

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES CARDÍACAS  
INDUZIDAS POR DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS:  
PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**

**Belo Horizonte**

**2019**

**ALEXANDRE SANTOS BRUNO**

**AVALIAÇÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES CARDÍACAS  
INDUZIDAS POR DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS:  
PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Fisiologia e Farmacologia

Orientador: Professor Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau (Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG)

**BELO HORIZONTE**

**2019**

**"AVALIAÇÃO TEMPORAL DAS ALTERAÇÕES CARDÍACAS  
INDUZIDAS POR DIETA RICA EM CARBOIDRATOS  
REFINADOS: PARTICIPAÇÃO DE MEDIADORES  
INFLAMATÓRIOS"**

**ALEXANDRE SANTOS BRUNO**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **27 de maio de 2019**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
**PROF. DR. ANDERSON JOSÉ FERREIRA**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROFA. DRA. ADALIENE VERSIANI MATOS FERREIRA**  
ENFERMAGEM/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

  
**PROF. DR. STÉFANY BRUNO DE ASSIS CAU**  
ICB/UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ORIENTADOR

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia  
Instituto de Ciências Biológicas - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

**Belo Horizonte, 27 de maio de 2019**

## AGRADECIMENTOS

A vida é, de fato, composta por ciclos, e neste momento, mais um se encerra. Ciclo este consideravelmente curto, mas de extremo aprendizado. Primeiramente, agradeço à família, especialmente aos meus pais. De uma forma em geral, sem o apoio familiar, eu não teria conseguido concluir a graduação, ingressar em uma pós-graduação extremamente conceituada e suportar os momentos difíceis do dia-a-dia, para, assim, gozar dos dias de alegria. Muito obrigado, mãe e pai, por me apoiarem sempre que necessário, seja psicologicamente ou financeiramente. Às minhas irmãs e a minha namorada, Lívia, obrigado por me suportarem e por estarem ao meu lado em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Stêfany, que me acolheu após anos sem nenhum contato com o mundo científico, me dando a chance de voltar a pesquisa. Obrigado por confiar em mim, pela oportunidade, pela orientação e pela sua humanidade para com os seus orientandos, pode ter certeza que o seu olhar sobre o mundo nos cativa e nos inspira a querer ser melhores.

Muito obrigado à Professora Dr. Marina e aos meus amigos que conheci através do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e da Inflamação (LAFACI): Pedro, Bárbara, Isabela Paiva, Isabella Sá, Fábio, Patrícia, Anízia, Lucas, Karla e Webster. Um obrigado especial à Renata Gomes Miranda e Castor, companheira de todos os dias para os testes experimentais, como o cateterismo e o Langendorff. Renata, enfim conseguimos conquistar o gráfico da  $dP/dt$ . A todos vocês, muito obrigado por fazer do meu local de trabalho um ambiente mais produtivo, prazeroso e descontraído. Obrigado por todas as lições, ideias, trabalhos em grupo, journal clubs, faxinas e colaborações. Nada disso seria possível sem vocês.

A todos os laboratórios colaboradores, mas principalmente, ao Professor Dr. Anderson José Ferreira e a Dra. Grazielle Cordeiro Aguiar, à Professora Dra. Daniella Bonaventura e a Msc. Daniela Reis. Além disso, gostaria de agradecer às professoras Danielle da Glória de Souza e Silvia Carolina Guatimosim Fonseca e seus alunos: a Msc. Camila Bernardo de Brito e André Luis Lima Monteiro, respectivamente. Obrigado pela generosidade, confiança e disponibilidade ao longo deste projeto, sem a colaboração de vocês, este projeto não teria acontecido.

À Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq), à Fundação de Desenvolvimento da Pesquisa (Fundep), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), agradeço por acreditar nesta pesquisa e por financiá-la através de editais que visem o progresso da pesquisa brasileira. Tais projetos são essenciais para o desenvolvimento e manutenção da ciência no Brasil.

À todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para minha formação como Mestre em Ciências Biológicas, obrigado por me acompanharem, seja de forma breve ou duradoura. Vocês foram essenciais nesta conquista.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Aive – área interna da câmara ventricular esquerda

Aivd - área interna da câmara ventricular direita

ASC – área sob a curva

At<sub>s</sub> - área total do septo

At<sub>vd</sub> - área total do ventrículo direito

At<sub>ve</sub> - área total do ventrículo esquerdo

CCL2 – (CC – motif) ligante 2

CCL3 - (CC – motif) ligante 3

CEBIO - Centro de Bioterismo

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

Ce<sub>vd</sub> - comprimento externo do ventrículo direito

Ce<sub>ve</sub> - comprimento externo do ventrículo esquerdo

Ci<sub>vd</sub> - comprimento interno do ventrículo direito

Ci<sub>ve</sub> - comprimento interno do ventrículo esquerdo

Ci<sub>svd</sub> - comprimento interno septo-ventricular direito

Ci<sub>sve</sub> - comprimento interno septo-ventricular esquerdo

DAC - doença arterial coronariana

DHE- dihidroetidina

Dieta HC – padrão alimentar rico em carboidratos refinados

dP/dt - derivada da pressão pela derivada do tempo

dP/dtmax - dP/dt máxima

dP/dtmin - dP/dt mínima

ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assays* (ensaio de imunoabsorbância enzimática)

e.p.m. – erro padrão da média

EPVd - espessura média da parede ventricular direita

EPVe - espessura média da parede ventricular esquerda

EPS - espessura média da parede septal

EROs – espécies reativas de oxigênio

IC - insuficiência cardíaca

IL-1 $\beta$  – interleucina-1-beta

IL-18 – interleucina-18

IL-6 – interleucina-6

IL-10 – interleucina-10

i.p. – intraperitoneal

MMPs - metaloproteinases de matriz

NAG - n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase

NF- $\kappa$ B - fator nuclear *kappa* B

OCT- *optimal cutting temperature compound* (composto de temperatura de corte ideal)

OMS - Organização Mundial de Saúde

PAD – pressão arterial diastólica

PAI-1 - inibidor dos ativadores de plasminogênio-1

PAS - pressão arterial sistólica

PBS – tampão fosfato-salina

PDVE – pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo

Pta - peso de tecidos adiposos

Pc - peso corporal

RHVE - remodelamento hipertrófico ventricular esquerdo

RPM - rotações por minuto

SERCA2 - ATPase transportadora de cálcio do retículo sarcoplasmático 2

MnSOD – superóxido dismutase dependente de manganês

STAT3- transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TBARS - *thiobarbituric acid reactive substances* (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico)

TRI -teste de resistência à insulina

TTOG - teste de tolerância oral à glicose

TGF- $\beta$ 1 - fator de transformação do crescimento beta-1

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral-alfa

u.a. – unidades arbitrárias

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                                                                                    |           |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b>  | <b>Consumo de açúcar refinado e prevalência de obesidade ao longo dos anos entre população caucasiana</b>                                          | <b>17</b> |
| <b>2</b>  | <b>Relação consumo-dependente entre o consumo de açúcares de adição e o risco relativo de doença cardiovascular</b>                                | <b>18</b> |
| <b>3</b>  | <b>Principais causas de morte no mundo em 2016</b>                                                                                                 | <b>19</b> |
| <b>4</b>  | <b>Classificação ventrículo-independente dos tipos de insuficiência cardíaca de acordo com o tipo de disfunção e o momento do ciclo cardíaco</b>   | <b>21</b> |
| <b>5</b>  | <b>Tipos de remodelamento cardíaco de acordo com a espessura relativa da parede ventricular esquerda e o índice de massa ventricular esquerda</b>  | <b>24</b> |
| <b>6</b>  | <b>STAT3 e suas funções de acordo com o desencadeador de sua ativação</b>                                                                          | <b>30</b> |
| <b>7</b>  | <b>Delineamento experimental de animais e tempo de dieta</b>                                                                                       | <b>34</b> |
| <b>8</b>  | <b>Representação esquemática do corte feito no coração e testes realizados</b>                                                                     | <b>39</b> |
| <b>9</b>  | <b>Representação esquemática e cálculo morfometria cardíaca</b>                                                                                    | <b>41</b> |
| <b>10</b> | <b>Representação esquemática da canulação da carótida direita com subsequente inserção de cateter na câmara ventricular esquerda</b>               | <b>43</b> |
| <b>11</b> | <b>Representação esquemática do sistema de perfusão e parâmetros analisados durante a técnica de verificação da função cardíaca <i>ex vivo</i></b> | <b>44</b> |
| <b>12</b> | <b>Avaliação do peso corporal ao longo do experimento</b>                                                                                          | <b>50</b> |
| <b>13</b> | <b>Avaliação do perfil de obesidade</b>                                                                                                            | <b>51</b> |
| <b>14</b> | <b>Avaliação de parâmetros metabólicos</b>                                                                                                         | <b>52</b> |
| <b>15</b> | <b>Avaliação da proporção volumétrica de elementos figurados por hematócrito</b>                                                                   | <b>53</b> |
| <b>16</b> | <b>Avaliação da pressão arterial por pletismografia de cauda</b>                                                                                   | <b>53</b> |
| <b>17</b> | <b>Avaliação do peso de órgãos</b>                                                                                                                 | <b>55</b> |
| <b>18</b> | <b>Imagens fotográficas representativas de corações de acordo com o grupo</b>                                                                      | <b>56</b> |
| <b>19</b> | <b>Avaliação de hipertrofia cardíaca e ventricular</b>                                                                                             | <b>57</b> |
| <b>20</b> | <b>Imagens representativas de cortes transversais de corações corados em HE</b>                                                                    | <b>58</b> |

|           |                                                                                                                              |           |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>21</b> | <b>Avaliação da morfometria cardíaca</b>                                                                                     | <b>59</b> |
| <b>22</b> | <b>Imagens representativas de cardiomiócitos provenientes de cortes transversais de corações corados em HE</b>               | <b>60</b> |
| <b>23</b> | <b>Avaliação do diâmetro de cardiomiócitos</b>                                                                               | <b>60</b> |
| <b>24</b> | <b>Avaliação da função cardíaca <i>in vivo</i></b>                                                                           | <b>62</b> |
| <b>25</b> | <b>Avaliação da função cardíaca <i>ex vivo</i> no estado basal</b>                                                           | <b>63</b> |
| <b>26</b> | <b>Avaliação da função cardíaca <i>ex vivo</i> sob estresse farmacológico por isoprenalina em diferentes concentrações</b>   | <b>65</b> |
| <b>27</b> | <b>Avaliação da concentração miocárdica de SERCA2</b>                                                                        | <b>66</b> |
| <b>28</b> | <b>Avaliação da peroxidação lipídica pela técnica de TBARS</b>                                                               | <b>67</b> |
| <b>29</b> | <b>Avaliação da concentração cardíaca de marcadores inflamatórios e anti-inflamatório</b>                                    | <b>68</b> |
| <b>30</b> | <b>Avaliação da correlação de Pearson entre a concentração miocárdica de IL-10 e a função cardíaca <i>in vivo</i></b>        | <b>69</b> |
| <b>31</b> | <b>Avaliação da ativação de STAT3 cardíaca através da fosforilação de Tir705</b>                                             | <b>70</b> |
| <b>32</b> | <b>Avaliação da atividade da metaloproteinase de matriz do tipo 2 (MMP-2)</b>                                                | <b>71</b> |
| <b>33</b> | <b>Proposta de via de sinalização responsável pelos danos morfofuncionais cardíacos induzidos por dieta rica em sacarose</b> | <b>81</b> |

## **LISTA DE TABELAS**

|          |                                                                                           |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>Composição nutricional das dietas utilizadas em termos de macronutrientes</b>          | <b>35</b> |
| <b>2</b> | <b>Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blotting</b>                              | <b>47</b> |
| <b>3</b> | <b>Pressão arterial de camundongos anestesiados submetidos ao cateterismo de carótida</b> | <b>54</b> |

## RESUMO

O consumo de açúcares refinados aumentou exponencialmente no último século. Com isso, estudos epidemiológicos têm demonstrado associação positiva entre o alto consumo de carboidratos refinados e o aumento de fatores de risco e mortalidade por doenças cardiovasculares. Entretanto, os efeitos de dietas ricas em carboidratos refinados sobre parâmetros morfofuncionais e sobre o estado inflamatório cardíaco ainda é pouco conhecido. Portanto, de acordo com protocolo aprovado pela CEUA (193/2015), objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes tempos de consumo de dieta HC sobre o coração de um modelo experimental. Para isso, camundongos da linhagem Balb/c foram alimentados com dieta padrão ou HC por 2 (2HC), 4 (4HC) ou 8 (8HC) semanas e eutanasiados com 14 semanas de vida. A dieta HC foi composta por 45% de dieta padrão, 45% de leite condensado e 10% de açúcar refinado. Características biométricas, metabólicas, hemodinâmicas, histológicas, funcionais e moleculares foram analisados. Observou-se um aumento do peso cardíaco em todos os grupos com a dieta HC, acompanhado por aumento da espessura relativa da parede ventricular esquerda nos grupos 4HC e 8HC. No teste *in vivo* de função cardíaca, todos os grupos que consumiram a dieta HC apresentaram disfunção sistólica e o grupo 8HC apresentou redução da função diastólica, avaliadas pelas dP/dT máxima e mínima, respectivamente. Resultado similar foi observado no teste *ex vivo*, onde observou-se uma redução do efeito máximo ( $E_{max}$ ) da isoprenalina sobre a dP/dT máxima e mínima de todos os grupos que consumiram a dieta HC. Tais achado foram independentes de alteração na pressão arterial. Além disso, foram encontrados níveis cardíacos diminuídos de IL-10 em todos os grupos com dieta HC, elevação da peroxidação lipídica até 4 semanas de dieta, aumento de metaloproteinase de matriz do tipo 2 (MMP-2) no grupo 4HC e aumento da concentração cardíaca de TNF- $\alpha$  no grupo 8HC. Portanto, a dieta HC gera remodelamento ventricular hipertrófico concêntrico e déficit da função contrátil. A redução dos níveis de IL-10 acompanha estes achados desde a 2ª semana de dieta, sugerindo seu envolvimento nas alterações cardíacas precoces. Enquanto que, mais tardiamente, a maior produção de espécies reativas de oxigênio (2ª e 4ª semana), MMP-2 (4ª semana) e de TNF- $\alpha$  (8ª semana) contribuíram para a manutenção do remodelamento e da disfunção cardíaca.

**Palavras-chave:** Dieta HC, remodelamento cardíaco, disfunção cardíaca, inflamação.

## ABSTRACT

Carbohydrate intake has increased across the last century and has become a major public health threat. In addition, epidemiological studies demonstrate clear and positive correlation between high carbohydrate (HC) intake and cardiovascular risk factors and mortality. However, there is a lack of knowledge regarding the relationship between high carbohydrate consumption, inflammation, cardiac morphology, and function. For this reason, according to the approval CEUA protocol sheet (193/2015), it is aimed to assess the effects from a HC diet on mouse hearts through different intake times. Then, Balb/c mice were fed with chow or HC diet during 2 (2HC), 4 (4HC), or 8 (8HC) weeks and euthanized at the same age (14 weeks old). The HC diet was comprised of 45% chow diet, 45% condensed milk and 10% refined sugar. Metabolic, hemodynamic, histological, functional, and molecular characteristics were analysed. It was observed an increase of the cardiac weight in all groups exposed to the HC diet, which resulted in enhanced relative wall thickness on four and eight weeks of HC diet consumption. *In vivo* cardiac function assessment demonstrated systolic dysfunction in all HC groups and diastolic dysfunction among animals with 8 weeks of HC diet consumption. Systolic and diastolic function were assessed through maximum and minimum dP/dT, respectively. Similarly, ex vivo analysis showed reduced maximum effect ( $E_{max}$ ) from isoprenaline over maximum and minimum dP/dT in all HC groups. These findings were blood pressure independent. Furthermore, it was observed reduced IL-10 cardiac levels in all times of HC diet consumption, enhanced lipid peroxidation on the 2HC and 4HC groups, elevated matrix metalloproteinase type 2 (MMP-2) levels on the 4HC group, and increased cardiac TNF- $\alpha$  concentration on the 8HC group. Therefore, HC diet led to left ventricular concentric remodeling and reduced contractility function. Diminished IL-10 cardiac levels were observed in parallel to morphofunctional modification from two weeks of HC diet intake. Meanwhile, high reactive oxygen species (2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> week), MMP-2 (4<sup>th</sup> week) and TNF- $\alpha$  (8<sup>th</sup> week) production contributed to cardiac remodeling and dysfunction sustenance.

**Keywords:** HC diet, cardiac remodeling, cardiac dysfunction, inflammation.

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                         |           |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                            | <b>17</b> |
| 1.1      | O consumo de carboidratos aumentou no mundo e, com este, o risco e a morte por doenças cardiovasculares | 17        |
| 1.2      | Doenças cardiovasculares desencadeadas pelo excesso de consumo de carboidratos refinados                | 19        |
| 1.3      | Dieta HC, sistema cardiovascular e inflamação                                                           | 25        |
| 1.4      | Perspectivas de associações entre carboidratos, inflamação e doenças cardiovasculares                   | 27        |
| 1.5      | Dualidade IL-10 e TNF- $\alpha$                                                                         | 28        |
| 1.6      | STAT3: O ponto-chave da comunicação inflamatória intracelular cardíaca                                  | 29        |
| <b>2</b> | <b>JUSTIFICATIVA</b>                                                                                    | <b>32</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                        | <b>33</b> |
| 3.1      | Objetivo geral                                                                                          | 33        |
| 3.2      | Objetivos específicos                                                                                   | 33        |
| <b>4</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b>                                                                               | <b>34</b> |
| 4.1      | Animais e dieta                                                                                         | 34        |
| 4.2      | Teste de resistência à insulina (TRI) tolerância oral à glicose (TTOG) e glicemia de jejum              | 35        |
| 4.3      | Hematócrito                                                                                             | 36        |
| 4.4      | Medida de pressão arterial                                                                              | 36        |
| 4.5      | Coleta de tecidos e órgãos                                                                              | 37        |
| 4.5.1    | <u>Índice de adiposidade</u>                                                                            | 37        |

|       |                                                                                                                                            |    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.5.2 | <b><u>Preparo do coração</u></b>                                                                                                           | 38 |
| 4.6   | <b>Análise histopatológica</b>                                                                                                             | 39 |
| 4.6.1 | <b><u>Confecção de lâminas histológicas</u></b>                                                                                            | 39 |
| 4.6.2 | <b><u>Análise morfométrica cardíaca</u></b>                                                                                                | 40 |
| 4.6.3 | <b><u>Análise morfométrica de cardiomiócitos</u></b>                                                                                       | 42 |
| 4.7   | <b>Avaliação da função cardíaca</b>                                                                                                        | 42 |
| 4.7.1 | <b><u>Função cardíaca <i>in vivo</i></u></b>                                                                                               | 42 |
| 4.7.2 | <b><u>Função cardíaca <i>ex vivo</i></u></b>                                                                                               | 43 |
| 4.8   | <b>Análise da peroxidação lipídica pela técnica de TBARS</b>                                                                               | 45 |
| 4.9   | <b>Quantificação de quimiocinas e citocinas</b>                                                                                            | 45 |
| 4.10  | <b>Avaliação de infiltrado de macrófagos no tecido pelo método de atividade da NAG</b>                                                     | 46 |
| 4.11  | <b>Western Blotting</b>                                                                                                                    | 46 |
| 4.12  | <b>Avaliação qualitativa de metaloproteinases da matriz por zimografia em gel</b>                                                          | 48 |
| 4.13  | <b>Análise estatística</b>                                                                                                                 | 48 |
| 5     | <b>RESULTADOS</b>                                                                                                                          | 50 |
| 5.1   | <b>Animais alimentados com dieta HC não possuem diferença de peso ao longo do tratamento dietético</b>                                     | 50 |
| 5.2   | <b>A dieta rica em carboidratos refinados tornou os animais obesos e alterou características metabólicas em todos os tempos de consumo</b> | 50 |

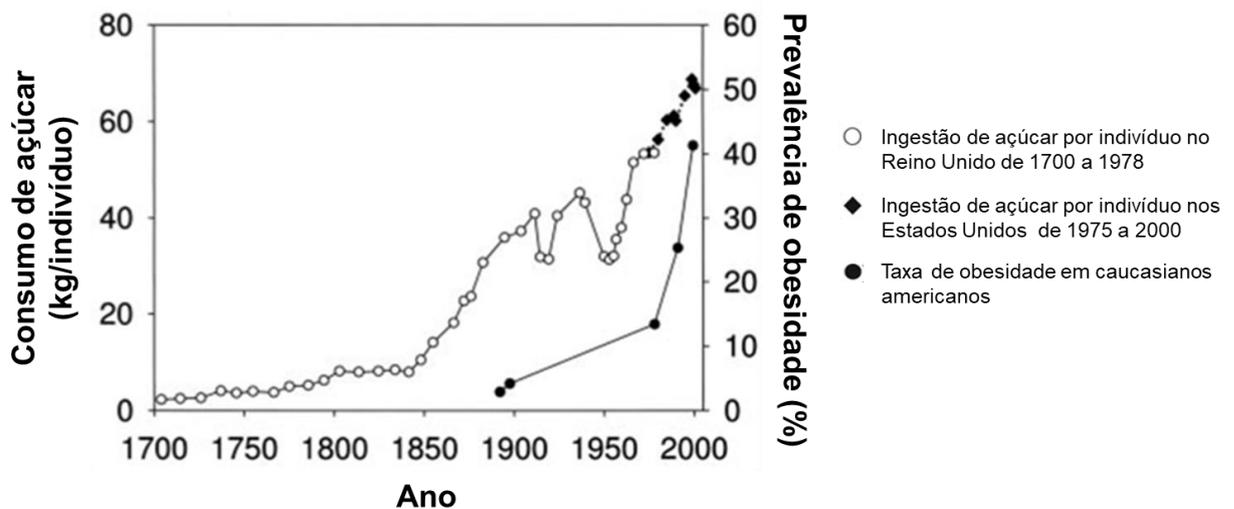
- 5.3 A dieta HC não alterou a porcentagem do hematócrito, tampouco a pressão arterial em nenhum tempo de consumo 52
- 5.4 A dieta HC causou hipotrofia pancreática a partir de 4 semanas de tratamento dietético, sem alterar o peso de outros órgãos 54
- 5.5 A dieta HC causou hipertrofia cardíaca em todos os tempos de consumo, com aumento da espessura relativa da parede ventricular esquerda a partir da quarta semana, caracterizando remodelamento hipertrófico concêntrico 56
- 5.6 O consumo excessivo de carboidratos refinados não alterou o diâmetro dos cardiomiócitos 60
- 5.7 A dieta HC causou disfunção cardíaca *in vivo* e *ex vivo* em todos os tempos de consumo 61
- 5.8 A dieta HC não alterou as concentrações miocárdicas de SERCA2 66
- 5.9 A dieta HC aumentou a peroxidação lipídica com até quatro semanas de consumo 66
- 5.10 A dieta HC não alterou os níveis cardíacos de CCL2, CCL3, NAG e pró-IL-1 $\beta$  em nenhum tempo de consumo, mas causou desequilíbrio miocárdico da citocina anti-inflamatória IL-10 e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  com oito semanas de consumo 67
- 5.11 A concentração miocárdica de IL-10 possui correlação positiva com a função sistólica *in vivo* 68
- 5.12 A dieta HC diminuiu a ativação de STAT3 cardíaca com até quatro semanas de consumo 69

|             |                                                                                                                                                                  |            |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5.13</b> | <b>O consumo de carboidratos refinados aumentou a concentração miocárdica da metaloproteinase da matriz extracelular do tipo 2 com quatro semanas de consumo</b> | <b>70</b>  |
| <b>6</b>    | <b>DISCUSSÃO</b>                                                                                                                                                 | <b>72</b>  |
| <b>7</b>    | <b>CONCLUSÃO</b>                                                                                                                                                 | <b>82</b>  |
|             | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                                                                                                | <b>83</b>  |
|             | <b>ANEXO 1 - CERTIFICADO PROTOCOLO 193/2015 - CEUA</b>                                                                                                           | <b>95</b>  |
|             | <b>ANEXO 2 - CERTIFICADO DE RELEVÂNCIA ACADÊMICA - SEMANA DO CONHECIMENTO UFMG – 2016</b>                                                                        | <b>96</b>  |
|             | <b>ANEXO 3 - CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA – ENCONTRO PÓS-GRADUAÇÃO FIS/FAR – 2016</b>                                                                           | <b>97</b>  |
|             | <b>ANEXO 4 - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO ORAL – XXII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR - 2018</b>                                                  | <b>98</b>  |
|             | <b>ANEXO 5 - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO ORAL – ENCONTRO PÓS-GRADUAÇÃO FIS/FAR - 2018</b>                                                                        | <b>99</b>  |
|             | <b>ANEXO 6 - CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA – XXIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR - 2019</b>                                                    | <b>100</b> |

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 O consumo de carboidratos aumentou no mundo e, com este, o risco e a morte por doenças cardiovasculares

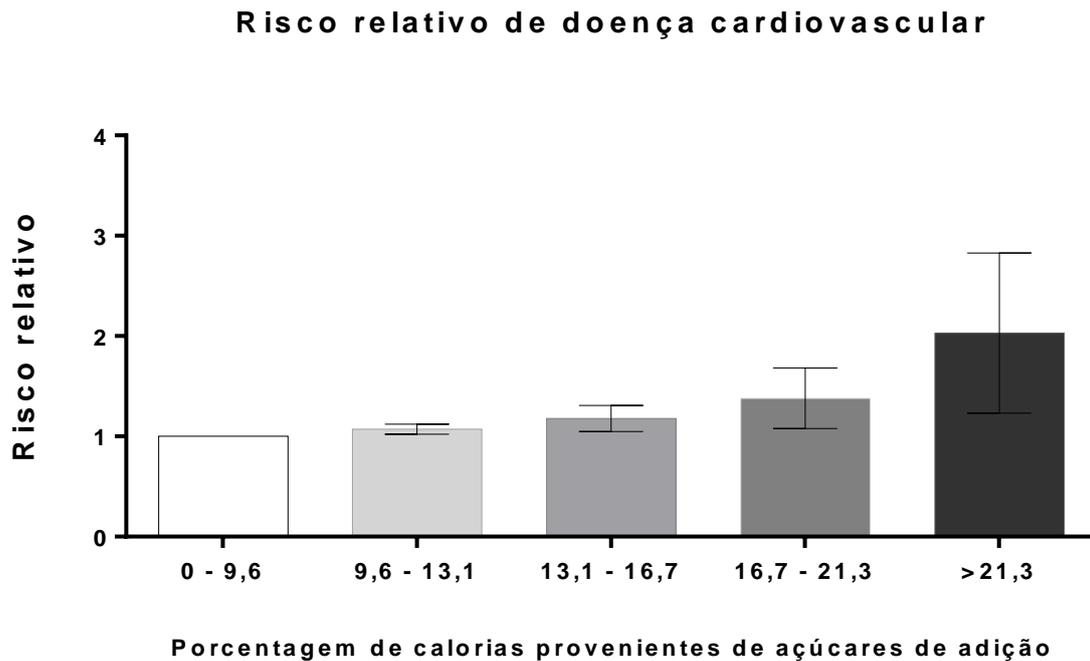
O consumo de carboidratos refinados aumentou substancialmente no último século e, com isso, houve também o aumento de doenças crônicas não-infecciosas (**Figura 1**) (Johnson *et al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) e o Ministério da Saúde brasileiro, é recomendável que o consumo diário de carboidratos refinados não ultrapasse 10% das calorias totais ingeridas (Nishida *et al.*, 2004). Entretanto, cerca de 85,7% da população brasileira utiliza, diariamente, açúcares refinados para adoçar comidas e bebidas (Silva Monteiro *et al.*, 2018) e, por isso, 36,7% ultrapassa a ingestão diária de, no máximo, 10% de carboidratos refinados em calorias (Bueno *et al.*, 2012).



**Figura 1: Consumo de açúcar refinado e prevalência de obesidade ao longo dos anos entre população caucasiana.** Dados são representados por média; Adaptado de Johnson *et al.* (2007).

Devido a este aumento do consumo, novos estudos surgem anualmente a fim de se estudar o impacto deste consumo sobre a saúde humana. Recentemente, um estudo prospectivo com 15.428 adultos e meta-analítico com mais 432.179 participantes demonstrou que o consumo excessivo de carboidratos (>70% da energia total diária consumida) está conectado a índices aumentados de mortalidade, independente da causa, sendo a faixa de 50 a 55%, a faixa com menor índice de morte entre os participantes (Seidemann *et al.*, 2018). Mais especificamente, os

carboidratos refinados foram apontados como os principais vilões do consumo excessivo de carboidratos. Outro estudo prospectivo, mas agora com 31.147 participantes, por exemplo, comprovou que há uma relação consumo-dependente (**Figura 2**) entre o consumo de carboidratos refinados e o risco relativo de doença cardiovascular (Yang *et al.*, 2014).



