi comprovadamente relacionada à fosforilação dos filamentos troponina I e troponina C cardíaca o que reduz a ativação do miofilamento e atenua a cooperatividade dos filamentos finos (SOLARO & RARICK, 1998). O aumento da expressão da isoforma PKC $\epsilon$  está associada também com redução na força máxima ativada pelo Ca<sup>2+</sup> e aumentada fosforilação da troponina I e troponina C, demonstrando uma relação intrínseca entre essa isoforma e defeitos contráteis observados na hipertrofia e insuficiência cardíaca (GOLDSPINK et al., 2004).

A estimulação  $\beta$  adrenérgica é o principal mecanismo fisiológico para aumento do inotropismo cardíaco (LAYLAND et al., 2005). Esse mecanismo se inicia com a ativação de receptores  $\beta$  adrenérgicos com elevação dos níveis de AMPc e ativação da PKA. Em relação à PKA, sabe-se que ela aumenta a atividade dos canais de Ca<sup>2+</sup> ativados por voltagem do tipo L nas células musculares cardíacas, fosforilando-os e elevando a concentração citossólica de Ca<sup>2+</sup> culminado com o aumento da força de contração cardíaca (KAMP & HELL, 2000). A PKA também tem como alvo a região N-terminal (Ser-23/24) das proteínas das miofibrilas - troponina I (cTnI), proteína C de ligação à miosina (cMyBP-C) e a titina (RAO et al., 2014). A troponina I é na realidade uma unidade inibitória do complexo de troponinas associado ao

filamento fino e inibe a interação entre a actina e a miosina quando os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares são mais baixos (diástole). Durante a sístole (com ativação da via adrenérgica e abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem) a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular aumenta, isso favorece a saída de mais  $\text{Ca}^{2+}$  do retículo endo(sarco)plasmático, induzindo a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  a troponina C (TnC). Tal ligação induz mudanças conformacionais que atenuam a influência inibitória da cTnI promovendo interação actomiosina (SOLARO, 2001; LAYLAND et al., 2005) (Figura 7).



**Figura 7: Estrutura das proteínas do filamento fino na ausência (off) e na presença (on) de  $\text{Ca}^{2+}$ .** Após a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  na troponina C (TnC), a região C-terminal da troponina I (TnI) dissocia da actina permitindo a movimentação da tropomiosina (Tm) e consequentemente, a ligação da miosina com a actina. Retirado de KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA et al., 2014.

Tanto a troponina I (TnI) quanto a troponina T (TnT) são passíveis de fosforilação pela PKA e PKC. A PKA parece atuar em condições fisiológicas, mantendo o correto inotropismo e cronotropismo cardíaco enquanto a PKC parece



atuar preponderantemente nessas proteínas em condições de doença cardíaca. Ambas, PKA e PKC, diminuem a produção de força cardíaca como resultado da fosforilação de diversos resíduos de aminoácidos dessas tropomiosinas com deslocamento do equilíbrio on-off para o estado off, contribuindo assim para o relaxamento (SOLARO & RARICK, 1998)

A maioria das estruturas observadas na Figura 5 é passível de fosforilação pela PKA. Além dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de membrana plasmática como já descrito, os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  de retículo sarcoplasmático (sensíveis a rianodina – RyR, e ao  $\text{IP}_3$ ) são fosforilados aumentando sua permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Ainda, o fosfolamban, proteína que regula negativamente a SERCA e a proteína C de ligação a miosina são passíveis de fosforilação (LAYLAND et al., 2005) completando o cenário intracelular que explica como a fosforilação da PKA, responsiva a estimulação beta adrenérgica, contribui para o efeito inotrópico positivo e o lusitropismo. A fosforilação do fosfolamban dependente de PKA, por exemplo, aumenta a captação de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do retículo sarcoplasmático, a fosforilação da cTnI (no resíduo de Ser22/23 em rato e Ser23/24 em humano) reduz a sensibilidade do miofilamento ao  $\text{Ca}^{2+}$  e aumenta a dissociação a partir da TnC, acelerando o relaxamento (JOHNS et al., 1997; HERRON et al., 2001; METZGER e WESTFALL, 2004) (Figura 7).

Alguns estudos demonstram que alterações na PKA geram modificações no estado normal de sístole e diástole cardíacos. SEQUEIRA e colaboradores (2013) demonstraram que a ativação dependente do comprimento (função de Frank-Starling) é reduzida em pacientes com cardiomiopatia hipertrófica e isso é acompanhado de um aumento na sensibilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$  e ainda reduzida

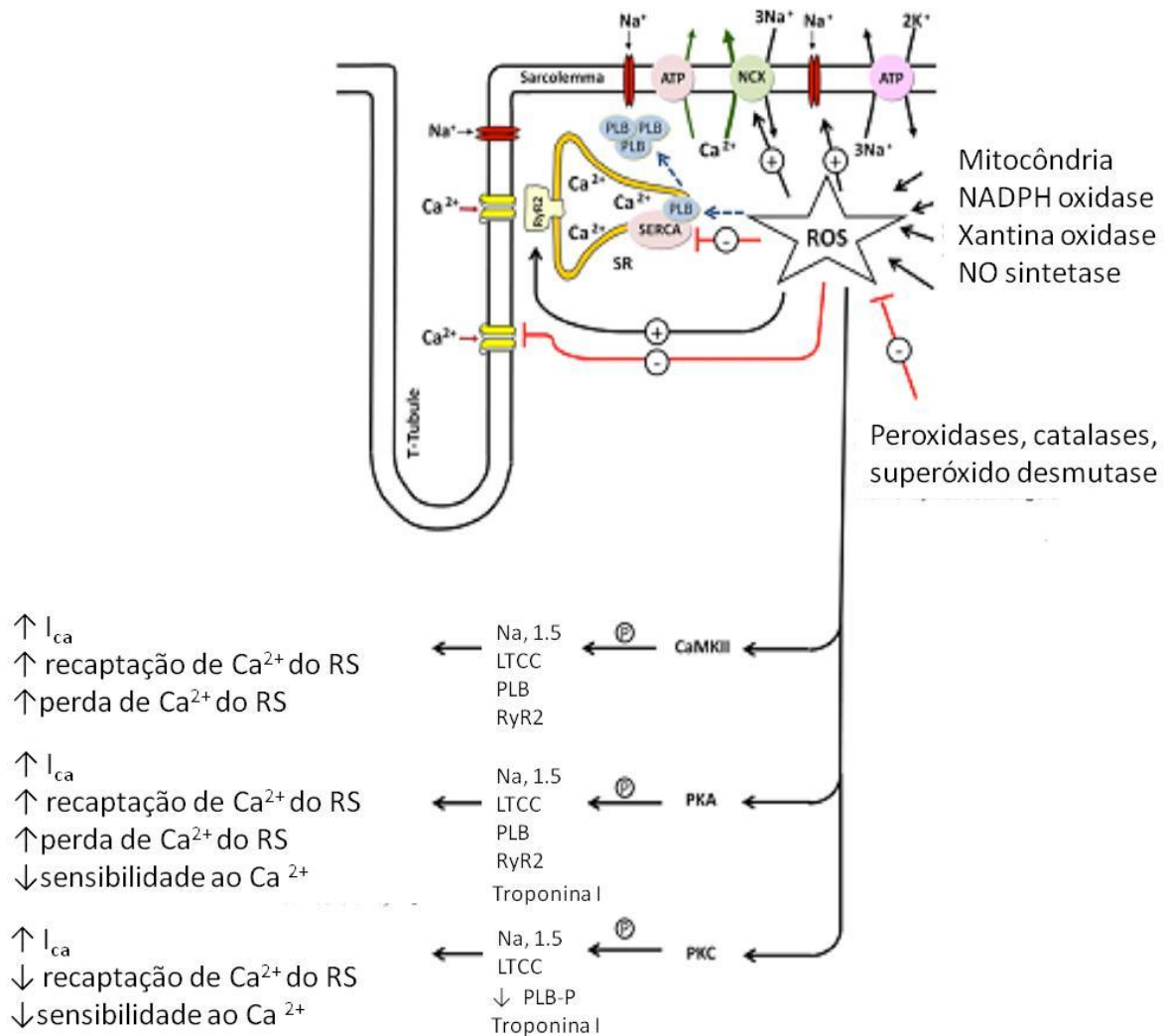
capacidade da PKA em fosforilar as proteínas do miofilamento (TnI e MyBP-C). Essa última característica também foi observada por HAN e colaboradores (2013) e pode estar relacionada à redução da insuficiência cardíaca (BODOR et al., 1997; VAN DER VELDEN et al., 2003). Tal redução na fosforilação pode aumentar a sensibilidade do miofilamento ao  $\text{Ca}^{2+}$  e prejudicar o ciclo das pontes cruzadas, assim como o relaxamento. Esse evento intracelular é detectado quando se compara miocárdios insuficientes com normais, por exemplo McCONNELL e colaboradores (1998) mostraram uma redução da sensibilidade dos miofilamentos ao  $\text{Ca}^{2+}$  induzida por aumento na atividade da PKA.

#### **1.4.3.c. Proteínas cinases como alvo de espécies reativas de oxigênio na lesão cardíaca**

Os radicais livres são agentes oxidantes gerados como um resultado do metabolismo oxidativo e possuem, pelo menos, um elétron não-pareado que o torna uma espécie reativa (OCHSENDORF, 1999; HOOL, 2006; HECK et al., 2010). Em organismos aeróbicos eles são inevitáveis como produtos da redução do  $\text{O}_2$  na cadeia respiratória mitocondrial e por sistemas enzimáticos como as NADPH oxidases e xantina oxidases (BOVERIS et al., 1972; IDE et al., 1999; LASSEGUE et al., 2012). Dependendo do número de elétrons transferido diversos intermediários podem ser gerados como o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (KÖHLER et al., 2014). Para prevenir o dano oxidativo existem alguns sistemas de tamponamento como a superóxido desmutase, catalase, vitaminas e flavonóides (MARTINDALE & HOLBROOK, 2002). Em condições fisiológicas a produção de ROS e a capacidade desses sistemas estão balanceadas (KÖHLER et al., 2014). Um aumento moderado no ROS pode alterar a expressão ou função

protéica. Isso pode soar positivamente como observado em condições adaptativas na isquemia e reperfusão cardíaca (SANTOS et al., 2011). Entretanto, quando o equilíbrio é extensamente deslocado (inserção exógena de ROS - terapia antineoplásica – ou aumento endógeno – insuficiência cardíaca), o sistema antioxidante pode não prevenir o dano oxidativo, afetando proteínas, lipídios e DNA induzindo apoptose (THANNICKAL & FANBURG, 2000; MARTINDALE & HOLBROOK, 2002; SEDDON et al., 2007).

Em cardiomiócitos o estresse oxidativo é capaz de gerar hipertrofia, fibrose, apoptose e inflamação, levando inclusive a prejuízos no acoplamento excitação-contracção cardíaco (PRACYK et al., 1998; MAACK et al., 2003; SATOH et al., 2006; WANG et al., 2010; TSAI et al., 2012). Além disso, pode levar a danos na neurotransmissão simpática com alterações em suas vias de sinalização: homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$  e proteínas cinases (GÜNES et al., 2005; RUNGSEESANTIVANON et al., 2010; SHI et al., 2010) (Figura 8).



**Figura 8: Influência das ROS no acoplamento excitação-contracção em várias vias.** aumento da função do receptor de rianodina (RyR) e do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  e redução da SERCA e canais de  $Ca^{2+}$ . As proteínas cinases são a princípio ativadas pelas espécies reativas de oxigênio, mas isso ainda não é claro. Adaptado de KÖHLER et al., 2014.

Em relação à SERCA, sabe-se que em sua estrutura existem sítios altamente reativos e propensos a oxidação (MURPHY, 1976). Sistemas geradores de radicais livres (dihidrofumarato e ferro) inibem a função da SERCA 2a enquanto agentes redutores (superóxido desmutase) são capazes de reverter essa inibição (SCHERER & DEAMER, 1986; KUKREJA et al., 1988). Em contraste, outros estudos mostram que as proteínas cinases (PKA e calmodulina cinase) podem ser ativadas por oxidação e como fosforilam o fosfolamban (proteína que regula

negativamente a SERCA) acabam por aumentar a atividade da enzima, gerando assim um evento contrabalanceador (MORRIS & SULAKHE, 1997). Alguns estudos mostram uma significativa inibição da atividade da PMCA em condições de estresse oxidativo aumentado (ZAIDI & MICHAELIS, 1999; ZAIDI et al., 2003). O trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  quando na presença de altas concentrações de ROS (peróxido de hidrogênio) apresenta atividade aumentada tanto em células isoladas quanto em vesículas (REEVES et al., 1986; GOLDBERGER, 1996); entretanto reduzida atividade quando na presença de oxidantes fortes como o hipoclorito (KATO & KAKO, 1988).

Especialmente as proteínas cinases tem sido associadas a geração de radicais livres com dano oxidativo celular (VIEIRA-FILHO et al., 2011). Sabe-se que a PKA tem sua atividade aumentada na presença de ROS e isso é acompanhado de um aumento na sua capacidade fosforilativa. BRENNAN e colaboradores (2006) mostraram que ao oxidarem a PKA suas proteínas alvo foram mais fosforiladas e ao diminuir a oxidação as mesmas proteínas mostraram-se menos fosforiladas. A PKC parece ter um papel dual frente a situações de estresse oxidativo. GOPALAKRISHNA & ANDERSON (1989) observaram que as isoformas das PKC ativadas por  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolipídios são reduzidas em atividade sobre estresse oxidativo leve. Ao contrário, a atividade da PKC independente de  $\text{Ca}^{2+}$  e fosfolipídios mostrou-se aumentada, gerando incertezas sobre qual isoforma esse mecanismo se aplica (GOPALAKRISHNA & ANDERSON, 1989; KÖHLER et al., 2014)

### **1.5. O coração como órgão alvo da desnutrição**

Como relatado acima, a desnutrição ocasionada em janelas críticas do desenvolvimento (da gestação aos primeiros cinco anos de vida) deixa marcas

irreversíveis que se manifestaram na vida adulta, e que podem afetar as gerações futuras (PESSOA et al., 2000). Ambos os tipos de desnutrição pré e pós-natal ocasionadas pela DBR impactam a homeostasia do sistema cardiovascular (SILVA et al, 2014a; SILVA et al, 2014b; VIEIRA-FILHO et al., 2014). A maioria dos estudos aborda as consequências da deficiência de proteínas durante a gravidez na função cardíaca da prole. Neste contexto, destaca-se o estudo de CHEEMA e colaboradores (2005) que mostraram que a prole apresenta diminuição do débito cardíaco e diminuição das velocidades máximas de contração e relaxamento, aumento da pressão diastólica final ventricular e apoptose dos cardiomiócitos. Logo em seguida, foi proposto um novo conceito chamado “predictive adaptive response” (resposta adaptativa preditiva) que se refere às respostas adaptativas ativadas durante o período de desnutrição fetal que são imediatamente benéficas para a sua sobrevivência, mas os efeitos em longo prazo destas adaptações podem ser deletérias se o ambiente pós natal não se relacionar com aquele pré-natal. Desta forma, foram observados hipertensão, hipertrofia da aorta, falência renal, alteração do sistema renina angiotensina cardíaco (CLEAL et al., 2007). Apesar de já estar fora da janela crítica de desenvolvimento, a desnutrição durante o período pós-natal também causa alterações moleculares que geram um coração sobrecarregado por uma hiperestimulação simpática (MURÇA et al., 2012) e alterações elétricas cardíacas (SILVA et al., 2014a).

Diferentes tipos de desnutrição têm sido associados a aumento na concentração de catecolaminas circulantes (LANGLEY-EVANS et al., 1996; PETRY et al., 2000; VICKERS et al., 2000; LANGLEY-EVANS, 2001; LANGLEY-EVANS, 2009) e à dessensibilização dos receptores  $\beta$ -AR. FERNANDEZ-TWINN e colaboradores (2006) demonstraram aumento na expressão dos  $\beta_1$ AR cardíacos em

ratos gerados por mães alimentadas com dietas de baixa proteína. Em seu trabalho foi constatado também a perda de sensibilidade dos  $\beta$ -AR ao isoproterenol bem como aumento da expressão da proteína  $\beta$ -arrestina responsável pela dessensibilização do adrenoceptor (FERNANDEZ-TWIN et al., 2006). O mesmo também foi observado em animais com restrição alimentar de curta e longa duração (KLEBANOV et al., 1997). Além disso, foi detectado o aumento da expressão de  $\beta_2$ AR em fêmeas advindas de mães desnutridas (LANGLEY-EVANS et al., 2008). ZOHDI e colaboradores (2011) observaram responsividade cardíaca e vascular reduzida a dobutamina em animais adultos submetidos à desnutrição durante o desenvolvimento precoce (gestação e lactação).

Embora haja consenso que a deficiência protéica em alguma etapa do desenvolvimento dispare uma resposta simpática sobrecarregando a função cardíaca, os mecanismos moleculares são pouco conhecidos. A hipertrofia cardíaca observada na desnutrição parece estar associada à ativação da PKC clássica  $\alpha$  (CHU et al., 2008; WANG et al., 2012). WATKINS & SINCLAIR (2014) demonstraram a redução de genes envolvidos com a sinalização do  $Ca^{2+}$  em miócitos cardíacos da prole advinda de machos submetidos ao nível subótimo de nutrição. Tal achado indica que a desnutrição pode alterar mecanismos chave para a regulação do  $Ca^{2+}$  intracelular no coração.

## **1.6. Resultados preliminares que geraram a hipótese desta tese**

Em relação aos danos cardiovasculares no trabalho com a dieta DBR em duas janelas do desenvolvimento (intrauterino [DBR-IU] e crônico [DBR-CR]) realizado durante o mestrado, foram detectadas diferentes respostas adaptativas nos ratos adultos. Foi observado que os ratos adultos DBR-CR e DBR-IU apresentam um

aumento de pressão sistólica e redução do débito cardíaco. Entretanto, apenas no grupo DBR-CR observou-se o aumento da pressão sistólica, do índice cardíaco e pulmonar além da redução da fração de ejeção e do volume sistólico. Utilizando microssomas cardíacos, observamos alterações de proteínas envolvidas na homeostasia intracelular do íon  $\text{Ca}^{2+}$  devido à: (a) diminuição da atividade da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de retículo sarco/endoplasmático (SERCA) nos grupos DBR-CR e DBR-IU; (b) aumento da atividade e reduzida expressão da  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase de membrana plasmática (PMCA) no DBR-CR e diminuição da expressão de PMCA no DBR-IU; (c) aumento da expressão de fosfolamban e FKBP12, proteínas reguladoras de SERCA e do canal de  $\text{Ca}^{2+}$  apenas no grupo DBR-CR.

Dessa forma, a hipótese de trabalho desta tese de doutorado é que a desnutrição multifatorial ocasionada pela DBR ativa mecanismos moleculares dependentes da etapa do desenvolvimento em que ocorreu a desnutrição que aumenta o esforço cardíaco, provocando no animal jovem a insuficiência cardíaca.



## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o impacto da desnutrição promovida pela dieta básica regional em dois períodos de desenvolvimento – intrauterino e crônico – sobre função cardíaca no rato Wistar adulto; correlacionando com alterações na maquinaria subcelular envolvida na homeostasia de  $\text{Ca}^{2+}$  e na via de sinalização  $\beta$  adrenérgica. Além disso, um segundo objetivo foi explorar a possibilidade da reversão da falência cardíaca induzida pela desnutrição através do tratamento com o  $\beta$  bloqueador propranolol.

### 2.1. Objetivos Específicos

1. Avaliar o impacto da desnutrição sobre os parâmetros morfométricos do coração e dos principais órgãos afetados pela falência cardíaca.
2. Identificar áreas isquêmicas no coração dos ratos submetidos à desnutrição.
3. Avaliar a função cardíaca sistólica e diastólica dos ratos jovens submetidos a desnutrição.
4. Delinear a relação pressão vs volume, através das curvas de Frank-Starling dos ratos jovens submetidos a desnutrição comparando com os ratos controle.
5. Determinar se o tratamento em longo prazo com o propranolol impede as marcas na função cardíaca deixadas pela desnutrição.
6. Identificar processos de estresse oxidativo lipídico e protéico no coração dos ratos submetidos à desnutrição.
7. Determinar se as alterações na sinalização  $\beta$  adrenérgica impactadas pela desnutrição são revertidas no tratamento em longo prazo com o propranolol.
8. Determinar se o propranolol recupera a homeostasia intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  e da via de sinalização associada durante o processo de desnutrição.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais e tratamento com propranolol.

Ratos Wistar machos, foram mantidos em ambiente a temperatura constante ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ), no ciclo padrão claro/escuro (12 h/12 h), com livre acesso a água filtrada e ração. Foram utilizados nos experimentos 131 ratos divididos aleatoriamente em seis grupos descritos abaixo. Durante o período do estudo houve uma perda de 25% dos ratos criados sendo a maior parte das perdas no grupo desnutrido cronicamente sem tratamento.

1. Desnutrição intrauterina (DBR-IU): as mães se alimentaram da dieta DBR durante o período gestacional. Após o nascimento, os ratos foram alimentados de mães normonutridas e após o desmame foram submetidos à dieta convencional.

2. Desnutrição intrauterina associada ao tratamento com propranolol (DBR-IUp): mesmo grupo descrito anteriormente, sendo os ratos tratados com propranolol adicionado a água de beber na dose de 30 mg/kg após o desmame.

3. Desnutrição crônica (DBR-CR): logo após o desmame foi introduzida a dieta DBR.

4. Desnutrição crônica associada ao tratamento com propranolol (DBR-CRp): mesmo grupo descrito anteriormente, sendo os ratos tratados com propranolol adicionado a água de beber na dose de 30 mg/kg após o desmame.

5. Controle (CTRL): onde os ratos provenientes da prole de mães normonutridas e alimentados com dieta comercial balanceada.

6. Controle tratado com propranolol (CTRLp): mesmo grupo descrito anteriormente, sendo os ratos tratados com com propranolol adicionado a água de beber na dose de 30 mg/kg (DBR-IUp) após o desmame.

O número de ratos (n) de cada grupo experimental será descrito em cada metodologia descrita a seguir. Quando os ratos, de todos os grupos experimentais, atingiram 13 semanas de vida onde são considerados adultos jovens foram eutanasiados por decapitação. O protocolo de manipulação destes animais foi realizado segundo as normas de boas práticas e aprovadas pela comissão de ética para o uso de animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-DFBCICB 007).

### **3.2. Dieta**

Os ratos do grupo CTRL foram alimentados com uma dieta balanceada disponível comercialmente (Purina Agriband, Paulínia, SP, Brasil), seguindo os padrões de formulação recomendados pelo Instituto Americano de Nutrição (AIN-93).

A dieta DBR foi preparada conforme inicialmente descrito por TEODÓSIO e colaboradores (1990) baseada em pesquisas epidemiológicas conforme descrito na introdução e composta dos seguintes ingredientes (g %): feijão (18), farinha de mandioca (65), carne de charque (3,7) e batata doce (13). Cada um destes componentes foi cozido, sendo a carne de charque foi ainda parcialmente dessalgada, desidratados a 60 °C, moídos e misturados a gordura da carne (0,3 g %). Posteriormente, foi adicionada água até se obter uma massa consistente. A massa foi moldada em formato de quadrados que foram desidratados a 60 °C por 24 h. Nenhum suplemento foi adicionado à dieta, sendo isocalórica quando comparada a dieta CTRL.

