



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Lais Alfien

**Caracterização do modelo de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada em ratos, induzido por L-NAME e dieta hiperlipídica**

Florianópolis

2023

Lais Alflen

**Caracterização do modelo de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada em ratos, induzido por L-NAME e dieta hiperlipídica**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Renata Maria Lataro

Florianópolis

2023

Alflen, Lais

Caracterização do modelo de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada em ratos, induzido por L-NAME e dieta hiperlipídica / Lais Alflen ; orientadora, Renata Maria Lataro, 2023.

73 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada. 3. Disfunção diastólica. 4. Doenças cardiovasculares. 5. L-NAME e dieta hiperlipídica. I. Lataro, Renata Maria. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Lais Alflen

**Caracterização do modelo de insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada em ratos, induzido por L-NAME e dieta hiperlipídica**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado em 28 de novembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profª Drª Áurea Elisabeth Linder  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr Fábio Nelson Gava  
Universidade Estadual de Londrina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Farmacologia

Prof. Dr José Eduardo da Silva Santos  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profª Drª Renata Maria Lataro  
Orientadora

Florianópolis  
2023

Dedico este trabalho aos meus pais, Sueli e Alcinei, os quais são meu grande exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento deste trabalho só foi possível devido à contribuição de pessoas extraordinárias, assim, do fundo do coração, agradeço:

Aos meus pais, Alcinei e Sueli, pois o seu apoio e amor incondicional foi essencial durante toda a minha vida e, especialmente, durante esses anos de mestrado. Tenho muita sorte em ser sua filha.

À minha excelente orientadora, professora Renata Lataro, pela paciência, acolhimento, ensinamentos e incentivos durante todos esses anos, desde a iniciação científica. Muito obrigada por me guiar e ser meu exemplo nesse mundo da ciência.

Ao excepcional professor Jamil Assreuy, por toda a contribuição, suporte e disposição para me ajudar sempre que precisei. E por ser um grande exemplo de dedicação e excelência no meio científico. Muito obrigada.

Ao professor José Eduardo da Silva Santos, por gentilmente emprestar a estrutura, equipamentos e reagentes de seu laboratório para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Agradeço também pela ajuda, sugestões e discussões científicas, as quais foram essenciais para este estudo e para o meu crescimento científico.

As minhas queridas (os) companheiras (os) e amigas (os) de laboratório, Andressa, Deyse, Vivi, Willyan e, especialmente, a Ana e ao Gabriel. Muito obrigada por toda a ajuda com os experimentos, por me incentivar e estar comigo sempre que precisei. Ter a companhia de vocês durante esses anos de mestrado foi fundamental para mim.

À minha querida amiga Daiane Bobermin, pela amizade, por compartilhar as vitórias e as angústias durante os seminários das disciplinas do mestrado e, também, pela ajuda com os experimentos de *Western Blotting*.

As minhas amigas incríveis Cibele e Agatha, pelo incentivo e amizade durante todos os anos de graduação e de mestrado. Obrigada pelos cafés, risadas e pelo apoio.

Aos queridos integrantes do LabCardio, especialmente à Lívia Cunha, pela ajuda com os procedimentos de canulação e acesso à femoral.

À Luciana Honorato e ao Thiago Machado, por sempre estarem dispostos a ajudar e pela contribuição com conselhos e sugestões durante os meus experimentos.

Ao Juliano Custódio, por gentilmente me ajudar com o protocolo de *ELISA*.

À professora Áurea Elisabeth Linder, professora Fernanda Lima, professor Gustavo Jorge Santos e professor Rui Prediger por emprestarem equipamentos e/ou reagentes para os experimentos deste trabalho. Muito obrigada.

Ao professor Geisson Nardi e ao Gilberto Marloch por toda a ajuda com procedimentos e técnicas de histologia.

Ao professor Fábio Gava e professora Áurea Elisabeth Linder, por aceitarem o convite para compor a banca e por estarem dispostos a contribuir com este trabalho.

Ao Tadeu, nina, mia e neno por todos os cheiros, carinho e companhia.

Ao corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) por todo o suporte, o qual foi essencial para o andamento dos experimentos deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, e especialmente, aos professores do PPG em Farmacologia, por incentivarem a busca por conhecimento, seguirem firmes na ciência e por suas contribuições enriquecedoras.

À CAPES, pela concessão de minha bolsa, e a FAPESP e CNPQ pelo suporte financeiro.

Por fim, aos ratos, os quais foram fundamentais para realização deste trabalho.

*I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale. We should not allow it to be believed that all scientific progress can be reduced to mechanisms, machines, gearings, even though such machinery has its own beauty. (Marie Curie)*



## RESUMO

A insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEp) é uma síndrome heterogênea caracterizada, predominantemente, pela presença de comorbidades como obesidade, hipertensão arterial, diabetes *mellitus* e/ou disfunção renal, associadas à disfunção diastólica do ventrículo esquerdo (VE) e fração de ejeção do VE (FEVE) preservada. A ICFEp corresponde a 50% de todos os casos de insuficiência cardíaca e está associada a altas taxas de mortalidade e morbidade. Até o momento, as terapias baseadas em evidências disponíveis para pacientes com ICFEp ainda são limitadas, em parte devido às limitações de modelos pré-clínicos dessa doença. Assim, os modelos animais de ICFEp, capazes de replicar as características encontradas na clínica, são cruciais para o sucesso do desenvolvimento de novas terapias e para a investigação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e progressão da ICFEp. O modelo animal de ICFEp, induzido em camundongos, pela administração concomitante de dieta hiperlipídica e N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), reproduz grande parte das características observadas em indivíduos com ICFEp. No entanto, ainda não há relatos na literatura do modelo de ICFEp, induzido pela combinação de dieta hiperlipídica e L-NAME, em ratos. Assim, a hipótese do presente estudo foi de que a combinação de dieta hiperlipídica + L-NAME será capaz de replicar, em ratos, as principais características fisiopatológicas observadas em pacientes com ICFEp. Desse modo, o objetivo desse estudo foi induzir este modelo de ICFEp, em ratos, pela primeira vez. Foram utilizados ratos *Wistar* e a indução da ICFEp foi realizada pelo tratamento de dieta hiperlipídica (ração balanceada padrão, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1) por 5 semanas + L-NAME (20mg/kg/dia) por 4 semanas. Ratos controles foram tratados com dieta padrão. A função cardíaca foi avaliada por meio do registro de pressão e volume intraventricular em condições basais e em resposta à dobutamina, um agente inotrópico positivo. Ratos submetidos ao tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram aumento da pressão arterial sistólica, da gordura corporal, dos níveis plasmáticos de colesterol e menor tolerância à glicose em relação ao grupo controle. Além disso, observou-se que ratos expostos ao tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram FEVE, débito cardíaco, trabalho sistólico, volume sistólico, frequência cardíaca, volume sistólico final, volume diastólico final e valor máximo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda (+dp/dt) preservados. Apresentaram, também, menores valores do valor mínimo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda (-dp/dt) e maiores valores de tempo de relaxamento isovolumétrico ventricular (TAU), indicando disfunção diastólica do VE. A disfunção diastólica também foi confirmada pela resposta cardíaca à dobutamina. Além disso, o tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica resultou em remodelamento cardíaco adverso, caracterizado por hipertrofia e aumento da fibrose cardíaca, reduziu a tolerância ao exercício e aumentou os níveis cardíacos da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Porém, não houve alteração nos níveis plasmáticos e cardíacos de fator de necrose tumoral  $\alpha$ , interleucina 6 e no peso do pulmão dos ratos tratados, o que caracteriza uma possível limitação deste modelo em ratos. Assim, o tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica em ratos replicou, pela primeira vez, grande parte das características observadas em pacientes e camundongos com ICFEp. Desse modo, conclui-se que ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica desenvolveram ICFEp. Além disso, este modelo de ICFEp em ratos, considerando suas limitações, poderá ser utilizado em futuros estudos que busquem novas terapias para o

tratamento dos indivíduos com ICFeP, bem como, investigar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nessa doença.

**Palavras-chave:** Disfunção diastólica, doenças cardiovasculares, iNOS.

## ABSTRACT

Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is characterized by multiple comorbidities, including hypertension, obesity, diabetes, and renal dysfunction, associated with left ventricular (LV) diastolic dysfunction, and preserved LV ejection fraction (LVEF). HFpEF corresponds to 50% of all heart failure cases and is associated with high rates of mortality and morbidity. The pathophysiological mechanisms of this disease are not yet fully established due to the limitations of preclinical models of this disease. As a result, no evidence-based clinical therapies are available for HFpEF patients. For this reason, HFpEF animal models are crucial for the successful development of new therapies and for investigating the physiopathological mechanisms involved in the development and progression of this disease. In mice, the “two-hit” HFpEF model, induced by the combination of a high-fat diet and N $\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), replicates most of the clinical features of HFpEF. However, this model has not been characterized in rats. Thus, the hypothesis of the present study was that the combination of a high-fat diet + L-NAME would replicate, in rats, the main pathophysiological features observed in HFpEF patients. Therefore, the aim of this study was to induce the “two-hit” HFpEF model in rats for the first time. Hence, Wistar rats were treated with a high-fat diet (standard chow, roasted peanuts, milk chocolate, and cornstarch biscuit in a ratio of 3:2:2:1) for 5 weeks associated with L-NAME (20 mg/kg/day) for 4 weeks. Control rats received standard chow. Cardiac function was assessed by intraventricular pressure and volume recording under baseline conditions and after dobutamine administration, a positive inotropic agent. Rats treated with L-NAME and a high-fat diet showed increased systolic blood pressure, body fat, plasmatic cholesterol levels and lower glucose tolerance when compared to the control group. Additionally, rats exposed to L-NAME and high-fat diet treatment demonstrated preserved LVEF, cardiac output, stroke work, stroke volume, heart rate, end-systolic volume, end-diastolic volume, maximum derivative of left ventricular pressure over time (+dp/dt), and also exhibited decreased minimum derivative of left ventricular pressure over time (-dp/dt) and increased isovolumic relaxation constant (TAU), indicating LV diastolic dysfunction. Diastolic dysfunction was also confirmed by cardiac response to dobutamine. Treatment with L-NAME and a high-fat diet also resulted in adverse cardiac remodeling, characterized by cardiac hypertrophy and fibrosis, reduced exercise tolerance and elevated cardiac levels of inducible nitric oxide synthase (iNOS). However, there were no changes in plasma and cardiac levels of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 6 and in the lung weight-to-tibia length ratio. These data indicate that treatment with L-NAME and a high-fat diet in rats replicated, for the first time, most of the features observed in patients and mice with HFpEF. In conclusion, rats treated with L-NAME and high-fat diet developed HFpEF. Furthermore, this HFpEF rat model can be used in future studies, taking into account its limitations, to explore new therapies for the treatment of HFpEF patients, as well as to investigate the physiopathological mechanisms involved in this disease.