**Figura 2: Relação consumo-dependente entre o consumo de açúcares de adição e o risco relativo de doença cardiovascular.** Dados são representados por média  $\pm$  d.p.; Adaptado de Yang *et al.* (2014).

Assim, o consumo de carboidratos refinados tem ganhado a atenção de pesquisadores. Comparações entre o consumo excessivo de diferentes macronutrientes demonstrou maior associação entre o consumo exacerbado de carboidratos e mortalidade, em comparação ao consumo isocalórico de outros macronutrientes (Dehghan *et al.*, 2017). Estudos prospectivos apontam que a causa para este acontecimento é a maior associação entre o risco relativo de doenças cardiometabólicas e o consumo excessivo de carboidratos em relação a outros macronutrientes, como: carboidratos integrais, ácidos graxos monoinsaturados, poliinsaturados e ácidos graxos saturados (Li *et al.*, 2015). Isto é, mais do que outros macronutrientes, o consumo de carboidratos refinados está intimamente associado a doenças cardiometabólicas (Johnson *et al.*, 2007). Uma vez que doenças

cardiovasculares ainda são a principal causa de morte no mundo entre adultos (WHO, 2018), sendo, por exemplo, a doença arterial coronariana (DAC) a principal causa de morte no mundo em 2016 (**Figura 3**), torna-se evidente a necessidade de estudos mais detalhados, que foquem na relação causa-consequência entre o consumo de carboidratos refinados e doenças cardiovasculares.

### Top 10 principais causas globais de morte, 2016

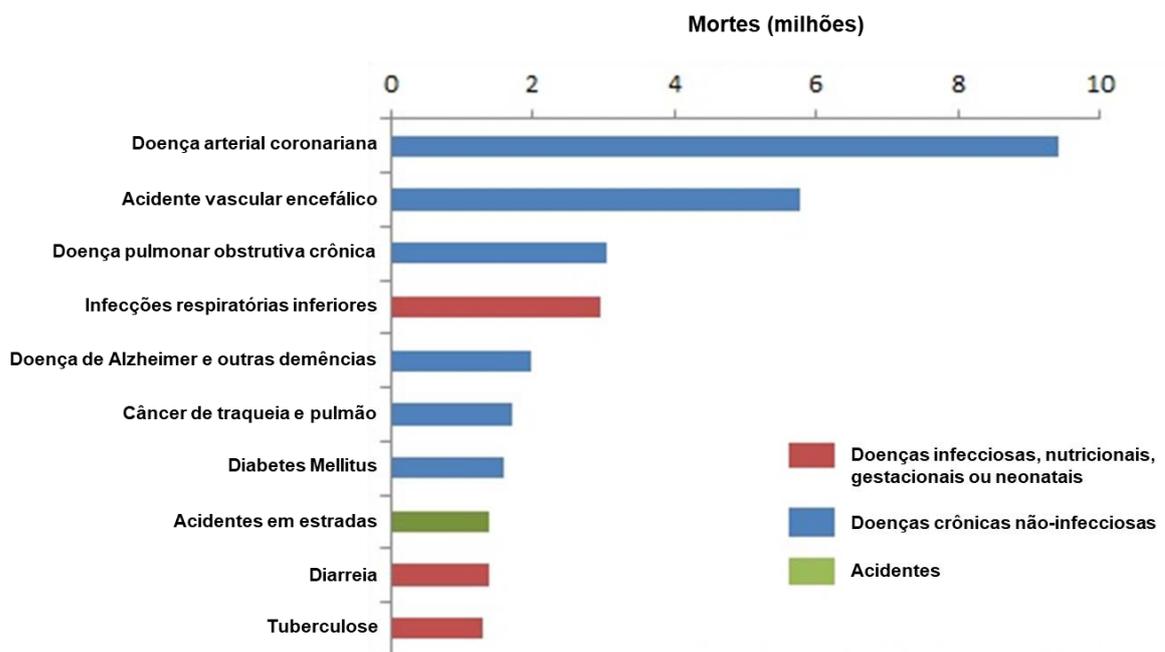


Figura 3: Principais causas de morte no mundo em 2016. Adaptado de WHO (2018).

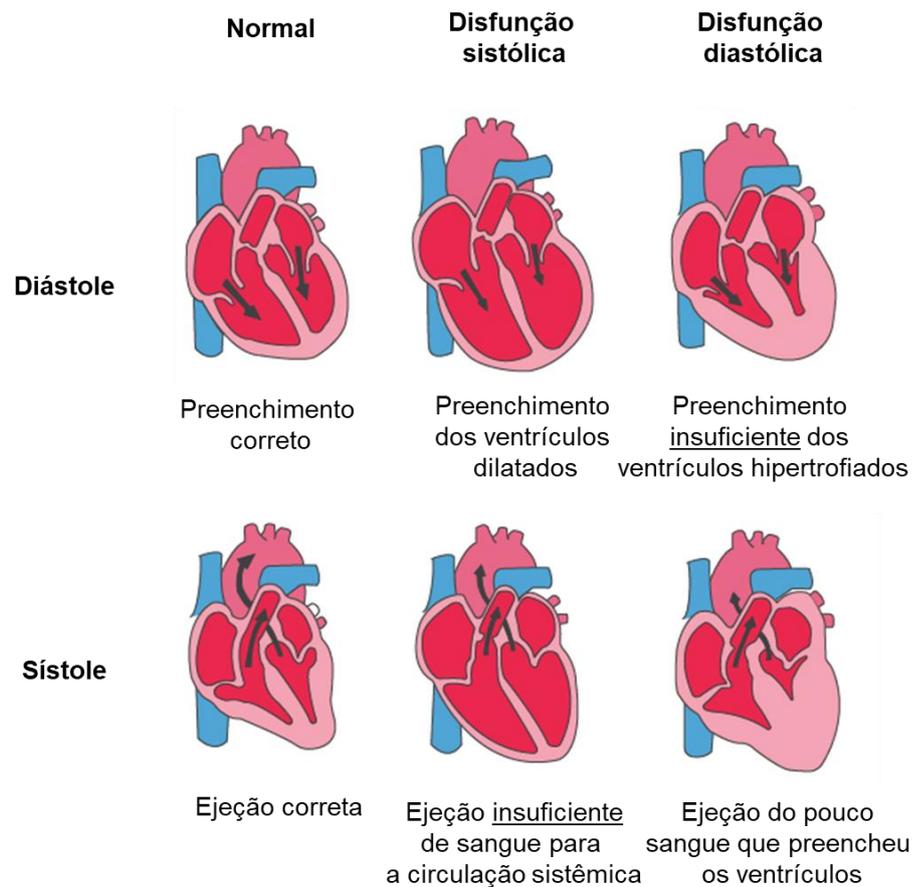
## 1.2 Doenças cardiovasculares desencadeadas pelo excesso de consumo de carboidratos refinados

Como já descrito, há uma relação consumo-dependente entre carboidratos refinados e o risco relativo de doença cardiovascular (Yang *et al.*, 2014). Dentro das doenças cardiovasculares, destacam-se a DAC e a insuficiência cardíaca (IC) associada ou não ao remodelamento cardíaco patológico.

Durante muitos anos, acreditou-se que o consumo excessivo de ácidos graxos era o principal indutor de morte por DAC, entretanto, os carboidratos refinados são, hoje, apontados como tão importantes desencadeadores da doença como os ácidos graxos (Temple, 2018). Na década de 1960, o estudo de Framingham classificou

como principais fatores de risco para a DAC a existência de níveis elevados de colesterol total e triglicérides sérico (Kahn e Dawber, 1966). Além disso, estudos envolvendo 25 anos de observação, em sete países diferentes, sugeriram forte associação entre o consumo de ácidos graxos e morte por DAC (Kromhout *et al.*, 1995). Criou-se o paradigma de que o principal fator de risco para a DAC seria o consumo excessivo de ácidos graxos. Entretanto, estudos mais recentes apontam os níveis de triglicérides (Cullen, 2000), mas não a ingestão de ácidos graxos, como fator de risco independente para a incidência de DAC (Virtanen *et al.*, 2014). Ademais, ácidos graxos e carboidratos já demonstraram ter capacidades similares de alterar a concentração sérica de triglicérides (Mensink *et al.*, 2003), sendo o consumo de carboidratos também intimamente relacionado com agravamento do perfil lipídico (Ma *et al.*, 2006). Assim, quando o consumo de carboidratos desencadeia, em paralelo, o aumento de triglicérides sérico e do perfil lipídico, aumenta-se em seis vezes o risco de desenvolvimento de DAC (Assmann *et al.*, 1996). Portanto, apesar da dúvida em relação ao consumo excessivo de ácidos graxos, o consumo exacerbado de carboidratos refinados apresenta-se como um dos principais envolvidos na fisiopatologia da DAC, a doença que mais leva pessoas a óbito ao redor do mundo (WHO, 2018).

O quadro de IC também pode estar associado a ingestão de carboidratos refinados. Segundo a *American Heart Association*, a IC caracteriza-se pela incapacidade cardíaca de prover correto débito cardíaco ao corpo, em descanso ou sob estresse (Yancy *et al.*, 2013). O débito cardíaco compreende o volume de sangue ejetado pelo coração em um minuto (Vincent, 2008). Um estudo, com mais de 5.000 participantes, mostrou que a IC possui rápido desenvolvimento, evoluindo para morte em cerca de 16,5% dos casos em menos de um ano após o seu diagnóstico (Dokainish *et al.*, 2017). Tal evolução deve-se, justamente, à característica da IC de tornar seus portadores incapazes do correto preenchimento das câmaras ventriculares (disfunção diastólica) e/ou de uma acurada perfusão sistêmica (disfunção sistólica) (**Figura 4**) (Borlaug e Redfield, 2011). Faz-se de extrema importância, portanto, a realização de exames periódicos de rotina, para que, o correto tratamento clínico seja iniciado, o mais rápido possível.



**Figura 4: Classificação ventrículo-independente dos tipos de insuficiência cardíaca de acordo com o tipo de disfunção e o momento do ciclo cardíaco.** Adaptado de (Borlaug e Redfield, 2011).

Um dos parâmetros que se correlaciona ao prejuízo da contratilidade miocárdica é a medida da derivada da pressão pela derivada do tempo ( $dP/dt$ ). A IC sistólica do ventrículo esquerdo, por exemplo, pode ser caracterizada e prevista pela  $dP/dt$  máxima ( $dP/dt_{max}$ ) do ventrículo esquerdo, enquanto a IC diastólica do ventrículo esquerdo pode ser identificada de forma confiável através da  $dP/dt$  mínima ( $dP/dt_{min}$ ) do mesmo (Kolias *et al.*, 2000). Isto deve-se ao fato de que a  $dP/dt$  leva em consideração as variáveis “pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo” e o “tempo gasto pelo mesmo para desenvolver tal pressão”, permitindo, assim, a inferência sobre a capacidade de ejetar e de se distender do músculo cardíaco ao longo do tempo. Deste modo, constatou-se em modelos geneticamente modificados, como o *ob/ob* e o *db/db*, que a hiperfagia, incluindo de carboidratos, é capaz de induzir redução da  $dP/dt_{max}$  e  $dP/dt_{min}$  *in vivo* e, por consequência, induzir IC (Buchanan *et al.*, 2005).

Assim como também já foi demonstrado que o consumo de uma dieta rica em lipídeos e carboidratos refinados é capaz de reduzir a  $dP/dt_{max}$  e  $dP/dt_{min}$  *in vivo* em ratos (Deng *et al.*, 2007).

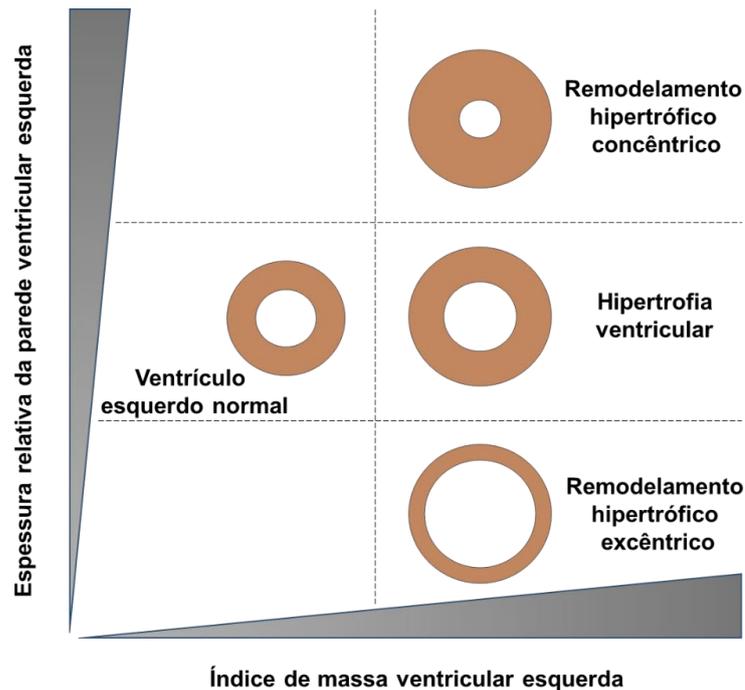
Sabe-se que o consumo de carboidratos refinados em excesso virou um hábito alimentar e que tal hábito tem impactado diretamente na incidência de doenças crônicas não infecciosas, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares (Ludwig *et al.*, 2018). Em pacientes diabéticos, não-hipertensos e sem histórico de DAC, por exemplo, é comum o surgimento de IC diastólica (Loncarevic *et al.*, 2016). É proposto, portanto, que o consumo excessivo de carboidratos refinados leve ao aumento do risco relativo de doenças cardiovasculares, como à baixa da concentração sanguínea de lipoproteína de alta densidade ou ao aumento de triglicérides e, por consequência, ao aumento da probabilidade de IC (Benjamin *et al.*, 2017).

Em comparação a outros macronutrientes, os carboidratos parecem ser os mais conectados a IC. Por exemplo, a ingestão de carboidratos refinados, mais do que a ingestão de carboidratos complexos ou ácidos graxos saturados, aumentou a hipertrofia cardíaca e o índice de morte por IC em ratos Dahl sal-sensíveis (Sharma *et al.*, 2007). Além disso, em uma população com síndrome metabólica, a estratégia de se retirar o carboidrato, mas não os ácidos graxos saturados, foi capaz de restaurar a função diastólica do ventrículo esquerdo de pacientes com IC (Von Bibra *et al.*, 2017). Estes achados sugerem que, mais do que outros macronutrientes, os carboidratos estão envolvidos no desenvolvimento e na manutenção da IC. Existem várias hipóteses para tal ligação entre o consumo de carboidratos e IC, entretanto, ainda há uma deficiência de conhecimento sobre este assunto. Uma possibilidade envolve a ligação entre o consumo excessivo de carboidratos refinados e doenças vasculares (Naderali *et al.*, 2001), o que levaria a medidas adaptativas cardíacas, de forma indireta.

Outra teoria bem aceita envolve ações diretas dos carboidratos sobre o metabolismo cardíaco, como alterações da captação de nutrientes e, por consequência, alterações morfofuncionais miocárdicas diretamente provenientes de modificações da captação cardíaca (Porto *et al.*, 2011). Diferentemente de outros órgãos, que utilizam quase exclusivamente a glicose como fonte de energia, o coração

saudável tende a utilizar majoritariamente os ácidos graxos para gerar ação, utilizando minoritariamente a glicose, lactato, corpos cetônicos e aminoácidos apenas em condições substancialmente adversas (Yu *et al.*, 2006). Porto *et al.* (2011) demonstraram que o coração de animais que consumiram uma dieta rica em carboidrato complexo (amido) reduziu a utilização de ambos (ácidos graxos e glicose), reduzindo consideravelmente o catabolismo de ATP. Entretanto, tais ações diretas e indiretas de dietas ricas em carboidratos sobre o coração ainda não são completamente exploradas. Por exemplo, existe uma íntima ligação entre IC e remodelamento hipertrófico ventricular esquerdo (RHVE) (Yancy *et al.*, 2013). Entretanto, não é conhecida a ligação entre o consumo de carboidratos refinados, IC e a ativação de mediadores pró-inflamatórios ou pró-fibróticos no coração.

Dentro dos tipos de remodelamento cardíaco, dois tipos de RHVE patológico se destacam: o RHVE excêntrico e o concêntrico (Seferovic e Paulus, 2015), como descrito na **figura 5**. O RHVE excêntrico caracteriza-se pelo aumento do índice de massa ventricular esquerda, acompanhada por diminuição da espessura média relativa da parede ventricular esquerda (Ganau *et al.*, 1992). Por outro lado, o RHVE concêntrico caracteriza-se pelo aumento do índice de massa ventricular esquerda, acompanhada por aumento da espessura média relativa da parede ventricular esquerda (Ganau *et al.*, 1992). Em termos microscópicos, os fenótipos concêntrico e excêntrico se diferenciam quanto ao tipo de hipertrofia de cardiomiócitos. Enquanto a hipertrofia concêntrica é tipicamente caracterizada pelo aumento do diâmetro dos cardiomiócitos, com adição sobreposta de sarcômeros, a hipertrofia excêntrica caracteriza-se pelo alongamento celular, com a adição de sarcômeros em série (Kehat e Molkentin, 2010; Kehat *et al.*, 2011).



**Figura 5: Tipos de remodelamento cardíaco de acordo com a espessura relativa da parede ventricular esquerda e o índice de massa ventricular esquerda.**

Um estudo com americanos demonstrou clara relação entre RHVE excêntrico com disfunção sistólica, enquanto o RHVE concêntrico estava fortemente conectado à disfunção diastólica (Fox *et al.*, 2007). Além disso, o estudo de Framingham apontou que a hipertrofia ventricular esquerda, per si, é um importante preditor de IC (Kannel *et al.*, 1987). É reforçada, portanto, a conexão entre morfologia e função cardíaca, realçando a importância do entendimento dos efeitos de um padrão alimentar rico em carboidratos refinados (dieta HC) sobre a morfologia do coração de modelos experimentais e clínicos. Contudo, não há na literatura a relação entre carboidratos refinados e potenciais modificações morfofuncionais desencadeadas pelo consumo excessivo deste.

### 1.3 Dieta HC, sistema cardiovascular e inflamação

Nas décadas de 1980 e 1990, dietas ricas em carboidratos refinados foram extensamente utilizadas no estudo da elevação da pressão arterial (PA) em animais espontaneamente hipertensos e seus respectivos controles normotensos (Preuss e Preuss, 1980; Young e Landsberg, 1981; Fournier *et al.*, 1986; Preuss *et al.*, 1986; El Zein, Areas, Knapka, *et al.*, 1990; El Zein, Areas e Preuss, 1990). Entende-se dieta rica em carboidratos como o padrão alimentar constituído de pelo menos 70% de suas calorias diárias provenientes de carboidratos (Seidemann *et al.*, 2018) e, caso 30% desta seja proveniente de açúcares simples e ultraprocessados, a mesma é entendida como dieta HC. Interessantemente, dietas ricas em sacarose eram capazes de elevar ainda mais a pressão de animais já hipertensos (Preuss e Preuss, 1980). Contrariamente de seus respectivos controles normotensos, animais espontaneamente hipertensos tinham sua PA elevada rapidamente (7 dias) (Young e Landsberg, 1981). Curtos períodos de consumo de dieta HC elevavam drasticamente a PA de animais espontaneamente hipertensos (30 mmHg em 3 meses), enquanto animais normotensos só possuíam leves aumentos de PA em consumos crônicos de dieta HC (10 mmHg em 12 meses) (El Zein, Areas e Preuss, 1990). Sugere-se, portanto, que dietas do tipo ricas em carboidratos refinados são capazes de alterar a PA, mas elas alteram mais drasticamente, como um potencializador, quando já há um quadro de alteração vascular envolvido.

Em termos de função vascular, registros com dieta HC mostram clara redução da resposta de relaxamento de artérias mesentéricas expostas a concentrações crescentes de acetilcolina, insulina ou nitroprussiato de sódio em animais que consumiram a dieta por 12 semanas (Naderali *et al.*, 2001). Entretanto, já foi demonstrada uma associação independente de alterações metabólicas entre o alto consumo de carboidratos e disfunção vascular. Isto é, foi demonstrado que com apenas dois dias de consumo, antes mesmo de alterações no peso corporal, índice de adiposidade ou índice de massa muscular, a dieta HC desencadeou uma resposta prejudicada de relaxamento vascular, sendo dependente ou independente de endotélio (Naderali e Williams, 2001). Isto traz à tona a relevância de estudos que visem elucidar o papel e o impacto dos carboidratos refinados sobre a função cardiovascular, independente de outros fatores. Por fim, um trabalho desenvolvido na

Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) mostrou que esta disfunção vascular desencadeada pelo consumo excessivo de carboidratos refinados está associada ao aumento da produção de óxido nítrico (NO) induzida (iNOS) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Silva *et al.*, 2016).

Em termos de função cardíaca, quando o coração foi isolado e submetido a técnica de Langendorff (Langendorff e Nawroeki, 1897), para análise de sua contratilidade, foi demonstrado que a dieta HC não desencadeia alteração na pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) ou na dP/dt de corações isolados em estado basal de camundongos que consumiram a dieta HC (Aasum *et al.*, 2008). Entretanto, ao utilizar um transdutor de tensão, foi observada uma redução da tensão sistólica, bem como da derivada da tensão pela derivada do tempo (dT/dt) máxima e mínima em ratos (Porto *et al.*, 2011), indicando que o consumo de carboidratos é capaz de reduzir a contratilidade cardíaca.

A razão para tais disfunções cardiovasculares após consumo de dieta HC ainda parece não estar completamente elucidada. Apesar de Porto *et al.* (2011) ter demonstrado que a redução da função cardíaca, em animais que consumiram a dieta HC, estava associada a redução da captação de glicose e ácidos graxos pelo coração, disfunções cardiovasculares já foram demonstradas independentemente de alterações metabólicas (Naderali e Williams, 2001). Portanto, abre-se um leque de possibilidades, onde outras alterações desencadeadas pelo consumo excessivo de carboidratos podem também estar envolvidas em tais disfunções cardiovasculares. Sabe-se, como descrito por Oliveira *et al.* (2013), que a dieta HC possui alto poder inflamatório. Além disso, diferente de dietas ricas em lipídeos, é conhecida a capacidade da dieta HC em induzir, seletivamente, a produção de TNF- $\alpha$  no fígado de camundongos (Ferreira *et al.*, 2011). Ademais, em aortas, o excesso de açúcar já mostrou ser capaz de aumentar a produção de iNOS e TNF- $\alpha$  e, por isso, diminuir a função vascular (Silva *et al.*, 2016). Entretanto, não há registro na literatura do estado inflamatório de corações de animais que consumiram a dieta HC e novas associações e correlações entre mudanças morfofuncionais e o consumo de carboidratos podem surgir de estudos que foquem neste assunto.

#### 1.4 Perspectivas de associações entre carboidratos, inflamação e doenças cardiovasculares

Como já demonstrado por Oliveira *et al.* (2013), a dieta HC tem alto poder de desencadear inflamação, com a produção desequilibrada de citocinas pró e anti-inflamatórias. A razão para este possível desequilíbrio de citocinas anti e pró-inflamatórias durante a dieta HC e em algumas patologias cardíacas ainda não é completamente elucidada. Entretanto, é sugerido que monossacarídeos como a glicose tem alto poder glicotóxico (Kawahito *et al.*, 2009), podendo levar, por exemplo, a lesão endotelial (Funk *et al.*, 2012), ativação de receptores do tipo Toll (Rajamani e Jialal, 2014; Pahwa e Jialal, 2016) e aumento da atividade do fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) (Hamuro *et al.*, 2002). Tal ativação de NF- $\kappa$ B é capaz de desencadear a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ), interleucina-18 (IL-18) (Haneklaus e O'Neill, 2015) e enzimas, como a iNOS durante quadros hiperglicêmicos (Stockklauser-Färber *et al.*, 2000). Além disso, a hiperglicemia é capaz de desencadear dano mitocondrial (Kowluru e Abbas, 2003; Vanhorebeek *et al.*, 2009) e aumentar a concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Wolff *et al.*, 1991; Cai *et al.*, 2005; Araki e Nishikawa, 2010; Giacco e Brownlee, 2010), o que levaria a um quadro elevado de produção de citocinas pró-inflamatórias e, como medida adaptativa, anti-inflamatórias também.

Assim, um fenômeno comumente associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, especialmente em quadros patológicos hiperglicêmicos, é a produção exacerbada de EROs (Liu *et al.*, 2014; Kayama *et al.*, 2015; Wilson *et al.*, 2017). É possível de se observar, por exemplo, o aumento de EROs em modelo experimental de cardiomiopatia diabética por meio da detecção de peroxidação lipídica de cardiomiócitos (Aksakal *et al.*, 2011). Por sua vez, EROs têm demonstrado claro efeito prejudicial ao coração. EROs em excesso podem levar a fibrose cardíaca através do fator de transformação do crescimento beta-1 (TGF- $\beta$ 1) (Zhao *et al.*, 2008), potencialização de hipertrofia, apoptose e remodelamento de cardiomiócitos por ativação de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) (Kameda *et al.*, 2003). Além disso, o excesso de EROs já foi apontado como um mediador do dano mitocondrial (Suematsu *et al.*, 2003), ocasionando um ciclo de *feed back* positivo, onde EROs levam a produção de mais estresse oxidativo e suas consequências.

## 1.5 Dualidade IL-10 e TNF- $\alpha$

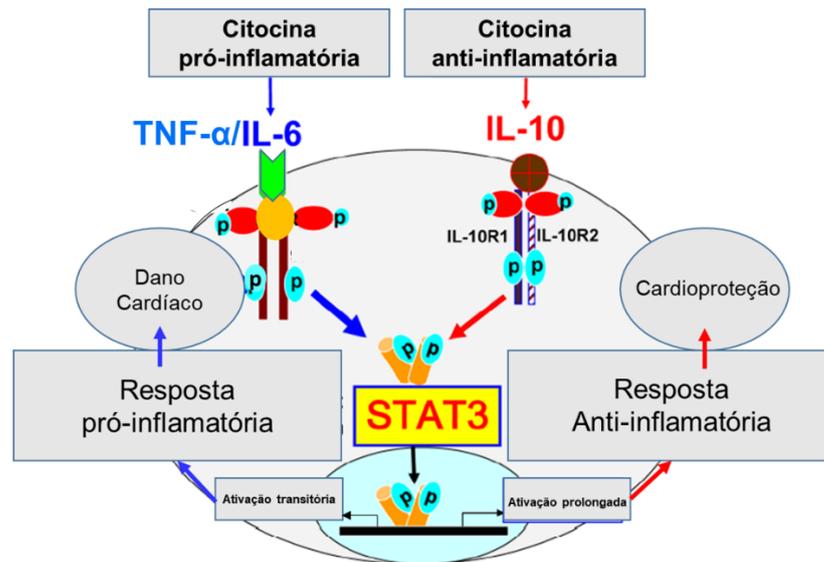
Interleucina-10 (IL-10) e TNF- $\alpha$  promovem efeitos antagônicos ao coração, sendo TNF- $\alpha$  uma citocina danosa e IL-10 uma citocina cardioprotetora (Kaur, Sharma e Singal, 2006). Por exemplo, TNF- $\alpha$  pode induzir o aumento de estresse oxidativo (Kaur, Sharma, Dhingra, et al., 2006) e apoptose no coração (Dhingra et al., 2009), sendo IL-10 uma redutora destes fenômenos (Dhingra et al., 2011). Além disso, a expressão constitutiva local de TNF- $\alpha$  cardíaca é capaz de desencadear intensa apoptose, que resulta em remodelamento ventricular concêntrico (Engel et al., 2004). Concordantemente, demonstra-se que a inflamação, fibrose e disfunção cardíaca puderam ser amenizadas por meio do antagonismo farmacológico (anti-TNF- $\alpha$ ) em animais normotensos com glicemia alta (Westermann et al., 2007). Em trabalho mais recente, foi observado um efeito inotrópico negativo em corações perfundidos com uma solução contendo TNF- $\alpha$  e este foi apontado como capaz de induzir rápida disfunção cardíaca (Jude et al., 2017).

Por outro lado, a IL-10 normalmente desempenha papel protetor para o coração. Na isquemia/reperfusão, por exemplo, o tratamento com IL-10 demonstrou reverter a disfunção cardíaca pós-reperfusão (Manukyan et al., 2011). Similarmente, o aumento de IL-10 é apontado como ponto chave da melhora da função cardíaca em determinados casos. Por exemplo, em camundongos que consumiram a dieta rica em ácidos graxos saturados e submetidos a exercício físico, o aumento da expressão de IL-10, desencadeado pelo exercício físico, foi capaz de reduzir a fibrose e, conseqüentemente, melhorar a fração de ejeção (Keshewani et al., 2015). Entretanto, não há registro na literatura sobre o efeito de dietas ricas em carboidratos refinados sobre o equilíbrio da expressão e atividade de IL-10 e TNF- $\alpha$  no coração e, portanto, novos estudos mostram-se necessários.