A composição da DBR e da dieta CTRL estão apresentadas na Tabela 2. A dieta multicarenciada foi validada em experimentos anteriores que mostraram um acentuado decréscimo da evolução ponderal dos ratos DBR ao longo da vida após o desmame.

**Tabela 2:** Composição (g%) da DBR<sup>1</sup> e da dieta CTRL (retirado da tese de doutorado de Paulo André da Silva submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Fisiologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014).

Componentes	CTRL	DBR
Proteínas	23	8
Carboidratos	44	69
Gorduras	2	1
Fibras	7	8
Minerais:		
Ca <sup>2+</sup>	1,8	0,9 <sup>2</sup>
Mg <sup>2+</sup>	0,3	0,4 <sup>2</sup>
K <sup>+</sup>	1,15	0,54 <sup>2</sup>
Na <sup>+</sup>	0,2 – 0,4 <sup>3</sup>	0,2 – 0,4 <sup>3</sup>
Kcal/100g	≈ 295	≈ 320

<sup>1</sup>Modificado de TEODÓSIO et al., 1990

<sup>2</sup>Comunicação pessoal Carmen Castro-Chaves, UFPE.

<sup>3</sup>Determinação por fotometria de chama em amostras de dietas escolhidas randomicamente.

### 3.3. Avaliação do conteúdo de água retida nos órgãos

Após a eutanásia, os ratos foram pesados e os órgãos alvo para o estudo (coração, pulmão e fígado) removidos e pesados (peso úmido). Posteriormente os órgãos foram alocados em estufa a 60 °C e pesados sequencialmente até que se obtivesse valores de peso constante (peso seco). O conteúdo percentual de água presente em cada órgão foi calculado a partir da fórmula:  $(\text{peso seco}/\text{peso úmido}) \times 100$ . O número de ratos utilizados foi de 5 para cada grupo.

### **3.4. Análise Histológica**

Após a eutanásia dos ratos, o coração foi cortado longitudinalmente em 2 partes e fixado em formaldeído a 10% em solução de tampão fosfato (relação volume do coração – volume do fixador 1:20) durante 24 h. O tecido foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (de 70 até 100%) sendo cada etapa de desidratação com duração de 45 min. Em seguida, procedeu-se o clareamento, que é a substituição do agente desidratante pelo xileno, preparando o tecido para a penetração da parafina (inclusão). A inclusão ocorreu de forma gradativa (xileno-parafina: 1:1, 1:2 – 40 min, cada etapa – e parafina pura por 1 h a 60 °C). Finalmente, foi realizada a fabricação do bloco sólido utilizando moldes metálicos nos quais foram colocadas as amostra embebidas com parafina líquida para resfriamento rápido e consequente solidificação. O tecido foi então seccionado em micrótomo (modelo MRP-03, Lupe Indústria e Comércio Ltda.) cuja espessura foi de 5 µm e as laminas preparadas.

Após o preparo das laminas os cortes foram corados para a visualização do tecido ao microscópio de luz. A coloração escolhida foi o Tricrômica de Masson para a visualização das fibras musculares e detecção de elementos fibrosos à base de colágenos. Para isso, os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em

soluções aquosas de etanol, clareados em xileno, corados, adicionados de algumas gotas de meio de montagem (entellan) e cobertos com uma lamínula. Tal técnica foi realizada em colaboração com o Laboratório de Patologia Celular e Laboratório de Proliferação e Diferenciação Celular (ICB e IBCCF – UFRJ).

As lâminas dos tecidos cardíacos corados com Tricrômico de Masson foram observadas em microscópio óptico com aumento de 20X (Eclipse 400, Nikon, Tokyo, Japan) e as imagens capturadas por câmera fotográfica digital (Evolution Media Cybernetics Inc., Bethesda, MD, USA). Cinco campos aleatórios de cada lâmina foram fotografados, de forma que foram observadas para cada coração 4 lâminas, sendo que cada grupo experimental era composto de 3 animais. A área muscular foi quantificada pelo programa Image J (disponível no site [www.rsb.info.nih.gov/ij](http://www.rsb.info.nih.gov/ij)). A porção muscular, correspondente a porção avermelhada, foi selecionada e quantificada através da seleção de todas as porções com a mesma coloração. Posteriormente as áreas obtidas ( $\mu\text{m}^2$ ) foram usadas para cálculo da média e erro padrão e representadas graficamente.

### **3.5. Ensaios *ex vivo***

Com o intuito de se avaliar a atividade cardíaca basal e a sua responsividade ao agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol (ISO), foram realizados ensaios em coração isolado utilizando a técnica de Langendorff. Uma vez heparinizados e sacrificados por inalação de  $\text{CO}_2$ , os corações dos ratos (5 corações para cada grupo experimental) foram retirados e canulados pela aorta. Foram submetidos à perfusão retrograda a uma taxa constante de 10 mL/min com meio de Krebs (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,2 mM,  $\text{MgSO}_4$  1,2 mM,  $\text{CaCl}_2$  1,25 mM, glicose 11 mM,  $\text{NaHCO}_3$  25 mM) equilibrado com 95% de  $\text{O}_2$  / 5% de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. Um balão de

látex foi inserido no ventrículo esquerdo através da válvula mitral e conectada a um transdutor de pressão (PowerLab System, ADInstruments, Sidney, Austrália) para registro contínuo da pressão no ventrículo esquerdo. O coração foi imerso em uma cuba e a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) ajustada para 10 mmHg. Após 30 min de estabilização os parâmetros funcionais foram registrados na ausência (valores de base) e presença de crescentes concentrações de ISO ( $3 \times 10^{-10}$  a  $10^{-6}$  M). A pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo (PDVE) foi calculada pela diferença entre os picos de pressão sistólica e PDFVE. Nesse contexto, parâmetros cinéticos como afinidade do agonista pelo  $\beta$ -AR ( $CE_{50}$  – concentração do agonista necessária para alcançar metade do efeito máximo possível) e efeito máximo ( $E_{max}$  – efeito máximo alcançado pelo agonista através da curva concentração-resposta) foram avaliados. Para avaliar a relação pressão-volume, o volume do balão no ventrículo esquerdo foi ajustado para uma variação na pressão diastólica final de 0 mmHg. Incrementos de volume de 20  $\mu$ L foram adicionados e a cada incremento a variação de pressão foi registrada (Adaptado de EUN-JEONG et al., 2010). Nesse contexto o  $V_0$  (volume necessário para que haja uma primeira variação da pressão diastólica) foi calculado por regressão linear. Para cálculo dos parâmetros cinéticos,  $CE_{50}$  foi utilizada a equação da curva:  $Y=100/(1+10^{(LogEC50-X)*HillSlope})$  onde o coeficiente de Hill foi de  $1,5 \pm 0,3$ .

### **3.6. Observação da área isquêmica cardíaca**

Após o processo de perfusão com meio de Krebs, utilizando o aparato de Langendorf, os corações ( $n = 3$ , para cada grupo experimental) foram divididos em 3 fragmentos do ápice até a base e incubados com 1% de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) por 5 min a  $37^{\circ}C$  (MARQUES-NETO et al., 2014). O TTC cora em vermelho

escuro as porções teciduais que contêm o sistema de enzimas desidrogenases intactas. Áreas recentemente necrosadas e infartadas não possuem atividade das enzimas desidrogenases e, portanto não são coradas, apresentando-se esbranquiçadas (FISHBEIN et al., 1981). Após 5 min, os fragmentos foram alocados em tubos falcon onde permaneceram imersos em solução de formaldeído 10% (v/v) por 24 h para melhorar o contraste entre as áreas saudáveis e infartadas.

### **3.7. Obtenção da preparação de ultracentrifugado total ventricular**

Para investigar a ocorrência de alterações da homeostasia intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  foram obtidos o homogeneizado total de ventrículos de ratos (Adaptado de SCARAMELLO et al., 2002). Os corações (n = 10 para cada grupo experimental) foram retirados, sendo imediatamente imersos em solução de Tyrode gelada contendo NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM;  $\text{NaHCO}_3$  11,9 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,36 mM; glicose 5,55 mM;  $\text{CaCl}_2$  1,77 mM e  $\text{MgCl}_2$  0,40 mM (pH 7,4). Em seguida, os ventrículos foram dissecados, fragmentados e homogeneizados em solução gelada (6 mL por mg de tecido) contendo: sacarose 250 mM, DTT 2 mM, PMSF 0,2 mM, antipaína 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , aprotinina 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , EDTA 1 mM e Tris-HCl 5 mM (Meio de homogeneização) (pH 7,4). O homogeneizado total foi obtido através de 3 ciclos de 13.500 RPM por 10 s com 20 s de pausa entre os ciclos usando um homogeneizador Ultra-Turrax (T25 IKA Labortechnik, Staufen, Germany). Em seguida, o homogeneizado total foi submetido a uma centrifugação de 100.000 g por 1 h. O precipitado foi ressuspensão e armazenado em  $\text{N}_2$  líquido (QUINTAS et al., 2000). A concentração de proteína destas frações foi medida empregando-se o método de Lowry (LOWRY et al., 1951), usando-se albumina sérica bovina como



padrão. O teor de proteína da amostra foi estimado pela equação da reta de regressão linear dos padrões e expresso em mg de proteína.mL<sup>-1</sup>.

### **3.9. Medida das atividades Ca<sup>2+</sup>-ATPásica total, Ca<sup>2+</sup>-ATPásica de retículo endo(sarco) plasmático (SERCA) e Ca<sup>2+</sup>-ATPásica de membrana plasmática (PMCA)**

As preparações biológicas (0,2 mg/mL de proteína) foram incubadas a 37 °C por um período de 1 h em um meio contendo: HEPES-Tris 50 mM (pH 7,4), NaN<sub>3</sub> 10 mM, EGTA 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, KCl 60 mM, Ca<sup>2+</sup> livre (10 μM), ATP-Na<sup>+</sup> 1 mM e [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 cpm/nmol de ATP). A reação foi finalizada pela adição de 1 mL de uma suspensão gelada de carvão ativado com HCl 0,1 N seguida de centrifugação a 1500 g por 15 min a 4 °C. A atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica total foi calculada subtraindo-se a atividade basal (na presença EGTA 0.2 mM) da atividade ATPásica medida na presença de 10 μM de Ca<sup>2+</sup> livre (SCARAMELLO et al., 2002). A atividade da SERCA foi calculada pela diferença entre a atividade Ca<sup>2+</sup>-ATPásica total e a atividade da PMCA, medida na presença de 3 μM de tapsigargina (Tg; inibidor específico de SERCA).

### **3.10. Atividade da proteínas cinases C e A (PKC e PKA)**

150 μg de histona foram adicionados em um meio de reação contendo 20 mM de HEPES-Tris (pH 7,0), 4 mM MgCl<sub>2</sub> e 70 μg da preparação de homogeneizado ventricular total. A reação foi disparada com adição de 10 μM de ATP [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] (atividade específica ~ 1,5x10<sup>11</sup> Bq/mmol). Após 5 min a reação foi parada com adição de 100 μL de ácido tricloroacético 40%. Uma alíquota de 0,1 mL foi retirada e filtrada em filtro milipore com poro de 0,45 μm de tamanho. Posteriormente os filtros

foram lavados com solução gelada de TCA 20% e tampão fosfato 0,1 M (pH 7). A radioatividade incorporada à histona foi quantificada em cintilação líquida. A atividade específica de cada proteína cinase foi calculada pela diferença entre os níveis de fosfato incorporados na histona por mg de tecido na ausência e na presença dos inibidores específicos (10 nM PKAi<sub>5-24</sub> –inibidor de PKA; 10 nM de calfofostina C – inibidor das isoformas de PKC dependentes de DAG) (VALVERDE et al., 2011).

### 3.11. Fosforilação regulatória da PMCA

A fosforilação regulatória da PMCA foi determinada como previamente descrito (MUZI-FILHO et al., 2013). 100 µg de homogeneizado ventricular total foram incubadas em um meio de reação contendo 50 mM de HEPES-Tris (pH 7,4), 0,5 mM de ouabaína, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 10 mM de NaN<sub>3</sub>, 10 mM de NaF, 0,3 mM de EGTA, 0,31 mM CaCl<sub>2</sub> (10 µM de Ca<sup>2+</sup> livre) a 37 °C. A reação foi iniciada com adição de uma mistura contendo 5 mM [γ-<sup>32</sup>P] (atividade específica ~3,0 × 10<sup>11</sup> Bq/mmol) e 120 mM de KCl (concentração final). Após 10 min, a reação foi parada com 50 mL de tampão de amostra, submetida à separação de proteínas com SDS-PAGE (6% bis-acrilamida/acrilamida) e as proteínas transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Estas membranas foram expostas por 48 h a uma tela sensível a radiação (phosphor screen) e analisadas usando o Phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics) para medir a intensidade da banda de 140 KDa correspondente a PMCA fosforilada detectada com anticorpo primário específico para a mesma. Para determinar o nível de fosforilação mediada por cada proteína cinase, inibidores específicos foram adicionados: 10 nM PKAi<sub>5-25</sub>, para bloquear a atividade da PKA ou 10 nM calfofostina C para garantir a inibição das isoformas de

PKC dependentes de DAG. Os níveis de fosforilação mediada por proteína cinase foram calculados pela diferença entre a intensidade das bandas obtidas com a fosforilação total e na presença do seu inibidor específico. Uma vez que o seu conteúdo protéico de PMCA é diferente entre os ratos CTRL e DBR, os resultados foram normalizados pela densitometria da banda de 140 KDa.

### **3.12. Eletroforese e imunodeteção**

Para análise do conteúdo protéico dos diferentes constituintes do homogeneizado ventricular total foram realizados ensaios de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo o método de LAEMLI (1970). 60 µg de proteína foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As membranas foram bloqueadas por 60 min em solução de bloqueio [TBS (2,42 g de Tris e 8 g de NaCl diluídas por L de água, pH 7,6) contendo 0,5% de Tween 20 (TBS-T) e leite em pó 5%] por 60 min, à temperatura ambiente, sob leve agitação. Em seguida, a membrana foi pré-incubada durante 60 min com anticorpos primários específicos contra as proteínas a serem identificadas (anticorpo IgG policlonal anti PKC  $\alpha$  na diluição de 1:500, IgG policlonal anti PKC  $\epsilon$  na diluição de 1:500, IgG policlonal anti receptor  $\beta$ 1AR na diluição de 1:1000, IgG policlonal anti PKA na diluição 1:200, IgG monoclonal anti trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  na diluição de 1:1000). Após esta etapa a membrana foi lavada 3 vezes com TBS-T sob leve agitação (durante 15, 5 e 5 min). Em seguida, a membrana foi incubada a temperatura ambiente por 60 min com anticorpos secundários fluorescentes (IgG de camundongo ou coelho), diluídos em TBS (1:10000) em vasilhames protegidos da luz, recobertos com papel laminado. Passado o tempo de incubação, a membrana foi então lavada novamente com TBS-T. As bandas imunomarcadas pelos

diferentes anticorpos primários foram reveladas utilizando-se o scanner Odyssey CLx Infrared Imaging System (Li-cor Inc, United Kindom). A intensidade das bandas protéicas imunomarcadas foi analisada pelo programa Scion (versão alfa 4.0.3.2). O controle de carregamento utilizado foi a densitometria do conteúdo de proteína total detectado com vermelho de Ponceu, uma vez que a desnutrição afeta o conteúdo de proteínas do citoesqueleto.

### **3.13. Quantificação do stresse oxidativo**

#### **3.13.1. Medida dos níveis de TBRs**

A técnica baseia-se na propriedade do ácido tiobarbitúrico (TBA) em reagir com o malondialdeído (MDA) que é um produto secundário da peroxidação lipídica, derivado da ruptura de ácidos graxos poliinsaturados. O MDA ao reagir com TBA forma um cromógeno de cor rosa fluorescente capaz de ser lido em espectrofotômetro (VASCONCELOS et al., 2007)

Os níveis de espécies reativas de ácido 2-tiobarbitúrico (TBARs) foram avaliados de acordo com a metodologia descrita por VIEIRA-FILHO e colaboradores (2011). Inicialmente os ventrículos foram homogeneizado em 5 mL de KCl 1,15% por g de tecido em gelo. Para cada mL do homogeneizado foi adicionado 1 mL de ácido tiobarbitúrico 0,38% (p/v) em TCA 15% (p/v). Os tubos foram selados e aquecidos à 100 °C por 15 min. Após resfriamento, os tubos foram centrifugados por 10 min à 1500 g, e a absorbância do sobrenadante foi medida a 535 nm.

#### **3.13.2. Dosagem de sulfidrilas livres**

A dosagem de grupamentos sulfidrilas foi realizada de acordo com Ellman com modificações (ELLMAN, 1956; HERKEN et al., 2009) onde as preparações biológicas foram incubadas em metanol e solução tampão pH 8,2 (EDTA 0,02 M, Tris 0,2 M). O início da reação ocorreu com a adição de DTNB [5,5'- ditio-bis(2-nitrobenzóico)] 0,01 M (diluído em metanol absoluto) e progrediu durante 30 min à temperatura ambiente. Passado o tempo os tubos foram centrifugados a 3000 g por 15 min. Uma alíquota do sobrenadante foi então retirada e lida em espectrofotômetro a 412 nm. A cisteína foi utilizada como padrão, a curva padrão utilizou concentrações de 5 à 100 µM de cisteína. Tal ensaio se baseia na reação entre as sulfidrilas reduzidas da proteína com o reagente DTNB com consequente liberação de ácido tionitrobenzóico, o qual apresenta coloração amarelada. A concentração de sulfidrilas livres é calculada por mg de proteína (MUZI-FILHO et al., 2013) Quanto maior o teor de sulfidrilas reduzidas menor as livres. O conteúdo de sulfidrilas livres é, portanto, inversamente relacionado com o dano oxidativo uma vez que os grupamentos sulfidrilas representam os mais frequentes antioxidantes do organismo (PÉREZ et al., 2012)

### **3.14. Análise estatística**

Os dados foram apresentados sob a forma de média  $\pm$  EPM de pelo menos 3 experimentos. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância (One-Way ANOVA) utilizando o programa computacional Primer (McGraw Hill version 1.0) e a significância aceita de  $p < 0.05$ . Os resultados foram representados graficamente através dos programas de computador Sigma Plot 9.0.

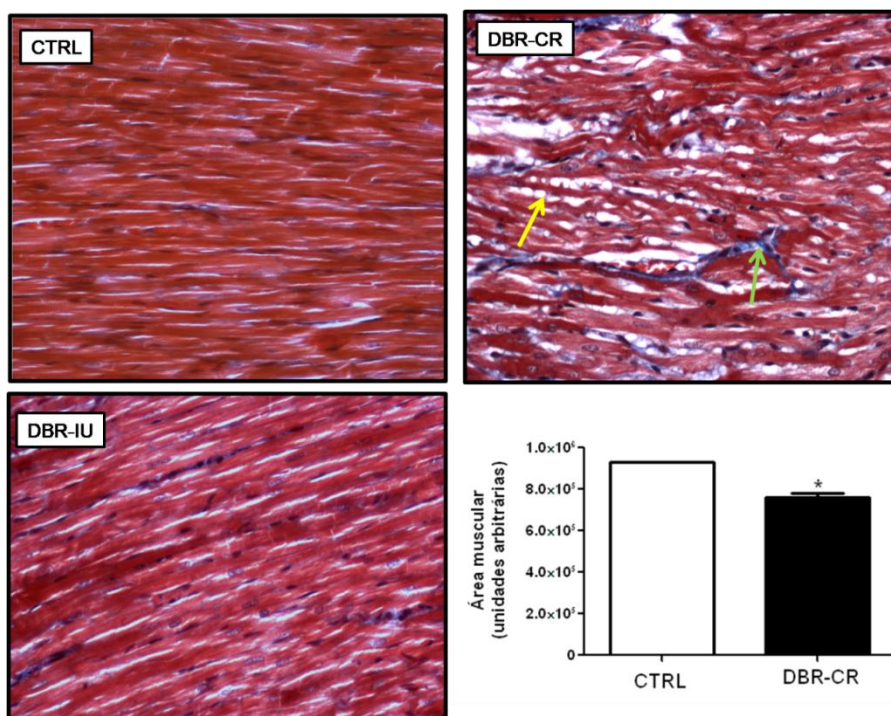
### **3.15. Reagentes**

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma Chemical Co., incluindo alguns anticorpos, uma outra parte de anticorpos foi adquirida da Santa Cruz Biotechnology Inc e Calbiochem®. O radioisótopo ( $\gamma$ [ $^{32}\text{P}$ ]-ATP) foram fornecidos pela Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, Inglaterra.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Avaliação do impacto da desnutrição sobre os parâmetros morfométricos do coração e dos principais órgãos afetados pela falência cardíaca e o efeito do tratamento com propranolol.**

Com o intuito de verificar a integridade das fibras cardíacas e identificar possíveis alterações morfológicas relacionadas ao processo de desnutrição intrauterina e crônica o método de coloração Tricrômico de Masson foi utilizado (Figura 9). Esta coloração diferencia o tecido em três cores, a saber: núcleo em azul escuro, o citoplasma e o músculo de vermelho e o colágeno em azul claro (TIMM, 2005). As secções longitudinais do tecido cardíaco do grupo DBR-IU demonstraram que a desnutrição promovida na fase intrauterina não alterou a estrutura do tecido cardíaco. As fibras encontraram-se bem coradas sem nenhum infiltrado fibroso de colágeno (Figura 9, painel B). Já em relação à desnutrição crônica foi detectado um aumento dos níveis de colágeno inseridos nos espaços interfibras (seta verde), a presença de bolsões de gordura inseridos em alguns dos espaços brancos observados entre as fibras (seta amarela) (Figura 9, painel C). Tais espaços brancos também se apresentaram aumentados quando comparados aos CTRL associado à diminuição da quantidade de fibras musculares sugerindo o acúmulo de água no interstício (Figura 9, painel D).