**Keywords:** Diastolic dysfunction, cardiovascular diseases, iNOS.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DA INFLAMAÇÃO À RIGIDEZ MIOCÁRDICA: MECANISMOS FISIOPATOLÓGICOS ENVOLVIDOS.....	22
FIGURA 2: CARACTERÍSTICAS OBSERVADAS EM INDIVÍDUOS COM ICFEP E NÍVEIS DE SEMELHANÇA ENTRE MODELOS ANIMAIS E PACIENTES COM ICFEP .....	24
FIGURA 3: LINHA DO TEMPO DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL. ....	29
FIGURA 4: REGISTRO TÍPICO DE MEDIDAS CONSECUTIVAS DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA OBTIDAS POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA. ....	32
FIGURA 5: REGISTROS TÍPICOS DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS DE UM RATO CONTROLE OBTIDOS COM O CATETER DE PRESSÃO E VOLUME, INSERIDO NO VENTRÍCULO ESQUERDO ATRAVÉS DA CARÓTIDA DIREITA. ....	35
FIGURA 6: MEMBRANA APÓS A ELETROTRANSFERÊNCIA DURANTE PROTOCOLO DE <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	42
FIGURA 7: CURVA DE SOBREVIVÊNCIA DE RATOS SUBMETIDOS AO TRATAMENTO DE L-NAME NAS DOSES DE 20 MG/KG/DIA, 40 MG/KG/DIA E 70 MG/KG/DIA.....	44
FIGURA 8: O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA AUMENTOU A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA, A GORDURA CORPORAL E NÃO ALTEROU O PESO CORPORAL DOS RATOS. ....	45
FIGURA 9: O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA REDUZIU A TOLERÂNCIA À GLICOSE, NÃO ALTEROU OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TRIGLICERÍDEOS, PORÉM, AUMENTOU OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL DOS RATOS. ....	46
FIGURA 10: O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA LEVOU À REDUÇÃO DA FUNÇÃO DIASTÓLICA SEM ALTERAR A FRAÇÃO DE EJEÇÃO. ....	47
FIGURA 11: O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA REDUZIU A TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO DOS RATOS. ....	50
FIGURA 12: RATOS TRATADOS COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA APRESENTARAM FIBROSE E HIPERTROFIA CARDÍACA, PORÉM NÃO HOUVE DIFERENÇA NO PESO DO PULMÃO. ....	51
FIGURA 13: O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA NÃO ALTEROU OS NÍVEIS CARDÍACOS DE CITOCINAS (IL-6 E TNF- $\alpha$ ).....	52
FIGURA 14: AUMENTO NA EXPRESSÃO DE INOS NOS CORAÇÕES DE RATOS TRATADOS COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA.....	53

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE CORAÇÃO PARA ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	37
QUADRO 2: PROTOCOLO DE COLORAÇÃO COM TRICOMO DE GOMORI. ....	38

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1: DELTA DOS EFEITOS DA DOBUTAMINA SOBRE A FUNÇÃO CARDÍACA. ....	49
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

+dP/dt	Valor máximo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda
-dP/dt	Valor mínimo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda
ANG II	Angiotensina II
DC	Débito cardíaco
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
DOCP	Pivalato de desoxicorticosterona
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> )
FC	Frequência cardíaca
HP	Hipertensão pulmonar
IC	Insuficiência cardíaca
ICFEp	Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada
ICFEr	Insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida
IRE1 $\alpha$	Proteína sequestradora de inositol 1 $\alpha$ (do inglês <i>inositol-requiring enzyme 1 <math>\alpha</math></i> )
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
L-NAME	N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster
NO	Óxido nítrico
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C Reativa
PDF	Pressão diastólica final
PSF	Pressão sistólica final
PKG	Proteína Quinase G
P-V	Pressão volume
sGC	Guanilato Ciclase solúvel

SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
TAU	Tempo de relaxamento isovolumétrico
TBS-T	Solução salina tamponada com Tris (TBS-T, do inglês <i>Tris-Buffered Saline</i> )
TGF $\beta$	Fator de transformação do crescimento $\beta$
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$ (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> )
TNF $\alpha$ R1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
TS	Trabalho sistólico
UPR	Resposta a proteínas não dobradas ou mal dobradas (do inglês <i>unfolded protein response</i> )
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VDF	Volume diastólico final
VE	Ventrículo esquerdo
VS	Volume sistólico
VSF	Volume sistólico final
XBP1s	Proteína 1 de Ligação a X-Box (do inglês, <i>spliced X-box binding protein 1</i> )
ZSF1	Ratos Zucker espontaneamente hipertensos



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA	19
1.2. MODELOS ANIMAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA	23
1.3. MODELO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA, INDUZIDO PELA COMBINAÇÃO DE L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA, EM CAMUNDONGOS	25
<b>2. HIPÓTESE</b>	<b>26</b>
<b>3. OBJETIVO GERAL</b>	<b>26</b>
<b>4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
5.1. ANIMAIS	27
5.2. DESENHO EXPERIMENTAL	27
5.3. INDUÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA	30
5.4. REGISTRO INDIRETO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA	31
5.5. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	32
5.6. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS	32
5.7. ANÁLISE DA FUNÇÃO CARDÍACA	33
5.8. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CARDÍACA À ADMINISTRAÇÃO DE DOBUTAMINA	36
5.9. COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS	36
5.10. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO	36
5.11. TESTE DE TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO	39
5.12. CONCENTRAÇÃO CARDÍACA E PLASMÁTICA DE CITOCINAS	39
5.13. EXPRESSÃO DE INOS POR <i>WESTERN BLOTTING</i>	40
5.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>43</b>
6.1. O TRATAMENTO COM L-NAME NA DOSE DE 20 MG/KG/DIA APRESENTOU A MAIOR PORCENTAGEM DE SOBREVIVENTES EM RELAÇÃO ÀS DOSES DE 40 MG/KG/DIA E 70 MG/KG/DIA	43
6.2. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA AUMENTOU A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA, A GORDURA CORPORAL E NÃO ALTEROU O PESO CORPORAL DOS RATOS	44
6.3. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA REDUZIU A TOLERÂNCIA À GLICOSE, NÃO ALTEROU OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TRIGLICERÍDEOS, PORÉM, AUMENTOU OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL DOS RATOS	45
6.4. DISFUNÇÃO DIASTÓLICA E FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA EM RATOS TRATADOS COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA	46
6.5. RATOS TRATADOS COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA APRESENTARAM PREJUÍZO NA FUNÇÃO DIASTÓLICA DURANTE A RESPOSTA CARDÍACA À DOBUTAMINA	48
6.6. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA REDUZIU A TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO DOS RATOS	49
6.7. RATOS TRATADOS COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA APRESENTARAM HIPERTROFIA E FIBROSE CARDÍACA, PORÉM, NÃO APRESENTARAM ALTERAÇÃO NO PESO DO PULMÃO	50
6.8. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA NÃO ALTEROU OS NÍVEIS CARDÍACOS DE CITOCINAS (IL-6 E TNF- $\alpha$ )	52
6.9. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA AUMENTOU A EXPRESSÃO DE INOS NO CORAÇÃO DOS RATOS	53

<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>8. SUMÁRIO E CONCLUSÃO.....</b>	<b>60</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>61</b>
<b>10. APENDICE A .....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA

A insuficiência cardíaca (IC) é definida como uma síndrome heterogênea caracterizada por alterações na estrutura e função do coração, resultando na redução da capacidade do coração de encher e/ou bombear sangue nas quantidades necessárias para suprir as demandas metabólicas do organismo (MCMURRAY; PFEFFER, 2005, BOZKURT *et al.*, 2021; REDFIELD; BORLAUG, 2023).

Entre os pacientes com síndrome clínica de IC, a fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) é considerada um marcador fenotípico utilizado na clínica e, também, um indicativo de mecanismos fisiopatológicos e de resposta a terapias (PAULUS; TSCHÖPE, 2013; REDFIELD *et al.*, 2016). A FEVE é definida pelo percentual do volume diastólico final (VDF) que o ventrículo esquerdo (VE) ejeta para a aorta durante a sístole (PFEFFER *et al.*, 2019). Os pacientes são classificados como portadores de IC com FEVE reduzida (ICFEr) em caso de FEVE <50% ou FEVE preservada (ICFEp) em caso de FEVE ≥50% (DUNLAY *et al.*, 2017; PFEFFER *et al.*, 2019).

Atualmente, a ICFEp corresponde a 50% de todos os casos de IC e sua prevalência em relação à ICFEr continua a aumentar (BHATIA *et al.*, 2006; BORLAUG 2011; SHAHIM *et al.*, 2023).