## 1.6 STAT3: O ponto-chave da comunicação inflamatória intracelular cardíaca

O transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3) desempenha importante papel na comunicação intracelular cardíaca. No coração, STAT3 está presente em células progenitoras cardíacas, células endoteliais, macrófagos residentes, fibroblastos e cardiomiócitos (Haghikia *et al.*, 2014). Assim como está presente em diversas células no coração, suas funções também são múltiplas. No coração, STAT3 é, principalmente, ativado pela fosforilação de dois domínios, o domínio Ser727 ou Tir705 (Li, J. *et al.*, 2016). No caso da ativação via fosforilação de Ser727, há a translocação de p-STAT3 (Ser727) para a mitocôndria, onde este é capaz de estabilizar a cadeia transportadora de elétrons (Wegrzyn *et al.*, 2009) e inibir a abertura de poros de permeabilidade transitória (Boengler *et al.*, 2010). Por outro lado, a fosforilação de Tir705 leva a heterodimerização e translocação para o núcleo celular (Haghikia *et al.*, 2011). Neste caso, uma série de genes são ativados e proteínas são, portanto, codificadas para o controle da homeostasia celular.

No caso da ativação de STAT3 via citocina anti-inflamatórias, como via IL-10/JAK1, a fosforilação se dá no domínio Tir705, desencadeando uma prolongada via anti-inflamatória (**Figura 6**) e cardioprotetora (Hutchins *et al.*, 2013). Nesta via, as principais consequências são: produção de Bcl-xL, inibição de NF- $\kappa$ B e seus, subsequentes, efeitos pró-inflamatórios (Kuwata *et al.*, 2003) e aumento de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) (Negoro *et al.*, 2001). Por exemplo, Dhingra *et al.* (2011) provaram que o tratamento com IL-10 foi capaz de inibir apoptose mediada por TNF- $\alpha$  via fosforilação de JAK1 e STAT3. Além disso, animais geneticamente deficientes de STAT3, estritamente no coração, demonstraram claro aumento de fibrose e disfunção cardíaca, com aumento dos genes para colágeno do tipo 1 $\alpha$  e para o inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2004). Isto demonstra a evidente importância da ativação desta via para a saúde miocárdica.



**Figura 6: STAT3 e suas funções de acordo com o desencadeador de sua ativação.** Adaptado de (Wang *et al.*, 2011)

Por outro lado, uma vez que estímulos anti-inflamatórios são reduzidos, a ativação de STAT3, via estímulos pró-inflamatórios como via interleucina-6 (IL-6) ou TNF- $\alpha$ , pode levar a danos ao coração (**Figura 6**). A sinalização por citocinas pró-inflamatórias também causa fosforilação do sítio Tir705 de STAT3, entretanto, com maior intensidade e de forma transitória (White e Nicola, 2013), o que leva à transcrição de proteínas que são diferentes daquelas encontradas na ativação prolongada pela IL-10 (Braun *et al.*, 2013). Esta ativação transitória, diferente da ativação prolongada, está associada ao aumento da inflamação, do estresse oxidativo, de remodelamento cardíaco e de diminuição da função cardíaca (Haghikia *et al.*, 2011).

Portanto o efeito pró ou anti-inflamatório de STAT3 depende da citocina que desencadeia sua ativação (Wang *et al.*, 2011) e do tempo (transitório ou prolongado) de ativação de STAT3 (Braun *et al.*, 2013). Uma vez que o excesso de açúcar já demonstrou ser capaz de, em cultura celular, diminuir drasticamente a capacidade da IL-10 de desencadear a fosforilação do domínio Tir705 do STAT3 (Barry *et al.*, 2016), tornam-se relevantes os estudos que visem elucidar esta comunicação entre o

consumo de carboidratos refinados, IL-10, STAT3 e alterações morfofuncionais cardíacas.

Devido a correlação entre consumo de carboidratos refinados e a incidência de fatores de risco e mortalidade por doenças cardiovasculares (Yang *et al.*, 2014) fazem-se necessários estudos que visem elucidar os efeitos de tal consumo sobre a morfologia, função e estado inflamatório do coração. Este trabalho surge com a hipótese, portanto, de que o consumo exacerbado de carboidratos refinados desencadeia mudanças morfológicas, funcionais e inflamatórias no coração, buscando, assim, esclarecer se tais processos estão associados.

## JUSTIFICATIVA

O consumo de açúcares refinados aumentou exponencialmente no último século (Johnson *et al.*, 2007). Com isso, estudos epidemiológicos têm demonstrado associação positiva entre o alto consumo de carboidratos refinados e o aumento de fatores de risco e mortalidade por doenças cardiovasculares (Yang *et al.*, 2014). Recentemente, o consumo exacerbado de carboidrato refinado foi, até mesmo, caracterizado com maior grau de correlação com o aumento do risco relativo para doenças cardiovasculares (Li *et al.*, 2015) e mortalidade (Dehghan *et al.*, 2017) em relação ao consumo isocalórico de ácidos graxos saturados. Evidências na literatura apontam um alto poder pró-inflamatório de dietas ricas em carboidratos (Oliveira *et al.*, 2013) em modelo murino, entretanto, há poucos estudos experimentais que conectem este consumo exacerbado, doenças cardiovasculares e seus mecanismos fisiopatológicos. Portanto, estudos que visem elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia das doenças cardiovasculares desencadeadas pelo consumo excessivo de carboidratos refinados mostram-se extremamente relevantes e necessários. Este trabalho traz, pela primeira vez na literatura, uma conexão entre o consumo excessivo de carboidratos refinados, alterações morfofuncionais cardíacas e mediadores inflamatórios envolvidos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar os efeitos de diferentes tempos de consumo de dieta rica em carboidratos refinados sobre o coração de camundongos da linhagem Balb/c.

### **2.2 Objetivos específicos**

Verificar se há alteração morfológica no coração de camundongos que consumiram a dieta HC e, caso haja, definir o tempo necessário para que a alteração se instaure;

Verificar se há alteração funcional no coração de camundongos que consumiram a dieta HC e, caso haja, definir o tempo necessário para que a alteração se instaure;

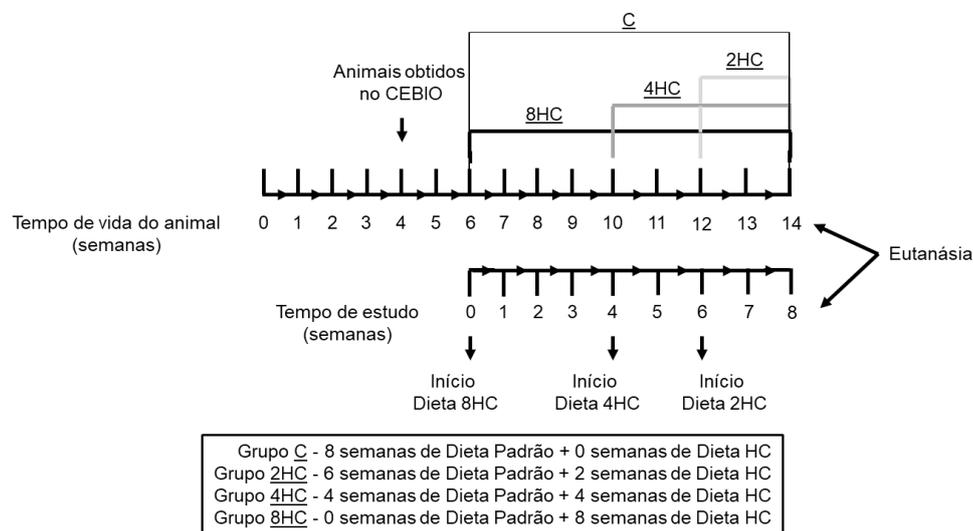
Estabelecer se há alterações de pressão arterial nos animais que consumiram dieta HC por duas, quatro ou oito semanas;

Investigar se há alterações de mediadores de estresse oxidativo e inflamatórios concomitantes a estes processos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e dieta

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, CEUA, por meio do protocolo 193/2015. Afim de se avaliar o efeito da dieta HC em diferentes tempos de consumo, camundongos Balb/c machos com idade entre seis e sete semanas de vida foram aleatoriamente divididos em quatro grupos (C, 2HC, 4HC, 8HC) e alimentados com acesso livre à dieta padrão (C) ou HC por duas (2HC), quatro (4HC) ou oito (8HC) semanas (**Figura 7**). Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG. A dieta HC, assim como descrito por Oliveira *et al.* (2013), foi composta por 45% de dieta padrão, 45% de leite condensado e 10% de açúcar refinado. Em termos de macronutrientes, a dieta padrão (4,0 kcal/g) é composta por 65,8% de carboidratos, 3,2% de gorduras e 31% de proteínas; enquanto a dieta HC (4,4 kcal/g) é composta por 74,2% de carboidratos, 5,8% de gorduras e 20% de proteínas (**Tabela 1**). Pelo menos 30% da dieta HC era composta por carboidratos refinados, principalmente sacarose.



**Figura 7: Delineamento experimental de animais e tempo de dieta.** CEBIO, Centro de Bioterismo; HC, *high carbohydrate* (rica em carboidrato).

Os animais foram pesados uma vez por semana e tiveram o consumo de dieta medido uma vez por dia. Ao atingir 14 semanas de vida, os animais foram

eutanasiados, por decapitação, ou utilizados para teste de função cardíaca *in vivo* sob anestesia e, em seguida, eutanasiados por sobredose de anestésico, assim como descrito no item 4.7.1.

**Tabela 1:** Composição nutricional das dietas utilizadas em termos de macronutrientes

| <b>Macronutriente</b>    | <b>Montante (%)</b>        |                        |
|--------------------------|----------------------------|------------------------|
|                          | <b><u>Dieta Padrão</u></b> | <b><u>Dieta HC</u></b> |
| Carboidratos             | 65,8                       | 74,2                   |
| Lipídeos                 | 3,2                        | 5,8                    |
| Proteínas                | 31                         | 20                     |
| <b>TOTAL</b>             | 100                        | 100                    |
| <b>Calorias (kcal/g)</b> | 4,0                        | 4,4                    |

HC, *high carbohydrate* (rica em carboidrato reinado).

### 3.2 Teste de resistência à insulina (TRI) tolerância oral à glicose (TTOG) e glicemia de jejum

Para o teste de resistência à insulina (TRI), camundongos alimentados receberam, pela manhã, uma injeção intraperitoneal (i.p.) de insulina (0,75 UI/kg; Novo Nordisk, Kalundborg, DK). Após a administração de insulina, foram coletadas amostras de sangue da cauda e a glicemia aferida em glicosímetro Accu-Check (Roche Diagnostics, Mannheim, BW, DE) nos tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos. O teste de tolerância oral à glicose (TTOG) foi realizado 48h após realização do TRI para que um teste não interferisse no outro. Para o TTOG, camundongos em jejum de 8 horas receberam através de gavagem D-glicose (2 mg/g). Níveis de glicose foram medidos em gotas de sangue caudal nos tempos 0, 15, 30, 60, 90 após a administração da D-glicose. Após estes experimentos, curvas “glicemia x tempo” foram geradas e a área sob a curva (ASC), em unidades arbitrárias (u.a.), foi

analisada. Além disso, a glicemia de jejum dos animais foi analisada a partir do tempo zero do TTOG. Todos os testes foram realizados na oitava semana de experimento.

### 3.3 Hematócrito

A fim de se avaliar potenciais mudanças bruscas de osmolaridade ou de volemia, após decapitação, o sangue total foi coletado em tubo heparinizado e o hematócrito foi avaliado. O sangue foi rapidamente transferido para um tubo capilar de vidro, sendo este, preenchido até 75% do volume total do tubo. Em seguida, o tubo foi tampado com massa de modelar e colocado em microcentrífuga. Este tubo foi, portanto, centrifugado a 10.000 rotações por minuto (RPM) por cinco minutos. Por fim, a porcentagem de elementos figurados do sangue foi verificada por meio da proporção de células vermelhas em relação ao todo.

### 3.4 Medida de pressão arterial

A medida de pressão arterial (PA) sistólica (PAS) não-invasiva foi realizada por método de pletismografia de cauda com sistema CODA, “Software” versão 4.1. O sistema CODA afere a pressão arterial através da variação de volume da calda do animal, reduzindo artefatos provenientes de pigmentação e movimentação por parte do animal. As medidas foram realizadas na 5<sup>a</sup> (antes do experimento) e 14<sup>a</sup> (depois do tratamento com a dieta) semanas de vida dos animais. No mínimo três medidas foram feitas para cada animal por seção e os resultados registrados resultaram de uma média aritmética destas três medidas.

Além disso, também foram aferidas a PAS, a PA diastólica (PAD) e a PA média (PAM) de forma invasiva por cateterismo da artéria carótida direita com camundongos anestesiados com cetamina (60mg/kg, i.p.) (Kawahara *et al.*, 2005) e uretana (0,7g/kg, i.p.) (Maggi e Meli, 1986). Inicialmente, apenas uretana (1,0g/kg, i.p.) seria utilizada, como descrito por (Yu *et al.*, 2006) em camundongos C57/BLACK. Entretanto, ao observar algumas mortes de animais, chegou-se à conclusão de que o Balb/c é mais susceptível a uretana que outros modelos descritos na literatura. Assim, evitando os impactos negativos da xilasina sobre o controle da função cardiovascular (Winslow *et*

*al.*, 2016), fez-se a escolha de cetamina (60mg/kg, i.p.), como indutor da anestesia, e uretana (0,7g/kg, i.p.) para manutenção da mesma. Sinais de nocicepção foram monitorados para garantir que o grau de anestesia fosse mantido durante todo o procedimento.

Para este procedimento, os animais tiveram suas carótidas direitas expostas, isoladas e canuladas com uma cânula de polietileno 10 (PE10) acoplada a um transdutor de pressão. Todas as medidas necessárias foram tomadas para não danificar o nervo Vago. Após a canulação, dez minutos de estabilização foram realizados e, então, os valores foram registrados. Os registros foram realizados em unidade MP100 da marca BIOPAC® *Systems, Inc.* O *software* AcqKnowledge versão 3.8.4 foi utilizado como interface digital e para analisar os dados.

### **3.5 Coleta de tecidos e órgãos**

Com exceção do protocolo em que se analisou a função cardíaca *in vivo*, tecidos adiposos epididimal, retroperitonal e mesentérico foram coletados para medida de adiposidade corporal em todas as repetições. Além disso, órgãos como coração, pulmão, fígado, rim direito, rim esquerdo e pâncreas também foram coletados. Com exceção do coração, todos os órgãos e tecidos foram apenas pesados e descartados. O coração de cada animal, por outro lado, foi retirado, pesado e preparado de acordo com a finalidade devida, como descrito no tópico **4.5.2**. A tíbia de cada animal também foi retirada, limpa e medida 24h após a eutanásia. Este osso longo foi utilizado como normalizador do peso dos órgãos.

#### **3.5.1 Índice de adiposidade**

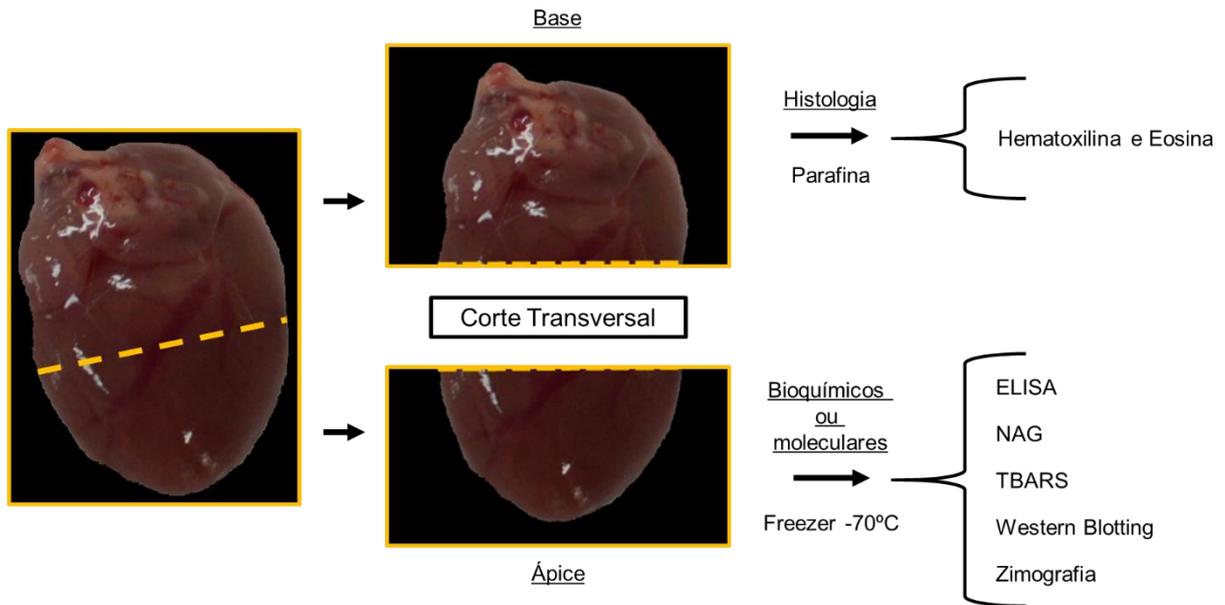
O índice de adiposidade é calculado pelo somatório do peso de tecidos adiposos (Pta) epididimal, retroperitonal e mesentérica, multiplicado por 100 e dividido pelo peso corporal (Pc) (Oliveira *et al.*, 2013). Assim, temos:

$$\text{Índice de Adiposidade (\%)} = \text{Pta} \times 100 / \text{Pc}$$

### 3.5.2 Preparo do coração

Após a eutanásia por decapitação, uma toractomia foi realizada em cada camundongo e o coração retirado imediatamente antes que o mesmo parasse de bater.

Para os testes histológicos, bioquímicos e moleculares, o coração de cada animal, ao ser retirado, foi rapidamente colocado em uma solução hipercalêmica (KCl, 150 mM) para que o mesmo parasse em diástole. Após esta etapa, uma imagem fotográfica utilizando uma câmara fotográfica digital, com 16 megapixels, foi tirada em papel milimetrado. O coração de cada camundongo foi pesado e um corte transversal foi feito, separando o coração em duas partes: base e ápice (**Figura 8**). O ápice do ventrículo direito foi descartado. O ápice do ventrículo esquerdo foi pesado e guardado em freezer (-70°C) até o processamento devido, tendo sido destinado a ensaio de imunabsorbância [*enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)], ensaio de detecção de n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG), ensaio de detecção de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico [*thiobarbituric acid reactive substances assay* (TBARS)] ou zimografia. Para o Western Blotting, o ápice do ventrículo esquerdo do coração de cada animal foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido, guardado em freezer (-70°C) por 24 horas e homogeneizado de acordo como descrito em 4.11. Por fim, a base dos corações foi submersa em paraformaldeído [4% em tampão fosfato-salina (PBS)] por 24h em temperatura ambiente e, então, transferidos para etanol (70%) por mais 24h, até que a mesma fosse processada para subsequente produção de lâminas histológicas assim como descrito em 4.6.1.



**Figura 8: Representação esquemática do corte feito no coração e testes realizados.** ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ensaio de imunoabsorbância); NAG, n-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase; OCT, *optimal cutting temperature compound*; TBARS, *thiobarbituric acid reactive substances assay* (ensaio de detecção de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico).

Além do peso total do coração, os ventrículos direito e esquerdo também foram pesados separadamente. Para este teste, os corações também foram rapidamente retirados após toractomia. Neste caso, os corações foram limpos, sendo o timo, a artéria aorta e tecidos adiposos adjacentes retirados. Os átrios direito e esquerdos também foram separados e descartados. Logo em seguida, as paredes ventriculares foram identificadas, separadas e pesadas. O ápice do ventrículo esquerdo foi pesado e guardado em freezer ( $-70^{\circ}\text{C}$ ) até o processamento.

Para o teste de função cardíaca *ex vivo*, o coração também foi retirado rapidamente, porém foi tratado assim como descrito em **4.7.2**.

### 3.6 Análise histopatológica

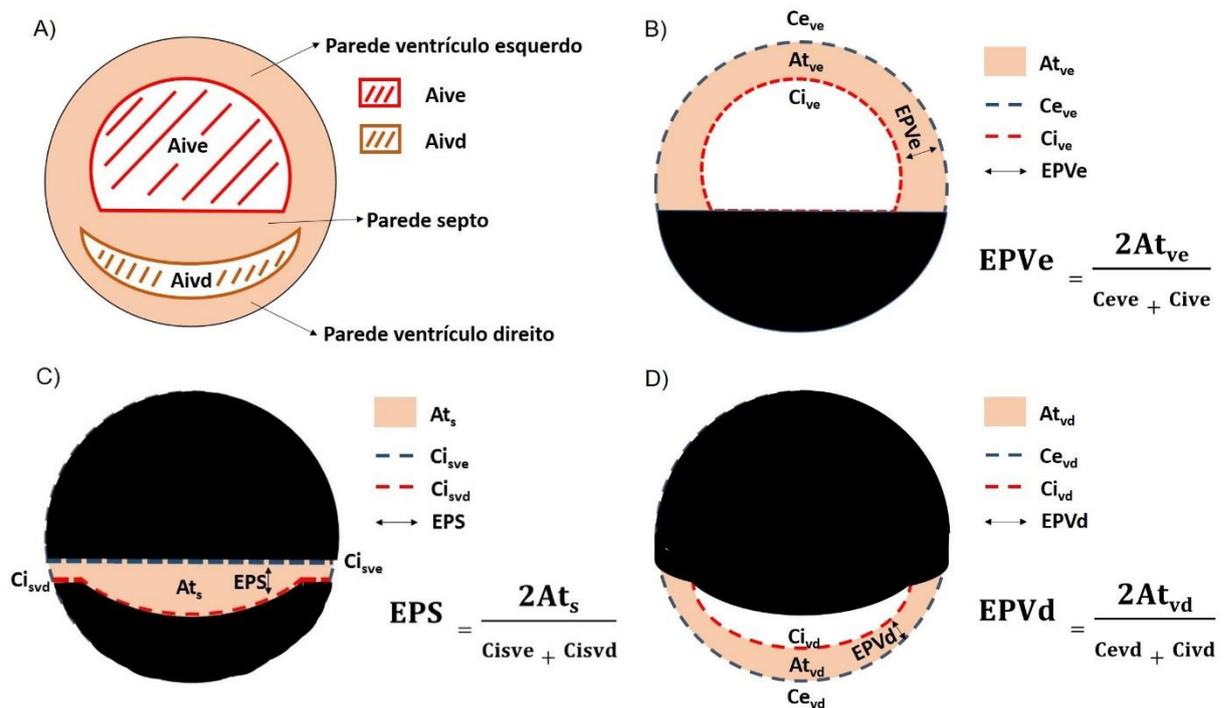
#### 3.6.1 Confecção de lâminas histológicas

Para a confecção das lâminas, as bases dos corações que estavam em álcool (70%) passaram por desidratação, realizada através de passagens subsequentes em

diferentes concentrações de etanol (80%, 90%, absoluto 1, 2 e 3 – 30 minutos cada); diafanização com xilol (1, 2 e 3 – 20 minutos cada) e embebidos em parafina líquida (Paraplast Sigma) 1, 2 e 3 – 20 minutos cada. Os corações foram então incluídos em formas contendo parafina líquida, onde permaneceram por 3 horas a temperatura ambiente. Para a análise histológica, cortes dos tecidos emblocados (espessura de 5  $\mu$ m) foram feitos em micrótomo. Por fim, as lâminas foram desparafinizadas (xilol 1, 2 e 3 – 20 minutos e álcool absoluto 1, 2 e 3, 90%, 80% e 70% - 2 minutos cada) e coradas com hematoxilina de Harris (40 segundos) e eosina (1 minuto) (HE). Após as lâminas estarem coradas, a análise morfométrica de cardiomiócitos e cardíaca foi realizada.

### **3.6.2 Análise morfométrica cardíaca**

A partir da análise do comprimento interno (Ci), comprimento externo (Ce) e área total da estrutura (At), a espessura média da parede septal (EPS), ventricular esquerda (EPVe) e direita (EPVd) pôde ser calculada utilizando-se as fórmulas (Cau *et al.*, 2015), demonstradas na **figura 9**. Além disso, a área interna das câmaras ventriculares esquerda (Aive) e direita (Aivd) também foi analisada ao utilizar o programa de imagens ImageJ (NIH – National Institute of Health). Todas as medidas foram retiradas de cortes da porção média do coração.



**Figura 9: Representação esquemática e cálculo morfometria cardíaca.** Representação esquemática da base do coração, visto em um corte transversal, embocado em parafina e fórmulas de medidas morfométrica utilizadas. Aive = área interna da câmara ventricular esquerda; Aivd = área interna da câmara ventricular direita;  $Ci_{ve}$  = comprimento interno do ventrículo esquerdo;  $Ci_{vd}$  = comprimento interno do ventrículo direito;  $Ci_{sve}$  = comprimento interno septo-ventricular esquerdo;  $Ci_{svd}$  = comprimento interno septo-ventricular direito;  $Ce_{ve}$  = comprimento externo do ventrículo esquerdo;  $Ce_{vd}$  = comprimento externo do ventrículo direito;  $At_{ve}$  = Área total do ventrículo esquerdo;  $At_{vd}$  = Área total do ventrículo direito;  $At_s$  = Área total do septo;  $EPS$  = espessura média da parede septal;  $EPVe$  = espessura média da parede ventricular esquerda;  $EPVd$  = espessura média da parede ventricular direita Adaptado de Cau *et al.* (2015).

Após a realização da medida da  $EPVe$  e da  $Aive$ , o cálculo da espessura relativa da parede ventricular esquerda ( $ERPVe$ ) foi realizado de acordo com a fórmula descrita a seguir e, a partir deste, o tipo de remodelamento foi determinado conforme os critérios de Ganau *et al.* (1992):

$$ERPVe = \frac{EPVe * \pi}{\sqrt{Aive}}$$

Assim, o aumento da  $EPVe$  caracteriza remodelamento hipertrófico. Uma vez observado aumento da  $ERPVe$ , somado à redução ou não da  $Aive$ , classifica-se como

remodelamento ventricular hipertrófico concêntrico. Já o aumento do peso ventricular esquerdo, somado à redução da ERPVe e aumento da área da câmara, caracteriza remodelamento hipertrófico excêntrico.

### **3.6.3 Análise morfométrica de cardiomiócitos**

Para a análise morfométrica de cardiomiócitos, todas as lâminas foram digitalizadas usando uma microcâmara (Q-Color5, Olympus) acoplada ao microscópio BX53 (Olympus) com auxílio do *softwer* Q-Capture Pro 7.0. O mesmo foi utilizado para a medição do diâmetro de 100 diferentes cardiomiócitos dispostos longitudinalmente com núcleo evidente. Após a medição, uma média aritmética simples foi realizada e o valor do diâmetro de cardiomiócitos de um animal foi encontrado.

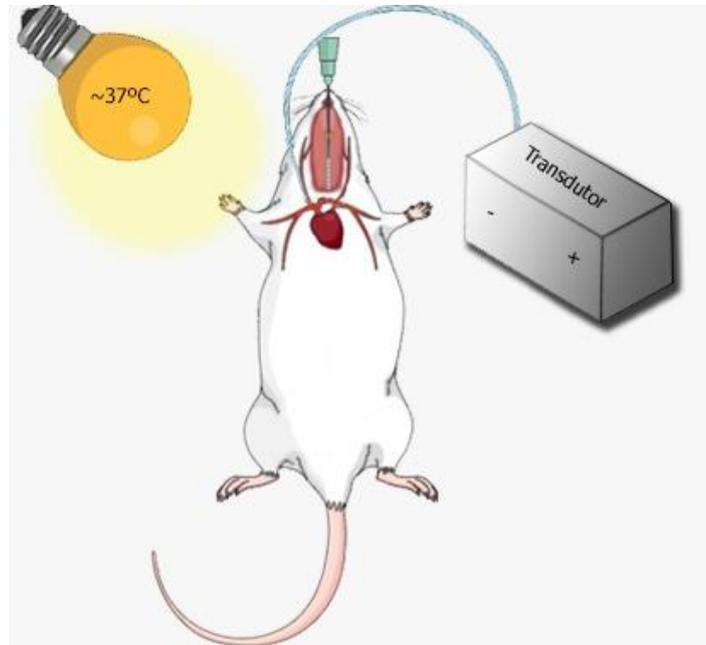
## **3.7 Avaliação da função cardíaca**

A fim de avaliar se as alterações causadas pela dieta afetaram a função cardíaca dos animais expostos a dieta HC, foram realizadas avaliações da função cardíaca *in vivo* sob anestesia, e *ex vivo*, através da técnica de Langendorff.