**Figura 9: Análise morfológica dos corações dos ratos Wistar adultos que sofreram desnutrição.** Controle (CTRL), desnutridos intrauterinamente (DBR-IU) e desnutridos cronicamente (DBR-CR), seguido pela quantificação da área muscular no grupo CTRL e DBR-CR, n= 3 para cada grupo. A seta amarela indica os bolsões gordurosos inseridos nos espaços interfibras mostrando a presença de células adiposas na região e a seta verde a presença de colágeno depositado nos mesmos espaços. \*  $p < 0.05$  t-student test

O conteúdo de água nos ventrículos cardíacos dos ratos DBR-CR, bem como nos órgãos afetados pela deficiência na sua função (fígado e pulmão), foi avaliado com a finalidade de detectar o edema tecidual. A Tabela 3 descreve os pesos médios corporais, úmidos e secos dos órgãos dos animais CTRL e DBR-CR, submetidos ou não ao tratamento com propranolol. A percentagem de água acumulada em cada órgão foi calculada pela fórmula  $[1 - (\text{peso seco} \div \text{peso úmido})] \times 100$ . A desnutrição crônica reduziu em torno de 80 % o peso corporal dos animais,

acompanhada pela redução na mesma proporção do peso do fígado (de  $10 \pm 0,7$  g no CTRL para  $1,8 \pm 0,2$  g no DBR-CR;  $p < 0.05$ ). A redução não proporcional a redução do peso corporal observada nos ventrículos cardíacos e no pulmão é parcialmente justificada pelo acúmulo de água nestes tecidos (% de acúmulo de água nos tecidos - ventrículos cardíacos:  $77 \pm 0,3$  no CTRL para  $83 \pm 1,8$  no DBR-CR e pulmões:  $81 \pm 0,5$  no CTRL para  $84 \pm 0,08$  no DBR-CR;  $p < 0.05$ ). Este acúmulo de água nos ventrículos cardíacos e nos pulmões foi prevenido no tratamento com propranolol (% de acúmulo de água nos tecidos - ventrículos cardíacos:  $77 \pm 0,5$  no CTRLp para  $79 \pm 0,5$  no DBR-CRp e pulmões: de  $79 \pm 0,6$  no CTRLp para  $79 \pm 0,5$  no DBR-CRp) reestabelecendo a proporcionalidade entre os órgãos e o peso corporal dos ratos desnutridos.



**Tabela 3:** Medida dos pesos ventriculares, hepáticos e pulmonares úmidos e secos dos animais controles sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp) e desnutridos cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp).

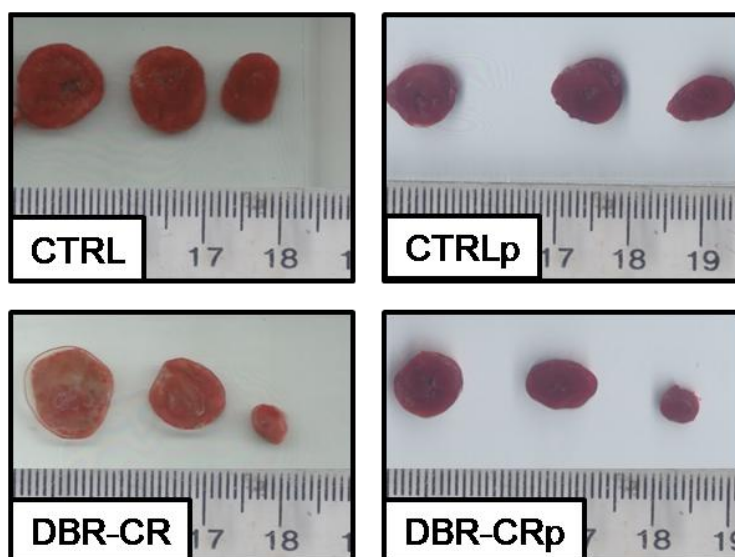
Parâmetro	CTRL n=5	CTRLp n=4	DBR-CR n=5	DBR-CRp n=4
Peso corporal (g)	261±11 <sup>a</sup>	273±34 <sup>a</sup>	54±3 <sup>b</sup>	49±0,5 <sup>b</sup>
Coração				
Peso úmido do ventrículo (g)	0,90±0,06 <sup>a</sup>	1,10±0,06 <sup>a</sup>	0,30±0,02 <sup>b</sup>	0,60± 0,03 <sup>c</sup>
Peso seco do ventrículo (g)	0,20±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,02 <sup>a</sup>	0,05±0,008 <sup>b</sup>	0,10±0,006 <sup>c</sup>
Conteúdo de água (%)	77±0,3 <sup>a</sup>	77±0,5 <sup>a</sup>	83±1,8 <sup>b</sup>	79±0,5 <sup>a</sup>
Fígado				
Peso úmido do fígado (g)	10,60±0,7 <sup>a</sup>	9,70±0,5 <sup>a</sup>	1,80±0,2 <sup>b</sup>	4,10±0,5 <sup>c</sup>
Peso seco do fígado (g/g)	3,10±0,2 <sup>a</sup>	3,10±0,2 <sup>a</sup>	0,50±0,07 <sup>b</sup>	1,50±0,09 <sup>c</sup>
Conteúdo de água (%)	70±0,3 <sup>a</sup>	68±0,7 <sup>a</sup>	73±1,0 <sup>a</sup>	62±8,2 <sup>a</sup>
Pulmão				
Peso úmido do pulmão (g)	1,50±0,2 <sup>a</sup>	2,10±0,1 <sup>b</sup>	0,40±0,03 <sup>c</sup>	1,20±0,1 <sup>a</sup>
Peso seco do pulmão (g)	0,30±0,03 <sup>a</sup>	0,40±0,01 <sup>b</sup>	0,07±0,002 <sup>c</sup>	0,30±0,03 <sup>a</sup>
Conteúdo de água (%)	81±0,5 <sup>a</sup>	79±0,6 <sup>a</sup>	84±0,8 <sup>b</sup>	79±0,5 <sup>a</sup>

Os valores são expressos em média ± erro padrão. Sobrescrito refere-se as diferenças relacionadas ao controle no mesmo parâmetro de forma que letras diferentes indicam  $p < 0.05$  (Anova seguida de pós test tukey). Todos os animais tinham idade de 13 semanas.

#### 4.2. Identificar áreas isquêmicas no coração dos ratos submetidos à desnutrição crônica.

Com o intuito de verificar se os processos atróficos observados no grupo DBR-CR estavam relacionados ao infarto, realizamos o ensaio de TTC, onde as fibras coradas em vermelho demonstram áreas viáveis e as não coradas áreas infartadas.

A Figura 10 mostra o aumento da área de tecido cardíaco não corado no DBR-CR quando comparados ao CTRL. O tratamento com propranolol previniu o aparecimento de áreas infartadas.

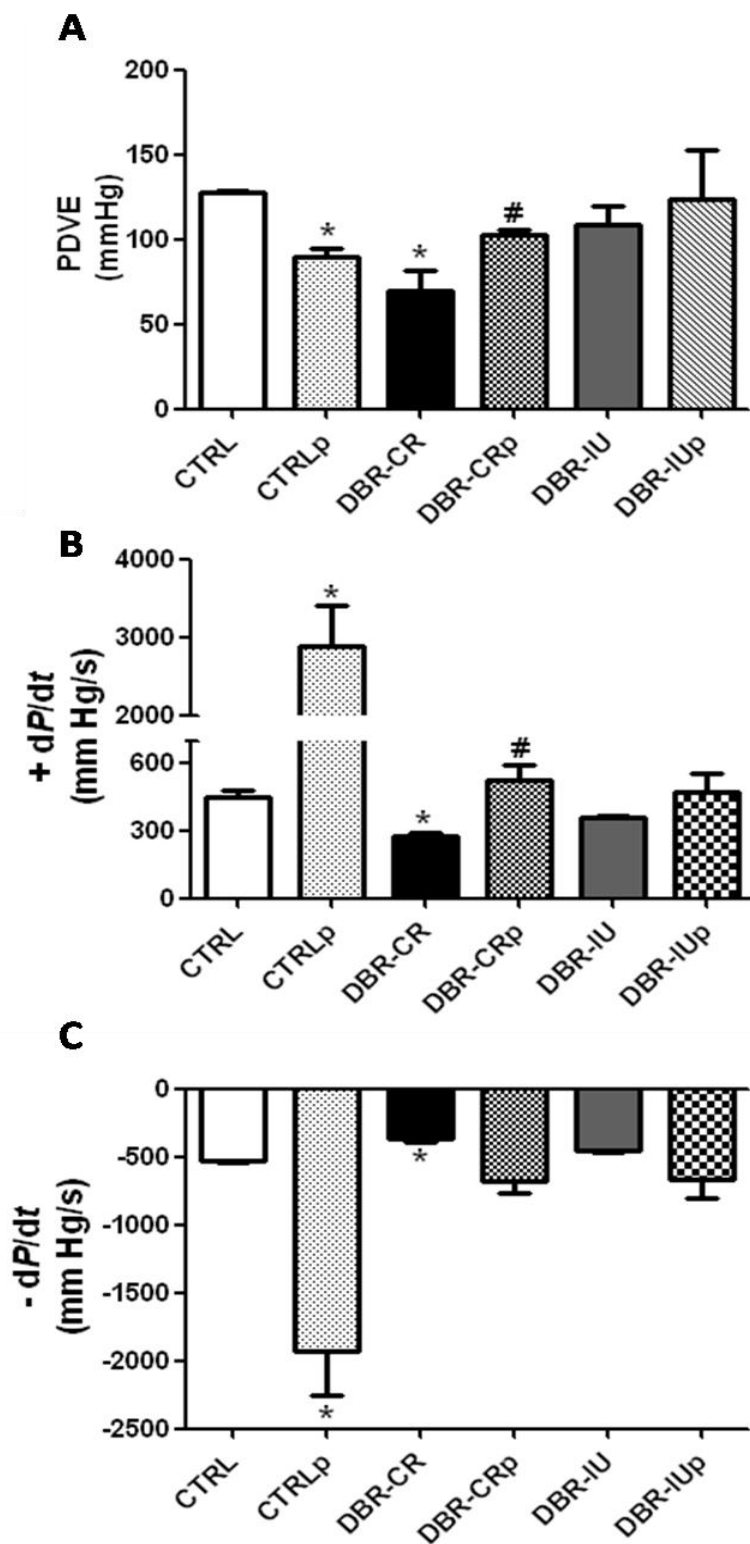


**Figura 10: Análise de áreas infartadas de corações de ratos Wistar adultos submetidos a desnutrição crônica.** Ratos controles sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp) e desnutridos cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp), n= 3 para cada grupo.

#### 4.3. Avaliar a função cardíaca sistólica e diastólica dos ratos jovens submetidos à desnutrição.

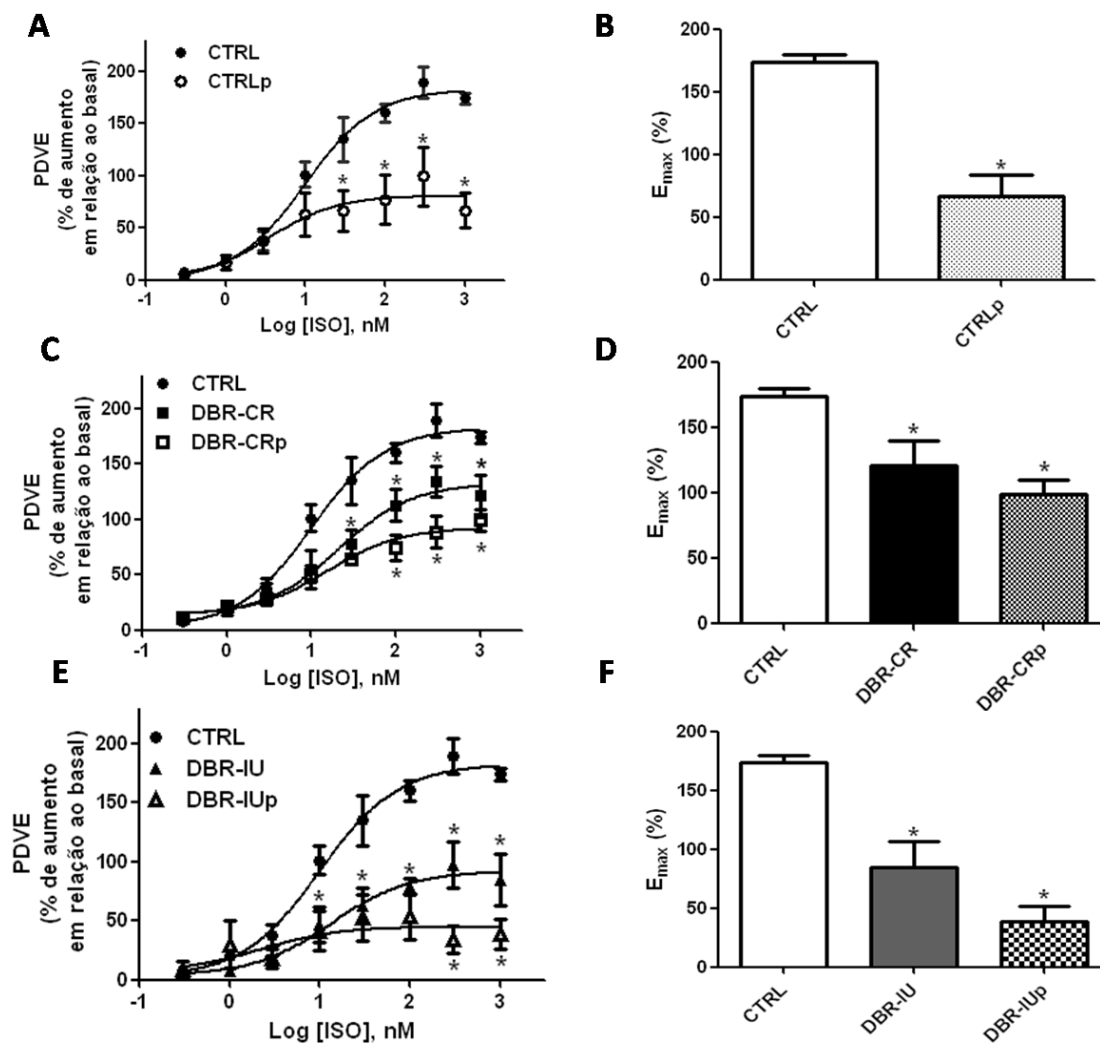
A Figura 11 mostra os parâmetros de função cardíaca basais nos grupos CTRL, DBR-CR e DBR-IU. Na condição de desnutrição intrauterina não houve alteração da PDVE, mas na condição de desnutrição crônica observamos uma redução de 45% (em mm Hg: CTRL  $127 \pm 1$ , DBR-IU  $109 \pm 11$  e DBR-CR  $70 \pm 12$ ,  $p < 0.05$ ). O tratamento com propranolol reduziu em 30% a PDVE nos ratos CTRL, não modificou no DBR-IU, mas preveniu a queda no grupo DBR-CR (em mm Hg: CTRLp  $90 \pm 4$ , DBR-IUp  $124 \pm 28$  e DBR-CRp  $103 \pm 3$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 11A). Outro parâmetro sistólico avaliado foi a derivada positiva da pressão em função do tempo ( $+dP/dt$ ). A Figura 11B mostra que ocorreu uma redução de 40% da ( $+dP/dt$ ) apenas no grupo DBR-CR (em mmHg/s: CTRL  $449 \pm 30$ , DBR-IU  $358 \pm 12$  e DBR-CR  $275 \pm 15$ ,  $p < 0.05$ ) O tratamento com propranolol preveniu a diminuição da velocidade de contração do grupo DBR-CR, no entanto acentuou a velocidade no grupo CTRL e não modificou no grupo DBR-IU (em mmHg/s: CTRLp  $2883 \pm 518$ , DBR-IUp  $475 \pm 81$  e DBR-CRp  $529 \pm 69$ ,  $p < 0.05$ ).

Em relação à derivada negativa da pressão em função do tempo ( $-dP/dt$ ) definida como a velocidade de relaxamento ventricular, um dos parâmetros da função diastólica, foi observada a redução do valor médio no grupo DBR-CR, sem alteração no DBR-IU (em mmHg/s: CTRL  $-532 \pm 7$ , DBR-IU  $-451 \pm 17$  e DBR-CR  $-366 \pm 28$ ,  $p < 0.05$ ). O tratamento com propranolol aumentou a velocidade de relaxamento no grupo CTRL, preveniu o decréscimo no grupo desnutrido cronicamente e não a modificou no grupo intrauterino (em mmHg/s: CTRLp  $-1930 \pm 318$ , DBR-IUp  $-663 \pm 144$  e DBR-CRp  $-679 \pm 88$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 11C).



**Figura 11: Análise da performance ventricular em corações isolados:** animais controles sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp) desnutridos cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) e desnutridos intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp). Painel definido por pressão desenvolvida basal (PDVE) (A), velocidade de contração (+dP/dt) (B) e velocidade de relaxamento (-dP/dt) (C). \*  $p < 0.05$  comparando todos os grupos ao grupo CTRL e #  $p < 0.05$  comparando os grupos tratados ao seu respectivo grupo sem tratamento. One-way ANOVA com pos test Tukey.  $n = 4$  para cada grupo.

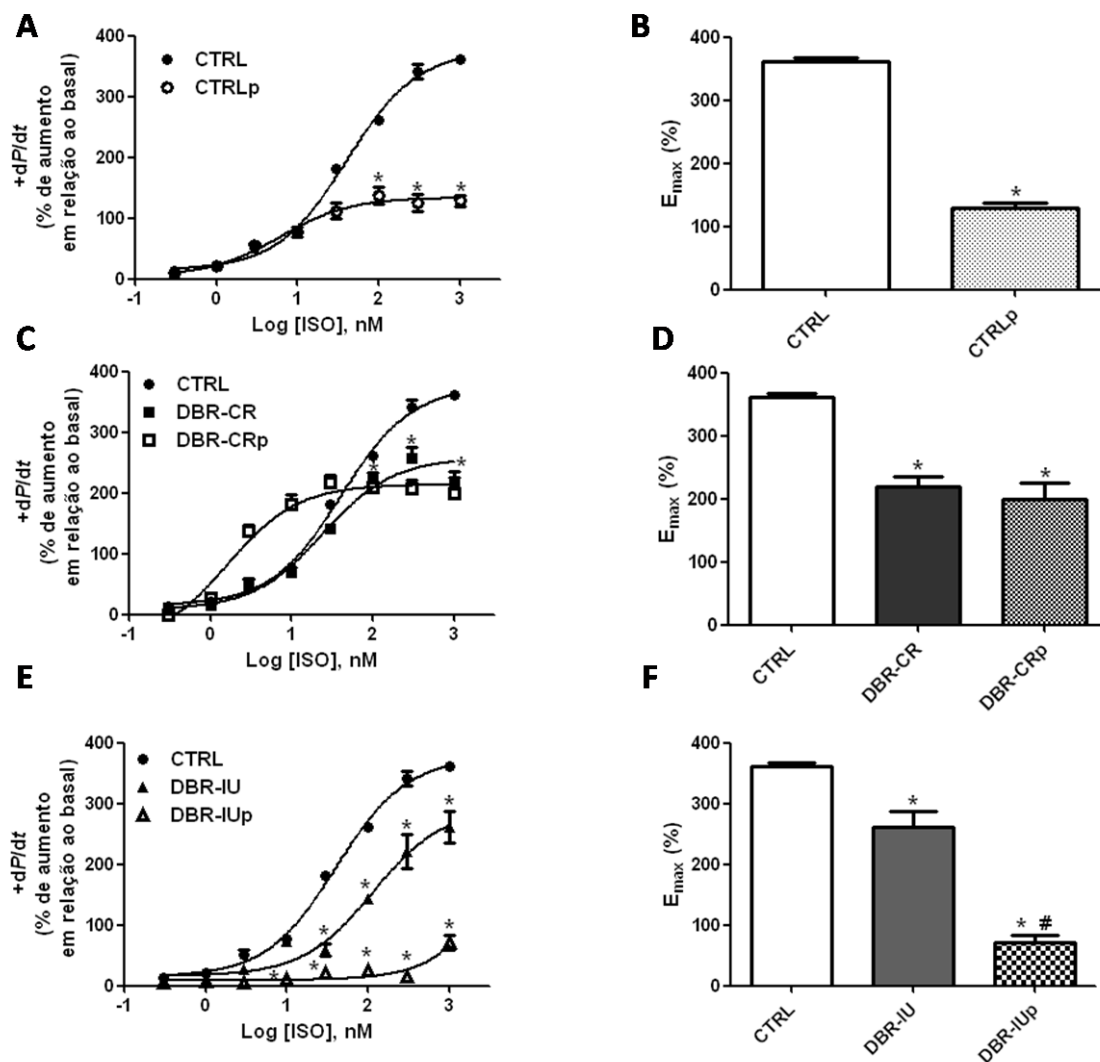
A *performance* cardíaca frente a diferentes concentrações do agonista  $\beta$  adrenérgico isoproterenol (ISO) (0,3-1000nM) foi avaliada na Figura 12 (Painéis A, C, E). Foi observado um decréscimo do valor máximo obtido de PDVE em resposta ao agonista ( $E_{max}$ ) independente do tipo de desnutrição (CTRL  $174 \pm 5$ , DBR-IU  $85 \pm 22$  e DBR-CR  $121 \pm 19\%$  de aumento,  $p < 0.05$ ) (Figura 12, compare os painéis B, D, F). No tratamento com propranolol o  $E_{max}$  obtido não melhorou frente a condição não tratada (CTRLp  $67 \pm 16$ , DBR-IUp  $38 \pm 12$  e DBR-CRp  $99 \pm 10\%$  de aumento) (Figura 12, compare os painéis B, D, F). Não foram detectadas alterações relevantes na afinidade do receptor ao ISO ( $CE_{50}$ ) em nenhuma das condições estudadas (CTRL  $1 \pm 0,1$ , CTRLp  $0,5 \pm 0,4$ , DBR-CR  $1,3 \pm 0,1$ , DBR-CRp  $1,2 \pm 0,2$ , DBR-IU  $1,1 \pm 0,2$  e DBR-IUp  $0,8 \pm 0,3$  nM).



**Figura 12: Análise da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo em concentrações crescentes de isoproterenol em corações isolados de ratos Wistar adultos.** Controles sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp) (A) e  $E_{max}$  alcançado (B), desnutridos cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) (C) e  $E_{max}$  alcançado (D) e desnutridos intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp) (E) e  $E_{max}$  alcançado (F). \* $p < 0.05$  comparando todos os grupos ao grupo CTRL. Painel A, C e E Two-way ANOVA com pos test Bonferroni; painel B t-student test; painel D e F One-way ANOVA com pos test Tukey.  $n=4$  para cada grupo.