Os pacientes com ICFEp apresentam múltiplas comorbidades, incluindo obesidade/síndrome metabólica, hipertensão, diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) e/ou disfunção renal, resultando em um fenótipo clínico complexo (SHAH *et al.*, 2016; JASINSKA-PIADLO; CAMPBELL, 2023; SHAHIM *et al.*, 2023). Além disso, sexo e idade também se apresentam como fatores que contribuem para o desenvolvimento da ICFEp, sendo as mulheres e os indivíduos acima de 65 anos de idade mais propensos a desenvolver a doença (TANAI; FRANTZ, 2015; SINGH; MEHTA, 2018).

Assim, a ICFEp se apresenta como uma doença sistêmica multifatorial, na qual ocorrem alterações estruturais e funcionais no coração, e por conta disso, são ativados mecanismos celulares, moleculares e neuro-humorais para a manutenção da homeostase (TANAI; FRANTZ, 2015). Isso resulta em uma síndrome clínica caracterizada por sintomas como fadiga, dispneia, congestão pulmonar e menor

tolerância ao exercício (TANAI; FRANTZ, 2015). No entanto, os sintomas podem variar de paciente para paciente devido à grande heterogeneidade fenotípica da ICfEp, incluindo seus mecanismos fisiopatológicos e suas manifestações clínicas, tornando-se um grande obstáculo aos ensaios clínicos de ICfEp atuais (SHAH *et al.*, 2014).

Nas últimas três décadas, a abordagem terapêutica para ICfEr evoluiu devido a estudos clínicos que demonstraram eficácia da inibição neuro-humoral (PAULUS; VAN BALLEGOIJ, 2010). No entanto, não houve evolução semelhante na ICfEp, uma vez que a inibição neuro-humoral não alcançou resultados positivos (PAULUS; VAN BALLEGOIJ, 2010; SAMSON *et al.*, 2016). Além disso, ao contrário da ICfEr, o diagnóstico da ICfEp se mostra um desafio, pois os pacientes apresentam FEVE normal, a congestão cardíaca é difícil de avaliar de forma não invasiva e grande parte dos pacientes apresenta alterações hemodinâmicas apenas durante o exercício (PIESKE, B. *et al.*, 2019). Assim, pacientes com ICfEp apresentam hospitalizações frequentes, baixa qualidade de vida e aumento da mortalidade (UPADHYA; KITZMAN, 2020).

Na ICfEp, a inflamação sistêmica, induzida pelas comorbidades, leva ao aumento dos níveis plasmáticos de biomarcadores inflamatórios (Figura 1A), como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-6 (IL-6) e proteína C reativa (PCR) (COLLIER *et al.*, 2011; D'ELIA *et al.*, 2015). A inflamação no endotélio da microvasculatura coronariana, por sua vez, induz a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), reduzindo a biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) nos cardiomiócitos adjacentes (Figura 1A) (PAULUS; TSCHÖPE, 2013). A baixa disponibilidade de NO reduz a atividade da guanilato ciclase solúvel (sGC), da monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) e da proteína quinase G (PKG) (Figura 2B) (SCHULZ *et al.*, 2008, VAN HEEREBEEK *et al.*, 2012). A atividade reduzida da PKG leva à hipofosforilação da titina (Figura 2B), uma proteína sarcomérica responsável pela distensibilidade diastólica dos cardiomiócitos (KRÜGER *et al.*, 2009). Além disso, as EROs diminuem a elasticidade da titina por meio da formação de ligações dissulfeto (Figura 2B), as quais interferem no dobramento da titina (LOESCHER *et al.*, 2020). Assim, essas modificações na titina aumentam a rigidez dos cardiomiócitos (SCHULZ *et al.*, 2008; KRÜGER *et al.*, 2009; VAN HEEREBEEK *et al.*, 2012, LOESCHER *et al.*, 2020).

A inflamação também estimula a expressão endotelial de moléculas de adesão, como a molécula de adesão celular vascular (VCAM) e a E-selectina, e induz a ativação de células imunes no coração, levando a infiltração miocárdica de monócitos e células T CD4+ (Figura 1C) (SHAH *et al.*, 2016). A expressão de moléculas de adesão atrai leucócitos, os quais secretam fator de transformação do crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que converte fibroblastos em miofibroblastos, aumentando a deposição de colágeno intersticial, caracterizando o aumento de fibrose e rigidez cardíaca (Figura 1D) (SHAH *et al.*, 2016).

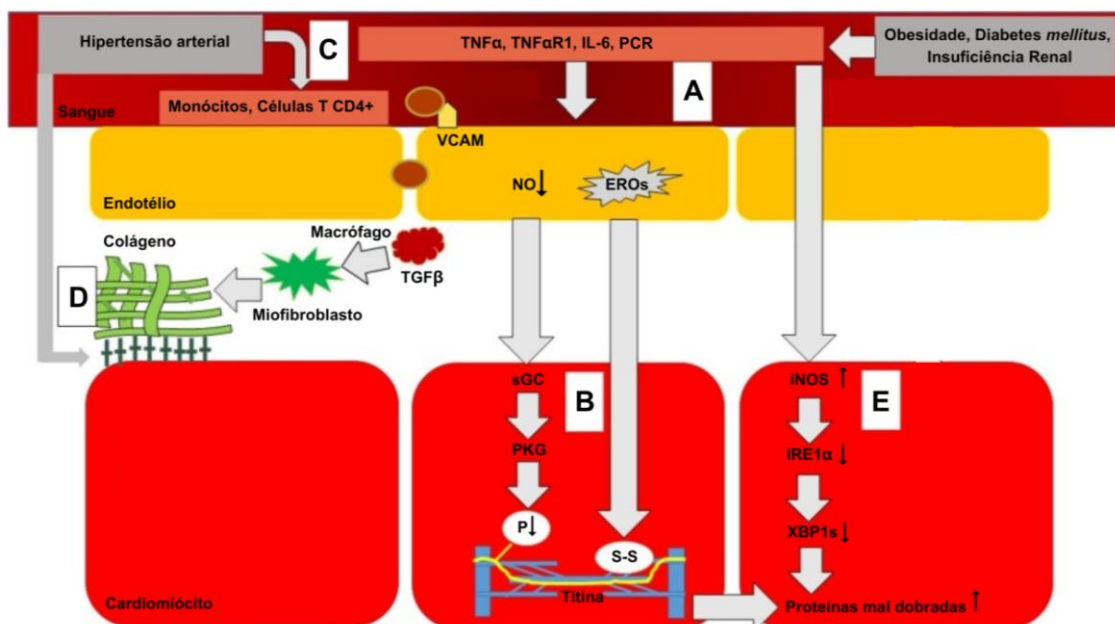
Além disso, na ICFEp, ocorre uma disfunção da resposta a proteínas não dobradas ou mal dobradas (UPR, do inglês *unfolded protein response*) (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019), a qual é responsável manter o equilíbrio do dobramento de proteínas no retículo endoplasmático. Essa disfunção na via UPR na ICFEp acontece devido ao aumento da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando ao aumento de S-nitrosilação da proteína sequestradora de inositol 1  $\alpha$  (IRE1 $\alpha$ , do inglês *inositol-requiring enzyme 1  $\alpha$* ) e à redução da atividade da proteína 1 de ligação a X-Box (XBP1s, do inglês *spliced X-box binding protein 1*), um dos efetores da via UPR. Isso resulta no acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas no coração, o que exacerba a inflamação, a disfunção e morte celular (WANG *et al.*, 2012; SCHIATTARELLA *et al.*, 2019).

Assim, o aumento da atividade da iNOS está associado ao aumento de estresse nitrosativo, disfunção da via UPR e, desse modo, contribui para a progressão da ICFEp (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019).

Desta forma, as alterações na estrutura e função do miocárdio levam ao remodelamento adverso do VE, resultando no aumento da rigidez deste ventrículo, assim, prolongando o relaxamento ventricular, causando uma disfunção diastólica do VE, caracteristicamente observada em pacientes com ICFEp (ZILE *et al.*, 2011).

Essas alterações na estrutura e função do coração em pacientes com ICFEp, por conta da hipertrofia e fibrose cardíaca e consequente disfunção diastólica, também prejudicam a perfusão coronariana que ocorre durante a diástole, assim, resultando em disfunção e morte celular, contribuindo para o ciclo de progressão da doença (HEUSCH 2022). Além disso, o comprometimento da função vascular coronariana está relacionado com um pior prognóstico para estes pacientes (HEUSCH 2022).

**Figura 1: Da inflamação à rigidez miocárdica: mecanismos fisiopatológicos envolvidos.**



**(A)** A obesidade, diabetes *mellitus* e insuficiência renal induzem uma sinalização pró-inflamatória, caracterizada pelo aumento de moléculas pró-inflamatórias, como TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ R1, IL-6 e PCR. A inflamação sistêmica desencadeia a expressão de VCAM, atraindo monócitos, diminuindo a biodisponibilidade de NO no endotélio e aumentando a produção endotelial de EROs. **(B)** A menor biodisponibilidade de NO diminui a atividade da sGC, e conseqüentemente, da PKG. Essa redução leva à hipofosforilação da titina (P $\downarrow$ ). As EROs causam a formação de ligações dissulfeto na titina. Assim, essas modificações na titina levam ao aumento da rigidez dos cardiomiócitos. **(C)** A hipertensão arterial, por sua vez, induz uma sinalização pró-inflamatória e fibrótica por meio da ativação de células imunes no coração, caracterizada pela infiltração miocárdica de monócitos e células T CD4 $^{+}$ ; **(D)** Os monócitos dão origem aos macrófagos, produzindo TGF $\beta$ , estimulando a produção de colágeno pelos miofibroblastos. **(E)** A inflamação induz o aumento da expressão em cardiomiócitos da iNOS, resultando na redução de IRE1 $\alpha$  e da XBP1s, levando ao acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas na matriz extracelular. TNF- $\alpha$  = Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ; TNF $\alpha$ R1 = Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ ; IL-6 = Interleucina 6; PCR = Proteína C Reativa; VCAM = molécula de adesão celular vascular; NO = óxido nítrico; EROs = espécies reativas de oxigênio; sGC = Guanilato Ciclastase solúvel; PKG = Proteína Quinase G; TGF $\beta$  = Fator de transformação do crescimento  $\beta$ ; iNOS = óxido nítrico sintase induzível. IRE1 $\alpha$  = Proteína sequestradora de inositol 1  $\alpha$  (do inglês, *inositol-requiring enzyme 1  $\alpha$* ; XBP1s = Proteína 1 de Ligação a X-Box (do inglês, *spliced X-box binding protein 1*). Adaptado de Paulus; Zile (2018).