### **3.7.1 Função cardíaca *in vivo***

No teste *in vivo*, os animais foram mantidos a uma temperatura próxima de 37°C e anestesiados com cetamina (60 mg/kg; i.p.) (Kawahara *et al.*, 2005) e uretana (0,7 g/kg; i.p.) (Maggi e Meli, 1986). Após exposição cirúrgica da artéria carótida direita, um catéter de polietileno foi inserido, por meio da artéria carótida direita, na câmara ventricular esquerda, assim como demonstrado na **figura 10** e descrito por Calligaris *et al.* (2013). Os catéteres foram ligados a transdutores de pressão acoplados a um amplificador apropriado. A pressão ventricular esquerda foi, então, registrada continuamente em unidade MP100 da marca BIOPAC® *Systems, Inc.* O *software* AcqKnowledge versão 3.8.4 foi utilizado como interface digital e para analisar os dados. Assim, foram registradas e analisadas a frequência cardíaca (FC), a pressão ventricular esquerda (PVE), a derivada da pressão pela derivada do tempo máxima (dP/dt<sub>max</sub>) e a derivada da pressão pela derivada do tempo mínima (dP/dt<sub>min</sub>).

Estas duas últimas foram, portanto, utilizadas como índices de função cardíaca da fase sistólica e diastólica, respectivamente. Por fim, os animais foram eutanasiados por sobredose de anestesia (cetamina 180 mg/kg, i.p.; uretana 2,1 g/kg, i.p.).

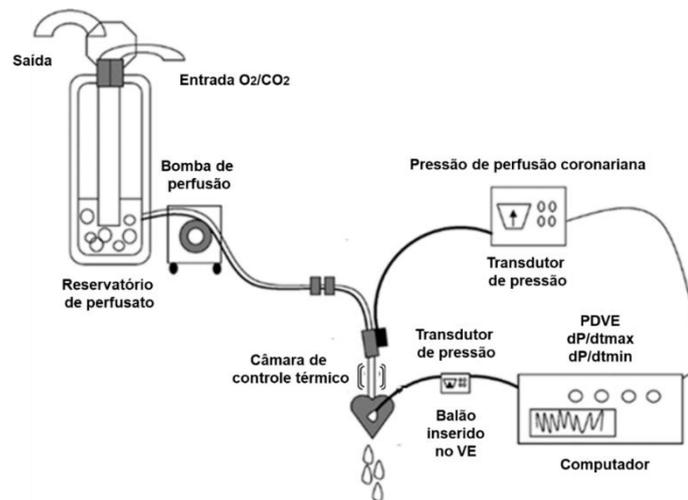


**Figura 10:** Representação esquemática da canulação da carótida direita com subsequente inserção de cateter na câmara ventricular esquerda.

### **3.7.2 Função cardíaca ex vivo**

Para avaliar a função cardíaca *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff (Langendorff e Nawroeki, 1897) com fluxo constante. O coração foi retirado do organismo e conectado a um sistema de perfusão (**Figura 11**) com uma solução nutritora (NaCl 113,00mM, KCl 4,70mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,10mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1,10mM, NaHCO<sub>3</sub> 22,00mM, C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 11,00mM, CaCl<sub>2</sub> 1,35 mM). Para isso os animais foram eutanasiados por decapitação 10 minutos após aplicação de heparina (1000 UI/kg; i.p.) (Herr *et al.*, 2015). Após a abertura da cavidade torácica, os corações foram retirados e colocados em uma placa de Petri contendo solução nutritora em temperatura de aproximadamente 4°C. Os outros tecidos que acompanhavam o coração durante a remoção, como tecido pulmonar e vascular, traqueia e timo foram removidos e, posteriormente, descartados. Em seguida a aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão que leva a solução nutritora às artérias

coronarianas. O tempo dessa preparação foi cerca de 5 minutos. Os corações que excederam esse tempo na preparação foram descartados. Os corações foram perfundidos com solução nutritora, contendo carbogênio (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>), com fluxo constante de 3 mL/min, pressão de perfusão entre 60 e 80mmHg e temperatura de 36,5°C.



**Figura 11: Representação esquemática do sistema de perfusão e parâmetros analisados durante a técnica de verificação da função cardíaca *ex vivo*.** dP/dt<sub>max</sub>, derivada da pressão máxima pela derivada do tempo; dP/dt<sub>min</sub>, derivada da pressão mínima pela derivada do tempo; PDVE, pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo; VE, ventrículo esquerdo. Imagem adaptada de Skrzypiec-Spring *et al.* (2007).

Para analisar os parâmetros de contratilidade, o átrio esquerdo foi retirado e um balão de látex conectado a um transdutor de pressão foi introduzido até a câmara do ventrículo esquerdo. Após introduzido, o balão foi inflado até atingir uma pressão de 100mmHg para captar a contratilidade do miocárdio. Cerca de 30 minutos de estabilização foram esperados e, então, os valores basais de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), a FC e as dP/dt máxima e mínima foram registrados pelo transdutor de pressão acoplado ao balão inserido na câmara ventricular esquerda. Em seguida, uma curva dose-resposta de isoprenalina nas concentrações de 10<sup>-13</sup> a 3x10<sup>-5</sup> M foi realizada e os valores registrados. Os registros foram realizados através do software AQCAD 2.2.4 e interpretados através do software ANCAD.

### 3.8 Análise da peroxidação lipídica pela técnica de TBARS

Para a quantificação da peroxidação lipídica, os ápices dos ventrículos esquerdos foram homogeneizados com PBS (pH 6,5) em uma proporção de 1mg de tecido para cada 50µL de PBS. Logo em seguida, 100 µL deste homogenato foi misturado a 50 µL de ácido fosfórico (7%) e 100 µL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA)/butil hidroxitolueno (BHT) (TBA 1%, NaOH 50mM, BHT 0,1mM). As amostras, então, foram colocadas em banho seco a 100°C por 15 minutos e misturada a 750 µL de butanol. Após centrifugação a 2000 RPM por cinco minutos, 250 µL do sobrenadante das amostras foram transferidos para uma placa de 96 poços e, esta, foi lida em espectrofotômetro (Emax, Molecular Devices) a 532 e 600nm. O valor final, assim como demonstrado por Hermes-Lima *et al.* (1995), foi obtido em nmol/g de tecido molhado por meio da fórmula:

$$\text{TBARS (nmol} * \text{mL}^{-1}\text{)} =$$

$$\frac{\{[\text{Absorbância da amostra (A532} - \text{A600)} - \text{Absorbância do branco (A532} - \text{A600)}] * 10^3\}}{156}$$

### 3.9 Quantificação de quimiocinas e citocinas

Os níveis de citocinas e quimiocinas foram medidos em homogenatos do ápice cardíaco por ELISA. As citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e IL1- $\beta$  total e as quimiocinas (CC – motif) ligante 2 (CCL2) e (CC – motif) ligante 3 (CCL3) foram analisadas. Para isso, os ápices foram homogeneizados com PBS (pH 7,4) contendo inibidores de proteases (0,1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil, 0,1 nM benzetônio clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% de Tween20. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 RPM e a 4°C. O sobrenadante foi utilizado para o ensaio de ELISA com diluição de 1:4. O ensaio ELISA foi realizado mediante instrução do fabricante (R&D System) e lido em espectrofotômetro (Emax, Molecular Devices), em um comprimento de onda de 492nm.

### 3.10 Avaliação de infiltrado de macrófagos no tecido pelo método de atividade da NAG

O ápice do ventrículo esquerdo foi colocado em solução salina 0,9% (4° C) contendo 0,15 v/v de Triton X-100. Logo em seguida, foi homogeneizado em vórtex e centrifugado a 4°C por dez minutos a 1.500 RPM. Os sobrenadantes foram imediatamente recolhidos e utilizados para o ensaio de NAG com diluição de 1:10.

A reação foi iniciada após a adição de 100 µL do sobrenadante recolhido após centrifugação e pela adição de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-D-glicosaminidina, diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M; pH 4,5) na concentração final de 2,24mM. A reação se processou a 37°C por dez minutos, em placas de 96 poços. O término da reação foi dado pela adição de 100 µL de tampão glicina 0,2M (pH 10,6). As placas de 96 poços foram lidas em espectrofotômetro (Emax, Molecular Devices) a 405 nm. O número de macrófagos foi calculado a partir de uma curva padrão da atividade de NAG expressa em aumento de absorbância a partir de macrófagos obtidos da cavidade peritoneal de camundongos estimulados com tioglicolato 3% (dados não mostrados). Os resultados foram expressos em número relativo de macrófagos por 100 miligramas de tecido úmido.

### 3.11 Western Blotting

A quantificação cardíaca da ATPase transportadora de cálcio do retículo sarcoplasmático 2 (SERCA2), STAT3, phopho-STAT3 e GAPDH foi realizada em homogenatos de ventrículos esquerdos pela da técnica de Western Blotting. Para isso, as amostras de tecido cardíaca previamente congeladas foram homogeneizadas com tampão RIPA gelado [Tris HCl (pH 8.0) 50 mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, SDS 0,1%, Deoxicolato 1%, Triton-X-100 1%, *cocktail* de inibidores de protease industrializado (Sigma), inibidores de protease separados (PMSF 200 mM; benzamidina 15,7 mg/mL; pepstatina 10 mM) e inibidor de fosfatase (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 1 mM)] para extração de proteínas totais. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 RPM e a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o conteúdo proteico total foi quantificado assim como descrito por Bradford (1976), utilizando solução reagente da Bio-Rad Laboratories, Inc.

Após a quantificação de proteínas totais, as proteínas (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (*sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – SDS-PAGE*) e transferidas para membranas de nitrocelulose por métodos semi-seco por meio de aparelho da Bio-Rad, por 27 minutos, a 400mA fixos. Em seguida, já com as proteínas transferidas para a membrana de nitrocelulose, os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados com TBS-T (Tris 0,02M, NaCl 0,16M, Tween 0,1%) + 5% de albumina de soro bovino. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários descritos na **Tabela 2**.

**Tabela 2:** Anticorpos utilizados nos ensaios de Western Blotting

| Alvo                                    | Diluição | Marca                  |
|-----------------------------------------|----------|------------------------|
| SERCA2 (F-1)                            | 1:1000   | Santa Cruz (sc-376235) |
| Stat3 (124H6) Mouse mAb                 | 1:1000   | Cell Signaling (#9139) |
| Phospho-Stat3 (Tyr705)                  | 1:1000   | Cell Signaling (#9131) |
| GAPDH (6C5)                             | 1:3000   | Santa Cruz (sc-32233)  |
| Anti-mouse IgG (Fc specific)-Peroxidase | 1:15000  | Sigma (A2554)          |

A incubação do anticorpo primário foi realizada em solução de TBS-T + 1% de BSA durante 18h horas (4°C). Logo depois, as membranas foram lavadas durante 30 minutos com TBS-T e, portanto, incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com anticorpo secundário *anti-mouse* conjugado com peroxidase, como descrito também na **Tabela 2**. As bandas foram, então, detectadas através de fotodocumentador ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Piscata Way, NJ, EUA). A intensidades das bandas foi quantificada através do programa ImageJ (NIH – National Institute of Health), por densitometria óptica.

### 3.12 Avaliação qualitativa de metaloproteinases da matriz por zimografia em gel

Para detecção de metaloproteinases da matriz extracelular do tipo 2 (MMP-2) e tipo 9 (MMP-9) foi utilizada a técnica de zimografia em gel (Hu e Beeton, 2010). Para isso, amostras de ápice do ventrículo esquerdo congeladas em freezer (-70°C) foram homogeneizadas em tampão Tris a 50mM com CaCl<sub>2</sub> a 10mM e *cocktail* de inibidores de protease (Sigma). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 10.000 RPM e a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o conteúdo proteico total foi quantificado assim como descrito por Bradford (1976).

Após a quantificação de proteínas totais, as proteínas (40 µg) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% (*sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis – SDS-PAGE*), impregnado com 0,5 mg/mL de gelatina (Sigma-Aldrich). Um controle positivo (C+), composto por soro fetal bovino, foi utilizado como método comprobatório da eficácia do método. Após a separação por peso molecular, o gel foi colocado em solução renaturante de Triton X-100 a 2% e, em seguida, solução de Tris a 50mM com CaCl<sub>2</sub> a 10mM overnight a 37°C para que a ação gelatinolítica das enzimas MMP-2 e MMP-9 fosse ativada. O gel foi, então, corado por três horas com Comassie Blue G-250 e colocado por uma hora em solução descorante (etanol 25%, ácido acético 7%) a fim de criar contraste. Os géis foram digitalizados utilizando fotodocumentador (HP Psc 1310 *series*; formato tiff.; 600 dpi). A intensidades das bandas foi quantificada, portanto, pelo programa ImageJ (NIH – National Institute of Health), por densitometria óptica.

### 3.13 Análise estatística

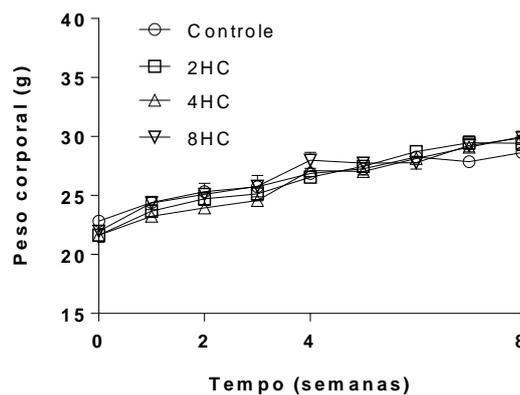
Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o programa de criação de gráficos estatísticos GraphPad Prism 6.0 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Primeiramente, todos os resultados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) para análise de normalidade de distribuição dos dados. Os resultados foram expressos como média seguida de erro padrão da média (média ± e.p.m.). Naqueles casos onde havia apenas uma variável, o teste paramétrico “Oneway ANOVA” foi utilizado para análise de variância, seguido de pós-teste de múltiplas

comparações de Dunnett. Para aqueles casos onde haviam duas ou mais variáveis, o teste paramétrico “Twoway ANOVA” foi utilizado para análise de variância, seguido de pós-teste de múltiplas comparações de Dunnett. Uma análise de correlação pelo coeficiente de Pearson foi utilizada para se determinar a correlação entre a concentração de IL-10 cardíaca e as dP/dt máxima e mínima durante o cateterismo do ventrículo esquerdo. Resultados onde  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Animais alimentados com dieta HC não possuem diferença de peso ao longo do tratamento dietético

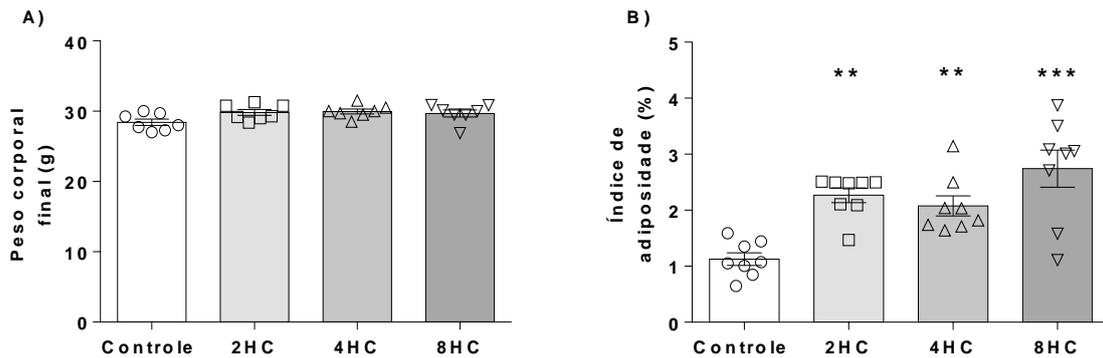
A fim de se avaliar o consumo de ração ao longo das oito semanas de experimento e o impacto do mesmo no peso corporal, a ingestão cumulativa de ração foi medida e, semanalmente, o peso corporal (**Figura 12**) foi registrado. Foi observado que, aparentemente, os animais dos grupos HC consumiram quantidades similares ou levemente maiores que o grupo controle (dado apenas qualitativo). Entretanto, o peso corporal dos animais não variou ao longo das semanas em relação ao grupo controle ( $P > 0,05$ ).



**Figura 12: Avaliação do peso corporal ao longo do experimento.** Peso corporal semanal (A). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; N = 7-8 animais por grupo.

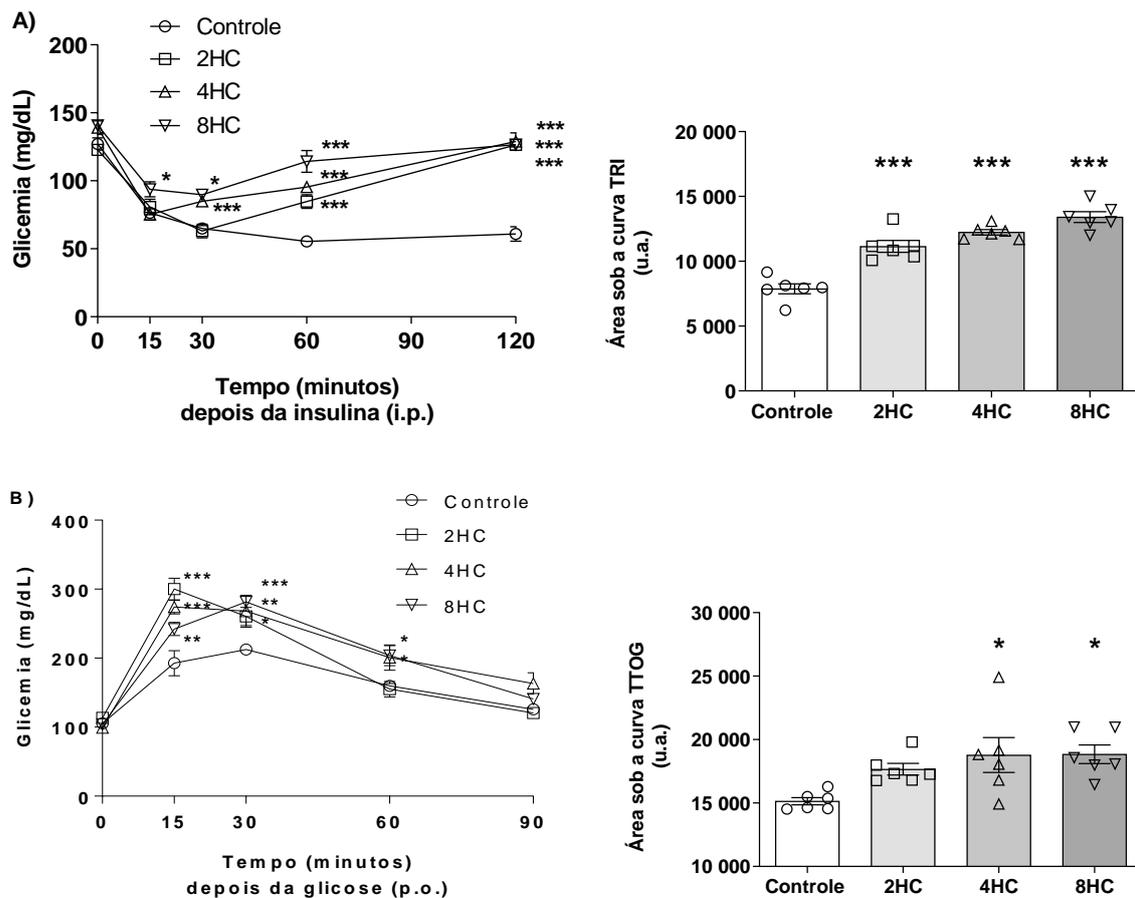
### 4.2 A dieta rica em carboidratos refinados tornou os animais obesos e alterou características metabólicas em todos os tempos de consumo

Apesar de não alterar o peso final (**Figura 13A**) dos animais ( $P > 0,05$ ), a dieta HC aumentou substancialmente a adiposidade visceral dos grupos HC (em %: C =  $1,1 \pm 0,1$  x 2HC =  $2,3 \pm 0,1^{**}$  x 4HC =  $2,1 \pm 0,2^{**}$  x 8HC =  $2,7 \pm 0,3^{***}$ ;  $^{**}P < 0,01$  x controle;  $^{***}P < 0,001$  x controle), representada pelo índice de adiposidade (**Figura 13B**). Esta diferença de adiposidade indica que os animais tratados com a dieta HC se tornaram obesos em termos de gordura visceral.



**Figura 13: Avaliação do perfil de obesidade.** Peso corporal final (A), índice de adiposidade (B). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \*\* $P < 0,01$  x controle; \*\*\* $P < 0,001$  x controle.

Dentro dos parâmetros metabólicos avaliados, foram observadas diferenças significativas, em relação ao controle, no TRI, no TTOG e na glicemia de jejum. No TRI (**Figura 14A**), após a administração de insulina, foi observado que todos os grupos HC apresentaram respostas com comportamento diferente do controle. Apesar da glicemia ter diminuído em todos os grupos, os grupos HC tiveram os valores de glicemia de volta ao estado basal até 120 minutos depois da administração de insulina, enquanto o grupo controle permaneceu com glicemia próxima de 60 mg/dL até o fim do experimento. Caracteriza-se, portanto, que todos os grupos HC estavam resistentes à insulina. Isto foi confirmado pela ASC (em u.a.:  $C = 7.872 \pm 385$  x 2HC =  $11.148 \pm 458^{***}$  x 4HC =  $12.234 \pm 212^{***}$  x 8HC =  $13.410 \pm 417^{***}$ ; \*\*\* $P < 0,001$  x controle). No TTOG (**Figura 14B**), após a administração oral de glicose, todos os grupos tiveram suas glicemias aumentadas, porém os grupos HC apresentaram glicemias significativamente elevadas até 30 minutos após a administração de glicose. Além disso, os grupos 4HC e 8HC mantiveram glicemia significativamente diferentes do controle até 60 minutos após a administração oral de glicose. Assim, pode-se concluir que todos os grupos HC possuíam diferentes perfis de resposta a administração oral de glicose em relação ao controle e que, como confirmado pela ASC (em u.a.:  $C = 15.145 \pm 288$  x 2HC =  $17.667 \pm 466$  x 4HC =  $18.783 \pm 1.378^*$  x 8HC =  $18.845 \pm 735^*$ ; \* $P < 0,05$  x controle), os grupos 4HC e 8HC estavam intolerantes à glicose. Por fim, a glicemia de jejum foi analisada pelo tempo zero do TTOG. Não foram encontradas diferenças entre os animais que consumiam a dieta HC e o grupo controle ( $P > 0,05$ ) (**Figura 14B**).



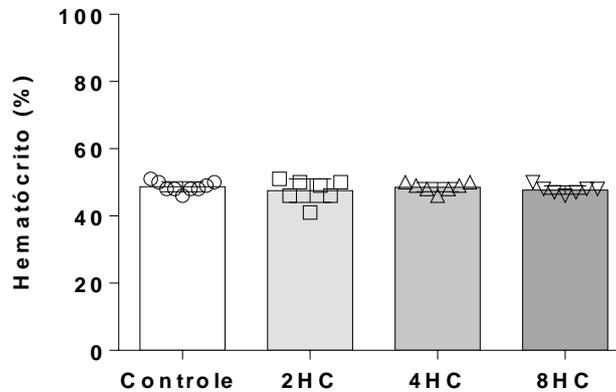
**Figura 14: Avaliação de parâmetros metabólicos.** Teste de resistência à insulina (A), teste de tolerância oral à glicose (B). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle; \*\*\* $P < 0,001$  x controle.

### 4.3 A dieta HC não alterou a porcentagem do hematócrito, tampouco a pressão arterial em nenhum tempo de consumo

A fim de se inferir possíveis influências de pré e pós-carga sobre o coração, o hematócrito (**Figura 15**) foi realizado e a PA foi avaliada de forma não-invasiva (**Figura 16**) e invasiva com anestesia (**Tabela 3**).

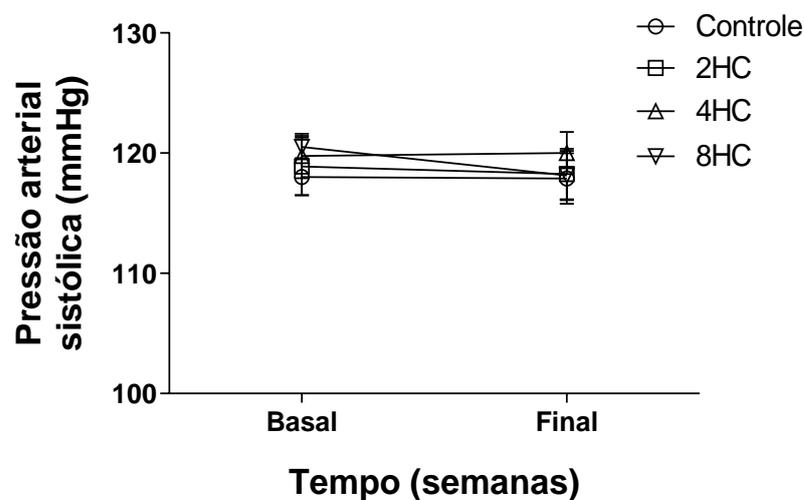
O alto teor glicídico da dieta poderia causar um estado de hiperosmolaridade plasmática. Esta alteração poderia impactar no enchimento ventricular. Uma vez que o hematócrito avalia a porcentagem volumétrica de elementos figurados no sangue total, mudanças na quantidade e composição do plasma potencialmente alterariam o valor deste teste. Entretanto, não foi observada alteração no hematócrito dos animais

que consumiram a dieta HC ( $P>0,05$ ), constatando que não houve mudança da proporção volumétrica entre plasma e elementos figurados do sangue.



**Figura 15: Avaliação da proporção volumétrica de elementos figurados por hematócrito.** Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m.

Na medida não-invasiva da PA, não foram observadas alterações de PAS entre grupos na semana zero do protocolo ( $P>0,05$ ), antes de começar o estudo experimental, tampouco na semana oito ( $P>0,05$ ), ao final do protocolo experimental (**Figura 16**). Similarmente, não foram observadas diferenças nos valores de PAS, PAD e PAM, quando analisadas sob anestesia via cateterismo da artéria carótida direita ( $P>0,05$ ) na oitava semana de tratamento dietético (**Tabela 4**).



**Figura 16: Avaliação da pressão arterial por pletismografia de cauda.** Pressão arterial sistólica (PAS). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; N= 8 animais por grupo.

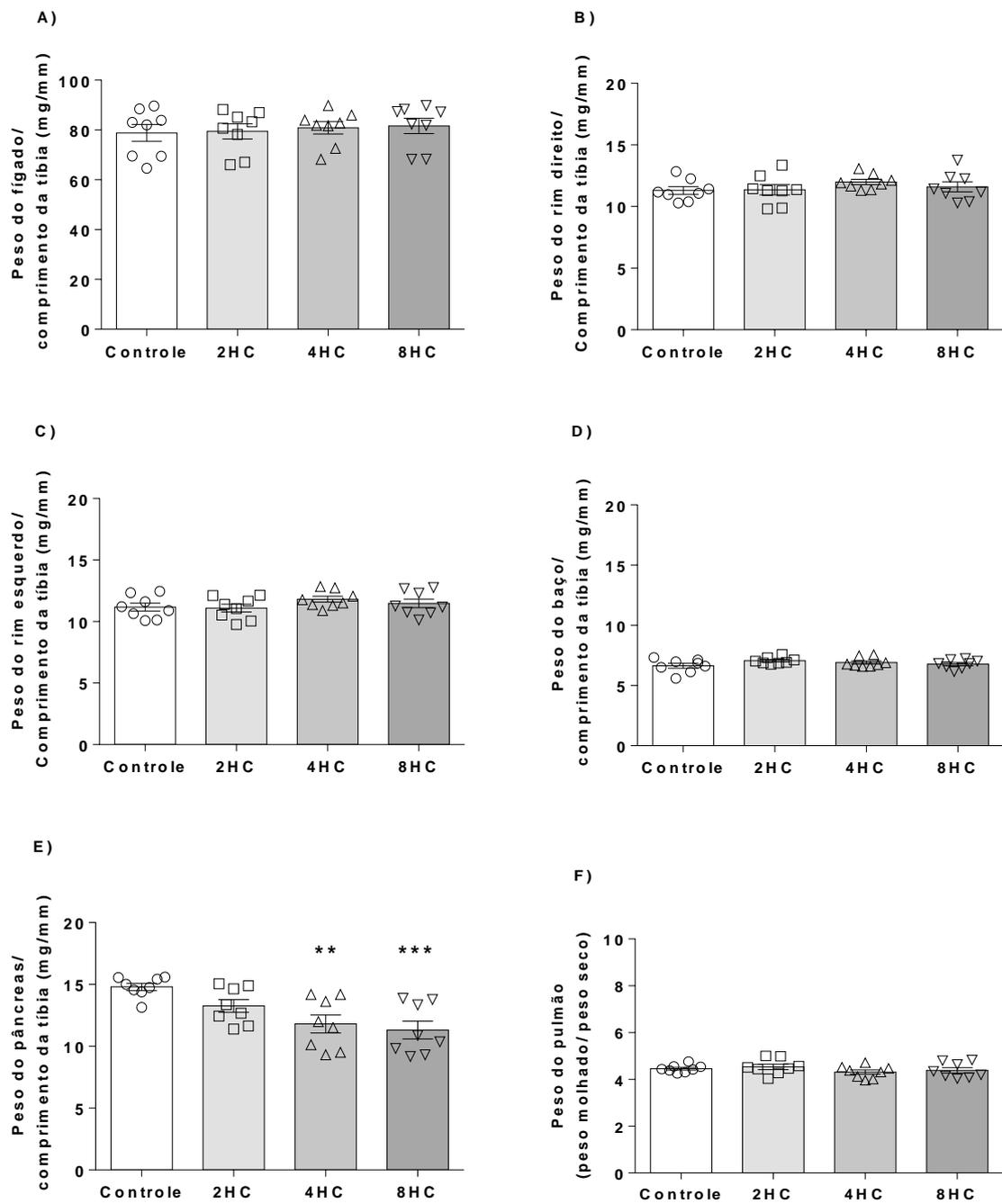
**Tabela 3:** Pressão arterial de camundongos anestesiados submetidos ao cateterismo de carótida.

| Parâmetros                         | C       | 2HC     | 4HC     | 8HC     |
|------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| <b>Pressão arterial sistólica</b>  | 106 ± 3 | 107 ± 3 | 103 ± 1 | 107 ± 2 |
| <b>Pressão arterial diastólica</b> | 67 ± 3  | 74 ± 3  | 71 ± 4  | 75 ± 4  |
| <b>Pressão arterial média</b>      | 80 ± 3  | 85 ± 3  | 81 ± 3  | 86 ± 2  |

Dados são representados por média ± e.p.m. N = 6-8 animais por grupo.