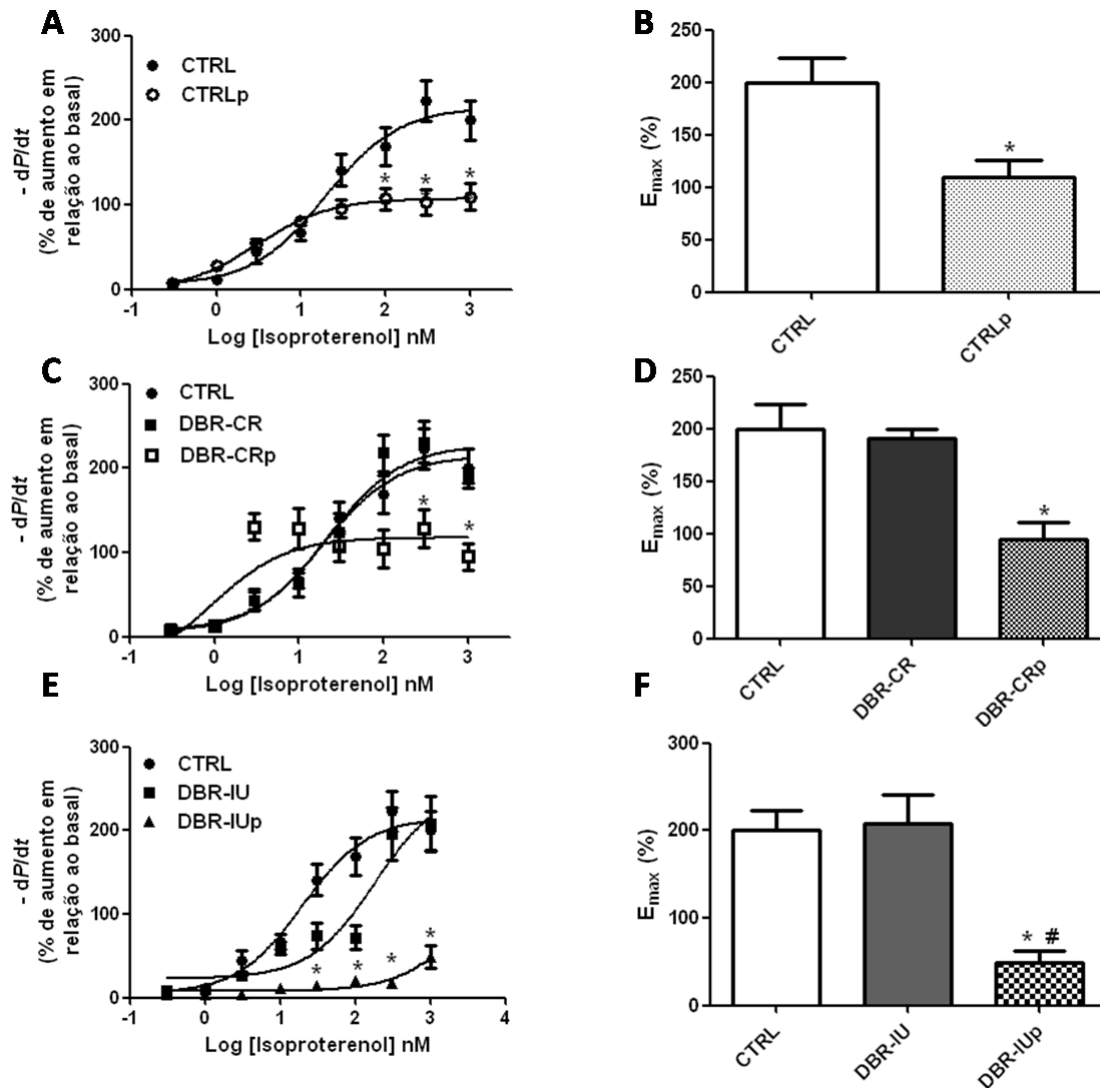
As velocidades de contração e relaxamento ventricular também foram avaliadas (Figura 13 e Figura 14, respectivamente). As curvas de concentração-resposta para a  $+dP/dt$ , demonstraram um decréscimo do  $E_{max}$  em ambos modelos de desnutrição (CTRL  $360 \pm 11$ , DBR-IU  $261 \pm 45$  e DBR-CR  $219 \pm 28$  % de aumento,  $p < 0.05$ ) (Figura 13 A, C, E), sem modificação na afinidade do receptor ao ISO (CTRL  $1,6 \pm 0,04$ , DBR-CR  $1,4 \pm 0,09$  e DBR-IU  $2 \pm 0,1$ nM). O tratamento com propranolol reduziu no CTRL e manteve reduzido no DBR-IU e DBR-CR os valores de  $E_{max}$  (CTRLp  $128 \pm 17$ , DBR-IUp  $70 \pm 20$  e DBR-CRp  $199 \pm 42$  % de aumento) (Figura 13 compare painéis B, D, F). Vale a pena destacar que apenas no grupo DBR-CRp ocorreu um aumento da afinidade do receptor ao ISO (DBR-CR  $1,4 \pm 0,09$  vs DBR-CRp  $0,2 \pm 0,1$  nM,  $p < 0.05$ ) (Figura 13C).

A Figura 14 mostra as curvas de  $-dP/dt$  perante diferentes concentrações de ISO. A desnutrição não promoveu qualquer alteração na velocidade máxima de relaxamento cardíaco (CTRL  $200 \pm 46$ , DBR-IU  $207 \pm 56$  e DBR-CR  $191 \pm 16$  % de aumento) (Figura 14 A, C, E). O tratamento com propranolol reduziu a velocidade de relaxamento nos grupos experimentais (CTRLp  $109 \pm 27$ , DBR-IUp  $48 \pm 20$  e DBR-CRp  $94 \pm 31$ % de aumento,  $p < 0.05$ ) (Figura 14 compare painéis B, D, F).



**Figura 13: Análise da velocidade de contração do ventrículo esquerdo em concentrações crescentes de isoproterenol em corações isolados de ratos Wistar adultos. Controles sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp) (A) e Emax alcançado (B), desnutridos cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) (C) e Emax alcançado (D) e desnutridos intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp) (E) e Emax alcançado (F). \* $p < 0.05$  comparando todos os grupos ao grupo CTRL. #  $p < 0.05$  comparando os grupos tratados com seus respectivos grupos sem tratamento. Painel A, C e E Two-way ANOVA com pos test Bonferroni; painel B t-student test; painel D e F One-way ANOVA com pos test Tukey.  $n=4$  para cada grupo.**





**Figura 14: Análise da velocidade de relaxamento do ventrículo esquerdo em concentrações crescentes de isoproterenol em corações isolados de ratos Wistar adultos.** Controles sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp) (A) e  $E_{max}$  alcançado (B), desnutridos cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) (C) e  $E_{max}$  alcançado (D) e desnutridos intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp) (E) e  $E_{max}$  alcançado (F). \* $p < 0.05$  comparando todos os grupos ao grupo CTRL. #  $p < 0.05$  comparando os grupos tratados com seus respectivos grupos sem tratamento. Painel A, C e E Two-way ANOVA com pos test Bonferroni; painel B t-student test; painel D e F One-way ANOVA com pos test Tukey.  $n=4$  para cada grupo.

#### **4.4. Delinear a relação pressão–volume, através das curvas de Frank-Starling dos ratos jovens submetidos à desnutrição comparando com os ratos controle.**

Para determinar o impacto da desnutrição na relação pressão-volume ventricular, incrementos de 20  $\mu\text{L}$  da solução de perfusão foram adicionados cumulativamente no balão de látex inserido no ventrículo esquerdo e as pressões sistólica, diastólica e desenvolvida (PDVE) (diferença entre a pressão sistólica e diastólica) foram medidas. O volume inicial ( $V_0$ , volume contido no balão onde a PDVE é 0 mmHg) foi estimado através de regressão linear.

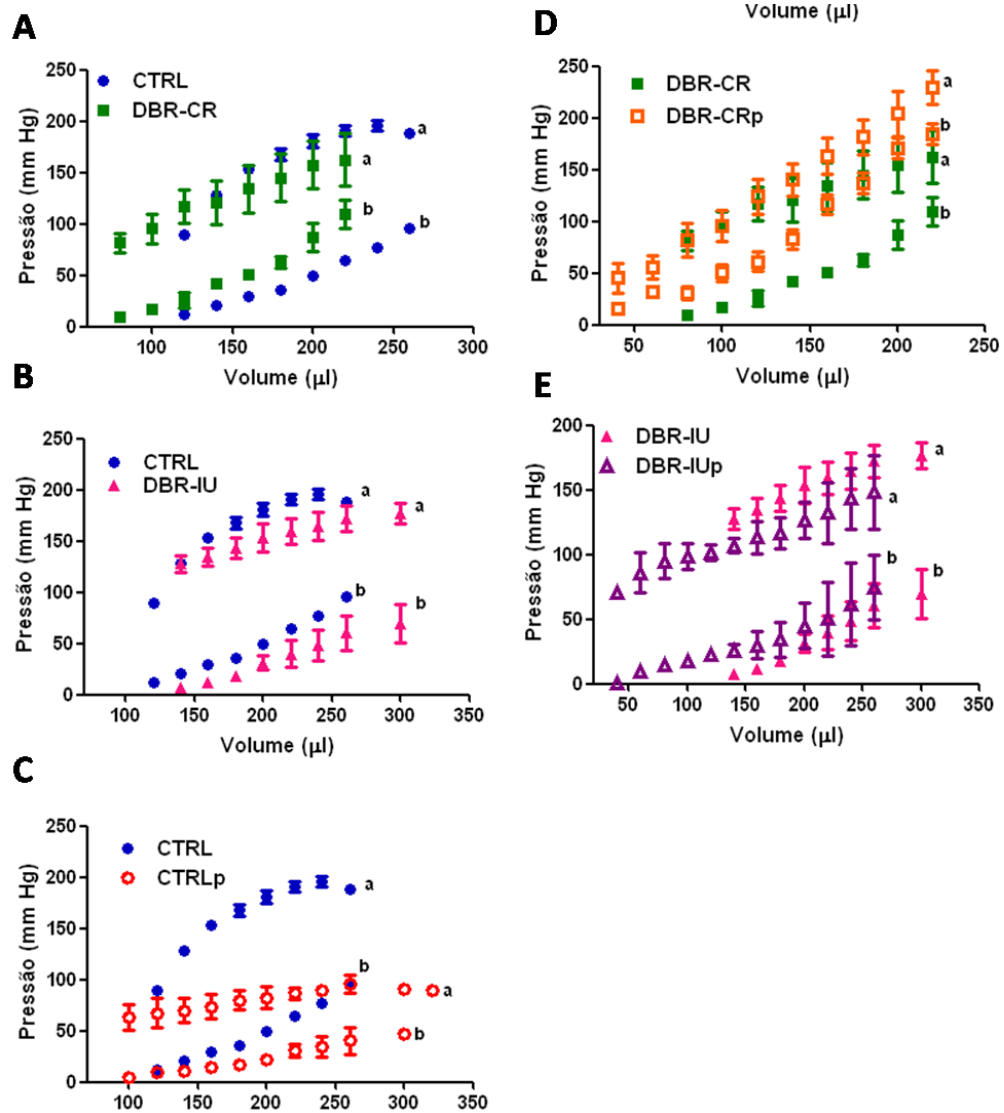
A relação pressão–volume nos grupos DBR-CR foi deslocada para a esquerda em relação ao CTRL. O aumento das pressões sistólica e diastólica conforme o incremento de volume inserido no balão intraventricular também foi alterado nos ratos DBR-CR. Neste grupo, a inclinação da curva diastólica foi mais íngreme (curvas inferiores do gráfico na Figura 15A), enquanto a curva sistólica foi menos aguda que o CTRL (curvas superiores do gráfico na Figura 15A). O  $V_0$  estimado para estas relações foram: 108  $\mu\text{L}$  no CTRL e 77  $\mu\text{L}$  no DBR-CR (Tabela 4), indicando uma diminuição da complacência ventricular. Ao analisar a relação pressão–volume do grupo DBR-IU (Figura 15B) observou-se curvas com perfis muito semelhantes ao do grupo CTRL e um aumento na complacência ventricular ( $V_0$  do CTRL  $108 \pm 1,6$  vs DBR-IU  $127 \pm 2$   $\mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabela 4). A relação PDVE–volume foi perdida em ambos os grupos de desnutrição (Figura 16A, compare os tracejados azul, CTRL, e verde, DBR-CR; Figura 16B, compare os tracejados azul, CTRL, e verde, DBR-IU).

O tratamento dos grupos com propranolol demonstrou:

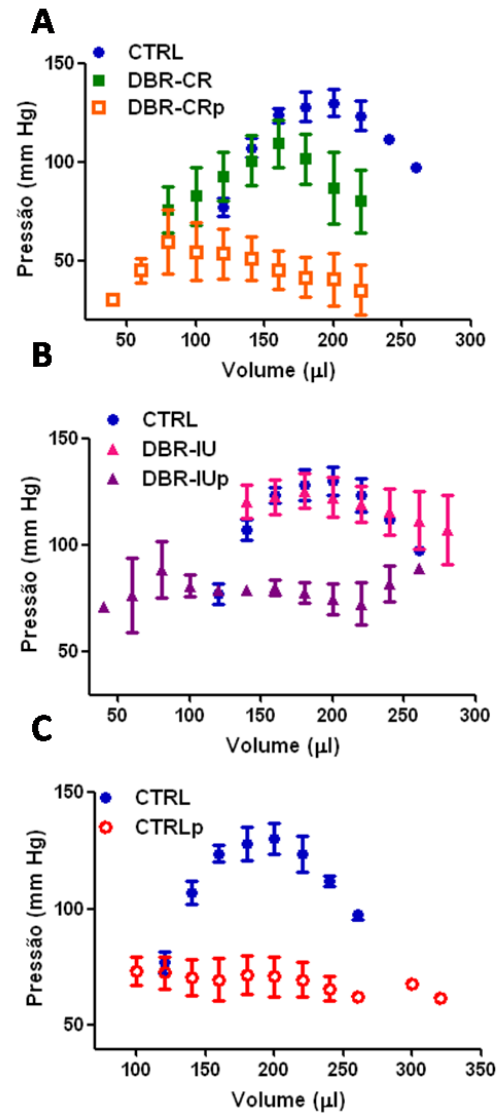
(1) no grupo DBR-CR: uma redução ainda maior da complacência ventricular quando comparado ao controle ( $V_o$  do CTRL  $108 \pm 1,6$ , DBR-CR  $77 \pm 1,4$ , DBR-CRp  $52 \pm 0,9 \mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ) e um deslocamento da curva para a esquerda (Figura 15D). O tratamento com propranolol não recuperou a relação PDVE-volume (Figura 16A).

(2) no grupo DBR-IU: o tratamento com propranolol reduziu a complacência ventricular ( $V_o$  do CTRL  $108 \pm 1,6$ ,  $V_o$  do DBR-IU  $127 \pm 2,2$ , DBR-IUp  $41 \pm 3 \mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabela 4), mas com o perfil de curva semelhante ao grupo sem tratamento (Figura 15E). A PDVE deixou de responder a incrementos de volume (Figura 16B).

(3) no grupo CTRL: uma diminuída capacidade em responder com aumento de pressão sistólica e diastólica a um aumento de volume intraventricular (Figura 15C), associada ao decréscimo da complacência ventricular ( $V_o$  do CTRL  $108 \pm 1,6$  vs CTRLp  $89 \pm 4,4 \mu\text{L}$ ,  $p < 0.05$ ) (Tabela 4). Quando tratado com propranolol, a PDVE deixou de responder a incrementos de volume (Figura 16C).



**Figura 15: Análise da complacência ventricular esquerda em resposta a incrementos crescentes de 20 µl de volume em corações isolados de ratos Wistar adultos. Comparação com o CTRL da relação volume ventricular – pressões sistólica (a) e diastólica (b) com os DBR-CR (A), DBR-IU (B) e CTRLp (C). Efeito do tratamento com propranolol sobre a relação volume ventricular – PDVE nos grupos DBR-CR (D) e DBR-IU (E). n=4 para todos os grupos**



**Figura 16:** Análise da complacência ventricular esquerda de acordo com a variação das pressões desenvolvidas em incrementos crescentes de 20 µl de volume ventricular em corações isolados de ratos Wistar adultos. Efeito do tratamento com o propranolol nos grupos DBR-CR (A) e DBR-IU (B). Compare com o grupo CTRL (C).n=4 para todos os grupos.

**Tabela 4: Valores de V0 obtidos por regressão linear a partir de ensaios com corações de animais:** controles sem e com tratamento (CTRL e CTRLp) desnutridos cronicamente sem e com tratamento (DBR-CR e DBR-CRp) e desnutridos intrauterinamente (DBR-IU e DBR-IUp).

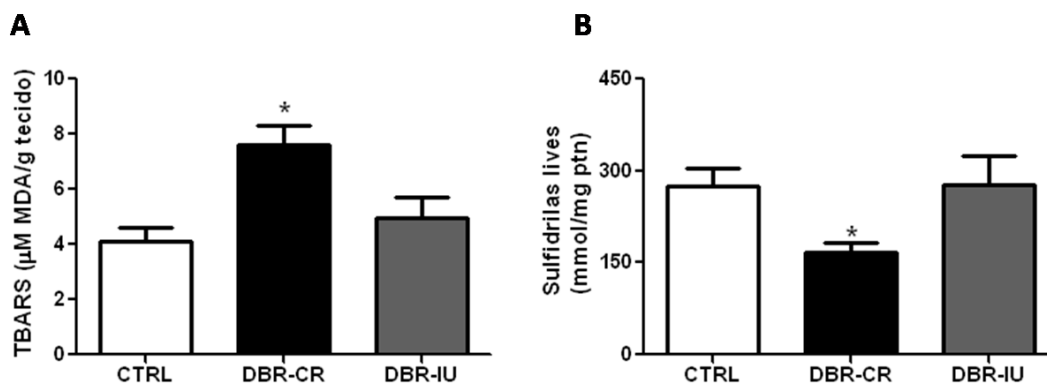
Grupos	Valores de V0 (μL)
CTRL	108 ± 1.6 <sup>a</sup>
CTRLp	89 ± 4.4 <sup>b</sup>
DBR-CR	77 ± 1.4 <sup>c</sup>
DBR-CRp	52 ± 0.9 <sup>d</sup>
DBR-IU	127 ± 2 <sup>e</sup>
DBR-IUp	41 ± 3 <sup>f</sup>

Os valores são expressos em média ± erro padrão. Sobrescrito refere-se as diferenças relacionadas ao controle no mesmo parâmetro de forma que letras diferentes indicam  $p < 0.05$  (Anova seguida de pós test tukey).

#### 4.5. Identificar processos de stresse oxidativo lipídico e protéico no coração dos ratos submetidos à desnutrição.

A Figura 17A mostra o nível de malonaldeído (MDA), composto gerado durante o processo de peroxidação lipídica no tecido cardíaco dos ratos submetidos a desnutrição. Foi observado um aumento dos níveis de MDA exclusivamente no grupo DBR-CR (CTRL 4 ± 0,4, DBR-IU 5 ± 0,7 e DBR-CR 7 ± 0,6 μmol MDA/ g de tecido,  $p < 0.05$ ).

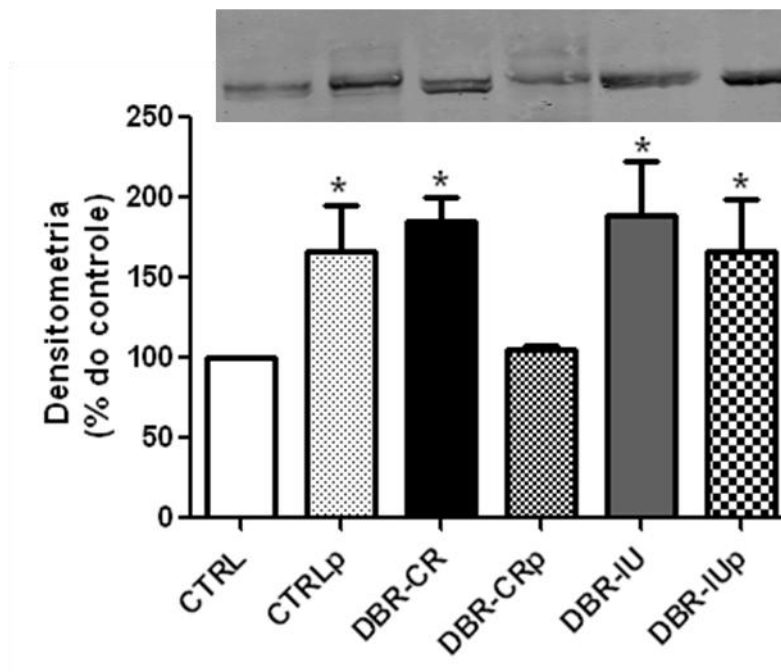
Em relação ao estresse oxidativo protéico medido através do conteúdo de sulfidrilas livres no tecido cardíaco foi observada a diminuição deste conteúdo apenas no grupo submetido a desnutrição crônica (CTRL 275 ± 27, DBR-IU 278 ± 46 e DBR-CR 168 ± 14 nmol/ mg de proteína,  $p < 0.05$ ) (Figura 17B).



**Figura 17: Efeito diferencial da janela de desnutrição sobre o estresse oxidativo.** Análise do dano oxidativo lipídico (A) e protéico (B) em corações de animais controle (CTRL), desnutrido cronicamente (DBR-CR) e desnutrido intrauterinamente (DBR-IU) \*  $p < 0.05$ . One-way ANOVA com pos test Tukey.  $n=4$  para cada grupo.

#### 4.6. Determinar se as alterações na sinalização $\beta$ adrenérgica impactadas pela desnutrição são revertidas no tratamento em longo prazo com o propranolol.

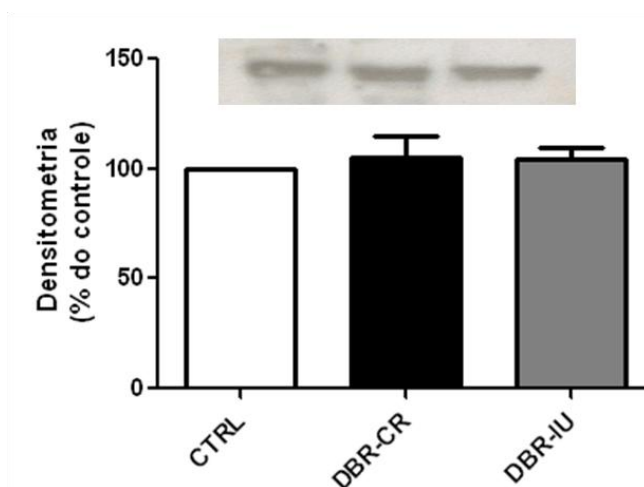
A análise do conteúdo protéico de  $\beta$ -AR no tecido cardíaco foi demonstrada na Figura 18. Foi observado que a desnutrição, seja ela intrauterina ou crônica acarretou o aumento de cerca de duas vezes no conteúdo deste receptor. O tratamento com propranolol aumentou a expressão do receptor no grupo CTRLp ( $166 \pm 28\%$  do CTRL,  $p < 0.05$ ) e retornou a níveis do controle o conteúdo do receptor no grupo DBR-CRp, mas manteve elevado o conteúdo no grupo DBR-IUp.



**Figura 18: Análise do conteúdo dos receptores  $\beta$  adrenérgicos em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp) desnutrido cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) e desnutrido intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp). \*  $p < 0.05$  One-way ANOVA com pos test Tukey. As bandas acima representam o resultado do western blot obtido.  $n=5$  para cada grupo.