Portanto, a ICFEp é caracterizada, predominantemente, pela presença de comorbidades, inflamação sistêmica e cardíaca, disfunção diastólica do VE e fração de ejeção preservada (TANAI; FRANTZ, 2015; SHAH *et al.*, 2016).

No entanto, ainda há uma deficiência em modelos pré-clínicos dessa doença. Como resultado, os mecanismos fisiopatológicos dessa doença ainda não são

completamente estabelecidos e, até o momento, as terapias clínicas baseadas em evidências disponíveis para esses pacientes são bem limitadas (DESAI *et al.*, 2023).

O desenvolvimento de terapias, geralmente, progride em etapas, desde a fase pré-clínica até os ensaios clínicos. Desse modo, os modelos animais de ICfEp, capazes de replicar as características encontradas na clínica, são cruciais para o sucesso no desenvolvimento de novas terapias (WITHAAR *et al.*, 2021).

## 1.2. MODELOS ANIMAIS DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA

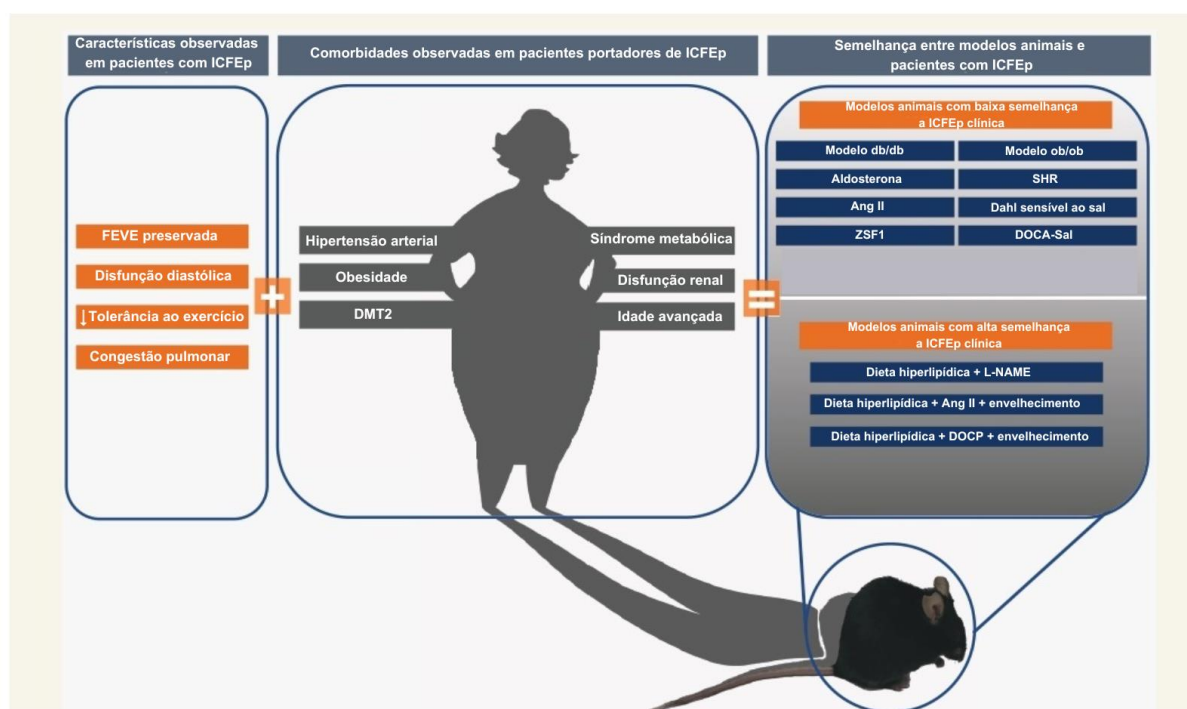
As limitações em terapias para pacientes com ICfEp podem ser explicadas, em parte, devido a utilização de modelos pré-clínicos inadequados (WITHAAR *et al.*, 2021). Isso porque a maior parte dos modelos pré-clínicos de ICfEp utilizam apenas uma comorbidade para reproduzir a doença. No entanto, devido à presença de múltiplas comorbidades em pacientes com ICfEp, esses modelos se mostram inadequados, pois não replicam a heterogeneidade de características observadas na clínica (SHAH *et al.*, 2020; WITHAAR *et al.*, 2021).

A hipertensão arterial é a comorbidade com maior prevalência em pacientes com ICfEp, seguida pela obesidade/síndrome metabólica (SINGH; MEHTA, 2018). Assim, estudos que utilizam agentes hipertensores como angiotensina II (ANG II) (ICHIHARA *et al.*, 2001; MURDOCH *et al.*, 2014), aldosterona (TANAKA *et al.*, 2016) ou estudos que utilizam animais geneticamente modificados, como ratos espontaneamente hipertensos (SHR) (BERGMAN *et al.*, 1999), ratos Dahl sensíveis ao sal (DOI *et al.*, 2000) ou camundongos e ratos DOCA-sal (ALLAN *et al.*, 2005), replicam apenas parte do fenótipo observado em pacientes com ICfEp.

Outros modelos induzem o aumento da adiposidade, com ou sem a presença de hipertensão arterial, utilizando animais geneticamente modificados, como o modelo *db/db*, no qual os camundongos possuem uma mutação no gene que codifica o receptor de leptina, levando ao mau funcionamento desse receptor e à obesidade (CHEN *et al.*, 1996), o modelo *ob/ob* de camundongos deficientes em leptina que desenvolvem espontaneamente obesidade e DM2 (LINDSTRÖM 2007), ou o modelo de ratos Zucker espontaneamente obesos (ZSF1) (SCHAUER *et al.*, 2021). No entanto, os modelos citados acima, também não reproduzem a variação de todo o

espectro fenotípico da ICfEp observado na clínica, o que configura uma limitação (Figura 2).

**Figura 2: Características observadas em indivíduos com ICfEp e níveis de semelhança entre modelos animais e pacientes com ICfEp**



Principais características e comorbidades observadas em indivíduos com ICfEp e níveis de semelhança entre modelos animais e pacientes com ICfEp. Ang II = Angiotensina II; *db/db* = modelo deficiente em leptina; DMT2 = Diabetes *mellitus* tipo 2; DOCP = pivalato de desoxicorticosterona; FEVE = Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; ICfEp = Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada; L-NAME = N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster; *ob/ob* = modelo deficiente no receptor de leptina; SHR = ratos espontaneamente hipertensos; Adaptado de Withaar et al., (2021).

Desse modo, o desenvolvimento de modelos com múltiplas comorbidades se tornam necessários para o desenvolvimento de um fenótipo semelhante ao de pacientes com ICfEp (Figura 2) (WITHAAR *et al.*, 2021). Atualmente, entre esses modelos, estão incluídos: 1) o modelo induzido por dieta hiperlipídica e infusão de ANG II em camundongos de 18-22 meses de idade (WITHAAR *et al.*, 2021); 2) o modelo induzido por dieta hiperlipídica e pivalato de desoxicorticosterona (DOCP) em camundongos com 16 meses de idade (DENG *et al.*, 2021) e 3) o modelo induzido por N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) e dieta hiperlipídica (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019), sendo este o primeiro estudo a desenvolver um modelo pré-clínico em



camundongos, denominado *two-hit model*, que possui alta semelhança à ICFEp em humanos.

Nesse estudo, publicado em 2019 por Schiattarella e colaboradores (2019), camundongos C57BL/6N foram submetidos a uma combinação de dieta hiperlipídica e agente hipertensor, L-NAME. Foi demonstrado que a combinação do estresse metabólico e estresse mecânico produziu um fenótipo típico de ICFEp (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019). Além disso, nesse estudo, os camundongos submetidos somente ao L-NAME ou somente à dieta hiperlipídica não desenvolveram esse fenótipo (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019). Já em outro estudo, publicado pelo mesmo grupo de autores, foi demonstrado que esses resultados são dependentes do sexo (TONG *et al.*, 2019). Camundongos fêmeas apresentaram-se mais resistentes ao desenvolvimento de ICFEp, apresentando em um fenótipo cardíaco de ICFEp atenuado quando comparado aos camundongos machos (TONG *et al.*, 2019).

### 1.3. MODELO DE INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA, INDUZIDO PELA COMBINAÇÃO DE L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA, EM CAMUNDONGOS

No modelo pré-clínico de ICFEp em camundongos, proposto por Schiattarella e colaboradores (2019), a combinação de estresse metabólico, decorrente da obesidade e síndrome metabólica, e do estresse mecânico, decorrente da hipertensão, reproduziu a fisiopatologia da ICFEp. Nesse modelo, o estresse metabólico foi induzido pela administração de dieta hiperlipídica e o estresse mecânico foi induzido por meio da supressão de NO sintases constitutivas pela administração de L-NAME (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019). A dieta hiperlipídica induz o aumento de peso corporal e intolerância à glicose, enquanto que o tratamento com L-NAME aumenta a pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica nos camundongos (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019).