#### **4.4 A dieta HC causou hipotrofia pancreática a partir de 4 semanas de tratamento dietético, sem alterar o peso de outros órgãos**

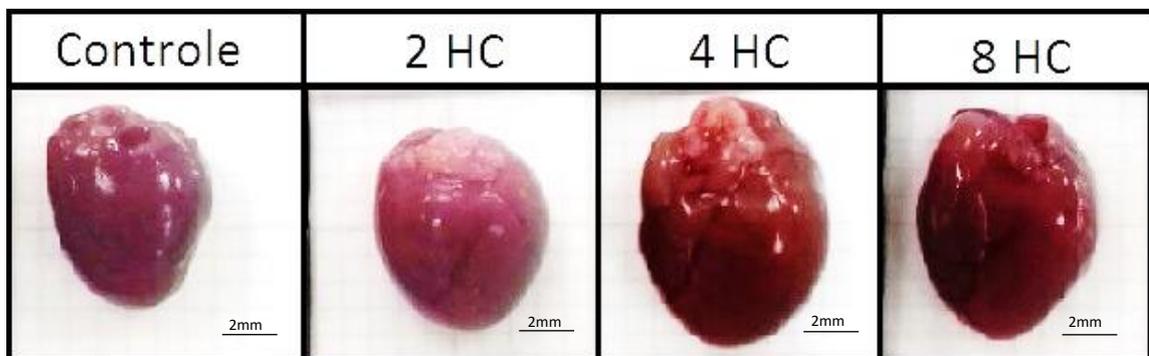
Para avaliação do impacto sistêmico da ingestão excessiva de carboidratos refinados, órgãos foram retirados e pesados. Para isso, todos os órgãos dos animais foram normalizados pelo comprimento da tíbia, com exceção dos pulmões, que foram normalizados por seu peso seco. Não foram encontradas mudanças significativas no peso do fígado (**Figura 17A**), rins direito (**Figura 17B**) e esquerdo (**Figura 17C**), baço (**Figura 17D**) e pulmão (**Figura 17F**) ( $P > 0,05$ ). Entretanto, foi observado que houve redução do peso do pâncreas (**Figura 17E**) a partir de quatro semanas de dieta HC (em mg/mm: C =  $14,8 \pm 0,3$  x 2HC =  $13,3 \pm 0,05$  x 4HC =  $11,8 \pm 0,7^*$  x 8HC =  $11,3 \pm 0,7^{**}$ ; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle), caracterizando a existência de uma hipotrofia pancreática.



**Figura 17: Avaliação do peso de órgãos.** Peso do fígado (A), rim direito (B), rim esquerdo (C), baço (D), pâncreas (E), pulmão (F). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle.

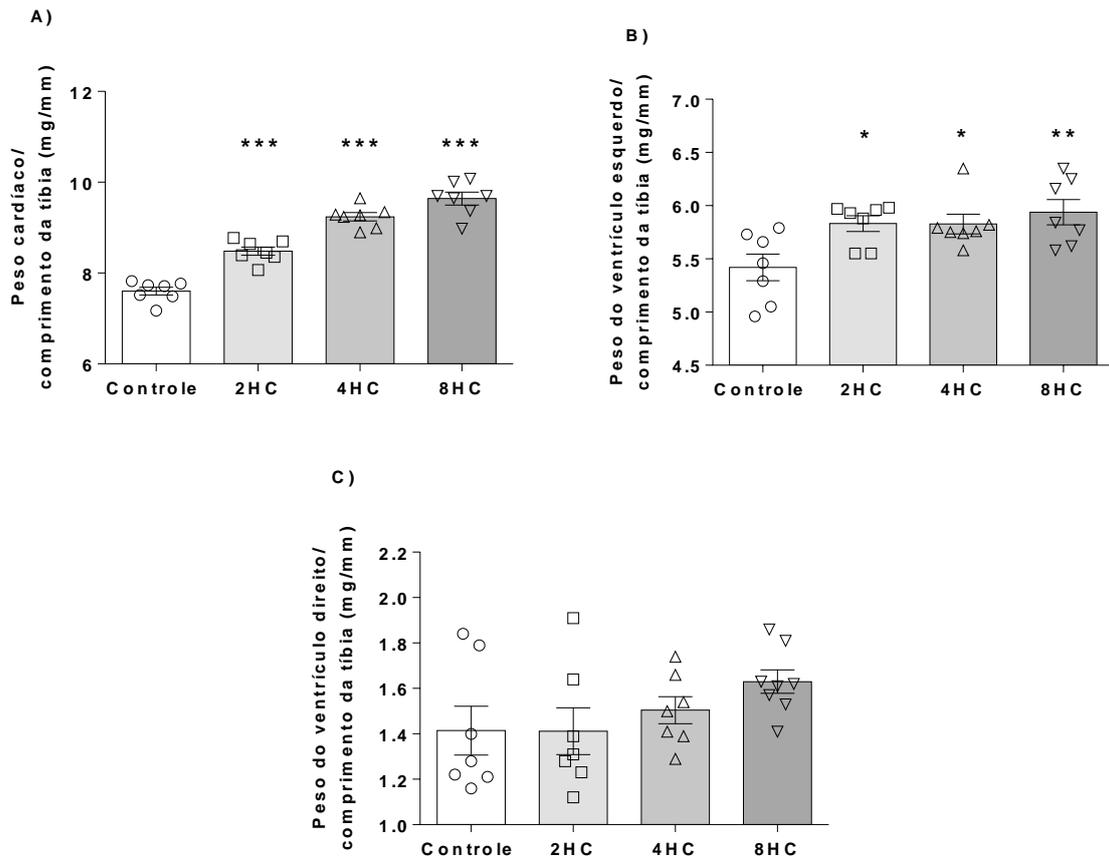
**4.5 A dieta HC causou hipertrofia cardíaca em todos os tempos de consumo, com aumento da espessura relativa da parede ventricular esquerda a partir da quarta semana, caracterizando remodelamento hipertrófico concêntrico**

Foi observado que os corações dos grupos HC também se encontravam diferentes em relação ao grupo controle. Visualmente, como observado na **figura 18**, os corações de todos os grupos HC apresentavam-se mais arredondados, com seus ápices com aspecto de “cheios”, enquanto os corações controle apresentavam-se majoritariamente com aspecto mais afinado na região do ápice. Além disso, os corações dos grupos 4HC e 8HC também aparentavam estar maiores em termos de comprimento, largura e volume.



**Figura 18:** Imagens fotográficas representativas de corações de acordo com o grupo.

Após a análise qualitativa dos corações, o peso total do coração (**Figura 19A**) e o peso do ventrículo esquerdo (**Figura 19B**) confirmaram que os corações de animais que consumiram a dieta HC estavam diferentes dos corações controle. Assim, foi observado que todos os grupos HC estavam com o peso do coração aumentado (em mg/mm: C =  $7,60 \pm 0,09$  x 2HC =  $8,48 \pm 0,09^{***}$  x 4HC =  $9,24 \pm 0,09^{***}$  x 8HC =  $9,64 \pm 0,14^{***}$ ;  $^{***}P < 0,001$  x controle), caracterizando uma hipertrofia cardíaca em todos os tempos de consumo de dieta HC. Além disso, apesar de não observada diferença de peso no ventrículo direito (**Figura 19C**) ( $P > 0,05$ ), constatou-se que houve aumento do peso do ventrículo esquerdo (em mg/mm: C =  $5,42 \pm 0,13$  x 2HC =  $5,83 \pm 0,07^*$  x 4HC =  $5,83 \pm 0,09^*$  x 8HC =  $5,94 \pm 0,11^{**}$ ;  $^*P < 0,05$  x controle;  $^{**}P < 0,01$  x controle) e, portanto, hipertrofia do ventrículo esquerdo em todos os grupos HC.



**Figura 19: Avaliação de hipertrofia cardíaca e ventricular.** Peso cardíaco total (A), peso do ventrículo esquerdo (B) e peso do ventrículo direito (C). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle; \*\*\* $P < 0,001$  x controle.

Uma vez que a hipertrofia ventricular esquerda foi constatada nos animais HC, a morfometria de cortes transversais das porções médias de corações corados em Hematoxilina/Eosina (HE) (**Figura 20**) foi realizada. O intuito dessa avaliação era verificar a existência, ou não, de remodelamento cardíaco nos animais tratados com dieta HC. Apesar da inexistência de diferença na espessura média da parede do ventrículo direito (**Figura 21A**) ( $P > 0,05$ ), foi observado um aumento da espessura média da parede do ventrículo esquerdo (**Figura 21B**) em todos os grupos HC (em mm: C =  $1,04 \pm 0,04$  x 2HC =  $1,20 \pm 0,04^*$  x 4HC =  $1,27 \pm 0,05^{**}$  x 8HC =  $1,31 \pm 0,04^{***}$ ; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle; \*\*\* $P < 0,001$  x controle), bem como da espessura média da parede do septo (**Figura 21C**) nos grupos 4HC e 8HC (em mm: C =  $0,87 \pm 0,04$  x 2HC =  $0,99 \pm 0,05$  x 4HC =  $1,14 \pm 0,07^*$  x 8HC =  $1,10 \pm 0,07^*$ ; \* $P < 0,05$  x controle). Além disso, foi observado que não houve diferença na área da

câmara ventricular direita (**Figura 21D**) ( $P > 0,05$ ) e que a área da câmara ventricular esquerda (**Figura 21E**), do grupo que consumiu oito semanas de dieta HC, diminuiu (em  $\text{mm}^2$ :  $C = 1,77 \pm 0,22$  x  $2\text{HC} = 1,24 \pm 0,10$  x  $4\text{HC} = 1,32 \pm 0,24$  x  $8\text{HC} = 1,08 \pm 0,04^*$ ;  $*P < 0,05$  x controle). Por fim, após constatar que houve aumento da espessura relativa da parede ventricular esquerda (**Figura 21F**) nos grupos 4HC e 8HC ( $C = 1,27 \pm 0,12$  x  $2\text{HC} = 1,79 \pm 0,15$  x  $4\text{HC} = 1,99 \pm 0,29^*$  x  $8\text{HC} = 2,14 \pm 0,07^{**}$ ;  $*P < 0,05$  x controle;  $**P < 0,01$  x controle), pode-se concluir que houve remodelamento ventricular hipertrófico concêntrico a partir de quatro semanas de dieta HC e este se manteve até a oitava semana de dieta.

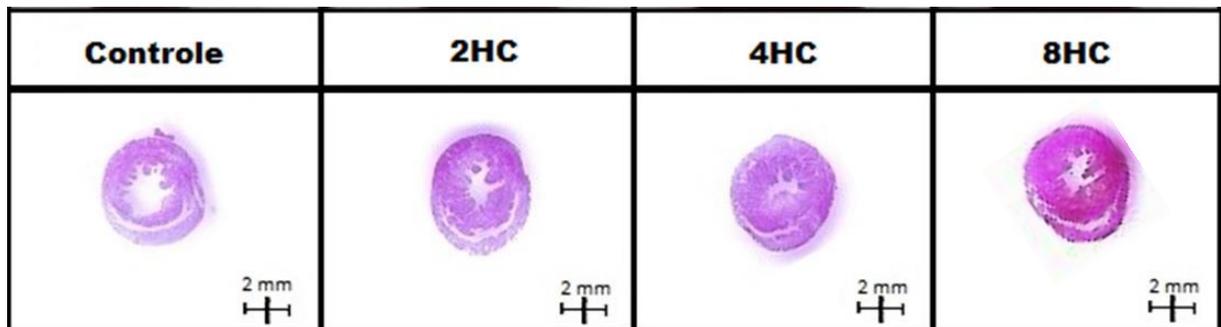
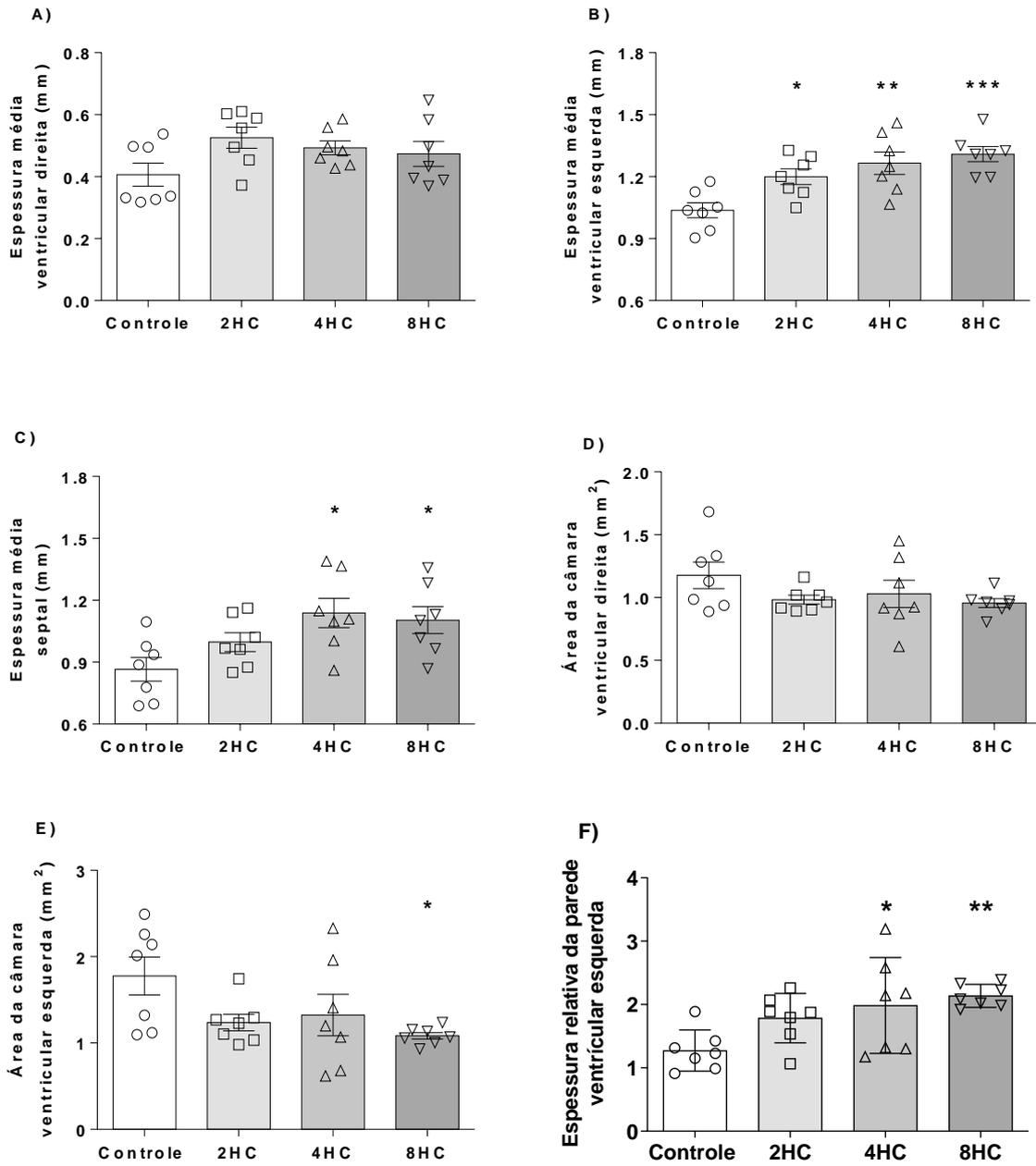


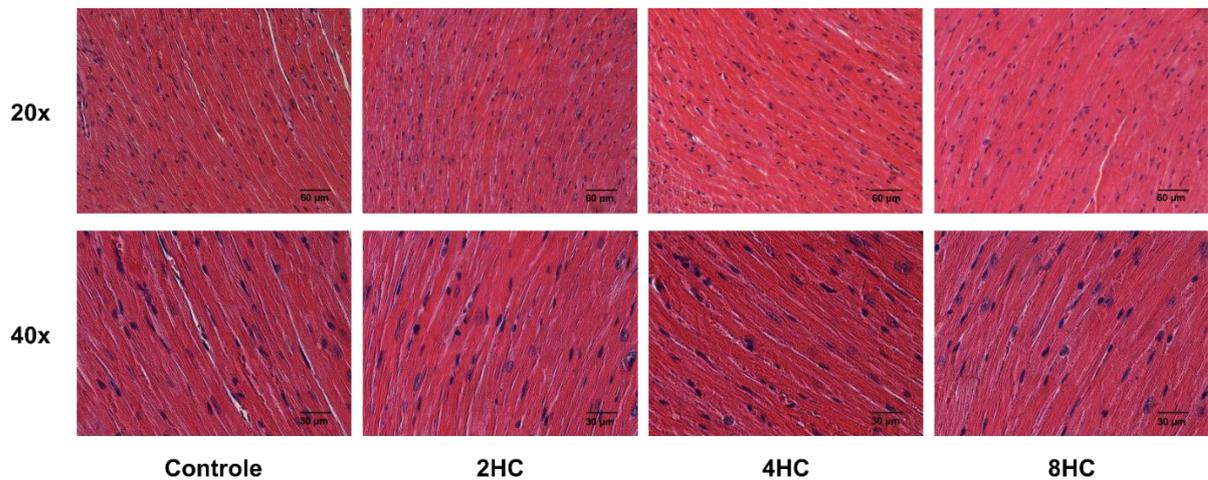
Figura 20: Imagens representativas de cortes transversais de corações corados em HE.



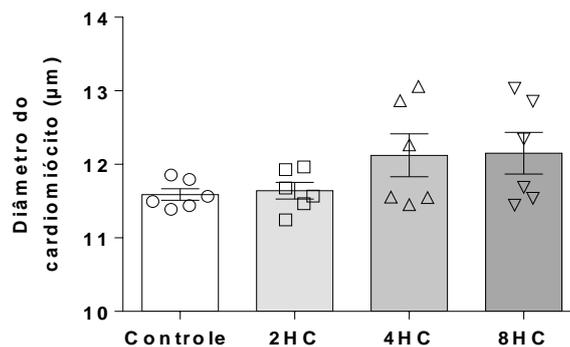
**Figura 21: Avaliação da morfometria cardíaca.** Análise realizada através de lâminas de corações cortados transversalmente e corados em HE. Espessura média ventricular direita (A), esquerda (B), septal (C), área da câmara ventricular direita (D), esquerda (E) e espessura relativa da parede ventricular esquerda (F). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle; \*\*\* $P < 0,001$  x controle.

#### 4.6 O consumo excessivo de carboidratos refinados não alterou o diâmetro dos cardiomiócitos

Apesar do remodelamento cardíaco constatado, após análise microscópica de cortes transversais corados em HE (**Figura 22**), não foram observadas alterações significativas no diâmetro dos cardiomiócitos (**Figura 23**) ( $P>0,05$ ).



**Figura 22:** Imagens representativas de cardiomiócitos provenientes de cortes transversais de corações corados em HE.

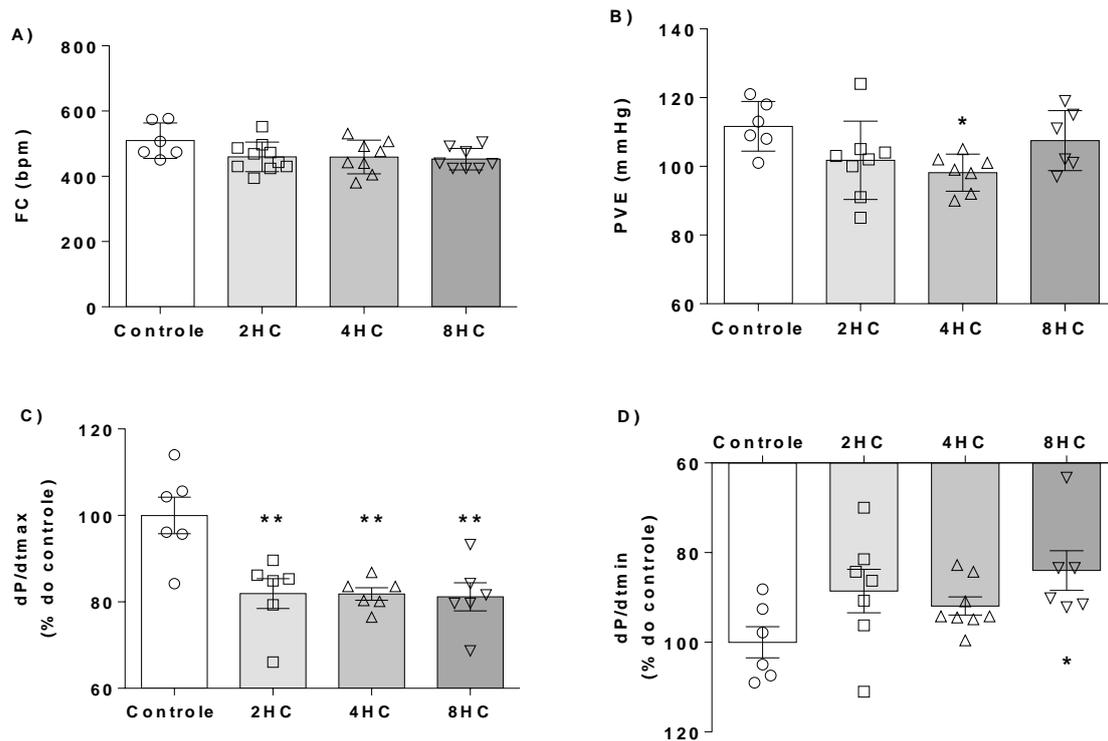


**Figura 23:** Avaliação do diâmetro de cardiomiócitos. Análise realizada através de cortes transversais de corações corados em HE com subsequente medida do diâmetro de cardiomiócitos dispostos longitudinalmente. Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m.

#### 4.7 A dieta HC causou disfunção cardíaca *in vivo* e *ex vivo* em todos os tempos de consumo

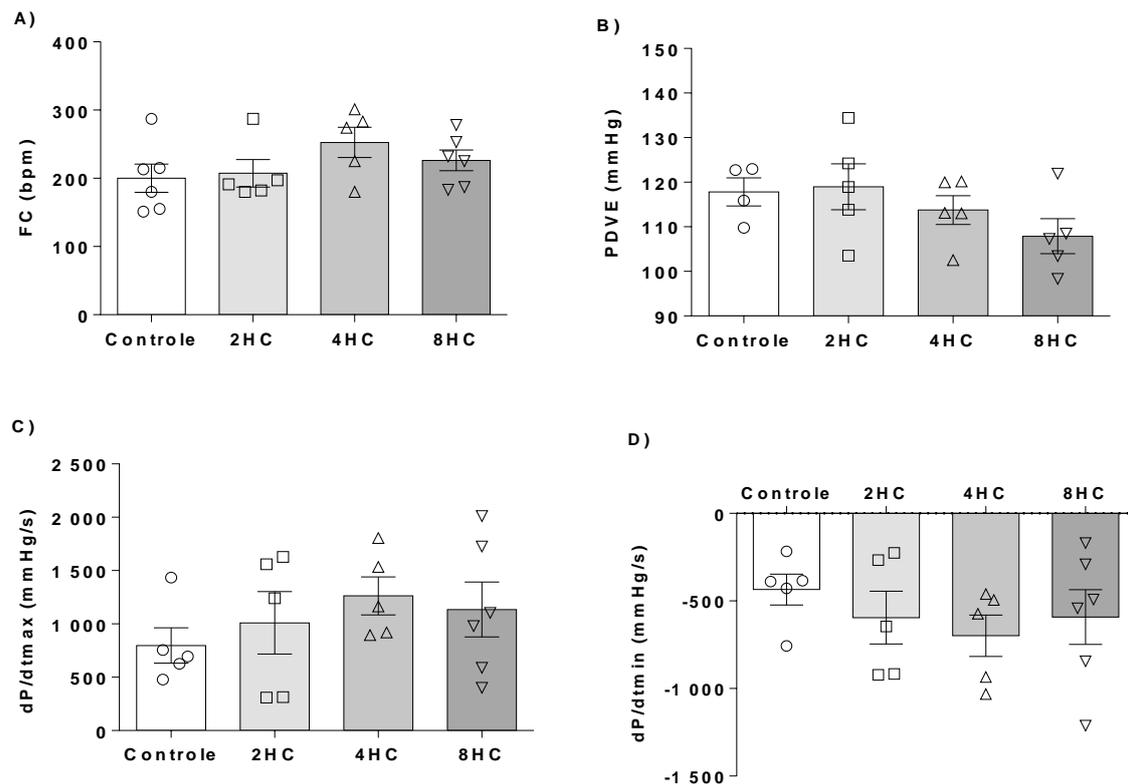
Uma vez que foram observadas mudanças morfológicas, a função cardíaca foi avaliada com o objetivo de se averiguar a capacidade da dieta HC de desencadear alterações funcionais. Para isso, foram realizados testes *in vivo*, por cateterismo do ventrículo esquerdo, e *ex vivo*, pela técnica de Langendorff.

Foi observado que não houve diferença de FC (**Figura 24A**) em nenhum tempo de dieta HC ( $P > 0,05$ ) e que o grupo que consumiu quatro semanas de dieta HC apresentou menor PVE (**Figura 24B**) em relação ao grupo controle (em mmHg: C =  $111 \pm 3$  x 2HC =  $102 \pm 4$  x 4HC =  $98 \pm 2$  x 8HC =  $108 \pm 4^*$ ; \* $P < 0,05$  x controle). Além disso, observou-se que todos os grupos obtiveram menores valores de  $dP/dt_{max}$  (**Figura 24C**) (em % do controle: C =  $100 \pm 4$  x 2HC =  $82 \pm 3^{**}$  x 4HC =  $82 \pm 2^{**}$  x 8HC =  $81 \pm 3^{**}$ ; \*\* $P < 0,01$  x controle) e que o grupo 8HC estava com a  $dP/dt_{min}$  (**Figura 24D**) reduzida em relação ao controle (em % do controle: C =  $100 \pm 3$  x 2HC =  $89 \pm 5$  x 4HC =  $92 \pm 2$  x 8HC =  $84 \pm 4^*$ ; \* $P < 0,05$  x controle). Estes resultados indicam que a dieta HC, reduziu a função cardíaca sistólica de todos os grupos HC e que a função diastólica dos animais com dieta rica em carboidratos por oito semanas também se encontrava reduzida.



**Figura 24: Avaliação da função cardíaca *in vivo*.** Frequência cardíaca (FC) (A), pressão ventricular esquerda (PVE) (B), razão entre a derivada da pressão pela derivada do tempo máxima ( $dP/dt_{max}$ ) (C), e mínima ( $dP/dt_{min}$ ) (D). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle.