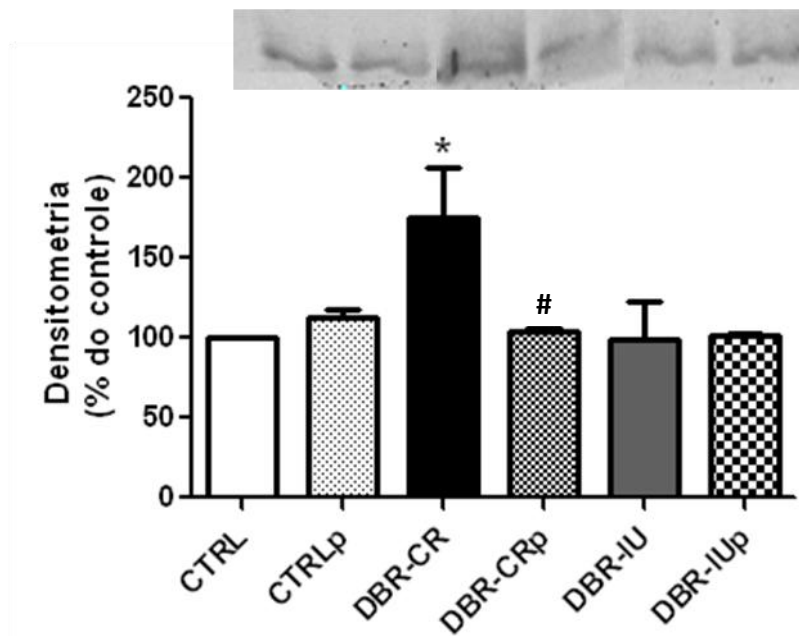
O conteúdo da proteína beta arrestina fosforilada, envolvida no processo de dessensibilização dos receptores  $\beta$  adrenérgicos, não foi alterado em nenhum dos grupos de desnutrição (Figura 19).





**Figura 19: Análise do conteúdo da proteína beta arrestina fosforilada em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle (CTRL) desnutrido cronicamente (DBR-CR) e desnutrido intrauterinamente (DBR-IU). \*  $p < 0.05$  One-way ANOVA com pos test Tukey. As bandas acima representam o resultado do western blot obtido.  $n=5$  para cada grupo.

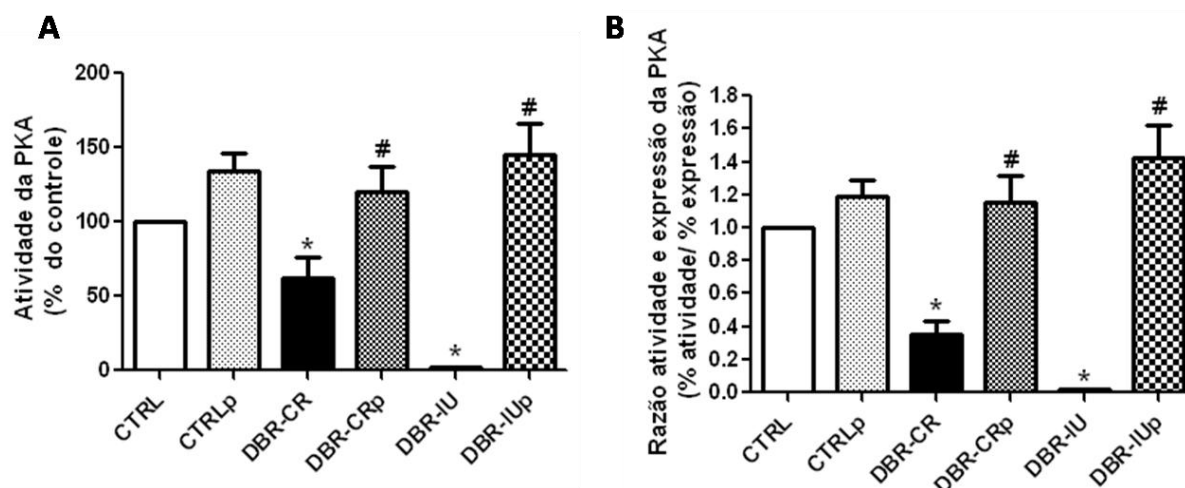
A ativação dos receptores  $\beta$ -AR culmina com a ativação de PKA, envolvidas nos processos de sístole (KÖHLER et al., 2014). A fim de avaliar se a via de sinalização inerente a ativação dos receptores  $\beta$  adrenérgicos seria o alvo molecular das respostas adaptativas da desnutrição o conteúdo e a atividade de PKA foram avaliados na Figura 20 e Figura 21, respectivamente. Foi observado o aumento do conteúdo da enzima apenas no grupo DBR-CR ( $175 \pm 31\%$  do CTRL,  $p < 0.05$ ), retornando ao controle com o tratamento com propranolol (Figura 20).



**Figura 20: Análise do conteúdo das proteínas cinases A em preparação ultracentrifugada de coração:** nos grupos controle sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp) desnutrido cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) e desnutrido intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp). \*  $p < 0.05$  comparando todos os grupos ao grupo CTRL e #  $p < 0.005$  comparando os grupos tratados ao seu respectivo grupo sem tratamento. One-way ANOVA com pos test Tukey. As bandas acima representam o resultado do western blot obtido.  $n=5$  para cada grupo

A desnutrição promoveu a redução da atividade da PKA em ambos os grupos de desnutrição, destacando a drástica redução no grupo DBR-IU (DBR-IU  $1.9 \pm 0.2$  e DBR-CR  $62 \pm 12$  % do CTRL,  $p < 0.05$ ) (Figura 21A). O tratamento com propranolol impediu a redução da atividade da enzima em ambos os grupos de desnutrição (Figura 21A).

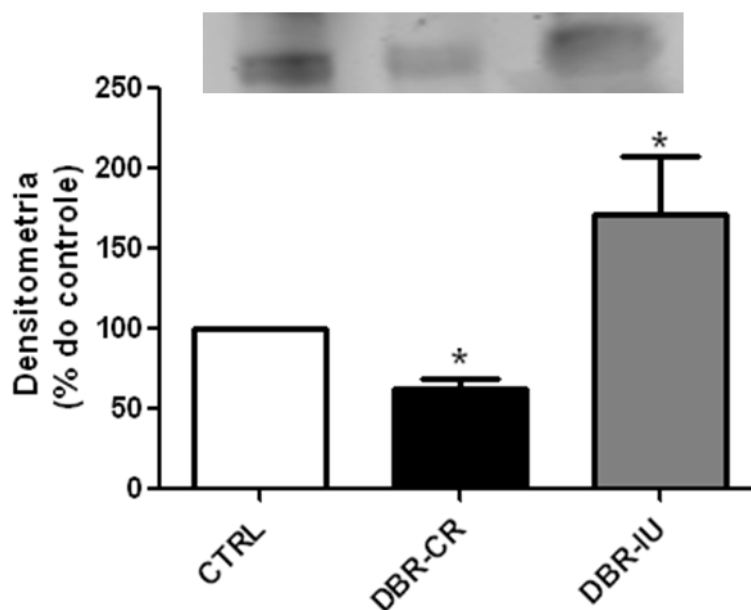
A razão entre atividade da enzima e o seu conteúdo protéico revelou que apesar do aumento do conteúdo de PKA no grupo DBR-CR, a razão permaneceu menor quando comparado ao grupo CTRL. No grupo DBR-IU essa razão foi ainda menor, uma vez que não houve alteração do conteúdo protéico (CTRL  $1,2 \pm 0,1$ , DBR-CR  $0,3 \pm 0,08$  e DBR-IU  $0,015 \pm 0,0002\%$ ,  $p < 0.05$ ). O tratamento com propranolol retornou a razão para valores próximos aos do CTRL (Figura 21B).



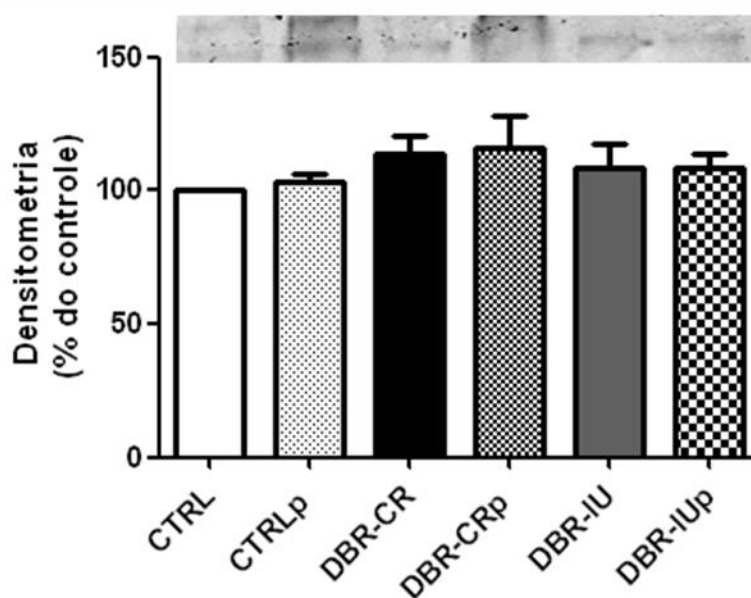
**Figura 21: Análise da atividade da proteína cinase A (PKA) (A) e razão entre atividade e expressão (B) em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp), desnutrido cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) e desnutrido intrauterinamente sem e com tratamento (DBR-IU e DBR-IUp) \*  $p < 0.05$  comparando todos os grupos ao grupo CTRL e #  $p < 0.05$  comparando os grupos tratados ao seu respectivo grupo sem tratamento. One-way ANOVA com pos test Tukey.  $n = 5$  para cada grupo.

#### 4.7. Determinar se o propranolol recupera a expressão de proteínas envolvidas na homeostasia intracelular do $Ca^{2+}$ e da via de sinalização associada durante o processo de desnutrição.

A adequada homeostasia intracelular do íon  $Ca^{2+}$  é fundamental para os processos corretos de contração e relaxamento cardíaco. O conteúdo protéico do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , principal entidade bioquímica responsável pela remoção do  $Ca^{2+}$  intracelular após o processo contrátil, foi avaliado nos grupos de desnutrição. A Figura 22 mostra que o conteúdo protéico varia de acordo com o tipo de desnutrição acometida. A desnutrição crônica promoveu uma redução do conteúdo do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , enquanto a intrauterina aumentou (DBR-CR  $62 \pm 5$  e DBR-IU  $171 \pm 36$  % do CTRL,  $p < 0.05$ ). Não houve alteração no conteúdo protéico de SERCA nos grupos desnutridos e tratados com propranolol (Figura 23).



**Figura 22: Análise do conteúdo do trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle (CTRL), desnutrido cronicamente (DBR-CR) e desnutrido intrauterinamente (DBR-IU). \*  $p < 0.05$  One-way ANOVA com pos test Tukey. As bandas acima representam o resultado do western blot obtido.  $n=3$  para cada grupo



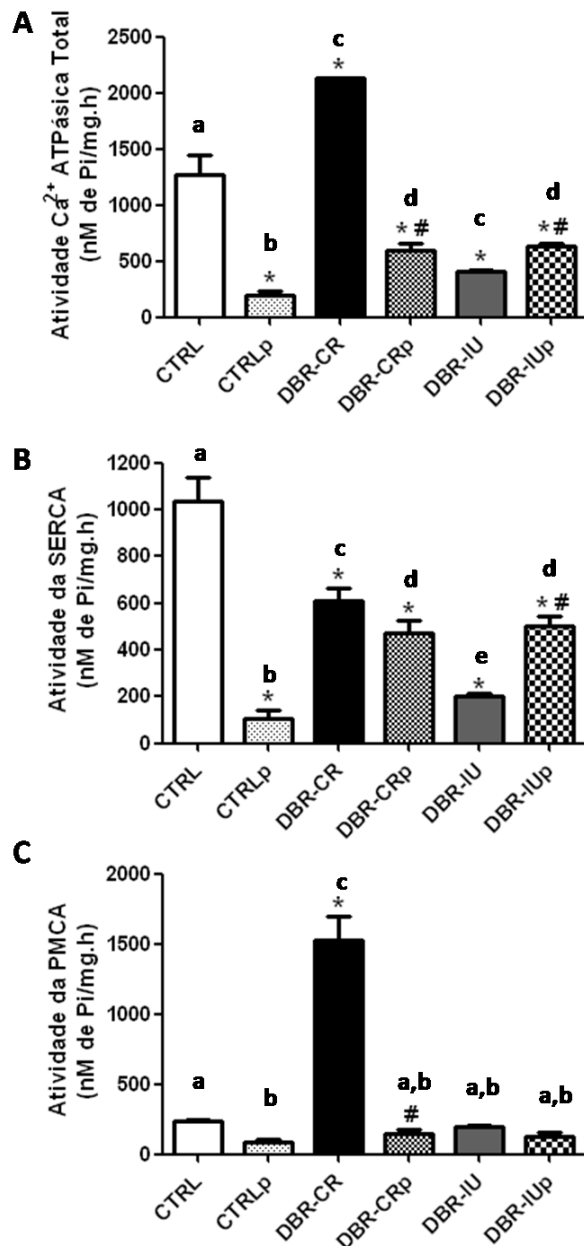
**Figura 23: Análise do conteúdo da enzima SERCA em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp), desnutrido cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) e desnutrido intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp). \*  $p < 0.05$  One-way ANOVA com pos test Tukey. As bandas acima representam o resultado do western blot obtido.  $n=5$  para cada grupo

Na Figura 24 foi demonstrado a influência do tratamento com propranolol sobre a atividade das  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases. No grupo DBR-CR foi observado que o tratamento com propranolol reduziu a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total em 72% quando comparado ao seu respectivo grupo (DBR-CR  $2129 \pm 7$  e DBR-CRp  $594 \pm 69$   $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 24A). Na desnutrição intrauterina, o tratamento com propranolol reverteu parcialmente a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total (DBR-IU  $403 \pm 20$  e DBR-IUp  $634 \pm 23$   $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 24A). Vale a pena ressaltar, que o tratamento com propranolol, per se, diminui a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total (CTRL  $1269 \pm 183$ , CTRLp  $196 \pm 39$   $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ).

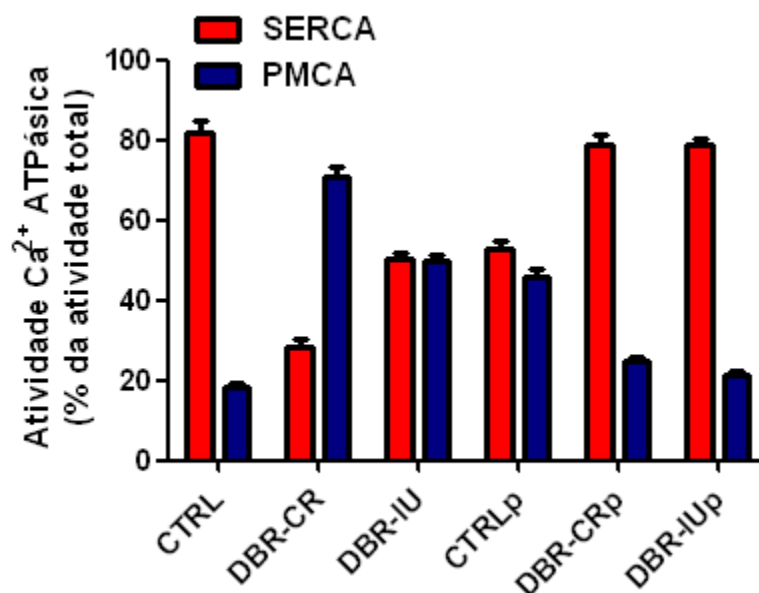
O tratamento com propranolol impediu exclusivamente o aumento da atividade da PMCA observado na desnutrição crônica (atividade da SERCA em  $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ : CTRL  $1037 \pm 100$ , CTRLp  $105 \pm 35$ , DBR-CR  $608 \pm 54$  e DBR-CRp  $469 \pm 59$ ; e atividade PMCA em  $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ : CTRL  $232 \pm 14$ , CTRLp  $89 \pm 21$ , DBR-CR  $1528 \pm 169$  e DBR-CRp  $146 \pm 29$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 24 B e C, respectivamente). De forma que, a atividade da SERCA retoma a sua preponderância como observado no CTRL ( $\approx 80\%$  PMCA e  $\approx 20\%$  SERCA) (Figura 25).

Já no grupo de desnutrição intrauterina, a diminuta atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total se deve a queda na atividade das duas enzimas, cada uma contribuindo para 50 % dessa atividade total (Figura 24 B e C). O tratamento com propranolol impediu parcialmente a queda da atividade da SERCA no grupo DBR-IU (em  $\text{nmol Pi} \times \text{mg}^{-1} \times \text{h}^{-1}$ : CTRL  $1037 \pm 100$ , CTRLp  $105 \pm 35$ , DBR-IU  $203 \pm 10$  e DBR-IUp  $500 \pm 45$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 24B). A atividade da PMCA não foi modificada nesse grupo (Figura

24C). Assim como na desnutrição crônica, o tratamento com propranolol também retoma a preponderância da SERCA ( $\approx 80\%$  PMCA e  $\approx 20\%$  SERCA) (Figura 25).

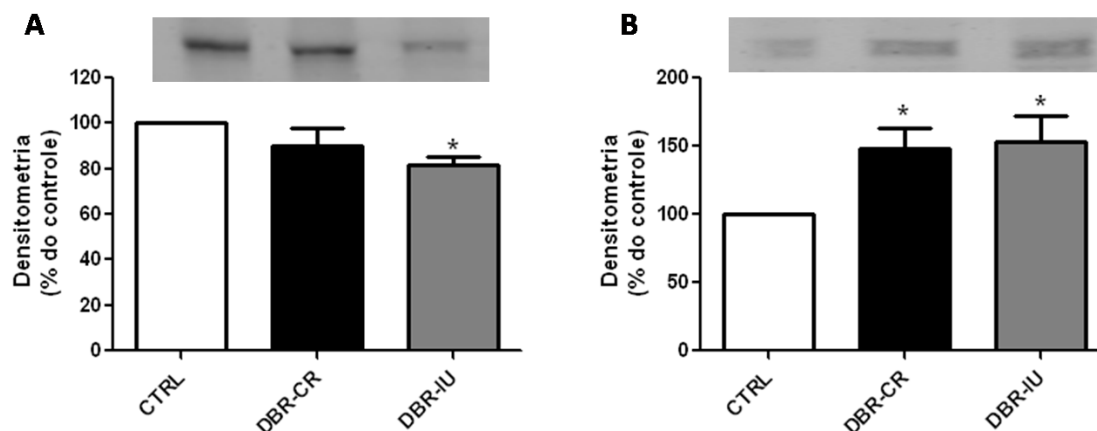


**Figura 24: Análise da atividade  $\text{Ca}^{2+}$  ATPásica:** total (A), tapsigargina sensível (TgS – SERCA) (B) e tapsigargina resistente (TgR – PMCA) (C) em preparação ultracentrifugada de coração nos grupos controle sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp), desnutrido cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) e desnutrido intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp). \*  $p < 0.05$  comparando todos os grupos ao grupo CTRL e #  $p < 0.05$  comparando os grupos tratados ao seu respectivo grupo sem tratamento. As letras diferentes demonstram mais claramente a diferença observada entre os grupos. One-way ANOVA com pos test Tukey.  $n=5$  para cada grupo.



**Figura 25: Análise do grau de contribuição das enzimas SERCA e PMCA para a atividade  $\text{Ca}^{2+}$  ATPásica total em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp), desnutrido cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) e desnutrido intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp).  $n=5$  para cada grupo.

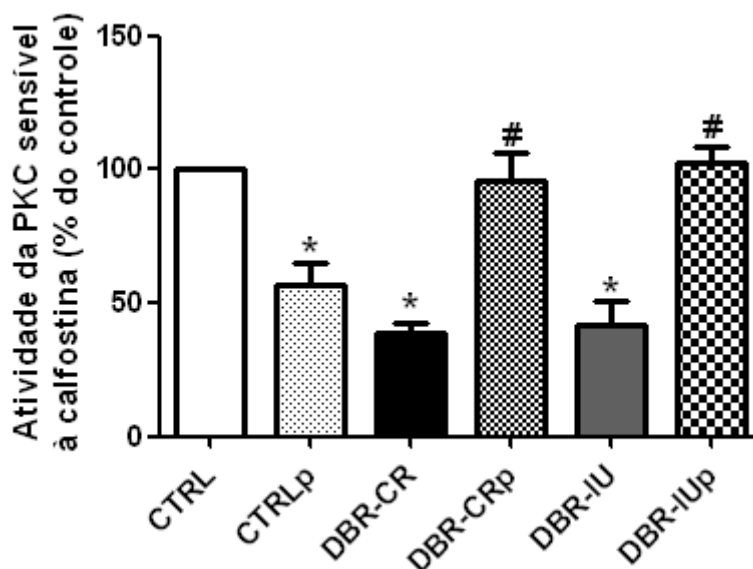
Foram analisados os conteúdos protéicos de  $\text{PKC}\alpha$  e  $\text{PKC}\epsilon$ , por estarem envolvidas na indução da insuficiência cardíaca (Figura 26). Foi observado um discreto decréscimo do conteúdo protéico de  $\text{PKC}\alpha$  apenas no grupo DBR-IU (em % do CTRL: DBR-CR  $90 \pm 8$  e DBR-IU  $81 \pm 4$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 26A). O conteúdo protéico de  $\text{PKC}\epsilon$  aumentou nos dois grupos de desnutrição (em % do CTRL: DBR-CR  $143 \pm 14$  e DBR-IU  $153 \pm 19$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 26B).



**Figura 26: Análise do conteúdo das proteínas cinases C alfa (A) e proteína cinase C épsilon (B) em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle (CTRL), desnutrido cronicamente (DBR-CR) e desnutrido intrauterinamente (DBR-IU). \*  $p < 0.05$  One-way ANOVA com pos test Tukey. As bandas acima representam o resultado do western blot obtido.  $n=5$  para cada grupo.

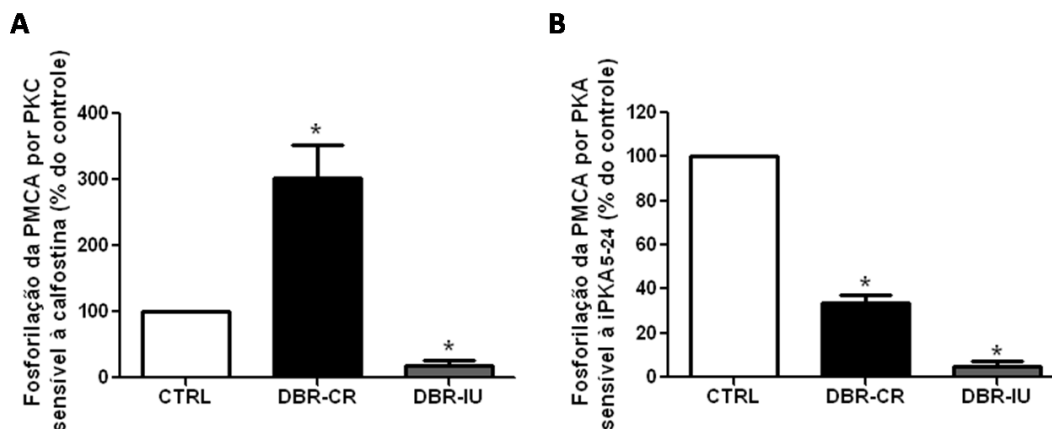
A Figura 27 mostra a atividade de PKC sensível a calfostina C (isoformas clássica e novel) nos grupos CTRL e desnutridos tratados ou não com propranolol. Foi observado que a atividade da PKC foi reduzida em 60% independente do tipo de desnutrição estudada (em % do CTRL: DBR-CR  $39 \pm 3$  e DBR-IU  $41 \pm 9$ ,  $p < 0.05$ ). O tratamento com propranolol recuperou a atividade da PKC sensível a calfostina C, apesar da redução de 50% da atividade no grupo CTRLp.