Assim, Schiattarella e colaboradores (2019) mostraram que camundongos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica por 5 ou 15 semanas apresentaram aumento do peso corporal, menor tolerância à glicose, aumento da PAS e pressão arterial diastólica, hipertrofia e fibrose miocárdica, redução da densidade capilar miocárdica, disfunção diastólica, congestão pulmonar, menor tolerância ao exercício, aumento da atividade da iNOS e disfunção da via UPR.

Desse modo, o modelo de ICfEp, induzido pela combinação de dieta hiperlipídica e L-NAME replica a maioria das características clínicas da ICfEp. As intervenções utilizadas neste modelo para reproduzir o fenótipo clínico são baseadas nas observações fisiopatológicas, embora limitadas, em humanos (SCHIATTARELLA G. et al., 2019).

No entanto, até o momento, ainda não há relatos na literatura do modelo de ICfEp, induzido pela combinação de dieta hiperlipídica e L-NAME, em ratos. Assim, o presente estudo propõe a indução deste modelo de ICfEp em ratos, pela primeira vez, para assim, ampliar as possibilidades de escolha da espécie a ser utilizada neste modelo em futuros estudos, atualmente restrita a camundongos.

## **2. HIPÓTESE**

A combinação de dieta hiperlipídica + L-NAME será capaz de replicar, em ratos, as principais características fisiopatológicas observadas em pacientes com ICfEp.

## **3. OBJETIVO GERAL**

Caracterizar o modelo de ICfEp em ratos, induzido por L-NAME e dieta hiperlipídica.

## **4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1) Avaliar os efeitos de diferentes doses de L-NAME (20 mg/kg, 40 mg/kg e 70 mg/kg), concomitantemente com dieta hiperlipídica, na sobrevivência dos ratos;
- 2) Avaliar os efeitos do tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica sobre:
  - A pressão arterial, por pletismografia de cauda;
  - O estresse metabólico, pela análise dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol, pela análise da tolerância à glicose e pela avaliação do peso e da gordura corporal;
  - A função cardíaca dos ratos, pelo registro de pressão e volume intraventricular;
  - A resposta cardíaca à dobutamina;

- O remodelamento cardíaco pela análise do índice cardíaco (pelo cálculo da razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia) e da fibrose cardíaca, por meio da análise histológica dos corações dos ratos;
- A tolerância ao exercício, por meio do teste de tolerância ao exercício;
- A inflamação cardíaca e sistêmica, pela dosagem de TNF- $\alpha$  e IL-6 por meio de ensaio de imunoabsorção enzimática;
- A expressão de iNOS no coração dos ratos, por *Western Blotting*.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. ANIMAIS

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina, sob o protocolo nº 2123200622 (Apendice A).

Foram utilizados ratos machos *Wistar* adultos (300 a 320 g, com 60 dias de idade) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis/SC). Os ratos foram transferidos para o Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas sete dias antes do início dos experimentos. Os ratos foram mantidos em caixas plásticas coletivas (três ratos por caixa) com livre acesso a ração e água. Permaneceram em salas climatizadas (temperatura de  $23 \pm 2^\circ$  C e umidade de  $50 \pm 10\%$ ), com ciclo claro-escuro de doze horas. Os ratos foram divididos em 2 grupos: I) controle e II) ICFEp.

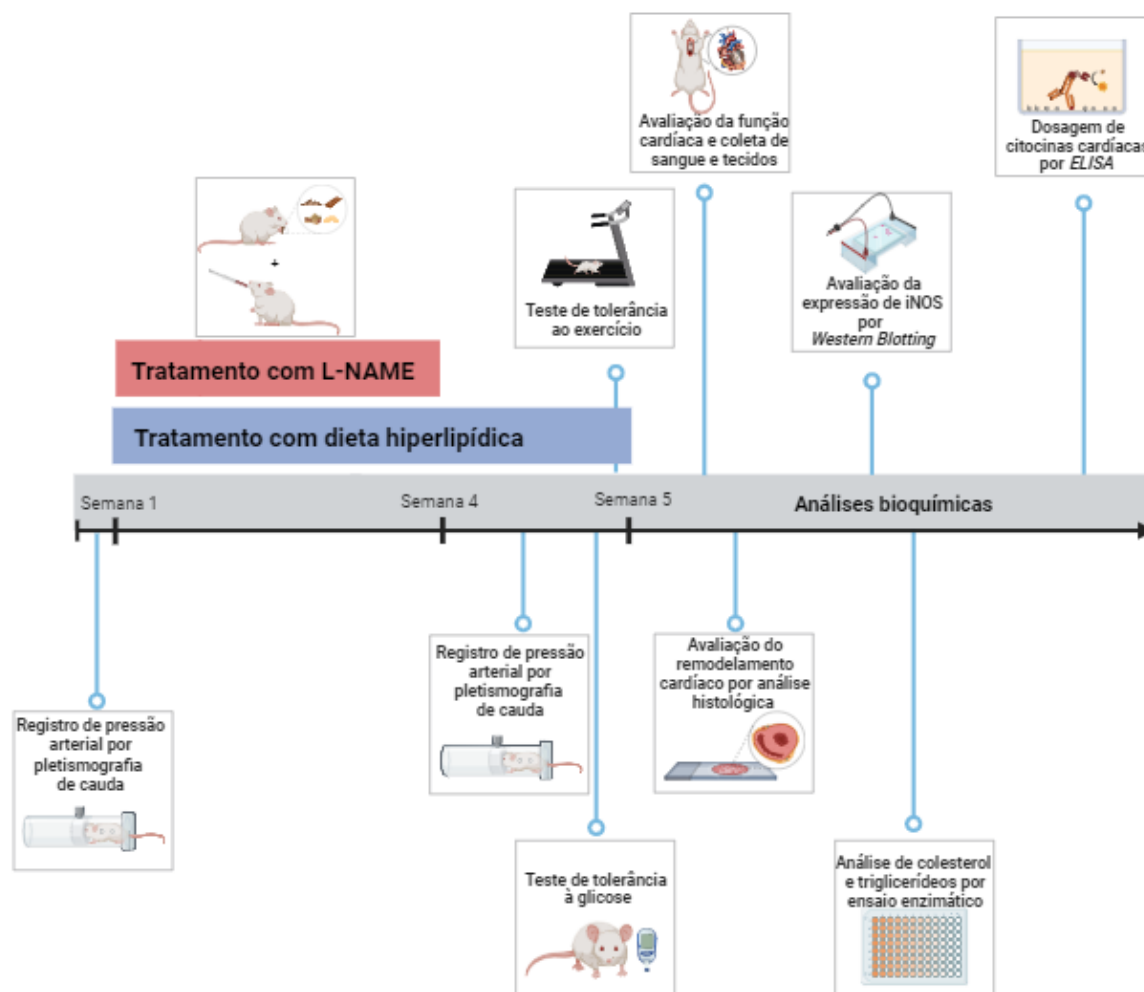
### 5.2. DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental está ilustrado na Figura 3. O grupo I foi tratado com dieta padrão + veículo por cinco semanas e o grupo II foi tratado com L-NAME por quatro semanas + dieta hiperlipídica por cinco semanas.

Antes do início do tratamento e na quinta semana de tratamento foi registrada a pressão arterial por pletismografia de cauda. Entre a quarta e a quinta semana foram realizados o teste de tolerância à glicose e o teste de tolerância ao exercício. Ao final

das cinco semanas do protocolo experimental foi realizada a análise da função cardíaca, coleta de tecidos e sangue para posterior avaliação do remodelamento cardíaco por análise histológica dos corações, da expressão de iNOS por *Western Blotting*, da concentração plasmática de triglicerídeos e colesterol por ensaio enzimático e da concentração plasmática e cardíaca de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) por *ELISA*.

Figura 3: Linha do tempo do protocolo experimental.



A indução da ICPEp foi realizada pelo tratamento de dieta hiperlipídica (ração balanceada padrão, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1) + L-NAME (20mg/kg/dia). Ratos controles foram tratados com dieta padrão. A pressão arterial sistólica foi avaliada antes do início do tratamento e na quinta semana de tratamento, por pletismografia de cauda. Entre a quarta e quinta semana de tratamento foram realizados o teste de tolerância à glicose e o teste de tolerância ao exercício. Ao final das cinco semanas do protocolo experimental foi realizada a análise da função cardíaca, coleta de tecidos e sangue para posterior avaliação do remodelamento cardíaco por análise histológica dos corações, da expressão de iNOS por *Western Blotting*, da avaliação da concentração plasmática de triglicérides e colesterol por ensaio enzimático e da avaliação da concentração plasmática e cardíaca de citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-6) por *ELISA*. ICPEp = insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada; L-NAME = *nitro-L-arginina metil éster*; TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral; IL-6 = Interleucina-6; *ELISA* = *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*; iNOS = óxido nítrico sintase induzível. Imagem: Própria autora, criada com Biorender.com (2023).

### 5.3. INDUÇÃO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA

Para a padronização do modelo de ICFEp, foram realizados experimentos preliminares para escolha da dose de L-NAME (CAS 51298-62-5, Cayman, Michigan, USA) a ser utilizada. Para isso, as doses de 20 mg/kg/dia (MORENO *et al.*, 1995; PECHÁNOVÁ *et al.*, 1999; FERREIRA-MELO *et al.*, 2006), 40 mg/kg/dia (PAULIS *et al.*, 2008; ZEMANČÍKOVÁ; TÖRÖK, 2014) e 70 mg/kg/dia (DOS SANTOS *et al.*, 2010) foram administradas, durante 28 dias, concomitantemente com a administração de dieta hiperlipídica por 35 dias, em diferentes grupos de ratos. A partir da análise da porcentagem de sobreviventes de cada grupo, a dose de 20/mg/dia foi escolhida para a indução da ICFEp nos ratos. Dessa forma, os ratos foram tratados com dieta hiperlipídica por cinco semanas e L-NAME por quatro semanas para indução concomitante de estresse metabólico e hipertensivo nos ratos.