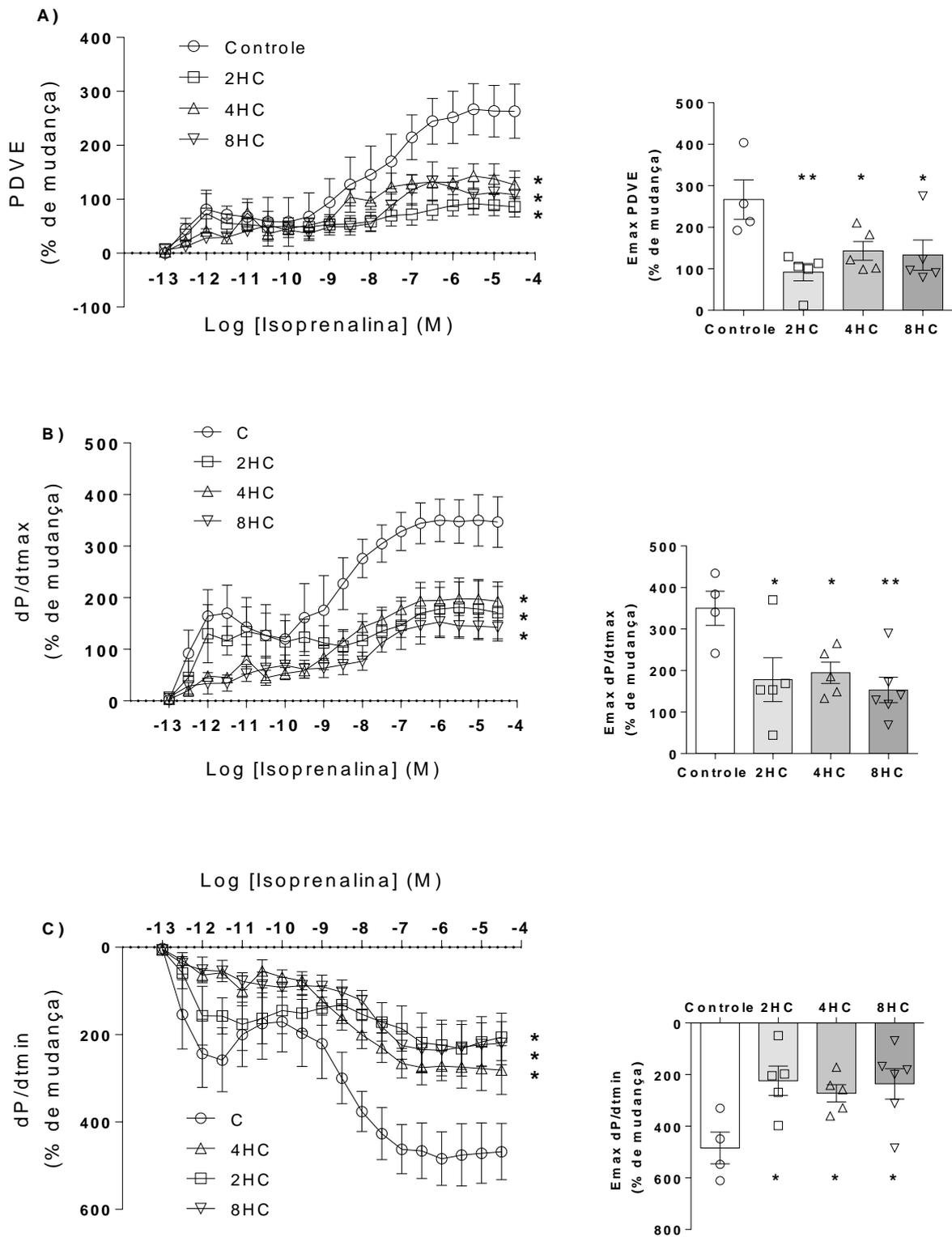
Assim, objetivando trazer o estudo de um modelo mais complexo para um sistema com menos variáveis, os corações foram isolados em aparato de perfusão para avaliação da contratilidade ventricular esquerda no estado basal e sob estresse farmacológico com isoprenalina. No estado basal, não foram encontradas diferenças entre os grupos HC e controle em nenhum parâmetro analisado ( $P > 0,05$ ) (Figura 25).



**Figura 25: Avaliação da função cardíaca ex vivo no estado basal.** Frequência cardíaca (FC) (A), pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) (B), razão entre a derivada da pressão pela derivada do tempo máxima (dP/dt<sub>max</sub>) (C), e mínima (dP/dt<sub>min</sub>) (D). Dados são representados por média ± e.p.m.

Entretanto, ao ser realizado o estímulo farmacológico com concentrações crescentes de isoprenalina ( $10^{-13}$  M até  $3 \times 10^{-5}$  M), observou-se uma diferença substancial da resposta inotrópica e lusitrópica desencadeada pela isoprenalina nos corações dos grupos HC em relação ao grupo que consumiu dieta padrão. Foi observado, por exemplo, que a isoprenalina desencadeou menor aumento da PDVE (**Figura 26A**) a partir da concentração de  $10^{-7}$  M em todos os grupos HC, em relação ao grupo controle, e se manteve até o  $E_{max}$  (em % de mudança: C =  $267 \pm 47$  x 2HC =  $92 \pm 21^{**}$  x 4HC =  $143 \pm 23^*$  x 8HC =  $133 \pm 36^*$ ; \*P<0,05 x controle; \*\*P<0,01 x controle). Descoberta similar foi constatada quando a dP/dt<sub>max</sub> (**Figura 26B**) foi analisada e observou-se redução do efeito da isoprenalina sobre o aumento dP/dt<sub>max</sub>. Este evento foi comprovado pela redução do  $E_{max}$  da dP/dt<sub>max</sub> em todos os grupos HC (em % de mudança: C =  $350 \pm 41$  x 2HC =  $178 \pm 52^*$  x 4HC =  $195 \pm 26^*$  x 8HC = 153

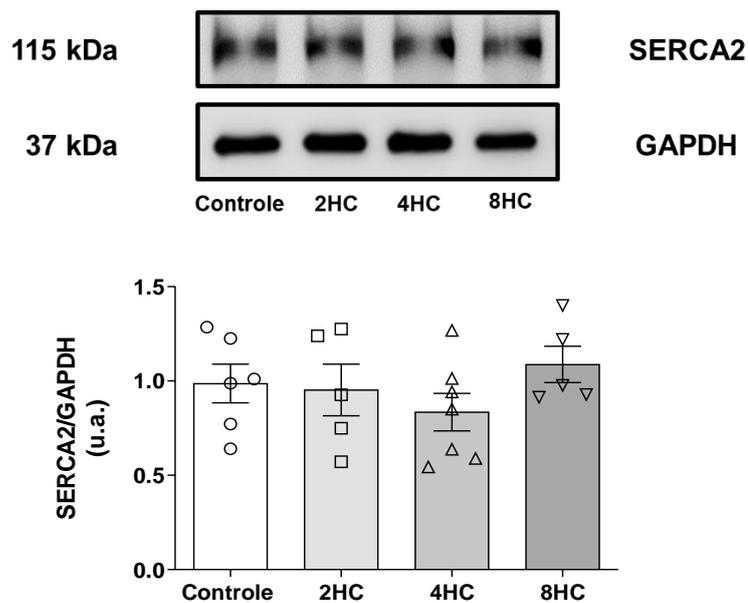
$\pm 31^{**}$ ;  $*P < 0,05$  x controle;  $**P < 0,01$  x controle). Assim, infere-se que a isoprenalina desencadeou menor efeito inotrópico positivo sobre os grupos HC em relação ao grupo controle. Por fim, também foi verificado uma redução do  $E_{max}$  da isoprenalina sobre a  $dP/dt_{min}$  (**Figura 26C**) de todos os grupos HC (em % de mudança: C =  $350 \pm 41$  x 2HC =  $178 \pm 52^*$  x 4HC =  $195 \pm 26^*$  x 8HC =  $153 \pm 31^{**}$ ;  $*P < 0,05$  x controle;  $**P < 0,01$  x controle). Assim a isoprenalina também possuiu menor efeito lusitrópico positivo nos grupos HC.



**Figura 26: Avaliação da função cardíaca *ex vivo* sob estresse farmacológico por isoprenalina em diferentes concentrações.** Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) (A), razão entre a derivada da pressão pela derivada do tempo máxima (dP/dt<sub>max</sub>) (B), e mínima (dP/dt<sub>min</sub>) (C). Dados são representados por média ± e.p.m; \*P<0,05 x controle; \*\*P<0,01 x controle.

#### 4.8 A dieta HC não alterou as concentrações miocárdicas de SERCA2

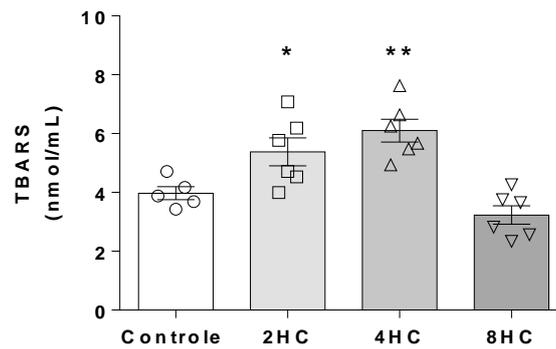
Uma vez confirmada alteração na velocidade de contração cardíaca, foi levantada a hipótese de que a enzima SERCA2, responsável pelo retorno do  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático para o retículo sarcoplasmático, estaria alterada. Entretanto, não foram observadas diferenças de expressão miocárdica de SERCA2 (**Figura 27**) entre o grupo controle e os grupos dieta HC ( $P > 0,05$ ).



**Figura 27: Avaliação da concentração miocárdica de SERCA2.** Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m.

#### 4.9 A dieta HC aumentou a peroxidação lipídica com até quatro semana de consumo

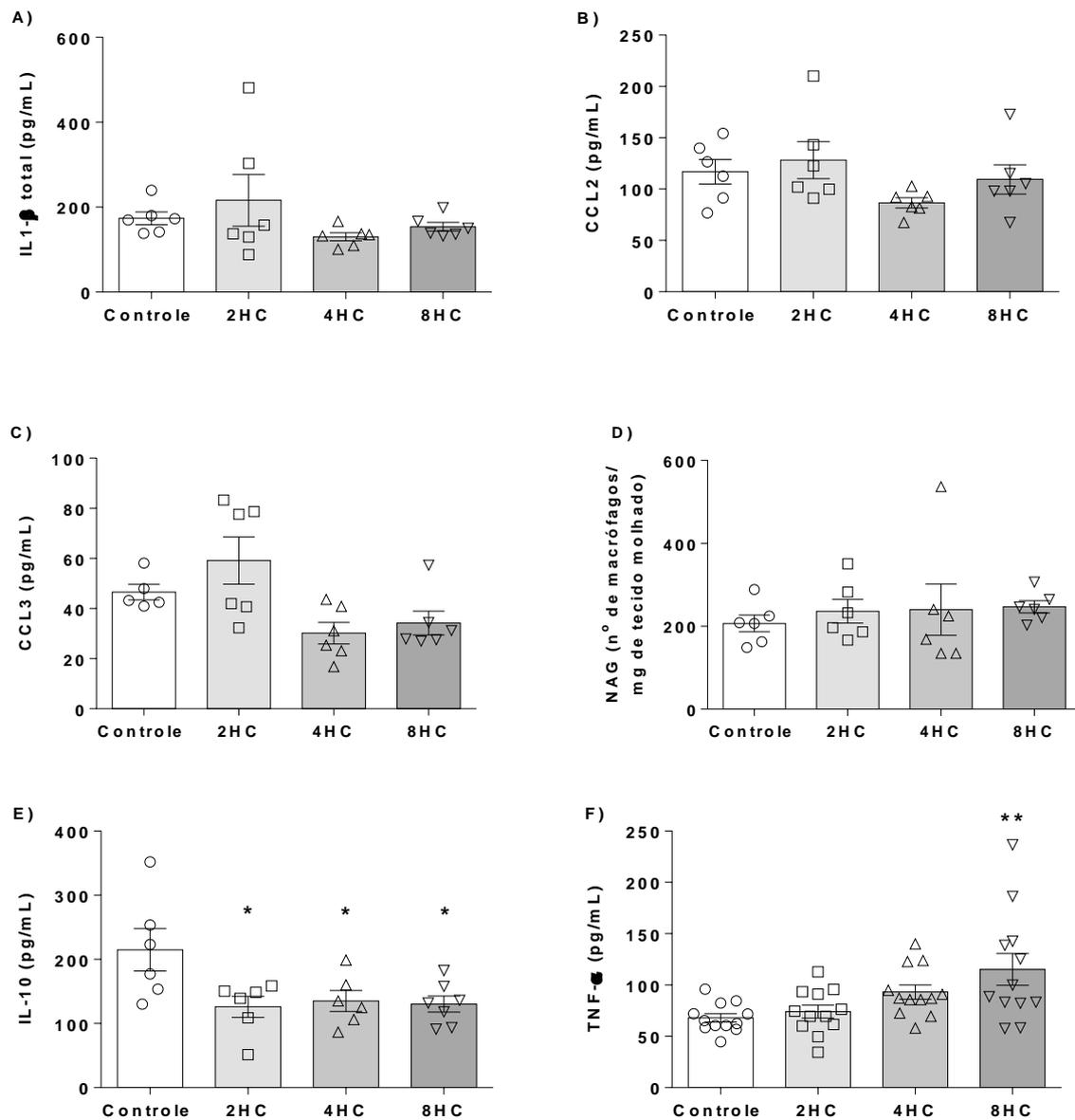
Foi observado que os animais que consumiram a dieta HC por até quatro semanas apresentaram aumento significativo da peroxidação lipídica (em nmol/mL: C =  $3,9 \pm 0,2$  x 2HC =  $5,4 \pm 0,5^*$  x 4HC =  $6,1 \pm 0,4^{**}$  x 8HC =  $3,2 \pm 0,3$ ; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle) (**Figura 28**). Indiretamente, é possível inferir que até quatro semanas de consumo de dieta desencadeia um aumento de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez, interagem com a membrana plasmática de células e organelas, aumentando a peroxidação lipídica.



**Figura 28: Avaliação da peroxidação lipídica pela técnica de TBARS.** Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle.

#### 4.10 A dieta HC não alterou os níveis cardíacos de CCL2, CCL3, NAG e pró-IL-1 $\beta$ em nenhum tempo de consumo, mas causou desequilíbrio miocárdico da citocina anti-inflamatória IL-10 e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ com oito semanas de consumo

Constatada alteração morfofuncional e pró-oxidativa, testou-se a hipótese de que a concentração local de mediadores pró e anti-inflamatórios cardíacos estaria modificada. Assim, foi observado que não houve alteração da concentração local cardíaca dos mediadores pró-inflamatórios: IL1- $\beta$  (**Figura 29A**), CCL2 (**Figura 29B**), CCL3 (**Figura 29C**) e NAG (**Figura 29D**) ( $P > 0,05$ ). Entretanto, foi descoberto que houve redução da concentração de IL-10 (**Figura 29E**) cardíaca em todos os tempos de consumo (em pg/mL: C =  $214 \pm 33$  x 2HC =  $126 \pm 17^*$  x 4HC =  $135 \pm 16^*$  x 8HC =  $130 \pm 13^*$ ; \* $P < 0,05$  x controle). Além disso, foi verificado um aumento da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  (**Figura 29F**) com oito semanas de dieta (em pg/mL: C =  $68 \pm 4$  x 2HC =  $74 \pm 6$  x 4HC =  $93 \pm 7$  x 8HC =  $115 \pm 15^{**}$ ; \*\* $P < 0,01$  x controle).

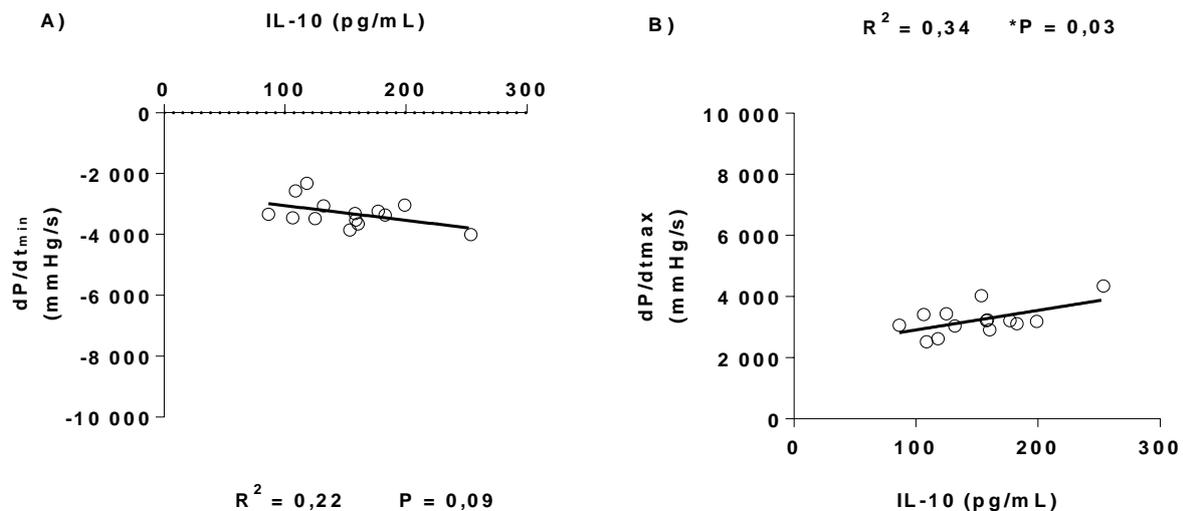


**Figura 29: Avaliação da concentração cardíaca de marcadores inflamatórios e anti-inflamatório.** Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \* $P < 0,05$  x controle; \*\* $P < 0,01$  x controle.

#### 4.11 A concentração miocárdica de IL-10 possui correlação positiva com a função sistólica *in vivo*

Uma vez que a importância da citocina IL-10 para a função cardíaca já é amplamente conhecida (Sikka *et al.*, 2013) e que foi observada alta semelhança entre os gráficos da concentração cardíaca de IL-10 e dos testes de função cardíaca por

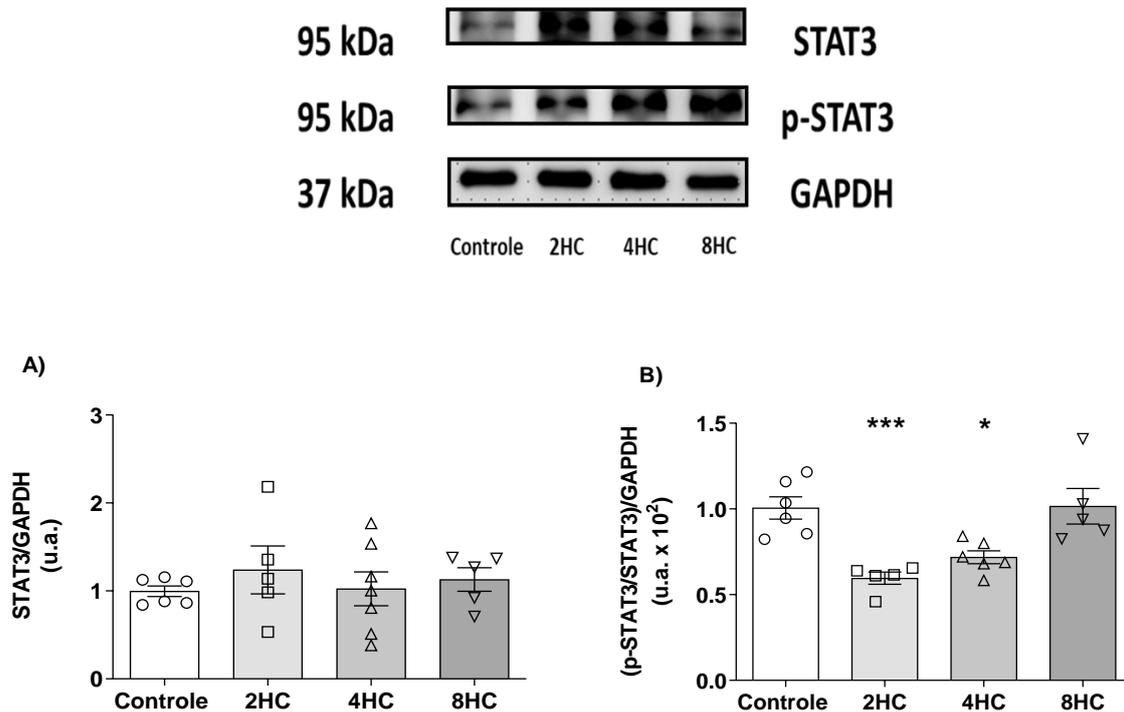
cateterismo do ventrículo esquerdo, procurou-se melhor compreender o comportamento de uma variável em relação a outra neste modelo. Tais variáveis foram, portanto, submetidos ao teste de correlação de Pearson. Apesar de não observada correlação entre a concentração de IL-10 no miocárdio e a  $dP/dt_{\min}$  (**Figura 30A**) ( $R^2= 0,22$ ;  $P=0,09$ ), foi constatada uma correlação positiva entre a concentração de IL-10 no miocárdio e a  $dP/dt_{\max}$  (**Figura 30B**) ( $R^2= 0,34$ ;  $P^*=0,03$ ).



**Figura 30: Avaliação da correlação de Pearson entre a concentração miocárdica de IL-10 e a função cardíaca *in vivo*.**

#### 4.12 A dieta HC diminuiu a ativação de STAT3 cardíaca com até quatro semanas de consumo

Dada a já demonstrada redução de IL-10 e de função cardíaca, a concentração cardíaca de STAT3, uma molécula sinalizadora a jusante à interação da IL-10 ao seu receptor, foi analisada. Não foram observadas diferenças nas concentrações de STAT3 total (**Figura 31A**) ( $P>0,05$ ), entretanto, foi verificado uma redução da fosforilação da STAT3 no domínio Tir705 nos grupos que consumiram a dieta por até 4 semanas de consumo (**Figura 31B**) (em u.a.: C =  $1,00 \pm 0,07$  x 2HC =  $0,60 \pm 0,04^{***}$  x 4HC =  $0,72 \pm 0,04^*$  x 8HC =  $1,01 \pm 0,10$ ; \* $P<0,05$  x controle; \*\*\* $P<0,001$  x controle). Este achado sugere que a redução da concentração miocárdica de IL-10 desencadeou uma redução na ativação do mediador anti-inflamatório STAT3 em períodos curtos de dieta.



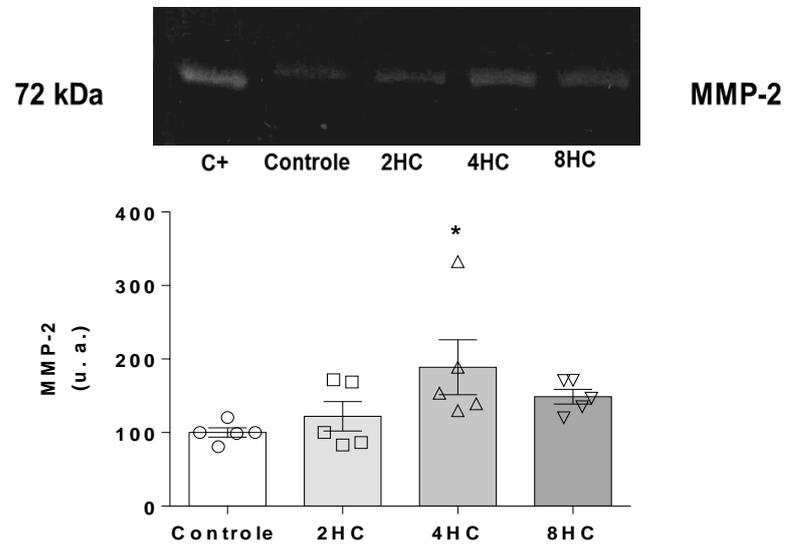
**Figura 31: Avaliação da ativação de STAT3 cardíaca através da fosforilação de Tir705.** STAT3 total (A) e STAT3 ativada através da fosforilação de Tir705 (B). Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m.; \* $P < 0,05$  x controle; \*\*\* $P < 0,001$  x controle.

#### 4.13 O consumo de carboidratos refinados aumentou a concentração miocárdica da metaloproteinase da matriz extracelular do tipo 2 com quatro semanas de consumo

Níveis relativos de MMP-2 e MMP-9, enzimas importantes para o remodelamento cardíaco e reguladas pela fosforilação de STAT3, também foram analisados. Não foi observado o aparecimento de bandas na altura de 92 kDa, o que indica que as concentrações de MMP-9 existentes nos lisados de ventrículo esquerdo foram indetectáveis, tanto no grupo controle, quanto nos grupos que consumiram a dieta HC. Por outro lado, foi observado o aparecimento de bandas na altura de 72 kDa, o que indica que houve concentrações detectáveis de MMP-2 nos géis analisados (Figura 32).

Após a análise, foi constatado que houve aumento significativa da concentração relativa de MMP-2 nos animais que consumiram a dieta HC por quatro

semanas em relação ao grupo controle (em u.a.: C =  $100 \pm 6$  x 2HC =  $122 \pm 20$  x 4HC =  $189 \pm 37^*$  x 8HC =  $149 \pm 10$ ; \*P<0,05 x controle).



**Figura 32: Avaliação da atividade da metaloproteinase de matriz do tipo 2 (MMP-2).** Dados são representados por média  $\pm$  e.p.m; \*P<0,05 x controle.

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho mostra pela primeira vez, em nosso conhecimento, o efeito de diferentes tempos de consumo de uma dieta HC, rica em sacarose (30%), sobre o coração de camundongos Balb/c. Mais especificamente, este trabalho demonstra a relação entre o consumo exacerbado de carboidratos refinados, alterações morfofuncionais cardíacas e mediadores inflamatórios, sugerindo o envolvimento destes mediadores nas alterações encontradas.

Ao final de todo o procedimento, foi observado que os animais obtiveram valores próximos de ingestão cumulativa de ração e que, ao longo e ao término do experimento, estavam com o peso corporal médio estatisticamente igual. Visto que as dietas comparadas são isocalóricas (Oliveira *et al.*, 2013), podemos entender que os resultados sobre os parâmetros cardíacos devem-se à composição da dieta HC, mas não ao consumo calórico. Como já demonstrado pela literatura, dietas ricas em grãos e açúcares refinados estão intimamente ligadas ao aumento de fatores de risco para doenças cardiovasculares, como o aumento de adiposidade visceral, aumento dos níveis plasmáticos de TG e LDL, e diminuição de HDL (Feng *et al.*, 2015). Além disso, o consumo excessivo de carboidratos leva a quadros de inflamação crônica, representados pelo aumento de proteína C reativa, aumentando ainda mais a ameaça ao sistema cardiovascular (Alves *et al.*, 2016). Desta forma, o excesso de carboidratos fez-se determinante para as alterações cardíacas e inflamatórias observadas. Este padrão alimentar é observado em países como Brasil, EUA, Suécia e Canadá (Moubarac *et al.*, 2014; Juul e Hemmingsson, 2015; Louzada *et al.*, 2015; Martinez Steele *et al.*, 2016) e influencia negativamente a saúde cardiovascular de seus cidadãos (Li *et al.*, 2015).

O consumo de produtos processados, como os açúcares refinados, afeta diretamente o perfil lipídico de quem os consomem (Rauber *et al.*, 2015), tendo como uma de suas principais propriedades o caráter obesogênico (Simon *et al.*, 2014). Ao mostrar associação significativa entre o consumo de açúcares refinados e aumento do índice de adiposidade sem afetar o peso corporal, este estudo corrobora com a ideia de que dietas ricas em carboidratos refinados levam a rápida proliferação de tecido adiposo (Oliveira *et al.*, 2013). Além disso, traz à tona a relevância clínica da associação entre hábitos alimentares, obesidade com peso normal (aumento do

percentual lipídico sem alteração do peso corporal) e o aparecimento de doenças cardiometabólicas (Romero-Corral *et al.*, 2010). Um estudo longitudinal, por exemplo, acompanhou meninas desde a pré-adolescência até o início da fase adulta e demonstrou que, mesmo com pesos indistinguíveis, as pacientes que possuíam elevada porcentagem de adiposidade na pré-adolescência obtiveram maior risco para doenças cardiometabólicas ao final dos sete anos de acompanhamento (Wiklund *et al.*, 2017). Isto significa que o aumento do índice de adiposidade observado neste experimento predispõe os animais a doenças cardiometabólicas e, conseqüentemente, piora da função cardíaca.

Em relação à caracterização metabólica, observa-se que em todos os tempos testados de dieta HC havia resistência à insulina, que os animais se tornaram intolerantes à glicose a partir de quatro semanas de dieta HC e que nenhum grupo apresentou glicemia de jejum alterada (**Figura 14**). Em concordância com a glicemia de jejum, o hematócrito indicou que não houve alteração de osmolaridade no plasma, fato classicamente associado a mudanças metabólicas semelhantes ao diabetes (Singer *et al.*, 1962). Ademais, cronologicamente, a resistência à insulina precedeu a intolerância à glicose desencadeada pelo consumo excessivo de carboidratos refinados. Assim, este trabalho confirma a íntima relação entre o consumo de carboidratos refinados e resistência à insulina (Barazzoni *et al.*, 2017). Além disso, ao demonstrar redução da função cardíaca em todos os tempos de consumo de dieta HC e em paralelo à resistência à insulina, corrobora-se com a ideia de uma associação entre resistência à insulina e disfunção cardiovascular, independente de alteração na glicemia de jejum (Aroor *et al.*, 2012; Reaven, 2012).