**Figura 27: Análise da atividade da proteína cinase C (PKC) em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle sem (CTRL) e com tratamento (CTRLp), desnutrido cronicamente sem (DBR-CR) e com tratamento (DBR-CRp) e desnutrido intrauterinamente sem (DBR-IU) e com tratamento (DBR-IUp) \*  $p < 0.05$  comparando todos os grupos ao grupo CTRL e #  $p < 0.05$  comparando os grupos tratados ao seu respectivo grupo sem tratamento. One-way ANOVA com pos test Tukey.  $n=6$  para cada grupo.

A influência da atividade da PKA (através da sinalização  $\beta$  adrenérgica) e da PKC sobre a PMCA nos grupos CTRL e desnutridos, tratados ou não com propranolol, foi demonstrada na Figura 28. No grupo DBR-CR, a PMCA foi fosforilada preferencialmente por PKC em relação à PKA. Neste contexto, o nível de fosforilação por PKC foi 3 vezes maior que no grupo CTRL (Figura 28A) ao passo que a fosforilação por PKA representou  $33 \pm 3\%$  do nível de fosforilação do CTRL (Figura 28A e B). Por outro lado, na desnutrição intrauterina, o nível de fosforilação da PMCA foi muito baixo, seja ele por PKC ou por PKA (fosforilação da PMCA em % do CTRL: por PKC =  $17 \pm 7$  e por PKA =  $5 \pm 2$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 28B).



**Figura 28: Análise do perfil de fosforilação da PKC (A) e PKA (B) em PMCA em preparação ultracentrifugada de coração:** grupos controle (CTRL), desnutrido cronicamente (DBR-CR) e desnutrido intrauterinamente (DBR-IU) \*  $p < 0.05$ . One-way ANOVA com pos test Tukey.

## 5. DISCUSSÃO

Na presente tese de doutorado, foram demonstradas alterações dos mecanismos moleculares nos miócitos cardíacos de ratos Wistar adultos submetidos à desnutrição ocorrida em diferentes janelas do desenvolvimento. Nesta fase, os ratos apresentaram a função cardíaca diminuída e alterações das vias de sinalização que regulam o  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. É importante ressaltar que a janela onde ocorreu o insulto de desnutrição determina a via de sinalização envolvida de forma a influenciar na extensão e no tipo de resposta celular impactando a gravidade da doença cardíaca e a eficiência do tratamento com propranolol. Para melhor compreensão e interpretação dos resultados, a discussão será dividida em duas partes.

### 5.1. Impacto da desnutrição crônica na função cardíaca do rato adulto: o estudo das respostas adaptativas e a sensibilidade ao tratamento com propranolol.

O coração do rato adulto que sofreu desnutrição durante toda a sua fase de crescimento é claramente insuficiente porque foi perdida a relação pressão–volume acarretando na diminuição da complacência ventricular. A disfunção cardíaca ocorre

na sístole e na diástole, uma vez que se observa uma redução dos valores basais de PDVE e da velocidade de contração (parâmetros sistólicos), e na velocidade de relaxamento (parâmetro diastólico) (Figura 11). Corrobora com a perda de função cardíaca o fato de que morfologicamente o tecido é atrófico e apresenta acúmulo de colágeno, bolsões de gordura, acúmulo de água – como consequência da redução na pressão oncótica do sangue na desnutrição, o que favorece a extrusão de plasma para o espaço intersticial – e pequenas áreas infartadas (Figura 9). A infiltração de células adiposas é importante componente no reparo celular de tecidos cardíacos infartados (MEDET et al., 2009). Em conjunto com o que foi demonstrado no mestrado, o decréscimo do débito cardíaco, da fração de ejeção e do diâmetro do ventrículo esquerdo são indicativos de uma insuficiência cardíaca esquerda que é congestiva, conforme demonstrado pelo aumento do índice pulmonar e não hepático (Tabela 3). Essas alterações cardíacas funcionais e estruturais culminam com um fenótipo que se assemelha a uma hipertensão maligna: caquexia, letargia severa, postura encurvada e ereção dos pelos. O tratamento com propranolol parece atenuar a progressão da doença no rato DBR-CR.

Nosso grupo e outros autores (MURÇA et al., 2012) demonstramos que o aparecimento da hipertensão não está restrita apenas na desnutrição ocorrida nas fases intrauterina e perinatal. No caso da desnutrição crônica, a hipertensão aparece por volta da 6ª semana de vida, no final de um período de latência caracterizada pela elevação e sustentação da frequência cardíaca (MENDES, 2010 dissertação de mestrado). O aumento da atividade simpática num período de pressão sistólica dentro de limites de normalidade pode ser visto como uma resposta adaptativa para assegurar o débito cardíaco face a expansão do volume do compartimento intravascular devido ao aumento da reabsorção de fluido no túbulo proximal renal (SILVA et al., 2014a). A curva de Frank-Starling anômala no rato DBR-CR revela que o miocárdio perdeu a sua habilidade de responder ao aumento do retorno venoso com uma contração mais vigorosa (Figura 15 e Figura 16). De forma que o ventrículo esquerdo fica menos complacente (Tabela 4).

O ponto de virada onde essa resposta adaptativa a um ambiente desfavorável dispara eventos cardíacos adversos na fase adulta, parece ocorrer na transição da

6<sup>a</sup> até a 9<sup>a</sup> semana de vida onde o DBR-CR deixa de ser pré-hipertenso e se torna hipertenso, que progressivamente diminui a função cardíaca (MENDES, 2010 dissertação de mestrado). A partir dos resultados aqui apresentados, fica claro que os ratos com elevada pressão sistólica, tecido cardíaco desafiado pela privação de proteínas se torna gradualmente atrofico e não consegue sustentar os valores normais de parâmetros hemodinâmicos (PVDE,  $+dP/dt$  e  $-dP/dt$ ) (Figura 11).

Foi demonstrado no estudo *ex vivo* que o coração do rato DBR-CR apresenta uma diminuída resposta sistólica ao ISO (Figura 12 e Figura 13). Os valores de  $E_{max}$  para PDVE e  $+dP/dt$  em resposta ao ISO são menores que aqueles encontrados no grupo CTRL, sugerindo uma downregulation ou dessensibilização da via de sinalização associada aos  $\beta$ -AR. Uma vez que o efeito lusitrópico  $-dP/dt$  é semelhante entre DBR-CR e CTRL (Figura 14), podemos sugerir que a resposta simpática alterada ocorre exclusivamente para o mecanismo molecular que dispara a sístole.

É notável que a janela onde ocorre o período de restrição protéica influencia a resposta do  $\beta$ -AR na vida adulta. Ratos adultos machos que foram amamentados de mães submetidas a uma dieta de restrição protéica exibiram um acentuado  $E_{max}$  de PDVE ao ISO (ELMES et al., 2008). Na desnutrição crônica, observamos um aumento do conteúdo protéico do  $\beta$ -AR (Figura 18) e de PKA (Figura 20), diminuição da atividade da PKA (Figura 21) e a redução da relação entre o conteúdo da proteína  $\beta$  arrestina fosforilada pelo conteúdo de proteína total (0,5, dados não mostrados). Em conjunto, podemos propor um desacoplamento entre receptor e via de sinalização levando a diminuição da resposta inotrópica ao ISO (Figura 13).

A redução aguda do débito cardíaco induz o aumento do conteúdo protéico de  $\beta$ -AR na tentativa de recuperar o débito cardíaco a valores normais (COHN et al., 1984; LYMPEROPOULOS, 2013). Na insuficiência cardíaca, a redução em longo prazo do débito cardíaco associado à superestimulação simpática leva a dessensibilização da via (LUCIA et al., 2014). Apesar do aumento do conteúdo protéico da PKA, sua atividade se encontra diminuída (Figura 21), de forma que, a razão entre atividade e conteúdo protéico permanece diminuída. Tal evidência sugere uma dessensibilização da via de sinalização mediada pelo  $\beta$ -AR e justifica a

diminuição da função cardíaca basal e estimulada por ISO (Figura 11, Figura 12 e Figura 13).

Uma importante função da PKA na sístole cardíaca é a fosforilação de estruturas-chaves que modulam a homeostasia intracelular do  $\text{Ca}^{2+}$  (RAO et al., 2014). A redução da atividade da enzima influencia o nível de fosforilação de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , diminuindo a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático, impactando a velocidade de contração cardíaca (KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA et al., 2014). Ainda nesse contexto, a PKA favorece o relaxamento miocárdial através da fosforilação: (i) do fosfolambam, levando a ativação de SERCA e o restabelecimento dos estoques intracelulares, (ii) das miofibrilas (troponinas I e C) diminuindo a interação actino-miosina e (iii) de PMCA, facilitando a extrusão do  $\text{Ca}^{2+}$  (LAYLAND et al., 2005). Na desnutrição crônica observamos que a fosforilação da PMCA pela PKA está diminuída (Figura 28), de forma a expor ou esconder outros possíveis sítios de fosforilação por outras proteínas cinases, como a PKC. De fato, o nível de fosforilação da PMCA por PKC está elevado (Figura 28).

O desequilíbrio dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  observado no DBR-CR pode ser uma resposta adaptativa importante para a adequada função cardíaca no rato jovem que acarretou na insuficiência cardíaca no rato adulto. Neste contexto, foram investigadas três enzimas-chaves na manutenção dos níveis baixos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular: trocador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e SERCA – responsáveis pela remoção em massa de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio intracelular – e PMCA – responsável pelo ajuste fino da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (BRINI & CARAFOLI., 2009). Em relação às enzimas que removem o  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio extracelular detectamos que a razão trocador/SERCA é de 0,8 enquanto no controle é 1,2 (em valores absolutos, compare Figura 22 e Figura 23). Isto indica que a SERCA ainda é responsável pela extrusão de  $\text{Ca}^{2+}$  para o meio extracelular. Em casos de insuficiência cardíaca terminal, o trocador é a enzima responsável por essa função (HASENFUS & PIESKE, 2002).

Em relação a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total, observamos que a desnutrição crônica aumenta a atividade (Figura 24). Devido a esse perfil, no rato CTRL a atividade da SERCA contribui para 80 % da atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica total, cabendo a PMCA apenas 20 %. A desnutrição crônica não modifica o conteúdo de SERCA e diminui sua atividade (Figura 23), enquanto aumenta o conteúdo protéico e

atividade da PMCA (MENDES, 2010 - dissertação de mestrado). Propomos que esta enzima passa a superar a atividade da SERCA, como observado na Figura 25. Os possíveis mecanismos para o aumento da atividade da PMCA são o aumento da afinidade da enzima pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (MENDES, 2010 - dissertação de mestrado) e a fosforilação da enzima pela PKC (Figura 28). Apesar disso, não se pode descartar a hipótese do desacoplamento entre a capacidade de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  e a atividade hidrolítica da enzima. Seja pelo aumento da afinidade da PMCA ao  $\text{Ca}^{2+}$ , seja pelo desacoplamento da enzima, podemos postular que o  $\text{Ca}^{2+}$  não é removido de forma eficiente do citoplasma contribuindo para as alterações observadas principalmente durante a sístole.

Uma vez que a PMCA é modulada pelas proteínas cinases PKC e PKA – muita das vezes produzindo efeitos antagônicos como observado no epitélio renal (CABRAL et al., 2007) – e que o nível de fosforilação da enzima pela PKA se apresenta reduzida, a PKC foi investigada. Na desnutrição crônica a atividade da PKC sensível a calfostina se encontra diminuída (Figura 27). Apesar disso, a fosforilação de PMCA por PKC é muito maior que no grupo CTRL possivelmente porque a razão PKC/PKA está aumentada e devido a exposição de sítios de fosforilação para PKC. Resultado similar foi observado no epitélio renal (CABRAL et al., 2007; SILVA et al., 2014a).

A desnutrição crônica aumenta a expressão da PKC $\epsilon$  (Figura 26), associada em diversos estudos a instauração da insuficiência cardíaca (LIU & MOLKENTIN, 2010; KOBIRUMAKI-SHIMOZAWA et al., 2014). Já foi observado “*up-regulation*” da expressão das isoformas PKC $\epsilon$  (NOGUCHI et al., 2004) em corações insuficientes de ratos adultos. Além disso, estudos demonstram uma aumentada atividade e expressão da isoforma PKC $\epsilon$  em corações de ratos com deprimida função de Frank-Starling (característica de insuficiência cardíaca) (MONTGOMERY et al., 2005). É importante frisar que a PKC $\epsilon$  já foi comprovadamente relacionada à fosforilação dos filamentos troponina I e troponina C cardíaca onde reduz a ativação do miofilamento e atenua a cooperatividade dos filamentos finos (SOLARO & RARICK, 1998), ainda nesse contexto foi observado que a superexpressão da isoforma PKC $\epsilon$  está associada com redução na força máxima ativada pelo  $\text{Ca}^{2+}$  e aumentada fosforilação da troponina I e troponina C, demonstrando uma intrínscita relação entre

essa isoforma e defeitos contráteis observados na hipertrofia e insuficiência cardíaca (GOLDSPINK et al., 2004) Podemos dessa forma especular que a atividade da PKC $\epsilon$  no grupo DBR-CR, seja mascarada pela diminuição total das atividade de PKCs sensíveis a calfofina. O aumento da expressão da PKC $\epsilon$  pode, em parte, justificar o aumento de áreas infartadas (Figura 10) e decréscimo da função de Frank Starling no grupo DBR-CR (Figura 15 e Figura 16). Além disso, uma vez que a PKC contribui para o relaxamento miocárdial ao fosforilar as miofibrilas, tal redução na atividade total pode ser um fator contribuinte para o déficit diastólico comentado anteriormente.

Adicionalmente, as vias de sinalização no coração que envolvem o Ca<sup>2+</sup> e o Na<sup>+</sup>, este último demonstrado por SILVA e colaboradores (2014a e 2014b), bem como o consumo exacerbado de ATP pela PMCA, contribuem para o aumento dos níveis tissulares de ROS. Nesse sentido observamos que tanto os radicais oxidantes lipídicos, quanto os protéicos aumentaram no grupo DBR-CR (Figura 17). O aumento do stress oxidativo lipídico pode parcialmente justificar a alteração na atividade da PKC observada, uma vez que a mesma é ativada por DAG que advém da quebra do PIP<sub>2</sub> um lipídio de membrana (VIEIRA-FILHO et al., 2011). Da mesma forma o aumento do stress protéico pode indicar danos a proteínas importantes como as Ca<sup>2+</sup>-ATPases, proteínas cinases, trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> e miofibrilas (REEVES et al., 1986; GOLDBERGER, 1996; MORRIS & SULAKHE, 1997; ZAIDI & MICHAELIS, 1999; ZAIDI et al., 2003). Dessa forma a extensa atrofia e presença de áreas infartadas podem ter como componente base, além da descompensação do Ca<sup>2+</sup> intracelular, o dano oxidativo protéico como indutor da morte programada dessas fibras como é demonstrado nos casos de insuficiência cardíaca (KÖHLER et al., 2014).

A justificativa do tratamento com propranolol advém do fato de que os ratos DBR-CR apresentam na fase inicial de vida um aumento da frequência cardíaca sem aumento de pressão sistólica e um quadro bastante semelhante a insuficiência cardíaca pela ecocardiografia (MENDES, 2010 - dissertação de mestrado). Em outras palavras, o coração destes ratos estaria sendo exposto a uma carga simpática exacerbada muito cedo que acarretaria numa perda de função na vida adulta. Por ser o propranolol um  $\beta$  bloqueador não seletivo, além de bloquear os  $\beta$ -

AR cardíacos, ele bloqueia  $\beta$ -AR vasculares, induzindo vasoconstricção (CADIRCI et al., 2010), contribuindo, em parte, para a redução do extravasamento de líquido nos tecidos e redução do edema em animais submetidos a desnutrição crônica. Podemos notar que o tratamento a longo prazo promoveu de forma geral resultados satisfatórios, dentre eles os que mais se destacam são: (i) impede o desenvolvimento de atrofia ventricular e da congestão pulmonar (Tabela 3), (ii) redução de áreas infartadas (Figura 10), (iii) previne a redução dos parâmetros basais cardíacos PDVE,  $+dP/dt$  e  $-dP/dt$  (Figura 11), (iv) impede o aumento da expressão do  $\beta$ -AR (Figura 18) com consequente reversão da via de sinalização associada a PKA (Figura 20 e Figura 21), (v) previne exclusivamente o aumento da atividade da PMCA (Figura 24), reestabelecendo a proporcionalidade de contribuição SERCA:PMCA para a atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica total (Figura 25) e (vi) mantém os níveis de atividade das PKCs sensíveis a calfostina (Figura 27). Entretanto, o tratamento com propranolol diminuiu ainda mais a complacência ventricular de forma que o perfil das curvas de Frank-Starling no grupo DBR-CRp se mantiveram parecidas com aquelas obtidas no grupo DBR-CR e não CTRL. O mesmo foi observado nos ensaios *ex-vivo* para os parâmetros cardíacos frente ao ISO. Neste caso, a diminuição do  $E_{max}$  da PDVE e da  $+dP/dt$  foram mantidos e associados a um decréscimo de  $-dP/dt$  que não estava modificado no rato DBR.

Clinicamente, o tratamento com propranolol demonstra que durante os primeiros meses ocorre uma redução ainda maior do débito e da função cardíaca em paciente insuficientes e após três meses consecutivos de tratamento os benefícios e a melhora da função cardíaca passam a ser observados (HALL et al., 1995). Nesse sentido, uma observação mais longa dos animais tratados poderia indicar se a redução da complacência ventricular estaria vinculada a reposta a longo prazo do propranolol. Corroborando com essa hipótese, em um estudo realizado por TUNCAY e colaboradores (2011), demonstraram que o propranolol melhorou a função cardíaca (PDVE basal e na presença de doses crescentes de ISO) em ratos controle, tratados durante 13 semanas e não 10 semanas como em nosso estudo. Outra possibilidade é de que para os estudos de Langendorff, o tratamento com propranolol é descontinuado 2 dias antes dos ensaios para que ocorra a queda de 2 tempos de meia-vida do fármaco na corrente sanguínea (PACCA et al., 2002;



PRIVIERO et al., 2007). Entretanto, não podemos garantir que o acúmulo de propranolol seja removido no tecido cardíaco, mascarando os ensaios com ISO.

Em conjunto com as publicações que demonstram alterações de função renal, bem como de mecanismos modulatórios (COSTA-SILVA et al., 2009, SILVA et al., 2014a) é possível postular que neste modelo de desnutrição os ratos desenvolvem uma Síndrome Cardio-renal do tipo 5, caracterizada pelas alterações cardíacas e renais ocasionadas por uma causa sistêmica (MIRANDA et al., 2009).

## **5.2. Impacto da desnutrição intrauterina na função cardíaca do rato adulto: a hipótese da programação e a sensibilidade ao tratamento com propranolol.**

Na desnutrição intrauterina, as alterações moleculares detectadas não representaram diretamente numa modificação do tecido cardíaco (Figura 9) nem nos parâmetros hemodinâmicos PDVE e velocidades de contração e relaxamento (Figura 11) no rato adulto jovem. Apesar da relação pressão–volume ser bastante semelhante à obtida no rato CTRL, observamos um aumento da complacência ventricular e hipertensão leve (MENDES, 2010 - dissertação de mestrado). Estes dados indicam que a mudança do *status* nutricional, logo após o nascimento, deixa marcas moleculares importantes deixando o coração sensível a qualquer insulto na vida adulta, corroborando com a hipótese da programação (BARKER, 1994; CLEAL et al., 2007). O mesmo também foi observado em relação à função renal. O aumento da atividade dos transportadores de Na<sup>+</sup> no túbulo proximal renal e da responsividade da via de sinalização dependente de Ang II não refletiram diretamente na excreção urinária de Na<sup>+</sup> e no processo de filtração glomerular (VIEIRA-FILHO et al., 2014).

O aumento do volume plasmático (VIEIRA-FILHO et al. 2011) associado a redução do débito cardíaco (MENDES, 2010 - dissertação de mestrado) sem alteração na hemodinâmica cardíaca sugere que a desnutrição intra-uterina dispara mecanismos que tentam preservar a função do órgão até a idade adulta. No entanto, não se pode descartar que a desnutrição intrauterina promove aumento da pós-carga ocasionada por uma hiperatividade simpática vascular. Mesmo assim, o aumento da descarga simpática deixa marcas no tecido cardíaco como o aumento do conteúdo protéico dos  $\beta$ -AR cardíacos (Figura 18).

A respeito do conteúdo protéico dos  $\beta$ -AR cardíacos, este não representou diretamente o aumento do  $E_{m\acute{a}x}$  nas respostas de PDVE e velocidades de contração e relaxamento frente a diferentes concentrações de ISO. Pelo contrário, foi observado um decréscimo do  $E_{m\acute{a}x}$  nas respostas de PDVE e da velocidade de contração (Figura 12 e Figura 13) e nenhuma alteração na velocidade de relaxamento (Figura 14). Isso indica que apesar de uma boa *performance* e integridade das fibras ventriculares a capacidade responsiva é limitada. Tal hipótese pode ser comprovada pelo fato de ocorrer um aumento da complacência ventricular (Tabela 4) e que é perdida a relação volume-pressão (Figura 15 e Figura 16). Este evento pode estar associado à dessensibilização da via de sinalização associada, dependente de PKA.

O reajuste dos níveis intracelulares de  $Ca^{2+}$  no DBR-IU pode ser o ponto-chave da programação cardíaca que predispõe o rato a doença cardiovascular. A desnutrição intra-uterina promove o aumento do conteúdo protéico do trocador  $Na^+/Ca^{2+}$  e diminuição da atividade  $Ca^{2+}$ -ATPásica total – reflexo da atividade diminuída da PMCA. O possível mecanismo para a diminuição destas atividades é a diminuição das atividades das proteínas cinases. De fato, o nível de fosforilação da PMCA por PKA e por PKC é muito baixa (Figura 28), devido a diminuta atividade das enzimas (Figura 21). Desta forma, podemos postular que o  $Ca^{2+}$  é removido do meio intracelular preponderantemente pelo trocador  $Na^+/Ca^{2+}$ , o marcador da insuficiência cardíaca (HASENFUS & PIESK, 2002). Este evento pode impactar a complacência ventricular, aumentando-a. Isso é importante porque o ventrículo passa a acomodar melhor o retorno venoso na tentativa de sobrepor a barreira imposta pela pós-carga. Entretanto, há um risco embutido nessa situação a longo prazo. Cada vez que o retículo deixa de retornar o  $Ca^{2+}$  para seu interior, os estoques tornam-se depletados, diminuindo a capacidade inotrópica positiva do coração que a princípio não está comprometida. Vale a pena ressaltar o desbalanço do conteúdo protéico entre as isoformas de PKC  $\alpha$  e  $\epsilon$  no sentido de favorecer o dano do tecido cardíaco (Figura 26).