A dieta hiperlipídica foi composta por ração balanceada padrão, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maisena, na proporção de 3:2:2:1, como descrito anteriormente (ESTADELLA *et al.*, 2004, SPERETTA *et al.*, 2012). Todos os componentes da dieta hiperlipídica foram moídos, misturados e oferecidos aos ratos em forma de *pellets*. Essa dieta continha 20g de proteína (17,3% kcal), 20g de gordura total (40% kcal), 48g de carboidrato (41% kcal) e 4g de fibra (1,7% kcal) por cada 100g de dieta (ESTADELLA *et al.*, 2004, SPERETTA *et al.*, 2012). Os ratos controles foram alimentados com dieta padrão. Dessa forma, os ratos receberam dieta padrão (controles) ou dieta hiperlipídica por cinco semanas e foram pesados semanalmente.

O L-NAME foi administrado na dose de 20 mg/kg/dia juntamente com geleia de morango (Sítio Palmará, Antônio Prado, Rio Grande do Sul, Brasil) misturada com água (veículo) em uma seringa. Os ratos do grupo controle receberam apenas a água (veículo). Os ratos foram treinados a ingerir voluntariamente o conteúdo da seringa, conforme realizado previamente em nosso laboratório (ROBERTO *et al.*, 2021; ALFLEN *et al.*, 2023). Inicialmente foi realizada a aclimação à seringa de 1 mL contendo 0,5 mL de água, para o grupo controle, ou geleia de morango + água, para o grupo de ICFEp, por sete dias. Após isso, foi oferecido para cada animal individualmente 0,5 mL de água ou geleia de morango + água + L-NAME em uma seringa de 1 mL de volume, diariamente, pelo período de quatro semanas.

#### 5.4. REGISTRO INDIRETO DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA

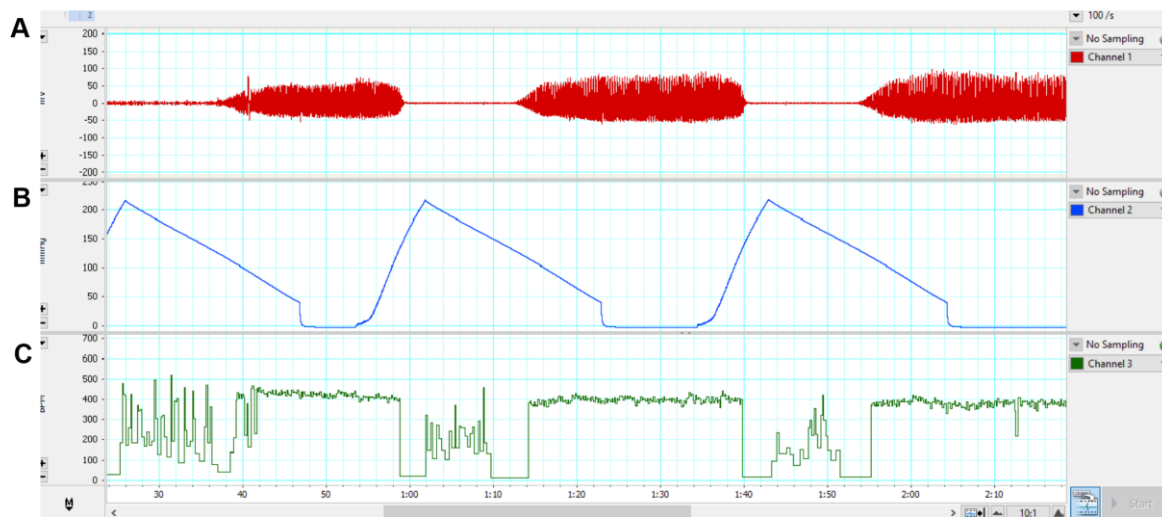
A PAS dos ratos foi mensurada por meio do método de medida do pulso arterial da cauda dos ratos, a pletismografia de cauda, também conhecida como *tail-cuff plethysmography*. As medidas do pulso arterial da cauda dos ratos foram obtidas por um sensor fotoelétrico (Pletismógrafo Coda, Kent Scientific Corporation, Torrington, CO, USA).

Os ratos foram previamente aclimatados por dois dias consecutivos aos contensores e à sala de experimentos antes do procedimento do registro da pressão arterial. Para isso, os ratos permaneceram em uma antessala livre de ruídos por 1 hora. Logo após, na sala de experimentação, ambiente também livre de ruídos, os ratos foram aclimatados aos contensores e ao manguito de borracha, o qual foi encaixado na porção proximal da cauda dos ratos, em uma plataforma pré-aquecida por 5 minutos, a qual é fundamental para permitir a detecção do fluxo sanguíneo na cauda dos animais pelo pletismógrafo.

No terceiro dia, para o registro da PAS, os ratos foram submetidos à aclimação na antessala por 1 hora, depois, na sala de experimentação, foram acomodados no contensor e o manguito de borracha foi encaixado na região proximal da cauda dos ratos e ligado ao esfigmomanômetro, o qual insufla e desinsufla automaticamente em intervalos fixos de aproximadamente 30 segundos.

Próximo ao manguito, um transdutor de pulso cilíndrico (sensor) conectado ao amplificador e conversor analógico digital (Kent Scientific, CODA- Torrington) registrou 3 ou mais medidas consecutivas da PAS dos ratos (Figura 4). A média dessas medidas foi calculada para a obtenção dos valores finais de PAS.

**Figura 4: Registro típico de medidas consecutivas da pressão arterial sistólica obtidas por pletismografia de cauda.**



**(A)** Onda de pulso arterial da cauda (mV; em vermelho); **(B)** Registro de pressão (mmHg; em azul); **(C)** Registro da frequência cardíaca (bpm; em verde). Imagem: Própria autora (2023).

## 5.5. TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Para determinar a glicemia plasmática foi utilizado o sistema de fitas (monitor digital) AccuCheck Performa® (ROCHE, Brasil). Para a análise utilizou-se amostra de sangue obtida da ponta da cauda do rato. O teste de tolerância à glicose foi realizado após jejum de 8 horas. Os ratos permaneceram por 1 hora antes do início do teste em uma sala livre de ruídos. Os ratos receberam a administração de uma solução de glicose 50% (m/v) em solução fisiológica (0,9% de NaCl) a 36°C (1 g/Kg de m.c), por via intraperitoneal. A glicemia foi aferida antes da administração de glicose e nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose.

## 5.6. NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS

As concentrações de triglicerídeos e colesterol total foram determinadas por kits de ensaio enzimático de acordo com as instruções do fabricante (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil), as quais estão descritas a seguir.



Primeiramente, 5µL de amostra de soro foram transferidos para um microtubo contendo 500µL de reagente padrão de trabalho, conforme instruções do fabricante, totalizando três microtubos de solução (amostra + reagente).

Após homogeneização da solução, 250 µL de cada solução foram pipetadas em cada poço, em triplicata, em uma placa de leitura de 96 poços. Para obtenção dos valores de colesterol e triglicerídeos do padrão e do branco, 250 µL dos respectivos reagentes foram pipetados em cada poço, também em triplicata.

Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 10 minutos. A absorbância foi determinada a 500 nm por espectrofotometria (Multileitora Infinite M200, Tecan, Suíça) e, para o cálculo dos dados, foram utilizadas as fórmulas descritas abaixo. Os resultados foram expressos como mg/dL.

$$\text{Colesterol (mg/dL)} = \frac{\text{absorbância da amostra} \times 200}{\text{absorbância do padrão}}$$

$$\text{Triglicerídeos (mg/dL)} = \frac{\text{absorbância da amostra} \times 200}{\text{absorbância do padrão}}$$

## 5.7. ANÁLISE DA FUNÇÃO CARDÍACA

Ao final das cinco semanas de tratamento, foram realizados os experimentos de cateterismo do VE com o cateter pressão-volume.

### 5.7.1. Protocolo anestésico

Os ratos foram anestesiados com a administração de cetamina (80 mg/kg, Dopalen, Sespo, São Paulo, Brasil) e xilazina (20 mg/kg, Anasedan, Sespo, São Paulo, Brasil), pela via intramuscular, e foi realizado reforço a cada 30-40 minutos, conforme necessário. A temperatura corporal dos ratos foi mantida por meio de uma placa aquecida entre 36,9°C e 37,7°C.

### 5.7.2. Registro de pressão e volume intraventricular

Após a confirmação do plano anestésico profundo, pela ausência de respostas a estímulos, foi realizada uma incisão, separação dos tecidos e localização da carótida direita. Em seguida, foi realizado o isolamento da carótida direita e uma pequena incisão nesta carótida, onde o cateter de pressão-volume (SPR-838, Millar Instruments, Houston, TX) foi introduzido até atingir o interior do VE, onde foi fixado para o registro de pressão e volume intraventricular (Figura 5A e 5B), conforme descrito por Pacher e colaboradores (2008). O cateter foi conectado a um sistema de pressão e volume (MPVS-Ultra Single Segment Pressure-Volume Unit®; Millar Instruments, Houston, Texas, EUA), e acoplado ao sistema de aquisição de dados (PowerLab 4/30®, AD Instruments, Castle Hall, Austrália). A confirmação da posição correta do cateter no interior do VE (Figura 5C) foi realizada mediante a observação das curvas ventriculares características de pressão e volume, conforme apresentado na Figura 5D.