Já foi demonstrado que a resistência à insulina e intolerância à glicose induzida por dieta HC se manifestam no coração pela diminuição do transportador de glicose cardíaco, GLUT4, comprometendo a força de contração cardíaca (Porto *et al.*, 2011). Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre os mecanismos envolvidos nestes processos. É possível que a redução da função cardíaca observada neste trabalho não seja consequência única da menor utilização de glicose e que outros fatores, como processos inflamatórios, estejam envolvidos. A redução do peso do pâncreas encontrada, por exemplo, sugere que houve lesão pancreática, sendo este um indicativo de ativação de inflamassoma durante à resistência à insulina (Zhou *et al.*,

2010) e obesidade (Finucane *et al.*, 2015). Isto indica que o excesso de carboidratos refinados levou a mudanças inflamatórias em órgão-alvo.

Neste estudo, corações de animais que consumiram a dieta HC apresentavam-se maiores e mais pesados, indicando hipertrofia do órgão. Mais especificamente, foi observada uma hipertrofia ventricular esquerda. Estes achados, surpreendentemente, foram exclusivos para o coração e tecido adiposo, não sendo observado o mesmo em outros órgãos analisados. Isto indica que a dieta afeta o coração de forma seletiva e localizada. Vale ressaltar que o estudo de Framingham, em 1987, apontou que a hipertrofia ventricular esquerda é um preditor independente de IC (Kannel *et al.*, 1987). Posteriormente, mostrou-se que a hipertrofia ventricular esquerda é intimamente conectada à disfunção cardíaca devido a modificações pró-inflamatórias intracelulares, que conduzem o tecido cardíaco a necrose e fibrose (Carreno *et al.*, 2006). Sugere-se, deste modo, que a hipertrofia ventricular esquerda dos corações de animais que consumiram a dieta HC seja fruto de alterações intracelulares com desequilíbrio inflamatório local. Além disso, Oliveira *et al.* (2013) mostraram que a dieta HC tem alto poder de desencadear resposta inflamatória em tecido adiposo. Este fato corrobora ainda mais com a ideia de que a função cardíaca é agravada devido a uma inflamação local desencadeada pela dieta HC.

Um fator fortemente associado a mudanças metabólicas e a hipertrofia ventricular esquerda é a hipertensão arterial (Nadruz, 2015). Sabe-se que o aumento de pós-carga é um fator de risco para o remodelamento cardíaco e para a perda de função diastólica (Li, T. *et al.*, 2016). Este estudo demonstrou que não houve mudança significativa da pressão arterial dos grupos com dieta HC em relação ao grupo controle. Logo, a hipertrofia ventricular esquerda e demais consequências cardíacas observadas neste trabalho, ao contrário de alguns trabalhos com a dieta HF (Schuler *et al.*, 2017), não foram fruto de elevação da pressão arterial, mas sim de fatores associados ao consumo excessivo de carboidratos refinados.

O remodelamento ventricular hipertrófico concêntrico, a partir de quatro semanas de dieta HC e independente de alteração na pressão arterial, evidencia os efeitos negativos do excesso de carboidratos refinados sobre o coração. O aumento da espessura relativa da parede ventricular esquerda está intimamente conectado com IC diastólica (Fox *et al.*, 2007). À medida que a parede ventricular cresce, sem

ser acompanhada pela área da câmara ventricular, há menos espaço para que o ventrículo se preencha corretamente e, conseqüentemente, ejete a quantidade necessária de fluido em um intervalo de tempo. Em concordância com as alterações morfológicas, a menor  $dP/dt_{\min}$  no grupo que consumiu a dieta rica em carboidratos refinados por oito semanas indica redução da função diastólica. Além disso, em casos de remodelamento concêntrico, é possível que pacientes também apresentem função sistólica reduzida (Rosen *et al.*, 2005). Neste trabalho, a redução da  $dP/dt_{\max}$  *in vivo* indica que a dieta HC leva a um prejuízo na intensidade de força sobre área que o músculo cardíaco consegue realizar em um intervalo de tempo. Esta alteração pode comprometer a perfusão do organismo e, conseqüentemente, a distribuição de nutrientes sistemicamente.

No teste de função cardíaca *ex vivo*, por utilizar uma técnica de perfusão retrógrada e com detecção da pressão ventricular de forma isovolumétrica (Langendorff e Nawroeki, 1897), infere-se a capacidade intrínseca do coração de contrair, com menores influências do preenchimento da câmara. Em concordância com Aasum *et al.* (2008) e diferentemente do observado no teste de função cardíaca *in vivo*, não foram encontradas diferenças entre os grupos HC e o controle no estado basal. Conclui-se que, em estado basal, os corações de camundongos que consumiram a dieta HC não possuem déficit de contratilidade. Isto pode indicar que, *in vivo*, as alterações funcionais se correlacionam mais com a geometria do ventrículo do que com a capacidade contrátil do miocárdio.

Entretanto, mais do que um componente pode estar envolvido na diminuição da função sistólica e diastólica no estado basal *in vivo*. A principal diferença entre a análise do coração *in vivo* para análise do órgão isolado é a retirada do controle autonômico, da resistência vascular periférica, do retorno venoso (pré-carga) e do preenchimento da câmara (comprometido pelo remodelamento observado). Um ou mais destes fatores podem ter contribuído para a diferença observada entre os dois modelos no estado basal. Já foi demonstrado por Kaufman *et al.* (1991) que o consumo exacerbado de açúcares aumenta a atividade simpática de ratos. Neste caso, seria esperado que a FC no teste *in vivo* estivesse aumentada, o que não foi observado. Entretanto, uma limitação deste trabalho foi a avaliação da FC sob anestesia, o que pode ter mascarado a atividade autonômica simpática.

Como o conceito de IC também envolve a capacidade de manter o débito cardíaco sob estresse (Yancy *et al.*, 2013), os corações foram estimulados com isoprenalina. Observou-se que todos os tempos de consumo de dieta HC levam a um comprometimento da resposta ao estresse, o que é evidenciado pelo menor crescimento de PDVE,  $dP/dt_{max}$  e  $dP/dt_{min}$  ao longo das doses crescentes. Os mecanismos da menor contratilidade à isoprenalina são múltiplos. Por exemplo, como a isoprenalina é um agonista  $\beta$  não-seletivo, pode haver um prejuízo da ativação de receptores  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  e  $\beta_3$  e/ou de sua via intracelular. É possível, por exemplo, que a densidade de receptores  $\beta$  esteja diminuída, como já foi demonstrado para sepse (Dal-Secco *et al.*, 2017), que a maquinaria de recrutamento e liberação de cálcio esteja comprometida (Winslow *et al.*, 2016), ou, simplesmente, que as fibras contráteis estejam danificadas (Biesiadecki, 2016).

Neste trabalho, foi mostrado que a expressão de SERCA2, uma importante proteína para o armazenamento de cálcio no retículo sarcoplasmático de cardiomiócitos (Lipskaia *et al.*, 2010), não foi alterada. A SERCA2, sua proteína inibitória, o fosfolambano, e o trocador de  $Na^+/Ca^{2+}$  são as principais proteínas relacionadas ao relaxamento cardíaco (Kranias e Hajjar, 2012). Sugere-se, portanto, que novos estudos tentem identificar se proteínas envolvidas na contração cardíaca estão alteradas. Entre elas, proteínas que compõem os miofilamentos, como actina, miosina, troponinas, ou reguladoras das oscilações intracelulares de cálcio, como receptor de rianodina e canal para cálcio do tipo L, constituem alvos de estudos futuros. Vale ressaltar que este é o primeiro trabalho a demonstrar que uma dieta rica em carboidratos refinados é capaz de diminuir a função cardíaca sob estresse farmacológico.

Este trabalho traz indícios de que as alterações cardíacas induzidas pelo consumo de açúcar envolvem um desequilíbrio inflamatório local. Foi mostrado, por exemplo, que há redução na função sistólica *in vivo* em todos os tempos avaliados de consumo de dieta HC e que à medida que a concentração cardíaca de IL-10 diminuía, a função sistólica diminuía proporcionalmente. A IL-10 é uma citocina que possui propriedades anti-aterogênicas e anti-inflamatórias, sendo, assim, cardioprotetora (Han e Boisvert, 2015). Existem diversos trabalhos na literatura mostrando a importância da IL-10 para a homeostase cardíaca (Dhingra *et al.*, 2011; Yilmaz *et al.*,

2014; Samanta e Dawn, 2016). Burchfield *et al.* (2008) mostraram, por exemplo, que o aumento da concentração plasmática de IL-10, por meio de transplante de células produtoras de IL-10, diminui o remodelamento cardíaco e aumenta a  $dP/dt_{max}$  de animais que passaram por cirurgia de infarto agudo do miocárdio (Burchfield *et al.*, 2008). Ademais, o tratamento direto com IL-10 atenuou a hipertrofia cardíaca, aumentou a fração de encurtamento e a fração de ejeção de animais com constrição da aorta, sendo estes fenômenos dependentes da ativação da sinalização IL-10/STAT3 (Verma *et al.*, 2012). Este trabalho demonstra, em concordância com a literatura, que a IL-10 é essencial para o correto funcionamento cardíaco e, além disso, corrobora com a ideia de que esta função é mediada por STAT3, ao demonstrar menor ativação desta proteína em períodos curtos de consumo de dieta HC.

A ativação do receptor de IL-10 por esta citocina leva à ativação da via JAK1/STAT3, culminando na fosforilação do sítio Tir705 de STAT3 (Niemand *et al.*, 2003). A ativação de STAT3, per si, estimula a função cardíaca, por interagir com diversos mediadores intracelulares. Zhang *et al.* (2016) demonstram que animais *knockouts* para STAT3 são deficientes de receptores  $\beta$ , receptor de rianodina, fosfolambano e canais de cálcio do tipo L (Zhang *et al.*, 2016). Considerando que houve redução de IL-10 em todos os períodos analisados e menor fosforilação de STAT3 nos períodos curtos de consumo de dieta, entende-se que a menor sinalização por STAT3, assim como demonstrado por Zhang, explica, em parte, a disfunção cardíaca observada neste trabalho. Uma vez que há redução da sinalização IL-10/STAT3 com o consumo de dieta HC, é provável que as proteínas citadas por Zhang *et al.* (2016) estejam reduzidas também, porém mais experimentos são necessários para se testar essa hipótese.

Além disso, STAT3 ativada também interage com diversos outros mediadores intracelulares que podem afetar a função cardíaca de forma indireta. Já foi demonstrado, por exemplo, que a ausência local de STAT3 cardíaca desencadeia intensa fibrose, apoptose e, conseqüentemente redução da função cardíaca (Hilfiker-Kleiner *et al.*, 2004). Por ser um alvo direto da ativação de STAT3 (Xie *et al.*, 2004), era esperado que os níveis de MMP-2 estivessem alterados. Observou-se aumento de MMP-2 com quatro semanas de dieta, período em que há redução dos níveis de fosforilação de STAT3. A MMP-2 é uma enzima que tem como função clássica a

degradação de proteínas da matriz extracelular para manutenção da homeostase cardíaca. Entretanto, em condições patológicas, a produção aumentada de MMP-2 está associada a fibrose, remodelamento cardíaco e perda de função do órgão (Berk *et al.*, 2007). Nestes casos, tanto a eliminação genética (Matsusaka *et al.*, 2006), quanto a inibição farmacológica da produção da mesma (Cau *et al.*, 2015) mostraram-se eficientes na presença de danos cardíacos associados ao aumento de MMP-2. Além disso, o aumento de MMP-2 está associado à diminuição da função contrátil cardíaca pela degradação direta de proteínas de sarcômeros, como a troponina I (Wang *et al.*, 2002), a cadeia leve de miosina (Sawicki *et al.*, 2005) e a titina (Ali *et al.*, 2010).

Esta potencial degradação de proteínas de sarcômeros poderia, em parte, explicar a razão pela qual não foram observadas diferenças significativas do diâmetro do cardiomiócito nos grupos HC que consumiram a dieta por pelo menos quatro semanas de dieta. O aumento de MMP-2 pode ter danificado os sarcômeros de tal forma que estímulos hipertróficos não foram suficientes para se sobreporem ao dano, inclinando ainda mais o cardiomiócito à disfunção celular. Assim, a redução da função cardíaca pode ser consequência do aumento de MMP-2 e suas ações. É possível que os animais com duas e quatro semanas de consumo da dieta HC apresentem necrose e fibrose, o que reconhecemos ser algo importante de se analisar neste estudo, embora ainda não realizado.

Em termos de balanço oxidativo, observa-se que há aumento de peroxidação lipídica em corações de animais que consumiram a dieta HC por até quatro semanas. A peroxidação lipídica é o processo pelo qual os lipídeos, como os que constituem a membrana celular, são oxidados em uma reação em cadeia. Está intimamente relacionada ao aumento de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, ou de nitrogênio, como o peroxinitrito (Radi, 2018). Além disso, está diretamente associada a morte celular (Gaschler e Stockwell, 2017), sendo, neste trabalho, um indicativo de dano celular por aumento de estresse oxidativo. Tais eventos já demonstraram, impactar negativamente o sistema cardiovascular (Zhang *et al.*, 2014), desencadeando remodelamento (Duarte *et al.*, 2009; Rababa'h *et al.*, 2018) e reduzindo a função cardíaca (Folden *et al.*, 2003; Nichols *et al.*, 2018). Além disso, já foi observado que a deleção de STAT3 sensibiliza células ao estresse oxidativo,

deixando-as mais susceptíveis à morte celular (Barry *et al.*, 2009). Sendo assim, é muito provável que os cardiomiócitos dos animais que consumiram a dieta HC por até quatro semanas estavam mais susceptíveis ao dano oxidativo e à perda de função. Sugere-se, portanto, que o aumento de peroxidação lipídica e, por consequência, de estresse oxidativo, tenham contribuído para o desencadeamento e para manutenção das alterações morfofuncionais cardíacas observadas. Como a fosforilação de STAT3 volta a parâmetros normais com oito semanas de ingestão, é possível que os níveis de antioxidantes tenham voltado também. Isso ocorre pois, à medida que a ativação de STAT3 aumenta, há também o aumento da produção de MnSOD (Negoro *et al.*, 2001). Assim, explica-se, por exemplo, a razão pela qual os níveis de peroxidação lipídica voltaram para próximos do controle.

Indica-se, portanto, que o principal evento ocorrido em períodos curtos de dieta HC é a diminuição da proteção cardíaca por parte da IL-10 e sua sinalização via STAT3. É possível que todos os animais que consumiram a dieta HC tenham tido sua função cardíaca prejudicada pelas ações diretas e indiretas da diminuição da sinalização IL-10/STAT3 em períodos curtos de consumo. Além disso, também é provável que os animais com oito semanas de dieta passaram por tais processo e, por isso, ainda possuem consequências dos mesmos.

Uma característica da ativação de STAT3 pela IL-10 é a inibição de vias pró-inflamatórias (Dhingra *et al.*, 2009). Sugere-se, assim, que a redução da via IL-10/STAT3 nos períodos curtos de consumo de dieta HC aumentou a probabilidade de vias pró-inflamatórias serem ativadas, como observado pelos níveis de TNF- $\alpha$  elevados com oito semanas de dieta. Embora a sinalização via STAT3 tenha efeitos protetores ao coração a longo prazo, a fosforilação do sítio Tir705 de STAT3 também pode acontecer a jusante à ativação do receptor de TNF- $\alpha$  (Miscia *et al.*, 2002). Esta ativação pode ter acontecido neste trabalho, já que o aumento da fosforilação de STAT3 e de TNF- $\alpha$  coincidem na oitava semana de dieta HC. Há explicações para este efeito paradoxal da STAT3, sendo uma delas a possibilidade de uma sinalização pró-inflamatória e danosa ao coração dependente do tempo induzida por TNF- $\alpha$  (Wang *et al.*, 2011). Dentre estes efeitos danosos estão: aumento de iNOS, aumento de vias pró-hipertroóficas e pró-fibróticas (Miscia *et al.*, 2002). Este estudo demonstra hipertrofia e disfunção cardíaca concomitante ao aumento dos efeitos pró-

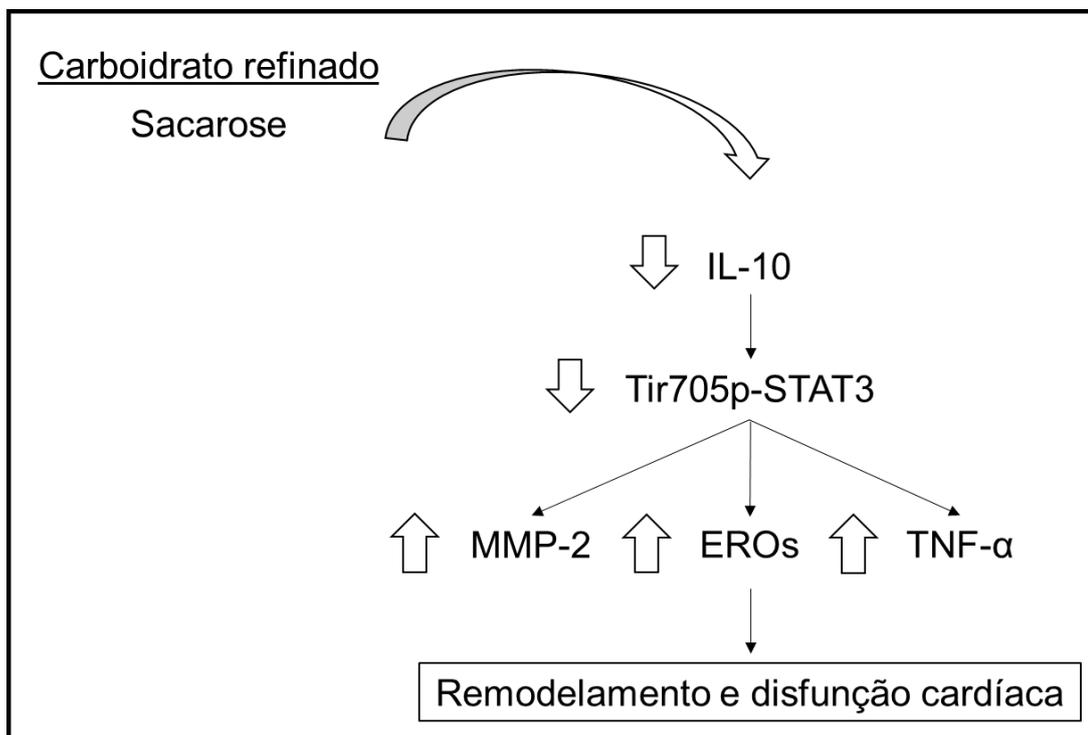
inflamatórios, corroborando com a ideia de que, mais do que alterações metabólicas, o coração possui alterações inflamatórias locais, que causaram danos ao órgão.

Apesar de não observada alteração na IL-1 $\beta$  total, é possível que a IL-1 $\beta$  ativa (17 kDa) esteja mais elevada em tempos maiores de consumo. O fato da concentração total da citocina estar similar ao observado no grupo controle não significa que a proteína não esteja mais ativa. Com o aumento do quadro pró-inflamatório, é comum que inflamassomas (complexos proteicos responsáveis pela clivagem e ativação de citocinas pró-inflamatórias) sejam ativados e, portanto, a clivagem e ativação de IL-1 $\beta$  também (Mangan *et al.*, 2018). Em um trabalho ainda não publicado do nosso grupo, demonstrou-se que a dieta rica em carboidratos refinados aumenta a ativação de inflamassoma no coração, a concentração miocárdica de IL-1 $\beta$  ativa e o dano cardíaco. A IL-1 $\beta$  desempenha importante papel no desenvolvimento de IC, desencadeando aumento da resposta pró-inflamatória intracelular cardíaca (Weber *et al.*, 2010), diminuição da sensibilidade de canais de cálcio do tipo L (Liu *et al.*, 1999), e menor expressão de SERCA2 e fosfolambano (Combes *et al.*, 2002). Assim, a concentração de IL-1 $\beta$  ativa pode ter tido influência sobre a redução da função cardíaca observada neste trabalho.

Há indícios de que o aumento do efeito pró-inflamatório e de estresse oxidativo observado não é proveniente de infiltrado de macrófagos. Neste trabalho, foram analisadas as quimiocinas: CCL2, importante quimioatraente de macrófagos em doenças cardiovasculares (Dewald *et al.*, 2005); e CCL3, uma quimiocina secretada por macrófagos e um biomarcador do mesmo (De Jager *et al.*, 2008). Além disso, a NAG, uma enzima contida em macrófagos e utilizada na pesquisa para quantificação de macrófagos (Coelho *et al.*, 2014), também foi analisada. Em todos os casos, não foram observadas diferenças entre grupos HC e grupo controle. Portanto, nem a elevação de estresse oxidativo nos curtos tempos de dieta, tampouco a produção da citocina pró-inflamatória, TNF- $\alpha$ , foram fruto de infiltrado de macrófagos. Sugere-se, assim, que tais produtos foram provenientes de células presentes no coração, como fibroblastos ou cardiomiócitos.

Assim, a alta ingestão de carboidratos refinados, especialmente sacarose, resulta na diminuição da concentração cardíaca de IL-10, que por sua vez, está associado a prejuízos morfofuncionais cardíacos (**Figura 33**). O mecanismo sugerido

é a menor ativação da via IL-10/STAT3, evidenciada pela redução da fosforilação de STAT3 no sítio Tir705. Esta redução, por sua vez, estaria desencadeando uma redução da resposta anti-inflamatória pela STAT3 nos menores tempos de consumo de dieta HC (duas ou quatro semanas), o que propiciaria o aumento de estresse oxidativo (duas e quatro semanas de dieta HC), metaloproteínas de matriz (quatro semanas de dieta HC) e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  em períodos mais prolongados de dieta HC (oito semanas). O conjunto dos fatos desencadearia, portanto, o remodelamento cardíaco observado e a redução da resposta contrátil.



**Figura 33: Proposta de via de sinalização responsável pelos danos morfofuncionais cardíacos induzidos por dieta rica em sacarose.**

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostra, portanto, que a alta ingestão de carboidratos refinados, especialmente sacarose, resulta em prejuízos morfofuncionais cardíacos, com remodelamento ventricular concêntrico a partir de quatro semanas de consumo e disfunção cardíaca em todos os tempos testados. Além disso, este trabalho também mostra que há um desequilíbrio inflamatório local, que se agrava de acordo com o aumento do tempo de consumo de dieta HC. Este desequilíbrio é constituído pela diminuição dos efeitos anti-inflamatórios e aumento dos efeitos pró-inflamatórios no coração, sendo os efeitos pró-inflamatórios mais pronunciados a partir de quatro semanas de ingestão. O conjunto dos fatos, assim, desencadeia as alterações morfofuncionais observadas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASUM, E. et al. Fenofibrate modulates cardiac and hepatic metabolism and increases ischemic tolerance in diet-induced obese mice. **J Mol Cell Cardiol**, v. 44, n. 1, p. 201-9, Jan 2008.

AKSAKAL, E. et al. The role of oxidative stress in diabetic cardiomyopathy: an experimental study. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 15, n. 11, p. 1241-6, Nov 2011.

ALI, M. A. et al. Titin is a target of matrix metalloproteinase-2: implications in myocardial ischemia/reperfusion injury. **Circulation**, v. 122, n. 20, p. 2039-47, Nov 16 2010.

ALVES, B. C.; SILVA, T. R.; SPRITZER, P. M. Sedentary Lifestyle and High-Carbohydrate Intake are Associated with Low-Grade Chronic Inflammation in Post-Menopause: A Cross-sectional Study. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 38, n. 7, p. 317-24, Jul 2016.

ARAKI, E.; NISHIKAWA, T. Oxidative stress: A cause and therapeutic target of diabetic complications. **J Diabetes Investig**, v. 1, n. 3, p. 90-6, Jun 1 2010.

AROOR, A. R.; MANDAVIA, C. H.; SOWERS, J. R. Insulin resistance and heart failure: molecular mechanisms. **Heart Fail Clin**, v. 8, n. 4, p. 609-17, Oct 2012.

ASSMANN, G.; SCHULTE, H.; VON ECKARDSTEIN, A. Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. **Am J Cardiol**, v. 77, n. 14, p. 1179-84, Jun 1 1996.

BARAZZONI, R. et al. Carbohydrates and insulin resistance in clinical nutrition: Recommendations from the ESPEN expert group. **Clin Nutr**, v. 36, n. 2, p. 355-363, Apr 2017.

BARRY, J. C. et al. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes. **Sci Rep**, v. 6, p. 21244, Feb 17 2016.

BARRY, S. P. et al. STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 385, n. 3, p. 324-9, Jul 31 2009.

BENJAMIN, E. J. et al. Heart Disease and Stroke Statistics-2017 Update: A Report From the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 10, p. e146-e603, Mar 7 2017.

BERK, B. C.; FUJIWARA, K.; LEHOUX, S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 568-75, Mar 2007.

BIESIADOCKI, B. J. Myofilament modulation of contraction. **Arch Biochem Biophys**, v. 601, p. 1-3, Jul 1 2016.

BOENGLER, K. et al. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. **Basic Res Cardiol**, v. 105, n. 6, p. 771-85, Nov 2010.

BORLAUG, B. A.; REDFIELD, M. M. Diastolic and systolic heart failure are distinct phenotypes within the heart failure spectrum. **Circulation**, v. 123, n. 18, p. 2006-13; discussion 2014, May 10 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.

BRAUN, D. A.; FRIBOURG, M.; SEALFON, S. C. Cytokine response is determined by duration of receptor and signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) activation. **J Biol Chem**, v. 288, n. 5, p. 2986-93, Feb 1 2013.

BUCHANAN, J. et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5341-9, Dec 2005.

BUENO, M. B. et al. Added sugars: consumption and associated factors among adults and the elderly. Sao Paulo, Brazil. **Rev Bras Epidemiol**, v. 15, n. 2, p. 256-64, Jun 2012.

BURCHFIELD, J. S. et al. Interleukin-10 from transplanted bone marrow mononuclear cells contributes to cardiac protection after myocardial infarction. **Circ Res**, v. 103, n. 2, p. 203-11, Jul 18 2008.

CAI, S.; KHOO, J.; CHANNON, K. M. Augmented BH4 by gene transfer restores nitric oxide synthase function in hyperglycemic human endothelial cells. **Cardiovasc Res**, v. 65, n. 4, p. 823-31, Mar 1 2005.

CALLIGARIS, S. D.; RICCA, M.; CONGET, P. Cardiac stress test induced by dobutamine and monitored by cardiac catheterization in mice. **J Vis Exp**, n. 72, Feb 10 2013.

CARRENO, J. E. et al. [Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]. **Rev Esp Cardiol**, v. 59, n. 5, p. 473-86, May 2006.

CAU, S. B. et al. The Nuclear Factor kappaB Inhibitor Pyrrolidine Dithiocarbamate Prevents Cardiac Remodelling and Matrix Metalloproteinase-2 Up-Regulation in Renovascular Hypertension. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 117, n. 4, p. 234-41, Oct 2015.

COELHO, B. A. et al. N-acetylglucosaminidase, myeloperoxidase and vascular endothelial growth factor serum levels in breast cancer patients. **Biomed Pharmacother**, v. 68, n. 2, p. 185-9, Mar 2014.

COMBES, A. et al. Chronic exposure to interleukin 1beta induces a delayed and reversible alteration in excitation-contraction coupling of cultured cardiomyocytes. **Pflugers Arch**, v. 445, n. 2, p. 246-56, Nov 2002.

CULLEN, P. Evidence that triglycerides are an independent coronary heart disease risk factor. **Am J Cardiol**, v. 86, n. 9, p. 943-9, Nov 1 2000.

DAL-SECCO, D. et al. Cardiac hyporesponsiveness in severe sepsis is associated with nitric oxide-dependent activation of G protein receptor kinase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 313, n. 1, p. H149-H163, Jul 1 2017.

DE JAGER, S. C. et al. CCL3 (MIP-1 alpha) levels are elevated during acute coronary syndromes and show strong prognostic power for future ischemic events. **J Mol Cell Cardiol**, v. 45, n. 3, p. 446-52, Sep 2008.

DEGHAN, M. et al. Associations of fats and carbohydrate intake with cardiovascular disease and mortality in 18 countries from five continents (PURE): a prospective cohort study. **Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2050-2062, Nov 4 2017.

DENG, J. Y. et al. Impairment of cardiac insulin signaling and myocardial contractile performance in high-cholesterol/fructose-fed rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 2, p. H978-87, Aug 2007.

DEWALD, O. et al. CCL2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 regulates inflammatory responses critical to healing myocardial infarcts. **Circ Res**, v. 96, n. 8, p. 881-9, Apr 29 2005.

DHINGRA, S. et al. Akt regulates IL-10 mediated suppression of TNFalpha-induced cardiomyocyte apoptosis by upregulating Stat3 phosphorylation. **PLoS One**, v. 6, n. 9, p. e25009, 2011.

DHINGRA, S. et al. IL-10 attenuates TNF-alpha-induced NF kappaB pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovasc Res**, v. 82, n. 1, p. 59-66, Apr 1 2009.

DOKAINISH, H. et al. Global mortality variations in patients with heart failure: results from the International Congestive Heart Failure (INTER-CHF) prospective cohort study. **Lancet Glob Health**, v. 5, n. 7, p. e665-e672, Jul 2017.