Ao contrário do que se observa no rim dos ratos DBR-IU, no coração não se observou o aumento dos marcadores do estresse oxidativo. O aumento da atividade das ATPases observadas no epitélio renal pode impactar as mitocôndrias na

geração de ATP promovendo a produção de ROS (VIEIRA-FILHO et al., 2009). Se tornando um ciclo vicioso, quando a oxidação lipídica e protéica afetam vias de sinalização e o dano tecidual. Na desnutrição intrauterina, a atividade  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPásica diminuída poderia evitar a geração de ROS.

As alterações bioquímicas com o tratamento com propranolol são parcialmente revertidas. Foram observados: (i) bloqueio parcial da diminuição da atividade da SERCA, de forma que é mantida a sua preponderância sobre a PMCA (Figura 24 e figura 25) e (ii) prevenção da diminuição da atividade da PKC e PKA (Figura 21 e Figura 27). O aumento da atividade da PKA pode fosforilar fosfolambam, que se desliga de SERCA, aumentando a sua atividade a nível controle. No entanto, observamos a resistência ao tratamento, uma vez que o conteúdo protéico do  $\beta$ -AR continua aumentado. Podemos sugerir então, que em condições normais, como nos ratos CTRL, onde a via  $\beta$ -AR-PKA está intacta o tratamento com propranolol modifica a *performance* ventricular basal. No entanto, onde a via  $\beta$ -AR-PKA está alterada, a resposta cardíaca basal se torna resistente ao tratamento com o fármaco. Mesmo neste contexto, o  $E_{\text{max}}$  dos parâmetros cardíacos frente ao ISO é mantido.

## 6. CONCLUSÃO

	Desnutrição intrauterina	Desnutrição crônica
Parâmetros hemodinâmicos - controle da pressão arterial (Luiza Villarinho – dissertação de mestrado, 2010)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ↓ do débito cardíaco, volume sistólico</li> <li>- ↑ aumento da pressão sistólica</li> <li>- <b>Hipertensão arterial leve</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ↓ do débito cardíaco, volume sistólico e fração de ejeção</li> <li>- ↑ aumento da pressão sistólica, diastólica e frequência cardíaca</li> <li>- <b>Hipertensão arterial bem definida</b></li> </ul>
Performance ventricular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inalterados</li> <li>- <b>Função basal preservada</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pressão desenvolvida, velocidade de contração e relaxamento basais reduzidos</li> <li>- <b>Dano principalmente sistólico</b></li> </ul>
Responsividade ao Isoproterenol	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pressão desenvolvida e velocidade de contração máximas reduzidas</li> <li>- <b>Dano sistólico evidenciado por estímulo adrenérgico adicional</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pressão desenvolvida e velocidade de contração e relaxamento máximas reduzidas</li> <li>- <b>Dano sistólico e diastólico mais evidente com estímulo adrenérgico adicional</b></li> </ul>
Complacência ventricular	<ul style="list-style-type: none"> <li>- complacência ventricular aumentada</li> <li>- Pressão desenvolvida em resposta ao aumento de volume intraventricular aumentado</li> <li>- <b>Insuficiência cardíaca ausente, apesar da detecção de alguns marcadores moleculares</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Complacência ventricular diminuída</li> <li>- Pressão desenvolvida em aumento de volume intraventricular diminuído</li> <li>- <b>Insuficiência cardíaca instaurada</b></li> </ul>
Morfologia das fibras e identificação de áreas infartadas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Integridade das fibras cardíacas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Atrofia muscular</li> <li>- Depósito de colágeno e células adiposas</li> <li>- Aumento de áreas infartadas</li> <li>- <b>Insuficiência cardíaca associada a degeneração tecidual do tipo infarto e indícios de reparo</b></li> </ul>
Identificação de edema	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Relação peso ventricular /peso corporal normal</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento da relação peso ventricular /peso corporal</li> <li>- Aumento do conteúdo de água ventricular e pulmonar</li> <li>- <b>Insuficiência cardíaca ventricular esquerda</b></li> </ul>
Expressão e função de proteínas pertencentes a via adrenérgica	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de <math>\beta</math>-AR</li> <li>- Aumento da atividade da PKA</li> <li>- <b>Compensação da disfunção sistólica por aumento da via</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Aumento de <math>\beta</math>-AR</li> <li>- Aumento do conteúdo e da atividade da PKA</li> <li>- <b>Compensação da disfunção sistólica e diastólica por aumento da via</b></li> </ul>

## 7. Referências Bibliográficas

- Ahmmed, G.U; Dong, P.H; Song, G.J; Ball, N.A; Xu, Y.F; Walsh, R.A; Chamvimonvat, N. Changes in Ca cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in a pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.*, 86:558-570, 2000.
- Akitake, Y; Katsuragi, S; Hosokawa, M; Mishima, K; Ikeda, T; Miyazato, M; Hosoda, H. Moderate maternal food restriction in mice impairs physical growth, behavior, and neurodevelopment of offspring. *Nutr Res.*, 35(1):76-87, 2015.
- Almeida, M.F; Silveira, A.C; Guedes, R.C; Hokoç, J.N; Martinez, A.M. Quantitative ultrastructural evidence of myelin malformation in optic nerves of rats submitted to a multideficient diet. *Nutr Neurosci.*, 8(2):91-99, 2005.
- Andrade, A,F; Guedes, R.C; Teodósio, N.R. Enhanced rate of cortical spreading depression due to malnutrition: prevention by dietary protein supplementation. *Braz J Med Biol Res.*, 23(9):889-893, 1990.
- Barker, D.J; Winter, P.D; Osmond, C; Margetts, B; Simmonds, S.J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 2(8663):577-580, 1989.
- Barker, D.J; Gluckman, P.D; Godfrey, K.M; Harding, J.E; Owens, J.A; Robinson, J.S. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*, 341(8850):938-941, 1993.
- Barker, D.J. *Mothers, Babies and Disease in Later Life.* London: BMJ Publishing Group, 1994.
- Barker, D.J. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab.* 13(9):364-368, 2002.
- Barros, K.M; Manhães-De-Castro, R; Lopes-De-Souza, S; Matos R.J; Deiró, T.C; Cabral-Filho, J.E; Canon, F. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci.*, 9(1-2):99-104, 2006.

- Belin, R.J; Sumandea, M.P; Allen, E.J; Schoenfelt, K; Wang, H; Solaro, R.J; De Tombe, P.P. Augmented protein kinase C-alpha-induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure. *Circ Res.*, 101(2):195-204, 2007.
- Benabe, J.E; Martinez-Maldonado, M. The impact of malnutrition on kidney function. *Miner Electrolyte Metab.*, 24(1):20-26, 1998.
- Berne, R.M; Levi, M.N; Koeppen, B.M; Stanton, B.A. O sistema cardiovascular. Em: Berne & Levi. *Fisiologia*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 277-285, 2009.
- Bers, D.M. *Excitation–contraction coupling and cardiac contractile force*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (segunda edição), 2001.
- Biblioteca Virtual do Ministério da saúde: [www.bvsms.saude.gov.br](http://www.bvsms.saude.gov.br).
- Bodor, G.S; Oakeley, A.E; Allen, P.D; Ladenson, D.L; Anderson, P.A. Troponin I phosphorylation in the normal and failing adult human heart. *Circulation*. 96:1495–1500, 1997.
- Boveris, A; Oshino, N; Chance, B. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J.*, 128:617–630, 1972.
- Bowling, N; Walsh, R.A; Song, G; Estridge, T; Sandusky, G.E; Fouts, R.L; Mintze, K; Pickard, T; Roden, R; Bristow, M.R; Sabbah, H.N; Mizrahi J.L; Gromo, G; King, G.L; Vlahos, C.J. Increased protein kinase C activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-sensitive isoforms in the failing human heart. *Circulation*. 99(3):384-391, 1999.
- Brennan, J.P; Bardswell, S.C; Burgoyne, J.R, Fuller, W; Schröder, E; Wait, R. Oxidant induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit interprotein disulfide bond formation. *J Biol Chem.*, 281:21827–21836, 2006.
- Brini, M; Carafoli, E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.*, 89:1341–1378, 2009.

- Brum, P.C; Rolim, N.P.L; Bacurau, A.V.N; Medeiros, A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78(3):485-503, 2006.
- Cabral, E.V; Vieira-Filho, L.D; Silva, P.A. Perinatal Na<sup>+</sup> overload programs raised renal proximal Na<sup>+</sup> transport and enalapril-sensitive alterations of Ang II signaling pathways during adulthood. *PLoS One* 7, e43791, 2012.
- Cabral, L.M; Wengert, M; Da Ressurreição, A.A; Feres-Elias, P.H; Almeida, F.G; Vieyra, A; Caruso-Neves, C; Einicker-Lamas, M. Ceramide is a potent activator of plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase from kidney-promixal tubule cells with protein kinase A as an intermediate. *J Biol Chem.*, 282(34):24599-24606, 2007.
- Cheema, K.K; Dent, M.R; Saini, H.K; Aroutiounova, N; Tappia, P.S. Prenatal exposure to maternal undernutrition induces adult cardiac dysfunction. *Br J Nutr.*, 93:471-477, 2005.
- Cho, K.I; Koo, S.H; Cha, T.J; Heo, J.H; Kim, H.S; Jo, G.B; Lee, J.W. Simvastatin attenuates the oxidative stress, endothelial thrombogenicity and the inducibility of atrial fibrillation in a rat model of ischemic heart failure. *Int J Mol Sci.*,15:14803-14818, 2014.
- Chu, C.H; Tzang, B.S; Chen, L.M. IGF-II/mannose-6-phosphate receptor signaling induced cell hypertrophy and atrial natriuretic peptide/BNP expression via Galphaq interaction and protein kinase C-alpha/CaMKII activation in H9c2 cardiomyoblast cells. *J Endocrinol.*, 197: 381–390, 2008.
- Cleal, J.K; Poore, K.R; Boullin, J.P; Khan, O; Chau, R; Hambidge, O; Torrens, C; Newman, J.P; Poston, L; Noakes, D.E; Hanson, M.A; Green, L.R. Mismatched pre- and postnatal nutrition leads to cardiovascular dysfunction and altered renal function in adulthood. *Proc Natl Acad Sci*, 104: 9529-9533, 2007.
- Cohn, J.N; Levine, T.B; Olivari, M.T; Garberg,V; Lura, D; Francis, G. S. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.*, 311:819–823, 1984.

- Costa-Silva, J.H; Silva, P.A; Pedi, N; Luzardo, R; Einicker-Lamas, M; Lara, L.S; Bezerra, A. M; Castro-Chaves, C; Vieyra, A. Chronic undernutrition alters renal active Na<sup>+</sup> transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *Eur J Nutr.*, 48: 437-45, 2009.
- Coutinho, E.M; De Freitas, L.P; Abath, F.G. The influence of the regional basic diet from northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.*, 25(1):13-20, 1992.
- De Sousa, A.P; Gurgel, C.A; Ramos, E.A; Trindade, R.F; De Faro Valverde, L; Carneiro, T.S; Cangussú, M.C; Pinheiro, A.L; Dos Santos, J.N. Infrared LED light therapy influences the expression of fibronectin and tenascin in skin wounds of malnourished rats. A preliminary study. *Acta Histochem.*, 116(7):1185-1191, 2014.
- Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.*, 82:70–77, 1956.
- Elmes, M.J; Gardner, D.S; Haase, A; Langley-Evans, S.C. Sex differences in sensitivity to b-adrenergic agonist isoproterenol in the isolated adult rat heart following prenatal protein restriction. *Br J Nutri.*, 101:725–734, 2008.
- FAO: [www.fao.org.br](http://www.fao.org.br)
- Feldman, A.M; Weinberg, E.O; Ray, P.E; Lorell, B.H. 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, 1997.
- Fernandez-Twinn, D.S; Ekizoglou, S; Wayman, A; Petry, C.J; Ozanne, S.E. Maternal low-protein diet programs cardiac beta-adrenergic response and signaling in 3-mo-old male offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 29:429-436, 2006.
- Ferreira, H.S; Coutinho, E.M; Teodósio, N.R; Cavalcanti, C.L; Samico, M.J. Intestinal protein absorption in malnourished mice with acute schistosomiasis *mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, 88(4):581-587, 1993.



- Figueroa, M .S; Peters, J.I. Congestive heart failure: Diagnosis, pathophysiology, therapy, and implications for respiratory care. *Respir Care.*, 51(4):403– 412, 2006.
- Fishbein, M.C; Meerbaum, S; Rit, J; Lando, U; Kanmatsuse, K; Mercier, J.C; Corday, E; Ganz, W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J.*, 101(5):593-600, 1981.
- Fitzsimons, D.P; Moss, R.L. Cooperativity in the regulation of force and the kinetics of force development in heart and skeletal muscles: cross-bridge activation of force. *Adv Exp Med Biol.*, 592:177-189, 2007.
- Forsen, T; Eriksson, J.G; Tuomilehto, J; Osmond, C; Barker, D.J. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *BMJ* 319: 1403-1407, 1999.
- Fowden, A.L; Giussani, D.A; Forhead, A.J. Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology*, 21: 29-37, 2006.
- Fuchs, F; Smith S.H. Calcium, Cross-Bridges, and the Frank-Starling Relationship. *News in Physiological Sciences.*, 16:5-10, 2001.
- Gauthier, C; Tavernier, G; Charpentier, F; Langin, D; Le Marec, H. Functional beta 3 adrenoceptor in the human heart. *J Clin Invest.*, 98:556-562, 1996.
- Goldhaber, J.I. Free radicals enhance Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in ventricular myocytes. *Am J Physiol.*, 271:H823–833, 1996.
- Goldspink, P.H; Montgomery, D.E; Walker, L.A; Urboniene, D; McKinney, R.D; Geenen, D.L. Protein kinase C $\alpha$  overexpression alters myofilament properties and composition during the progression of heart failure. *Circ Res.*, 95:424– 432, 2004.
- Gopalakrishna, R; Anderson W.B. Ca<sup>2+</sup>- and phospholipid-independent activation of protein kinase C by selective oxidativemodification of the regulatory domain. *Proc Natl Acad Sci.*, 86:6758–6762, 1989.

- Grassi, G; Quarti-Trevano, F; Seravalle, G; Dell'oro, R. Cardiovascular risk and adrenergic overdrive in the metabolic syndrome. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, 17:473–481, 2007.
- Grassi, G. Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. *J Hypertens.*, 16:1979–1987, 1998.
- Guimarães, S; Moura, D. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev.*, 53:319-356, 2001.
- Güneş, A; Ceylan, A; Sarioglu, Y; Stefek, M; Bauer, V; Karasu, C. Reactive oxygen species mediate abnormal contractile response to sympathetic nerve stimulation and noradrenaline in the vas deferens of chronically diabetic rats: effects of in vivo treatment with antioxidants. *Fundam Clin Pharmacol.*, 19(1):73-79, 2005.
- Guyton, A.C; Hall, J.E. O coração. Em Guyton & Hall. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 65-73, 2011.
- Hall, S.A; Cigarroa, C.G; Marcoux, L; Risser, R.C; Grayburn, P.A; Eichhorn, E.J. Time course of improvement in left ventricular function, mass and geometry in patients with congestive heart failure treated with beta adrenergic blockade. *J Am Coll Cardiol*. 25:1154-1161, 1995.
- Han, Y.S; Arroyo, J; Ogut, O. Human heart failure is accompanied by altered protein kinase A subunit expression and post-translational state. *Arch Biochem Biophys.*, 538(1):25-33, 2013.
- Hasenfuss, G; Pieske, B. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 34(8):951-969, 2002.
- Hasenfuss, G; Schillinger, W; Lehnart, S.E; Preuss M; Pieske, B; Maier L.S; Prestle, J; Minami, K; Just, H. Relationship between Na/Ca exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation*. 99:641-648, 1999.
- Heck, D.E; Shakarjian, M; Kim, H.D; Laskin, J.D; Vetrano, A.M. Mechanisms of oxidant generation by catalase. *Ann N Y Acad Sci.*, 1203: 120-125, 2010.

- Herken, E.N; Kocamaz, E; Erel, O; Celik, H; Kucukatay, V. Effect of sulfite treatment on total antioxidant capacity, total oxidant status, lipid hydroperoxide, and total free sulfhydryl groups contents in normal and sulfite oxidase-deficient rat plasma. *Cell Biol Toxicol.*, 25(4):355-62, 2009.
- Hernández-Julián, R; Mansour, H; Peters, C. The effects of intrauterine malnutrition on birth and fertility outcomes: evidence from the 1974 bangladesh famine. *Demography.* 51(5):1775-1796, 2014.
- Herron, T.J; Korte, F.S; McDonald, K.S. Power output is increased after phosphorylation of myofibrillar proteins in rat skinned cardiac myocytes. *Circ Res.*, 89(12):1184-1190, 2001.
- Hinken, A.C; Hanft, L.M; Scruggs, S.B; Sadayappan, S; Robbins, J; Solaro, R.J; McDonald, K.S. Protein kinase C depresses cardiac myocyte power output and attenuates myofilament responses induced by protein kinase A. *J Muscle Res Cell Motil.*, 33(6):439-448, 2012.
- Hobai, I.A; O'rourke, B. Enhanced Ca-activated Na/Ca exchange activity in canine pacing-induced heart failure. *Circ Res.*,87: 690-698, 2000.
- Hool, L.C. Reactive oxygen species in cardiac signalling: from mitochondria to plasma membrane ion channels. *Clin Exp Pharmacol Physiol.*, 33(1-2): 146-151,2006.
- Huang, L; Wolska, B.M; Montgomery, D.E; Burkart, E.M; Buttrick, P.M; Solaro, R.J. Increased contractility and altered Ca(2+) transients of mouse heart myocytes conditionally expressing PKCbeta. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 280(5):C1114-C1120, 2001.
- Huggett, R.J; Scott, E.M; Gilbey, S; Stoker, J.B; Mackintosh, A.F; Mary, D. A. Impact of type 2 diabetes mellitus on sympathetic neural mechanisms in hypertension. *Circulation* 108:3097–3101, 2003.

- Ide, T; Tsutsui, H; Kinugawa, S; Utsumi, H; Kang, D; Hattori, N. Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium. *Circ Res.*, 85:357–363, 1999.
- Inoguchi, T; Battan, R; Handler, E; Sportsman, J.R; Heath, W; King, G.L. Preferential elevation of protein kinase C isoform beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci.*, 89(22):11059-11063, 1992.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE): [www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)
- Irigoyen, M.C; Consolim-Colombo, M.F; Krieger, E.M. Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático. *Rev Bras Hipertens.*, 8:55-62, 2001.
- Jideama, N.M; Noland, T.A; Raynor, R.L; Blobe, G.C; Fabbro, D; Kazanietz, M.G; Blumberg, P.M, Hannun, Y.A, Kuo, J.F. Phosphorylation specificities of protein kinase C isozymes for bovine cardiac troponin I and troponin T and sites within these proteins and regulation of myofilament properties. *J Biol Chem.*, 271(38):23277-23283, 1996.
- Johns, E.C; Simnett, S.J; Mulligan, I.P; Ashley, C.C. Troponin I phosphorylation does not increase the rate of relaxation following laser flash photolysis of diazo-2 in guinea-pig skinned trabeculae. *Pflügers Arch.*, 433:842– 844, 1997.
- Kajiwara, H; Morimoto, S; Fukuda, N; Ohtsuki, I; Kurihara, S. Effect of troponin I phosphorylation by protein kinase A on length-dependence of tension activation in skinned cardiac muscle fibers. *Biochem Biophys Res Commun.*, 272:104–110, 2000.
- Kamp, T.J; Hell, J.W. Regulation of cardiac L-type calcium channels by protein kinase A and protein kinase C. *Circ Res.*, 87(12):1095-1102, 2000.
- Kato, M; Kako, K.J. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange of isolated sarcolemmal membrane: effects of insulin, oxidants and insulin deficiency. *Mol Cell Biochem.*, 83:15–25, 1988.

- Kiss, E; Ball, N.A; Kranias, E.G; Walsh, R.A. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca<sup>2+</sup>-ATPase protein levels. Effects on Ca<sup>2+</sup> transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res.*, 77:759-764, 1995.
  - Klebanov, S; Herlihy, J.T; Freeman, G.L. Effect of long-term food restriction on cardiac mechanics. *Am J Physiol.* 273:H2333-H2342, 1997.
- Kobirumaki-Shimozawa, F; Inoue, T; Shintani, S.A; Oyama, K; Terui, T; Minamisawa, S; Ishiwata, S; Fukuda, N. Cardiac thin filament regulation and the Frank-Starling mechanism. *J Physiol Sci.*, 64(4):221-232, 2014.
- Köhler, A.C; Sag, C.M; Maier, L.S. Reactive oxygen species and excitation–contraction coupling in the context of cardiac pathology. *J Mol Cell Cardiol.*, 73:92–102, 2014.
- Kukreja, R.C; Okabe, E; Schrier, G.M; Hess, M.L. Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Arch Biochem Biophys.*,261:447–457, 1988.
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227:680-685, 1970.
- Langley-Evans, S.C. Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc.*, 60:505-513, 2001.
- Langley-Evans, S.C. Nutritional programming of disease: unraveling the mechanism. *J Anat*, 215: 36-51, 2009.
- Langley-Evans, S.C; Phillips, G.J; Benediktsson, R; Gardner, D.S; Edwards, C.R.W; Jackson, A.A; Seckl, J.R. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension. *Placenta*, 17: 169-172, 1996.

- Lassegue, B; SanMartin, A; Griendling, K.K. Biochemistry, physiology, and pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system. *Circ Res.*,110:1364–1390, 2012.
- Layland, J; Solaro, R.J; Shah, A.M. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. *Cardiovasc Res.*, 66(1):12-21, 2005.
- Leimbach, W.N.Jr, Wallin, B.G, Victor, R.G, Aylward, P.E, Sundlof, G, Mark, A.L. Direct evidence from intraneural recordings for increased central sympathetic outflow in patients with heart failure. *Circulation* 73:913–919, 1986.
- Limas, C.J; Olivari, M.T; Goldenberg, I.F; Levine, T.B; Benditt, D.G; Simon, A. Calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum in human dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res.*, 21:601-605, 1987.
- Lima F.E.L, Rabito E.I, Dias M.R.M.G. Nutritional Status of the adult population in the Bolsa Família Program in Curitiba, State of Paraná, Brazil. *Rev Bras Epidemiol.* 14(2): 198-206, 2011.
- Liu, Q; Molkentin, J.D. Protein kinase C $\alpha$  as a heart failure therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol.*, 51(4):474-478, 2010.
- Litwin, S.E; Bridge, J.H.B. Enhanced Na-Ca exchange in the infarcted heart implications for excite on contraction coupling. *Circ Res.*, 8:1083-1093, 1997
- Lofredo, F.S; Nikolova, A.P; James, R. Pancoast, J.R; Lee, R.T. Heart failure with preserved ejection fraction: Molecular pathways of the aging myocardium. *Circulation Research.* 115: 97-107, 2014.
- Lowry, O.H; Rosebrought, N.J; Farr, A.L; Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.*, 193:265-275, 1951.
- Lucas, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J Nutr.*, 128(2 Suppl):401S-406S, 1998.