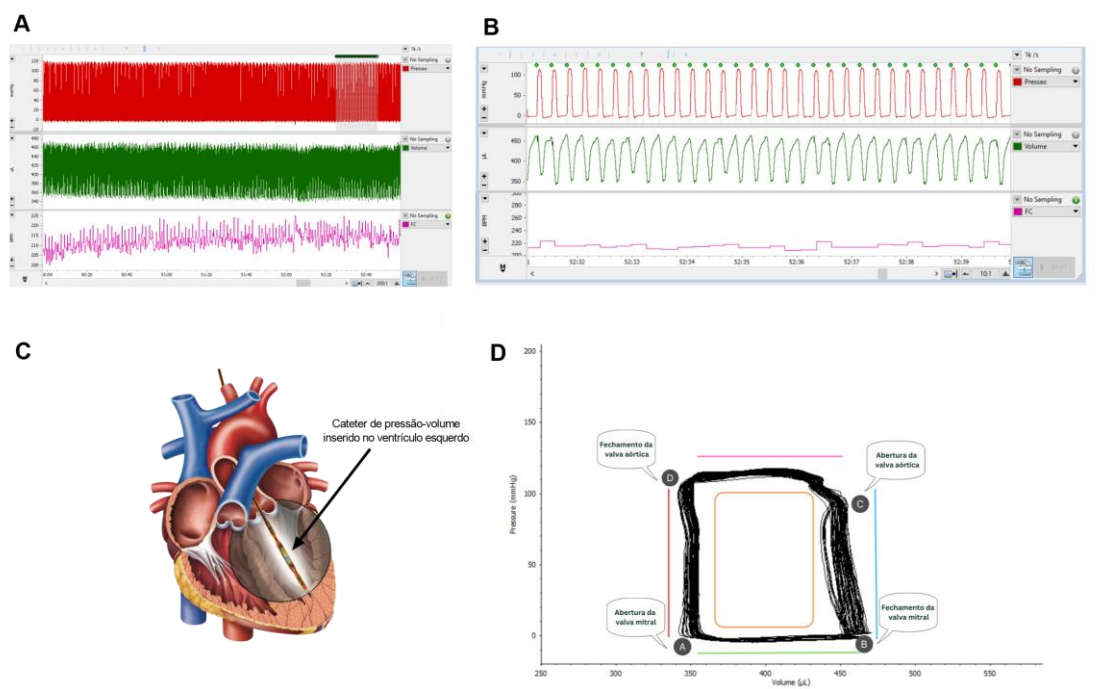
Para a calibração da pressão foi utilizado uma coluna de mercúrio, e 2 pontos de pressão (0 mmHg e 100 mmHg) foram registrados e inseridos no *Workflow* do programa de análise cardíaca PVLoop (LabChart® Pro v. 7.3.3, AD Instruments, Castle Hall, Austrália). Em seguida, para a calibração da condutância foram utilizados valores conhecidos por meio do sistema de informação MPVS-Ultra (MPVS-Ultra®, v2.0, Millar Instruments, Houston Texas, EUA), conforme orientações do fabricante para o cateter SPR-838 (Millar Instruments, Houston, Texas, EUA).

Para a calibração do volume, foi utilizado o método das cubetas. Ao término dos registros de pressão e volume intraventricular, foram coletados aproximadamente 2 mL de sangue heparinizado, pela da artéria carótida, para o preenchimento das cubetas de 3, 4, 5, 6, 7 e 8 mm de diâmetros, as quais correspondem, em volume de sangue, a 63,62; 113,10; 176,71; 254,47; 346,36 e 452,33 µl, respectivamente. As cubetas foram mantidas sobre uma placa aquecida a 37°C, conforme orientações do fabricante (Millar Instruments, Houston, Texas, EUA).

Os valores de pressão, volume e frequência cardíaca (FC) foram registrados. A FEVE, o débito cardíaco (DC), o trabalho sistólico (TS), o volume sistólico (VS), o volume diastólico final (VDF), volume sistólico final (VSF), a pressão diastólica final do VE (PDF), a pressão sistólica final do VE (PSF), valor máximo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda (+dP/dt), valor mínimo da primeira derivada da

pressão ventricular esquerda ( $-dP/dt$ ) e o tempo de relaxamento isovolumétrico ventricular (TAU) foram calculados pelo programa de análise cardíaca PVLoop (LabChart® Pro v. 7.3.3, AD Instruments, Castle Hall, Austrália).

**Figura 5: Registros típicos de parâmetros hemodinâmicos de um rato controle obtidos com o cateter de pressão e volume, inserido no ventrículo esquerdo através da carótida direita.**



(A) Registro típico comprimido e (B) expandido de pressão (em vermelho), volume (em verde) e frequência cardíaca (em rosa). (C) Representação gráfica do cateter de pressão-volume posicionado dentro do ventrículo esquerdo durante a avaliação da função cardíaca. (D) Curva típica de pressão-volume intraventricular obtida com o cateter de pressão-volume posicionado no ventrículo esquerdo, confirmando a posição correta do cateter, e representando os principais eventos ocorridos durante o ciclo cardíaco, sendo estes: a abertura da valva mitral (ponto A), ponto em que inicia-se a fase de enchimento ventricular, representada pela linha verde. O volume presente na câmara cardíaca ao fechamento da valva mitral (ponto B) consiste no volume diastólico final, completando a fase diastólica do ciclo cardíaco. Assim, o ventrículo está cheio de sangue e pronto para o início da sístole. A próxima fase do ciclo cardíaco, inicia-se a partir do fechamento da valva mitral, e consiste na fase de contração isovolumétrica, representada pela linha azul. Durante esta fase, o coração contrai, causando uma elevação da pressão sem alterar o volume ventricular. Quando a pressão no ventrículo excede a pressão na aorta, ocorre a abertura da valva aórtica (Ponto C), e inicia-se a fase de ejeção, representada pela linha rosa. Após essa fase, a pressão dentro da câmara cardíaca cai abaixo da pressão aórtica, levando ao fechamento da valva aórtica (Ponto D), assim, neste ponto completa-se a sístole e inicia a diástole, consistindo na fase de relaxamento isovolumétrico, representada pela linha vermelha, na qual a pressão do ventrículo cai enquanto o volume permanece constante, até a abertura da valva mitral. Por meio da relação entre o tempo e a pressão exercida na fase de relaxamento isovolumétrico são obtidos os valores de TAU. Quando a pressão dentro do ventrículo for menor que a do átrio, ocorre a abertura da valva mitral e o ventrículo começará a encher novamente, iniciando a diástole, concluindo, assim, o ciclo cardíaco. A área geométrica, representada pela linha em laranja, representa o gasto energético necessário para um batimento cardíaco, o qual consiste no Trabalho Sistólico. Imagem: Própria autora (2023). Figura 5C: adaptado de AD Instruments. Guia de seleção de cateter para pesquisa. Figura 5D: adaptado de Boron, Walter & Boulpaep, Emile. Fisiologia Médica. 2ª edição.

## 5.8. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA CARDÍACA À ADMINISTRAÇÃO DE DOBUTAMINA

Após 20-30 minutos de registro, para estabilização e obtenção do registro basal de pressão e volume intraventricular, foi administrada uma dose endovenosa de dobutamina (30 nmol/Kg), seguida por 100 µL de salina, por meio da veia femoral (CORRÊA 2021), para avaliação da resposta cardíaca dos ratos. Assim, a função cardíaca foi avaliada no ponto basal e após a administração de dobutamina.

## 5.9. COLETA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Ao final do protocolo de cateterismo do VE, foi administrada uma nova dose anestésica (30% da dose inicial de cetamina e xilazina), e após a confirmação da anestesia profunda, foi realizada a coleta de sangue pela carótida direita para obtenção de plasma e soro para a análise dos níveis de triglicérides, colesterol e de citocinas. Após a coleta de sangue, o coração foi removido, consistindo no procedimento cirúrgico terminal. O coração foi pesado, e sua porção apical foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada em freezer -80° C para a posterior análise de citocinas e da expressão de iNOS por *Western Blotting*. A porção basal do coração foi fixada em formol 10%, e, posteriormente, embebida em parafina para a análise histológica. Em sequência, o pulmão, a gordura retroperitoneal e a gordura epididimal também foram coletados e pesados. A tíbia foi removida e seu comprimento foi obtido para o cálculo da razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia e o cálculo da razão entre o peso do pulmão e o comprimento da tíbia.

## 5.10. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO CORAÇÃO

Para as análises histológicas, a porção basal do coração foi fixada em formol 10% por 24 horas, posteriormente, transferida para álcool 70% e processada de acordo com o protocolo descrito no Quadro 1.

**Quadro 1: Protocolo de processamento das amostras de coração para análises histológicas.**

<b>Reagente</b>	<b>Tempo</b>
Álcool 90%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Álcool 100%	1 hora
Xilol / Álcool 1:1	1 hora
Xilol	1 hora
Parafina I	1 hora
Parafina II	1 hora

Após o processamento, os corações foram emblocados em parafina, e aguardou-se pelo menos 24 horas para o endurecimento da parafina. Os blocos foram submetidos a cortes seriais de 5  $\mu\text{m}$ , por meio de um micrótomo (Leica RM2255). Posteriormente, os cortes histológicos foram corados com tricomo de Gomori, conforme protocolo descrito no Quadro 2.

**Quadro 2: Protocolo de coloração com tricomo de Gomori.**

<b>Reagente</b>	<b>Tempo</b>
Xilol	3 minutos
Xilol	3 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 90%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
Água corrente	1 minuto
Água destilada	1 minuto
Hematoxilina de Harris	8 minutos
Água corrente	1 minuto
Água destilada	1 minuto
Tricomo de Gomori	15 minutos
Álcool 95%	1 minuto
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 100%	3 minutos
Álcool 100% + Xilol 1:1	3 minutos
Xilol	3 minutos

Ao fim do processo de coloração, foi adicionado a cada corte histológico o meio de montagem (Entellan®, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), e, em seguida, foi aplicada uma lamínula em cada corte histológico.