DUARTE, D. R. et al. The role of oxidative stress and lipid peroxidation in ventricular remodeling induced by tobacco smoke exposure after myocardial infarction. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 64, n. 7, p. 691-7, 2009.

EL ZEIN, M. et al. Excess sucrose and glucose ingestion acutely elevate blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Am J Hypertens**, v. 3, n. 5 Pt 1, p. 380-6, May 1990.

EL ZEIN, M.; AREAS, J. L.; PREUSS, H. G. Long-term effects of excess sucrose ingestion on three strains of rats. **Am J Hypertens**, v. 3, n. 7, p. 560-2, Jul 1990.

ENGEL, D. et al. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 287, n. 3, p. H1303-11, Sep 2004.

FENG, R. et al. High carbohydrate intake from starchy foods is positively associated with metabolic disorders: a Cohort Study from a Chinese population. **Sci Rep**, v. 5, p. 16919, Nov 19 2015.

FERREIRA, A. V. et al. High-carbohydrate diet selectively induces tumor necrosis factor-alpha production in mice liver. **Inflammation**, v. 34, n. 2, p. 139-45, Apr 2011.

FINUCANE, O. M. et al. Monounsaturated fatty acid-enriched high-fat diets impede adipose NLRP3 inflammasome-mediated IL-1beta secretion and insulin resistance despite obesity. **Diabetes**, v. 64, n. 6, p. 2116-28, Jun 2015.

FOLDEN, D. V. et al. Malondialdehyde inhibits cardiac contractile function in ventricular myocytes via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 7, p. 1310-6, Aug 2003.

FOURNIER, R. D. et al. Refined carbohydrate increases blood pressure and catecholamine excretion in SHR and WKY. **Am J Physiol**, v. 250, n. 4 Pt 1, p. E381-5, Apr 1986.

FOX, E. R. et al. Left ventricular geometric patterns in the Jackson cohort of the Atherosclerotic Risk in Communities (ARIC) Study: clinical correlates and influences on systolic and diastolic dysfunction. **Am Heart J**, v. 153, n. 2, p. 238-44, Feb 2007.

FUNK, S. D.; YURDAGUL, A., JR.; ORR, A. W. Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes. **Int J Vasc Med**, v. 2012, p. 569654, 2012.

GANAU, A. et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. **J Am Coll Cardiol**, v. 19, n. 7, p. 1550-8, Jun 1992.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 482, n. 3, p. 419-425, Jan 15 2017.

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circ Res**, v. 107, n. 9, p. 1058-70, Oct 29 2010.

HAGHIKIA, A. et al. STAT3, a key regulator of cell-to-cell communication in the heart. **Cardiovasc Res**, v. 102, n. 2, p. 281-9, May 1 2014.

HAGHIKIA, A. et al. STAT3 and cardiac remodeling. **Heart Fail Rev**, v. 16, n. 1, p. 35-47, Jan 2011.

HAMURO, M. et al. High glucose induced nuclear factor kappa B mediated inhibition of endothelial cell migration. **Atherosclerosis**, v. 162, n. 2, p. 277-87, Jun 2002.

HAN, X.; BOISVERT, W. A. Interleukin-10 protects against atherosclerosis by modulating multiple atherogenic macrophage function. **Thromb Haemost**, v. 113, n. 3, p. 505-12, Mar 2015.

HANEKLAUS, M.; O'NEILL, L. A. NLRP3 at the interface of metabolism and inflammation. **Immunol Rev**, v. 265, n. 1, p. 53-62, May 2015.

HERMES-LIMA, M.; WILLMORE, W. G.; STOREY, K. B. Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. **Free Radic Biol Med**, v. 19, n. 3, p. 271-80, Sep 1995.

HERR, D. J.; AUNE, S. E.; MENICK, D. R. Induction and Assessment of Ischemia-reperfusion Injury in Langendorff-perfused Rat Hearts. **J Vis Exp**, n. 101, p. e52908, Jul 27 2015.

HILFIKER-KLEINER, D. et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. **Circ Res**, v. 95, n. 2, p. 187-95, Jul 23 2004.

HU, X.; BEETON, C. Detection of functional matrix metalloproteinases by zymography. **J Vis Exp**, n. 45, Nov 8 2010.

HUTCHINS, A. P.; DIEZ, D.; MIRANDA-SAAVEDRA, D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: recent developments and future challenges. **Brief Funct Genomics**, v. 12, n. 6, p. 489-98, Nov 2013.

JOHNSON, R. J. et al. Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. **Am J Clin Nutr**, v. 86, n. 4, p. 899-906, Oct 2007.

JUDE, B. et al. Rapid negative inotropic effect induced by TNF-alpha in rat heart perfused related to PKC activation. **Cytokine**, Nov 29 2017.

JUUL, F.; HEMMINGSSON, E. Trends in consumption of ultra-processed foods and obesity in Sweden between 1960 and 2010. **Public Health Nutr**, v. 18, n. 17, p. 3096-107, Dec 2015.

KAHN, H. A.; DAWBER, T. R. The development of coronary heart disease in relation to sequential biennial measures of cholesterol in the Framingham study. **J Chronic Dis**, v. 19, n. 5, p. 611-20, May 1966.

KAMEDA, K. et al. Correlation of oxidative stress with activity of matrix metalloproteinase in patients with coronary artery disease. Possible role for left ventricular remodelling. **Eur Heart J**, v. 24, n. 24, p. 2180-5, Dec 2003.

KANNEL, W. B.; LEVY, D.; CUPPLES, L. A. Left ventricular hypertrophy and risk of cardiac failure: insights from the Framingham Study. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 10 Suppl 6, p. S135-40, 1987.

KAUFMAN, L. N.; PETERSON, M. M.; SMITH, S. M. Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. **Am J Physiol**, v. 260, n. 1 Pt 1, p. E95-100, Jan 1991.

KAUR, K. et al. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. **J Mol Cell Cardiol**, v. 41, n. 6, p. 1023-30, Dec 2006.

KAUR, K.; SHARMA, A. K.; SINGAL, P. K. Significance of changes in TNF-alpha and IL-10 levels in the progression of heart failure subsequent to myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 1, p. H106-13, Jul 2006.

KAWAHARA, Y. et al. Preferable anesthetic conditions for echocardiographic determination of murine cardiac function. **J Pharmacol Sci**, v. 99, n. 1, p. 95-104, Sep 2005.

KAWAHITO, S.; KITAHATA, H.; OSHITA, S. Problems associated with glucose toxicity: role of hyperglycemia-induced oxidative stress. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 33, p. 4137-42, Sep 7 2009.

KAYAMA, Y. et al. Diabetic Cardiovascular Disease Induced by Oxidative Stress. **Int J Mol Sci**, v. 16, n. 10, p. 25234-63, Oct 23 2015.

KEHAT, I. et al. Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 regulate the balance between eccentric and concentric cardiac growth. **Circ Res**, v. 108, n. 2, p. 176-83, Jan 21 2011.

KEHAT, I.; MOLKENTIN, J. D. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. **Circulation**, v. 122, n. 25, p. 2727-35, Dec 21 2010.

KESHERWANI, V. et al. Exercise ameliorates high fat diet induced cardiac dysfunction by increasing interleukin 10. **Front Physiol**, v. 6, p. 124, 2015.

KOLIAS, T. J.; AARONSON, K. D.; ARMSTRONG, W. F. Doppler-derived dP/dt and -dP/dt predict survival in congestive heart failure. **J Am Coll Cardiol**, v. 36, n. 5, p. 1594-9, Nov 1 2000.

KOWLURU, R. A.; ABBAS, S. N. Diabetes-induced mitochondrial dysfunction in the retina. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 12, p. 5327-34, Dec 2003.

KRANIAS, E. G.; HAJJAR, R. J. Modulation of cardiac contractility by the phospholamban/SERCA2a regulatome. **Circ Res**, v. 110, n. 12, p. 1646-60, Jun 8 2012.

KROMHOUT, D. et al. Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. **Prev Med**, v. 24, n. 3, p. 308-15, May 1995.

KUWATA, H. et al. IL-10-inducible Bcl-3 negatively regulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4123-9, Dec 1 2003.

LANGENDORFF, O.; NAWROEKI, C. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. **Eur. J. Physiol.**, v. 66, p. 355–400, 1897.

LI, J. et al. PKCzeta interacts with STAT3 and promotes its activation in cardiomyocyte hypertrophy. **J Pharmacol Sci**, v. 132, n. 1, p. 15-23, Sep 2016.

LI, T. et al. Geometrical and functional changes of left heart in adults with prehypertension and hypertension: a cross-sectional study from China. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 16, p. 114, May 28 2016.

LI, Y. et al. Saturated Fats Compared With Unsaturated Fats and Sources of Carbohydrates in Relation to Risk of Coronary Heart Disease: A Prospective Cohort Study. **J Am Coll Cardiol**, v. 66, n. 14, p. 1538-1548, Oct 6 2015.

LIPSKAIA, L. et al. Sarcoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase as a therapeutic target for heart failure. **Expert Opin Biol Ther**, v. 10, n. 1, p. 29-41, Jan 2010.

LIU, Q.; WANG, S.; CAI, L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. **J Diabetes Investig**, v. 5, n. 6, p. 623-34, Nov 2014.

LIU, S. J.; ZHOU, W.; KENNEDY, R. H. Suppression of beta-adrenergic responsiveness of L-type Ca<sup>2+</sup> current by IL-1beta in rat ventricular myocytes. **Am J Physiol**, v. 276, n. 1, p. H141-8, Jan 1999.

LONCAREVIC, B. et al. Silent diabetic cardiomyopathy in everyday practice: a clinical and echocardiographic study. **BMC Cardiovasc Disord**, v. 16, n. 1, p. 242, Nov 29 2016.

LOUZADA, M. L. et al. Consumption of ultra-processed foods and obesity in Brazilian adolescents and adults. **Prev Med**, v. 81, p. 9-15, Dec 2015.

LUDWIG, D. S. et al. Dietary carbohydrates: role of quality and quantity in chronic disease. **BMJ**, v. 361, p. k2340, Jun 13 2018.

MA, Y. et al. Association between carbohydrate intake and serum lipids. **J Am Coll Nutr**, v. 25, n. 2, p. 155-63, Apr 2006.

MAGGI, C. A.; MELI, A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 2: Cardiovascular system. **Experientia**, v. 42, n. 3, p. 292-7, Mar 15 1986.

MANGAN, M. S. J. et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 17, n. 8, p. 588-606, Aug 2018.

MANUKYAN, M. C. et al. Interleukin-10 protects the ischemic heart from reperfusion injury via the STAT3 pathway. **Surgery**, v. 150, n. 2, p. 231-9, Aug 2011.

MARTINEZ STEELE, E. et al. Ultra-processed foods and added sugars in the US diet: evidence from a nationally representative cross-sectional study. **BMJ Open**, v. 6, n. 3, p. e009892, Mar 09 2016.

MATSUSAKA, H. et al. Targeted deletion of matrix metalloproteinase 2 ameliorates myocardial remodeling in mice with chronic pressure overload. **Hypertension**, v. 47, n. 4, p. 711-7, Apr 2006.

MENSINK, R. P. et al. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. **Am J Clin Nutr**, v. 77, n. 5, p. 1146-55, May 2003.

MISCIA, S. et al. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells. **Cell Growth Differ**, v. 13, n. 1, p. 13-8, Jan 2002.

MOUBARAC, J. C. et al. Processed and ultra-processed food products: consumption trends in Canada from 1938 to 2011. **Can J Diet Pract Res**, v. 75, n. 1, p. 15-21, Spring 2014.

NADERALI, E. K. et al. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. **Clin Sci (Lond)**, v. 100, n. 6, p. 635-41, Jun 2001.

NADERALI, E. K.; WILLIAMS, G. Effects of short-term feeding of a highly palatable diet on vascular reactivity in rats. **Eur J Clin Invest**, v. 31, n. 12, p. 1024-8, Dec 2001.

NADRUZ, W. Myocardial remodeling in hypertension. **J Hum Hypertens**, v. 29, n. 1, p. 1-6, Jan 2015.

NEGORO, S. et al. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. **Circulation**, v. 104, n. 9, p. 979-81, Aug 28 2001.

NICHOLS, C. E. et al. Reactive oxygen species damage drives cardiac and mitochondrial dysfunction following acute nano-titanium dioxide inhalation exposure. **Nanotoxicology**, v. 12, n. 1, p. 32-48, Feb 2018.

NIEMAND, C. et al. Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3. **J Immunol**, v. 170, n. 6, p. 3263-72, Mar 15 2003.

NISHIDA, C. et al. The joint WHO/FAO expert consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. **Public Health Nutr**, v. 7, n. 1A, p. 245-50, Feb 2004.

OLIVEIRA, M. C. et al. Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 9, p. E396-406, Sep 2013.

PAHWA, R.; JIALAL, I. Hyperglycemia Induces Toll-Like Receptor Activity Through Increased Oxidative Stress. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 14, n. 5, p. 239-41, Jun 2016.

PORTO, L. C. et al. Carbohydrate-enriched diet impairs cardiac performance by decreasing the utilization of fatty acid and glucose. **Ther Adv Cardiovasc Dis**, v. 5, n. 1, p. 11-22, Feb 2011.

PREUSS, H. G. et al. Refined carbohydrates affect blood pressure and retinal vasculature in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats. **J Hypertens Suppl**, v. 4, n. 3, p. S459-62, Oct 1986.

PREUSS, M. B.; PREUSS, H. G. The effects of sucrose and sodium on blood pressures in various substrains of Wistar rats. **Lab Invest**, v. 43, n. 2, p. 101-7, Aug 1980.

RABABA'H, A. M. et al. Oxidative Stress and Cardiac Remodeling: An Updated Edge. **Curr Cardiol Rev**, v. 14, n. 1, p. 53-59, Mar 14 2018.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, Jun 5 2018.

RAJAMANI, U.; JIALAL, I. Hyperglycemia induces Toll-like receptor-2 and -4 expression and activity in human microvascular retinal endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. **J Diabetes Res**, v. 2014, p. 790902, 2014.

RAUBER, F. et al. Consumption of ultra-processed food products and its effects on children's lipid profiles: a longitudinal study. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 25, n. 1, p. 116-22, Jan 2015.

REAVEN, G. Insulin resistance and coronary heart disease in nondiabetic individuals. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 32, n. 8, p. 1754-9, Aug 2012.

ROMERO-CORRAL, A. et al. Normal weight obesity: a risk factor for cardiometabolic dysregulation and cardiovascular mortality. **Eur Heart J**, v. 31, n. 6, p. 737-46, Mar 2010.

ROSEN, B. D. et al. Left ventricular concentric remodeling is associated with decreased global and regional systolic function: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Circulation**, v. 112, n. 7, p. 984-91, Aug 16 2005.

SAMANTA, A.; DAWN, B. IL-10 for cardiac autophagy modulation: New direction in the pursuit of perfection. **J Mol Cell Cardiol**, v. 91, p. 204-6, Feb 2016.

SAWICKI, G. et al. Degradation of myosin light chain in isolated rat hearts subjected to ischemia-reperfusion injury: a new intracellular target for matrix metalloproteinase-2. **Circulation**, v. 112, n. 4, p. 544-52, Jul 26 2005.

SCHULER, R. et al. High-Saturated-Fat Diet Increases Circulating Angiotensin-Converting Enzyme, Which Is Enhanced by the rs4343 Polymorphism Defining Persons at Risk of Nutrient-Dependent Increases of Blood Pressure. **J Am Heart Assoc**, v. 6, n. 1, Jan 17 2017.

SEFEROVIC, P. M.; PAULUS, W. J. Clinical diabetic cardiomyopathy: a two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. **Eur Heart J**, v. 36, n. 27, p. 1718-27, 1727a-1727c, Jul 14 2015.

SEIDELMANN, S. B. et al. Dietary carbohydrate intake and mortality: a prospective cohort study and meta-analysis. **Lancet Public Health**, v. 3, n. 9, p. e419-e428, Sep 2018.

SHARMA, N. et al. High fructose diet increases mortality in hypertensive rats compared to a complex carbohydrate or high fat diet. **Am J Hypertens**, v. 20, n. 4, p. 403-9, Apr 2007.

SIKKA, G. et al. Interleukin 10 knockout frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. **Exp Gerontol**, v. 48, n. 2, p. 128-35, Feb 2013.

SILVA, J. F. et al. Obesity, Inflammation, and Exercise Training: Relative Contribution of iNOS and eNOS in the Modulation of Vascular Function in the Mouse Aorta. **Front Physiol**, v. 7, p. 386, 2016.

SILVA MONTEIRO, L. et al. Use of Table Sugar and Artificial Sweeteners in Brazil: National Dietary Survey 2008-2009. **Nutrients**, v. 10, n. 3, Mar 1 2018.

SIMON, B. R. et al. Sweet taste receptor deficient mice have decreased adiposity and increased bone mass. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86454, 2014.

SINGER, D. L. et al. Serum osmolality and glucose in maturity onset diabetes mellitus. **Arch Intern Med**, v. 110, p. 758-62, Nov 1962.

SKRZYPIEC-SPRING, M. et al. Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 55, n. 2, p. 113-26, Mar-Apr 2007.

STOCKKLAUSER-FÄRBER, K. et al. Influence of diabetes on cardiac nitric oxide synthase expression and activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1535, n. 1, p. 10-20, 2000.

SUEMATSU, N. et al. Oxidative stress mediates tumor necrosis factor-alpha-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in cardiac myocytes. **Circulation**, v. 107, n. 10, p. 1418-23, Mar 18 2003.

TEMPLE, N. J. Fat, Sugar, Whole Grains and Heart Disease: 50 Years of Confusion. **Nutrients**, v. 10, n. 1, Jan 4 2018.

VANHOREBEEK, I. et al. Tissue-specific glucose toxicity induces mitochondrial damage in a burn injury model of critical illness. **Crit Care Med**, v. 37, n. 4, p. 1355-64, Apr 2009.

VERMA, S. K. et al. Interleukin-10 treatment attenuates pressure overload-induced hypertrophic remodeling and improves heart function via signal transducers and activators of transcription 3-dependent inhibition of nuclear factor-kappaB. **Circulation**, v. 126, n. 4, p. 418-29, Jul 24 2012.

VINCENT, J. L. Understanding cardiac output. **Crit Care**, v. 12, n. 4, p. 174, 2008.

VIRTANEN, J. K. et al. Dietary fatty acids and risk of coronary heart disease in men: the Kuopio Ischemic Heart Disease Risk Factor Study. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 34, n. 12, p. 2679-87, Dec 2014.

VON BIBRA, H. et al. Dietary therapy in heart failure with preserved ejection fraction and/or left ventricular diastolic dysfunction in patients with metabolic syndrome. **Int J Cardiol**, v. 234, p. 7-15, May 1 2017.

WANG, H. et al. Signal transducer and activator of transcription 3 in liver diseases: a novel therapeutic target. **Int J Biol Sci**, v. 7, n. 5, p. 536-50, Apr 27 2011.

WANG, W. et al. Intracellular action of matrix metalloproteinase-2 accounts for acute myocardial ischemia and reperfusion injury. **Circulation**, v. 106, n. 12, p. 1543-9, Sep 17 2002.

WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Sci Signal**, v. 3, n. 105, p. cm1, Jan 19 2010.

WEGRZYN, J. et al. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. **Science**, v. 323, n. 5915, p. 793-7, Feb 6 2009.

WESTERMANN, D. et al. Tumor necrosis factor-alpha antagonism protects from myocardial inflammation and fibrosis in experimental diabetic cardiomyopathy. **Basic Res Cardiol**, v. 102, n. 6, p. 500-7, Nov 2007.

WHITE, C. A.; NICOLA, N. A. SOCS3: An essential physiological inhibitor of signaling by interleukin-6 and G-CSF family cytokines. **JAKSTAT**, v. 2, n. 4, p. e25045, Oct 1 2013.

WHO. **Global Health Estimates 2016: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016**. Geneva: World Health Organization 2018.

WIKLUND, P. et al. Normal-weight obesity and cardiometabolic risk: A 7-year longitudinal study in girls from prepuberty to early adulthood. **Obesity (Silver Spring)**, Apr 21 2017.

WILSON, A. J. et al. Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting. **Heart**, Sep 27 2017.

WINSLOW, R. L.; WALKER, M. A.; GREENSTEIN, J. L. Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte. **Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med**, v. 8, n. 1, p. 37-67, Jan-Feb 2016.

WOLFF, S. P.; JIANG, Z. Y.; HUNT, J. V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and ageing. **Free Radic Biol Med**, v. 10, n. 5, p. 339-52, 1991.

XIE, T. X. et al. Stat3 activation regulates the expression of matrix metalloproteinase-2 and tumor invasion and metastasis. **Oncogene**, v. 23, n. 20, p. 3550-60, Apr 29 2004.

YANCY, C. W. et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 16, p. e147-239, Oct 15 2013.

YANG, Q. et al. Added sugar intake and cardiovascular diseases mortality among US adults. **JAMA Intern Med**, v. 174, n. 4, p. 516-24, Apr 2014.

YILMAZ, M. I. et al. The relationship between IL-10 levels and cardiovascular events in patients with CKD. **Clin J Am Soc Nephrol**, v. 9, n. 7, p. 1207-16, Jul 2014.

YOUNG, J. B.; LANDSBERG, L. Effect of oral sucrose on blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Metabolism**, v. 30, n. 5, p. 421-4, May 1981.

YU, Q.; HORAK, K.; LARSON, D. F. Role of T lymphocytes in hypertension-induced cardiac extracellular matrix remodeling. **Hypertension**, v. 48, n. 1, p. 98-104, Jul 2006.

ZHANG, P. Y.; XU, X.; LI, X. C. Cardiovascular diseases: oxidative damage and antioxidant protection. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 18, n. 20, p. 3091-6, Oct 2014.

ZHANG, W. et al. Critical Roles of STAT3 in beta-Adrenergic Functions in the Heart. **Circulation**, v. 133, n. 1, p. 48-61, Jan 5 2016.

ZHAO, W. et al. Oxidative stress mediates cardiac fibrosis by enhancing transforming growth factor-beta1 in hypertensive rats. **Mol Cell Biochem**, v. 317, n. 1-2, p. 43-50, Oct 2008.

ZHOU, R. et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. **Nat Immunol**, v. 11, n. 2, p. 136-40, Feb 2010.

## ANEXO 1 - CERTIFICADO PROTOCOLO 193/2015 - CEUA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA**

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### **CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº. 193 / 2015, relativo ao projeto intitulado "Avaliação das alterações cardíacas induzida por dieta rica em carboidratos: participação do estresse oxidativo e fatores inflamatórios", que tem como responsável Stefany Bruno de Assis Cau, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 18/08/2015. Este certificado espira-se em 18/08/2020.

### **CERTIFICATE**

We hereby certify that the Protocol nº. 193 / 2015, related to the Project entitled "Evaluation of cardiac changes induced by high-carbohydrate diet: involvement of oxidative stress and inflammatory factors", under the supervision of Stefany Bruno de Assis Cau, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 18/08/2015. This certificates expires in 18/08/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende  
 Coordenador(a) da CEUA/UFMG  
 Belo Horizonte, 18/08/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG  
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais  
 Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
 Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
 Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

## ANEXO 2 - CERTIFICADO DE RELEVÂNCIA ACADÊMICA - SEMANA DO CONHECIMENTO UFMG - 2016



**Semana  
Conhecimento** UFMG  
2016  
*Cultivar Vidas: Ciência e Sociedade*



**CERTIFICADO**

CERTIFICAMOS QUE O TRABALHO INTITULADO "DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS LEVA AO REMODELAMENTO CARDÍACO EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM BALB/C", FOI APRESENTADO NA XXV SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, PROMOVIDA PELA PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, NO PERÍODO DE 17-10-2016 A 21-10-2016, TENDO SIDO SELECIONADO COMO RELEVÂNCIA ACADÊMICA

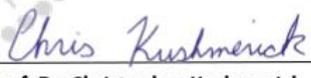
AUTOR(A): ALEXANDRE SANTOS BRUNO  
ORIENTADOR(A): STEFANY BRUNO DE ASSIS CAU DO(A) INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS.  
CO-AUTORES: DANIELA ESTEVES FERREIRA DOS REIS COSTA, GRAZIELLE CORDEIRO AGUIAR, DANIELLA BONAVENTURA, ANDERSON JOSÉ FERREIRA

*Mônica Maria Diniz Leão*  
MÔNICA MARIA DINIZ LEÃO  
PRÓ-REITORA ADJUNTA DE PESQUISA



realização UFMG

## ANEXO 3 - CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA – ENCONTRO PÓS-GRADUAÇÃO FIS/FAR - 2016

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|  <p style="font-size: small;">2016<br/>ICB-UFMG</p> <p><b>XXIV Encontro de Pesquisa</b><br/>Programa de Pós-Graduação em<br/>Fisiologia e Farmacologia</p> <p style="text-align: center;"><b>&amp;</b></p> <p><b>I Encontro de Inovação Tecnológica</b><br/>em Fisiologia e Farmacologia</p>                                                                                                                               | <h1 style="margin: 0;">CERTIFICADO</h1>                                                                                                                                                                                                                                                  |  |
| <p>Certificamos que <b>Alexandre Santos Bruno</b> recebeu Menção Honrosa pela apresentação do trabalho <b>“DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS INDUZ HIPERTROFIA CARDÍACA EM CAMUNDONGOS”</b>, no <b>XXIV Encontro de Pesquisa &amp; I Encontro de Inovação Tecnológica em Fisiologia e Farmacologia</b>, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG – realizado nos dias 10 e 11 de novembro de 2016, no Hotel Gran Minas, Vespasiano, MG.</p> |                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                                     |
| <br><hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> <p><b>Profa. Dra. Miriam Teresa Paz Lopes</b><br/>Coordenadora do Programa de Pós Graduação em<br/>Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia</p>                                                                                                                                                                                                                       | <br><hr style="width: 80%; margin: 0 auto;"/> <p><b>Prof. Dr. Christopher Kushmerick</b><br/>Vice-Coordenador do Programa de Pós Graduação em<br/>Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia</p> |                                                                                     |

**ANEXO 4 - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO ORAL – XXII SIMPÓSIO  
BRASILEIRO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR - 2018**



**XXII SIMPÓSIO BRASILEIRO  
DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR**



Certificamos que o trabalho de **Bruno AS, Costa DEFR, Castor RGM, Lopes PD, Aguiar GC, Romero MGMC, Bonaventura D, Ferreira AJ, Cau SBA**, intitulado: **DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS DESENCADEIA REMODELAMENTO CARDÍACO ASSOCIADO AO AUMENTO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E TNF- $\alpha$**  foi apresentado, sob a forma de apresentação oral, no XXII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, realizado na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, de 21 a 23 de Fevereiro de 2018.

*Rubens Fazan Jr.*

Prof. Dr. Rubens Fazan Júnior  
Departamento de Fisiologia  
FMRP-USP

*Rita Cassia Tostes*

Profa. Dra. Rita de Cassia Tostes  
Departamento de Farmacologia  
FMRP-USP

## ANEXO 5 - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO ORAL – ENCONTRO PÓS-GRADUAÇÃO FIS/FAR - 2018

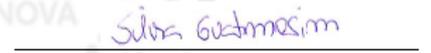


XXVI ENCONTRO DE PESQUISA EM  
**Fisiologia  
& Farmacologia**

### CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO ORAL

Certificamos que **Alexandre Santos Bruno** apresentou o trabalho **DISFUNÇÃO CARDÍACA DESENCADEADA POR DIETA RICA EM CARBOIDRATOS REFINADOS ESTÁ ASSOCIADA AO DESEQUILÍBRIO DE AGENTES PRÓ E ANTIINFLAMATÓRIOS**, na categoria **COMUNICAÇÃO ORAL**, durante o **XXVI Encontro de Pesquisa em Fisiologia e Farmacologia**, promovido pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia, ICB, UFMG, realizado nos dias 6 e 7 de dezembro de 2018, na Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

  
Prof. Dr. Márcio Flávio Dutra Moraes  
Coordenador do Programa de Pós Graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

  
Profa. Dra. Silvia Guatimosim  
Sub-Coordenadora do Programa de Pós Graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia

UFMG



ALESCO  
Research for life

Bioclin

Bonther  
Equipamentos para Ciência e Pesquisa

ANEXO 6 - CERTIFICADO DE MENÇÃO HONROSA – XXIII SIMPÓSIO  
BRASILEIRO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR - 2019



**XXIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE  
FISILOGIA CARDIOVASCULAR**



# MENÇÃO HONROSA

A comissão científica do XXIII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular confere ao **Alexandre Santos Bruno** esta distinção em reconhecimento pela qualidade do trabalho apresentado no simpósio que ocorreu entre os dias 24 e 27 de Fevereiro de 2019, cuja participação contribuiu para o brilhantismo do evento.

  
Prof. Dr. Eduardo Colombari

Presidente da Comissão Organizadora  
XXIII SBFCV