- Lucia, C; Femminella, G.D; Gambino, G; Pagano, ; Allocca, E; Rengo, C; Silvestri, C; Leosco, D; Ferrara, N, Rengo, G. Adrenal adrenoceptors in heart failure. *Frontiers in physiology*. 246(5):1-9, 2014.
- Luyckx, V.A; Brenner, B.M. Birth weight, malnutrition and kidney-associated outcomes-a global concern. *Nat Rev Nephrol.*, 1-15, 2015.
- Luzardo, R; Silva, P.A; Einicker-Lamas, M; Ortiz-Costa, S; Do Carmo, M.G; Vieira-Filho, L.D; Paixão, A.D; Lara, L.S; Vieyra, A. Metabolic programming during lactation stimulates renal Na<sup>+</sup> transport in the adult offspring due to an early impact on local angiotensin II pathways. *PLoS One*. 6(7):e21232, 2011.
- Lymeropoulos, A. Physiology and pharmacology of the cardiovascular adrenergic system. *Front Physiol*. 4:240, 2013.
- Lymeropoulos, A; Rengo, G; Koch, W. J. Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res*. 113:739–753, 2013.
- Maack, C; Kartes, T; Kilter, H; Schäfers, H.J; Nickenig, G; Böhm, M. Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation*.108:1567–1574, 2003.
- Malina, R.M; Bouchard, C; Bar-or, O. Undernutrition in childhood and adolescence. Em: *Growth, Maturation and Physical Activity (segunda edição)*, pp. 509–526, 2004.
- Marques-Neto, S.R; Ferraz, E.B; Rodrigues, D.C; Njaine, B; Rondinelli, E; Campos de Carvalho, A.C; Nascimento, J.H. AT1 and aldosterone receptors blockade prevents the chronic effect of nandrolone on the exercise-induced cardioprotection in perfused rat heart subjected to ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Drugs Ther.*, 28(2):125-135, 2014.
- Martindale, J.L; Holbrook, N.J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.*, 192:1–15, 2002.

- Masuo, K; Lambert, G.W; Esler, M.D; Rakugi, H; Ogihara, T; Schlaich, M.P. The role of sympathetic nervous activity in renal injury and end-stage renal disease. *Hypertens Res.* 33, 521–528, 2010.
- McConnell, BK; Moravec, CS; Bond, M. Troponin-I phosphorylation and myofilament calcium sensitivity during decompensated cardiac hypertrophy. *Am J Physiol.*, 274:H385–H396, 1998.
- Medet, J; Taro, M; Shin-ichiro, Y; Koichiro, K; Yoshiaki, K; Takayuki, M; Masako, M; Satoshi, S; Atsushi, H; Hideo, M; Noboru, F. Desdifferentiated fat cells convert to cardiomyocyte phenotype and repair infarcted cardiac tissue in rats. *J of Molecular and Cellular Cardiology.*, 47:565–575, 2009.
- Mendes, L.V.P. Efeito da desnutrição multifatorial no controle da homeostasia do cálcio no coração: possível implicação na insuficiência cardíaca? Dissertação de mestrado, 2010.
- Mesquita, E.T; Socrates, J; Rassi, S; Villacorta, H; Mady, C. Insuficiência cardíaca com função sistólica preservada. *Arq Bras Cardiol.*, 82:494-504, 2004.
- Metzger, J.M; Westfall, M.V. Covalent and noncovalent modification of thin filament action: the essential role of troponin in cardiac muscle regulation. *Circ Res.*, 94(2):146-158, 2004.
- Ministério da Saúde: [www.saude.gov.br](http://www.saude.gov.br)
- Michelini, C.A. Mind Map: a new way to teach patients and staff. *Home Healthc Nurse.* 18(5):318-322, 2000.
- Miranda, S.P; Macedo, R.N; Júnior, G.B.S, Daher, E.F. Síndrome cardiorenal: fisiopatologia e tratamento. *Rev Assoc Med Bras.*, 55(1):89-94, 2009.
- Monte, C.M.G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. *J pediatr (Rio de Janeiro)*, 76(3): 285-297, 2000.
- Monteiro, C.A. Trends in the burden of disease due to under- and over-nutrition in the developing world. *Forum Nutr.*, 56:266-267, 2003.



- Montgomery, D.E; Rundell, V.L; Goldspink, P.H; Urboniene, D; Geenen, D.L; De Tombe, P.P; Buttrick, P.M. Protein kinase C epsilon induces systolic cardiac failure marked by exhausted inotropic reserve and intact Frank–Starling mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 289:H1881–H1888, 2005.
- Morris, T.E; Sulakhe, P.V. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-pump dysfunction in rat cardiomyocytes briefly exposed to hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med.*, 22:37–47, 1997.
- Murça, T.M; Magno, T.S; De Maria, M.L; Capuruço, C.A; Chianca, D.A Jr; Ferreira, A.J. *Appl Physiol Nutr Metab.*, 37(3):455-462, 2012.
- Murphy, A.J. Sulfhydryl group modification of sarcoplasmic reticulum membranes. *Biochemistry.* 15:4492–4496, 1976.
- Muzi-Filho, H; Bezerra, C.G.P; Souza, A.M; Boldrini, L.C; Takiya, C.M; Oliveira, F.L; Nesi, R.T; Valença, S.S; Einicker-Lamas, M; Vieyra, A; Lara, L.S; Cunha, V.M.N. Undernutrition affects cell survival, oxidative stress, Ca<sup>2+</sup> handling and signaling pathways in vas deferens, crippling reproductive capacity. *Plos one*, 8: e69682-e-69693, 2013.
- Neves, R.H; Machado-Silva, J.R; Pelajo-Machado, M; Oliveira, S.A; Coutinho, E.M; Lenzi, H.L; Gomes, D.C. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 96(7):1013-1016, 2001.
- Noguchi, T; Hunlich, M; Camp, P.C; Begin, K.J; El-Zaru, M; Patten, R; Leavitt, B.J; Ittleman, F.P; Alpert, N.R; LeWinter, M.M; VanBuren, P. Thin filament-based modulation of contractile performance in human heart failure. *Circulation.* 110:982–987, 2004.
- Noland, T.A; Kuo, J.F. Protein kinase C phosphorylation of cardiac troponin I or troponin T inhibits Ca<sup>2+</sup>(+)-stimulated actomyosin MgATPase activity. *J Biol Chem.*, 266(8):4974-4978, 1991.

- Nyirenda, M.J; Lindsay, R.S; Kenyon, C.J; Burchell, A; Seckl, J.R. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programs rat hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J Clin Invest*, 101:2174-2181, 1998.
- Ochsendorf, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Human Reprod Update.*, 5(5): 399-420, 1999.
- Okosk, K; Tucci, P.J.F. Mecanismo de Frank-Starling e a Primeira Derivada Temporal de Pressão Ventricular (DP/DT). *Arq Bras Cardiol.*, 66(4):233-237, 1996.
- Organização das Nações Unidas: [www.onu.org.br](http://www.onu.org.br)
- O'rourke, B; Kass, D.A; Tomaselli, G.F; Kaab, S; Tunin, R; Marban, E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure: experimental studies. *Circ Res.*, 84:562-570, 1999.
- Pacca, S.R; De Azevedo, A.P; De Oliveira, C.F; De Luca, I.M.S; De Nucci,G; Antunes, E. Attenuation of hypertension, cardiomyocyte hypertrophy, and myocardial fibrosis by beta-adrenoceptor blockers in rats under long-term blockade of nitric oxide synthesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 39:201–207, 2002.
- Passos, M.C.F; Ramos, C.F; Moura, E.G. Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutrition Res*, 20(11): 1603-1612, 2000.
- Pérez, Y.G; Pérez, L.C.G; Netto, R.C.M; Lima, D.S.N; Lima, E.S. Malondialdeído e grupo sulí drila como biomarcadores do estresse oxidativo em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico. *Rev Bras Reumatol.*, 52(4):656-660, 2012.
- Pessoa, D.C; Lago, E.S; Teodósio, N.R; Bion, F.M. Dietary proteins on reproductive performance in three consecutive generations of rats. *Arch Latinoam Nutr.*, 50(1):55-61, 2000.

- Petry, C.J; Dorling, M.W; Wang, C.L; Pawlak, D.B; Ozanne, S.E. Catecholamine levels and receptor expression in low protein rat offspring. *Diabet Med.* 17: 848–853, 2000.
- Pieske, B; Maier, L.S; Bers, D.M; Hasenfuss, G. Ca<sup>2+</sup> handling and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 85(1):38-46, 1999.
- Pieske, B; Kretschmann, B; Meyer, M; Holubarsch, C; Weirich, J; Posival, H; Minami, K; Just, H; Hasenfuss, G. Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 92(5):1169-1178, 1995.
- Pi, Y; Walker, J.W. Diacylglycerol and fatty acids synergistically increase cardiomyocyte contraction via activation of PKC. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 279(1):H26-H34, 2000.
- Pogwizd, S.M; Schlotthauer, K; Lie, L; Yuan, W; Bers D.M. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure. *Circ Res.*, 88:1159-1167, 2001.
- Portal vencendo a desnutrição: [www.desnutricao.org.br](http://www.desnutricao.org.br)
- Pracyk, J.B; Tanaka, K; Hegland, D.D; Kim, K.S; Sethi, R; Rovira, I.I. A requirement for the rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest.*, 102:929–937, 1998.
- Priviero, F.B.M; Teixeira, C.E; Claudino, M.A; De Nucci, G; Zanesco, A; Antunes, E. Vascular effects of long-term propranolol administration after chronic nitric oxide blockade. *Europe J Pharmacol.*, 571:189–196, 2007.
- Quintas L.E.M; Caricati-Neto A; Lafayette S.S.L; Jurkiewicz A; Noel, F. Down regulation of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 2 isoform in denervated rat vas deferens. *Biochem Pharmacol.*, 60:741 – 747, 2000.
- Rao, V; Cheng, Y; Lindert, S; Wang, D; Oxenford, L; McCulloch, A.D; McCammon, J.A; Regnier, M. PKA phosphorylation of cardiac troponin I modulates

activation and relaxation kinetics of ventricular myofibrils. *Biophys J.*,107(5):1196-1204, 2014.

- Reeves, J.P; Bailey, C.A; Hale, C.C. Redox modification of sodium–calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem.*, 261:4948–4955, 1986.
- Rich-Edwards, J.W; Stampfer, M.J; Manson, J.E; Rosner, B; Hankinson, S.E; Colditz, G.A; Willett, W.C; Hennekens, C.H. Birth weight and risk of cardiovascular disease in a cohort of women followed up since 1976. *BMJ*, 315: 396-400, 1997.
- Ross, J Jr; Sonnenblick, E.H; Taylor, R.R; Spotnitz, H.M; Covell, J.W. Diastolic geometry and sarcomere lengths in the chronically dilated canine left ventricle. *Circ Res.*, 28:49-61, 1971.
- Ruknudin, A; Valdivia, C; Kofuji, P; Lederer, W.J; Schulze, D.H. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in *Drosophila*: cloning, expression, and transport differences. *Am J Physiol.*, 273:C257-265, 1997.
- Rungseesantivanon, S; Thenchaisri, N; Ruangvejvorachai, P; Patumraj, S. Curcumin supplementation could improve diabetes-induced endothelial dysfunction associated with decreased vascular superoxide production and PKC inhibition. *BMC Complement Altern Med.*,10:57, 2010.
- Salazar, N. C; Vallejos, X; Siryk, A; Rengo, G; Cannavo, A; Liccardo, D. GRK2 blockade with betaARKct is essential for cardiac beta2-adrenergic receptor signaling toward increased contractility. *Cell Commun. Signal.* 11:64, 2013.
- Santos, C.X.C; Anilkumar, N; Zhang, M; Brewer, A.C; Shah, A.M. Redox signaling in cardiac myocytes. *Free Radic Biol Med.*, 50:777–793, 2011.
- Satoh, M; Ogita, H; Takeshita, K; Mukai, Y; Kwiatkowski, D.J; Liao, J.K. Requirement of Rac1 in the development of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci.*, 103:7432–7437, 2006.

- Sawaya, A.L.; Dallal, G.; Solymos, G.; De Sousa, M.H.; Ventura, M.L.; Roberts, S.B.; Sigulem, D.M. Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of Sao Paulo, Brazil. *Obes Res.*, 2:107-115, 1995.
- Scaramello, C.B.V; Cunha, V.M.N; Rodriguez, J.B.R; Noel, F. Characterization of subcellular fractions and distribution profiles of transport components involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rat vas deferens. *J Pharmacol Toxicol Methods.*, 47:93 – 98, 2002.
- Schulze, D.H; Lederer, W.J. Advances in the molecular characterization of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Molecular Biology of Cardiovasc Disease*. New York. 275-290, 1997.
- Schwinger, R.H; Böhm, M; Koch, A; Schmidt, U; Morano, I; Eissner, H.J; Uberfuhr, P; Reichart, B. The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *American Heart Association*. 1524-4571 ,1994.
- Schwinger, R.H; Bohm, M; Schmidt, U; Karczewski, P; Bavendiek, U; Flesch, M; Krause, E.G; Erdmann, E. Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca<sup>2+</sup> uptake and Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation*, 92:3220-3228, 1995.
- Scherer, N.M; Deamer, D.W. Oxidation of thiols in the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum microsomes. *Biochim Biophys Acta.*, 862:309–317, 1986.
- Schwinger, R.H; Böhm, M; Koch, A; Schmidt, U; Morano, I; Eissner, H.J; Uberfuhr, P; Reichart, B. The failing human heart is unable to use the Frank-Starling mechanism. *American Heart Association.*, 74:959-969, 1994.
- Schwinger, R.H; Wang, J; Frank, K; Müller-ehmsen, J; Brixius, K; McDonough, A.A; Erdmann, E. Reduced sodium pump  $\alpha_1$ ,  $\alpha_3$  and  $\beta_1$ -isoform protein levels and Na/K ATPase activity but unchanged Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger protein levels in human heart failure. *Circulation* 99: 2105-2112, 1999.

- Seddon, M; Looi, Y.H; Shah, A.M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Heart.*, 93:903–907, 2007.
- Sequeira, V; Nijenkamp, L.L; Regan, J.A; Van der Velden, J. The physiological role of cardiac cytoskeleton and its alterations in heart failure. *Biochim Biophys Acta.*, 1838(2):700-722, 2013.
- Shamraj, O.I; Grupp, I.L; Grupp, G; Melvin, D; Gradoux, N; Kremers, W; Lingrel, J.B; De pover, A. Characterization of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts. *Cardiovasc Res.*, 27: 2229-2237, 1993.
- Shi, C; Wu, F; Xu, J. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and PAF mediate Abeta1-42-induced Ca<sup>2+</sup> dyshomeostasis that is blocked by EGb761. *Neurochem Int.*, 56:893-905, 2010.
- Shiels, H.A; White, E. The frank-starling mechanism in vertebrate cardiac myocytes. *J Exp Biol.*, 211(13):2005-2013, 2008.
- Silva, P.A; Monnerat-Cahli, G; Pereira-Acácio, A; Luzardo, R; Sampaio, L.S; Luna-Leite, M.A; Lara, L.S; Einicker-Lamas, M; Panizzutti, R; Madeira, C; Vieira-Filho, L.D; Castro-Chaves, C; Ribeiro, V.S; Paixão, A.D; Medei, E; Vieyra, A. Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition. *PLoS One.* 9(7):e100410, 2014a.
- Silva, P.A; Muzi-Filho, H; Pereira-Acácio, A; Dias, J; Martins, J.F; Landim-Vieira, M; Verdoorn, K.S; Lara, L.S; Vieira-Filho, L.D; Cabral, E.V; Paixão, A.D; Vieyra, A. Altered signaling pathways linked to angiotensin II underpin the upregulation of renal Na<sup>(+)</sup>-ATPase in chronically undernourished rats. *Biochim Biophys Acta*, 1842(12):2357-2366, 2014b.
- Sipido, K.R; Volders, P.G.A; De groot, S.H.M; Verdonck, F; Van de werf, F; Wellens, H.J.J; Vos, M.A. Enhanced Ca release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation.*, 102:2137-2144, 2000.

- Solaro, R.J. Modulation of cardiac myofilament activity by protein phosphorylation. *Handbook of physiology*. 7:264–300, 2001.
- Solaro, R.J; Rarick, H.M. Troponin and tropomyosin: proteins that switch on and tune in the activity of cardiac myofilaments. *Circ Res.*, 83:471–480, 1998.
- Strasser, R.H; Briem, S.K; Vahl, C.F; Lange, R; Hagl, S; Kubler, W. Selective expression of cardiac protein kinase C-isoforms in chronic heart failure. *Circulation*. 94(suppl I):I-551, 1996.
- Sumandea, M.P; Pyle, W.G; Kobayashi, T; De Tombe P.P; Solaro, R.J. Identification of a functionally critical protein kinase C phosphorylation residue of cardiac troponin T. *J Biol Chem.*, 278(37):35135-35144, 2003.
- Teodósio, N.R; Lago, E.S; Romani, S.A.M; Guedes, R.C.A. A regional basic diet (RDB) from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latin Nutricion.*, 40(4):533-547, 1990.
- Thannickal, V.J; Fanburg, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physio Lung Cell Mol Physiol.*, 279:L1005–L1028, 2000.
- Timm, L.L. Técnicas rotineiras de preparação e análise de lâminas histológicas. Em: *Métodos de Estudo em Biologia*. 11ª Ed. Canoas: Caderno La Salle; 231-239, 2005.
- Tonkiss, J; Trzcinska, M; Galler, J.R; Ruiz-Opazo, N. Prenatal malnutrition-induced changes in blood pressure: dissociation of stress and nonstress responses using radiotelemetry. *Hypertension*, 32: 108-114, 1998.
- Tsai, K.H; Wang, W.J; Lin, C.W; Pai, P; Lai, T.Y; Tsai, C.Y. NADPH oxidase-derived superoxide anion-induced apoptosis is mediated via the JNK-dependent activation of NF-kappaB in cardiomyocytes exposed to high glucose. *J Cell Physiol.*, 227:1347–1357, 2012.

- Tuncay, E; Zeydanli, E.N; Turan, B. Cardioprotective effect of propranolol on diabetes-induced altered intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in rat. *J Bioenerg Biomembr.*, 43:747-756, 2011.
- Valverde, R.H; Britto-Borges, T; Lowe, J; Einicker-Lamas, M; Mintz, E; Cuillel, M; Vieyra, A. Two serine residues control sequential steps during catalysis of the yeast copper ATPase through different mechanisms that involve kinase-mediated phosphorylations. *J Biol Chem.* 286(9):6879-89, 2011.
- Van der Velden, J; Papp, Z; Zaremba, R; Boontje, N.M; De Jong, J.W; Owen, V.J. Increased Ca<sup>2+</sup>-sensitivity of the contractile apparatus in end-stage human heart failure results from altered phosphorylation of contractile proteins. *Cardiovasc Res.*, 57:37–47, 2003.
- Vasan, R.S; Larson, M.G; Benjamin E.J, Evans J.C, Reiss C, Levy D. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction: prevalence and mortality in a population-based cohort. *J Am Coll Cardiol.*, 33:1948-1955, 1999.
- Vasconcelos, S.M.L; Goulart, M.A.S; Moura, J.B.F; Manfredini, V; Benfato, M.S; Kubota, L.T. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Quím Nova.* 30(5):2-26, 2007.
- Vickers, M.H; Breier, B.H; Cutfield, W.S; Hofman, P.L; Gluckman, P.D. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 279: 83-87, 2000.
- Vieira-Filho, L.D; Cabral, E.V; Farias, J.S; Silva, P.A; Muzi-Filho, H; Vieyra, A; Paixão, A.D. Renal molecular mechanisms underlying altered Na<sup>+</sup> handling and genesis of hypertension during adulthood in prenatally undernourished rats. *Br J Nutr.*, 24:1-13, 2014.
- Vieira-filho, L.D; Lara, L.S; Silva, P.A; Luzardo,R; Einicker-Lamas, M; Cardoso, H.D; Paixão, A.D; Vieyra, A. Placental oxidative stress in malnourished rats and



changes in kidney proximal tubule sodium ATPases in offspring. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 36: 1157-1163, 2009.

- Vieira-filho, L.D; Lara, L.S; Silva, P.A; Santos, F.T; Luzardo, R; Oliveira, F.S; Paixão, A.D; Vieyra, A. Placenta malnutrition changes the regulatory network of renal Na-ATPase in adult rat progeny: reprogramming by maternal  $\alpha$ -tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys.*, 505:91-97, 2011.
- Von Lueder, T.G; Krum, H. RAAS inhibitors and cardiovascular protection in large scale trials. *Cardiovasc Drugs Ther.* 27:171–179, 2013.
- Wang, K.C.W; Brooks, D.A; Thornburg, K.L; Morrison, J.L. Activation of IGF-2R stimulates cardiomyocyte hypertrophy in the late gestation sheep fetus. *J Physiol.*, 590: 5425–5437, 2012.
- Wang, M; Zhang, J; Walker, S.J; Dworakowski, R; Lakatta, E.G; Shah, A.M. Involvement of NADPH oxidase in age-associated cardiac remodeling. *J Mol Cell Cardiol.*, 48:765–772, 2010.
- Wang, Y; Loghmanpour, N; Vandenberghe, S; Ferreira, A; Keller, B; Gorcsan, J; Antaki, J. Simulation of dilated heart failure with continuous flow circulatory support. *Plos One.*, e-85234-e-85246, 2014.
- Wakasaki, H; Koya, D; Schoen, F.J; Jirousek, M.R; Ways, D.K; Hoit, B.D; Walsh, R.A; King, G.L. Targeted overexpression of protein kinase C beta2 isoform in myocardium causes cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci.* 94(17):9320-9325, 1997.
- Waterland, R.A; Garza, C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr.*, 69(2):179-197, 1999.
- Watkins, A.J; Sinclair, K.D. Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 306(10):H1444-1452, 2014.
- Whorwood, C.B; Firth, K.M; Budge, H; Symonds, M.E. Maternal undernutrition during early to midgestation programs tissue-specific alterations in the expression of

the glucocorticoid receptor, 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms, and type 1 angiotensin II receptor in neonatal sheep. *Endocrinology*, 142: 2854-2864, 2001.

- Zaidi, A; Barron, L; Sharov, V.S; Schoneich, C; Michaelis, E.K; Michaelis, M.L. Oxidative inactivation of purified plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase by hydrogen peroxide and protection by calmodulin. *Biochemistry*. 42:12001–1210, 2003.
- Zaidi, A; Michaelis, M.L. Effects of reactive oxygen species on brain synaptic plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Free Radic Biol Med.*, 27:810–821, 1999.
- Zarain-herzberg, A; Afzal, N; Elimban, V; Dhalla, N.S. Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.*, 164:285-290, 1996.
- Zohdi, V; Jane Black, M; Pearson, J.T. Elevated vascular resistance and afterload reduce the cardiac output response to dobutamine in early growth-restricted rats in adulthood. *Br J Nutr.*, 106(9):1374-1382, 2011.
- Zysko, D; Gajek, J; Sciborski, R; Smereka, J; Checinski, I; Mazurek, W. The pattern of activation of the sympathetic nervous system during tilt-induced syncope. *Europace*. 9:225–227, 2007.