Após a secagem do meio de montagem por pelo menos 24 horas, os cortes histológicos corados com tricomo de Gomori foram utilizados para a obtenção de imagens de campos localizados na parede livre do VE, com o auxílio de um microscópio em aumento 40x (Microscópio Olympus BX41).

A quantificação do colágeno intersticial foi realizada no programa ImageJ (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, disponível na internet no site <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) e o cálculo do valor médio da porcentagem de colágeno de 7-11 campos de cada rato foi realizado.

#### 5.11. TESTE DE TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO

Os animais foram submetidos ao teste de tolerância ao exercício com o objetivo de avaliar a sua resistência a um protocolo de exercício incremental.

##### 5.11.1. Aclimação à esteira

Antes do teste de tolerância ao exercício, foi realizada a aclimação dos ratos ao exercício na esteira por 3 dias consecutivos, caminhando na velocidade de 27,7 cm/s, por 10 minutos. O protocolo foi adaptado de (AGUIAR *et al.*, 2018; FRANÇA 2018).

##### 5.11.2. Exercício gradativo na esteira

Após a aclimação à esteira, os ratos foram submetidos ao teste de tolerância ao exercício, o qual consistiu em exercício gradativo na esteira com incrementos na velocidade de 5,55 cm/s a cada 3 min, iniciando em 27,7 cm/s. O teste perdurou até a intensidade máxima atingida por cada rato, definida como o nível máximo de exaustão dos ratos (momento em que os ratos permaneciam mais de 10 segundos apoiados na baia de proteção). Este protocolo foi adaptado de (AGUIAR *et al.*, 2018; FRANÇA 2018). O tempo de corrida (s) foi obtido e a distância percorrida (m) foi calculada de acordo com o tempo de corrida e velocidade (m/s).

#### 5.12. CONCENTRAÇÃO CARDÍACA E PLASMÁTICA DE CITOCINAS

A concentração de citocinas no coração foi mensurada com a utilização de kits de ensaio imunoenzimático (*ELISA* do inglês, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), segundo as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Para dosagem de IL-6 e TNF- $\alpha$ , aproximadamente 100 mg de coração, congelados em nitrogênio líquido, foram homogeneizados em 500  $\mu$ L de tampão de extração [Tris 10 mM pH 7.4 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), NaCl 150 mM (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), Triton X-100 1% (v/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos)] com auxílio de um homogeneizador (Ultra-Turrax, velocidade 2, 10 s, 4°C).

Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (13.000 xg, 4 °C, 10 min), e o sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem das citocinas, de acordo com as instruções do fabricante.

A absorbância foi determinada a 450 nm por espectrofotometria (Multileitora Infinite M200, Tecan, Suíça) e, após interpolação dos dados, os resultados foram expressos como pg/mL.

### 5.13. EXPRESSÃO DE INOS POR WESTERN BLOTTING

#### 5.13.1. Preparo das amostras

Aproximadamente 100 mg de coração, congelados em nitrogênio líquido, foram pulverizados e transferidos para microtubos contendo 200  $\mu$ L de solução tampão de lise [Coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos); Ortovanadato de sódio 100 mM; Fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM em T-Per (Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific, Rockford, IL, Estados Unidos)] e vortexados. Em seguida, as amostras foram sonicadas (60 W; 5 segundos) e incubadas por 1 hora no gelo. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas (11.000 rpm; 20 minutos; 4 °C) para obtenção do sobrenadante, o qual foi coletado e separado em duas alíquotas, uma para quantificação de proteínas totais e a outra foi adicionada ao tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção 1:6 (v/v). Logo após, as amostras foram fervidas (100 °C; 10 minutos) para a eletroforese. A concentração de proteínas totais foi mensurada pelo método *Bradford*, utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina, em triplicata, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Posteriormente foi realizada a interpolação dos resultados.

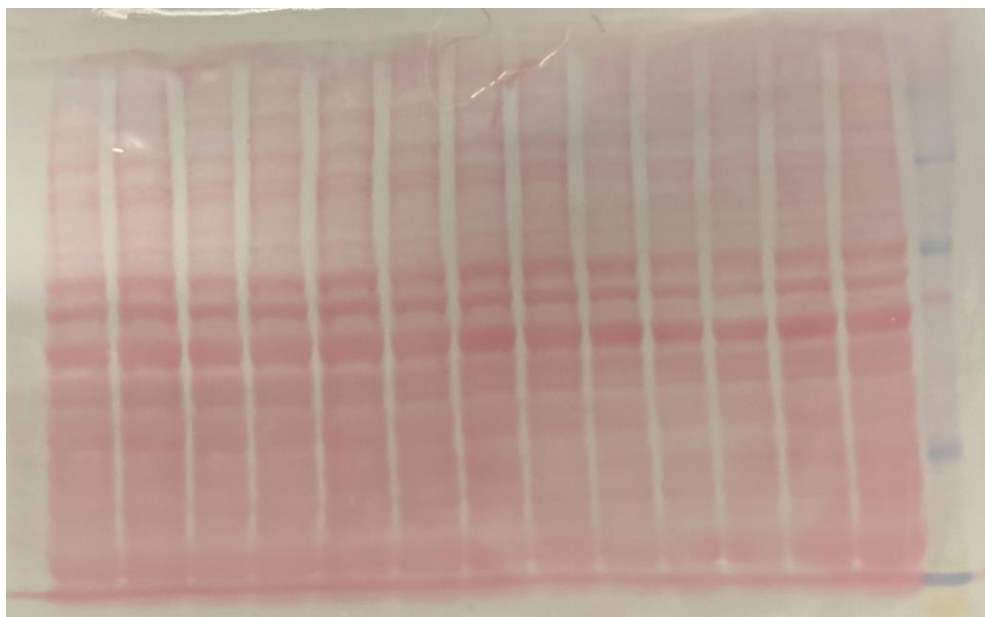


### 5.13.2. Eletroforese e eletrotransferência

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Um gel de entrada a 5% e um gel de separação a 7%, contendo 15 poços por gel, foram preparados e, logo após, para o *loading* dos géis, 80 µg de proteína de cada amostra foram adicionadas por poço. No primeiro poço, foi adicionado 5 µL do padrão de peso molecular (BLUeye Prestained Protein Ladder, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos).

A eletroforese foi realizada a 4 °C em cubas específicas (Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, BioRadLaboratoriesInc, Hercules, CA, Estados Unidos), contendo tampão de corrida e voltagem fixa em 100 V, por aproximadamente 2 horas. Ao término da eletroforese, foi realizada a eletrotransferência (100 V; 1 hora e 30 minutos; 4 °C), em tampão de transferência, na qual as proteínas dos géis foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µM). Após a eletrotransferência, as membranas foram coradas com vermelho de *Ponceau* 0,2% (v/v) em ácido tricloroacético 3% (v/v) para certificação da transferência (Figura 6). Para remoção do corante, as membranas foram lavadas por 3 vezes consecutivas, 10 minutos cada lavagem, sob agitação, com solução salina tamponada com Tris (TBS-T, do inglês *Tris-Buffered Saline*) (TrisHCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 0,05% (v/v), pH 7,5). Em seguida, foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas, com leite desnatado 5% (p/v) em TBS-T, sob agitação, por 1 hora, em temperatura ambiente.

**Figura 6: Membrana após a eletrotransferência durante protocolo de *Western Blotting*.**



Membrana corada com vermelho de Ponceau para certificação da transferência de proteínas, após a eletrotransferência. Fonte: Própria autora (2023).

### **5.13.3. Imunodeteccção**

Foi realizada a incubação das membranas *overnight*, por aproximadamente 20 horas em câmara fria (4 °C) com os anticorpos primários policlonal coelho anti-NOS-2 [1:500 (Leite desnatado 3% p/v em TBS-T; azida 0,02% v/v) – Santa Cruz, Biotechnology, CA, Estados Unidos] e monoclonal anti- $\beta$ actina conjugado com peroxidase [1:25000 (Leite desnatado 5% p/v em TBS-T) – Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos]. Em seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes, 10 minutos cada lavagem, com TBS-T, sob agitação, para retirada dos anticorpos excedentes. A membrana incubada com anticorpo primário anti-NOS-2 foi então incubada por 1 hora, em temperatura ambiente, ao anticorpo secundário, específico para o anticorpo primário [1:5000, cabra anti-coelho, (Leite desnatado 3% p/v de TBS-T) - Bio-Rad Laboratories, CA, Estados Unidos].

Logo após essa incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes para retirada dos anticorpos não ligados; cada lavagem teve a duração de 10 minutos. A imunodeteccção foi realizada com a utilização do kit de deteccção de substrato quimioluminescente (Hybond-ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, Reino

Unido). Para capturar as imagens das bandas, foi utilizada câmera CCD e aparelho ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). A quantificação da intensidade das bandas foi feita por densitometria (ImageJ, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA, disponível na internet no site <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) e os valores de densitometria encontrados nas bandas de interesse foram normalizados pelos valores encontrados na marcação para o controle endógeno ( $\beta$ actina).

#### 5.14. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise da curva de sobrevivência foi utilizado o teste de Mentel-Cox. Para os dados de natureza quantitativa, primeiramente, foi aplicado o teste de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e ao ser observado uma distribuição normal, foi aplicado o teste para avaliar se a variância era homogênea (teste de Levene). Após certificado que os dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade da variância, utilizou-se um teste paramétrico para análise dos dados. Além disso, o nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

Os resultados foram expressos com a média  $\pm$  desvio padrão (DP). Foram utilizados o teste t de *Student* não pareado, ou o teste de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo *post-hoc* de *Sidak*. Os dados foram analisados estatisticamente e os gráficos construídos pelo *GraphPad Prism* versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 6. RESULTADOS

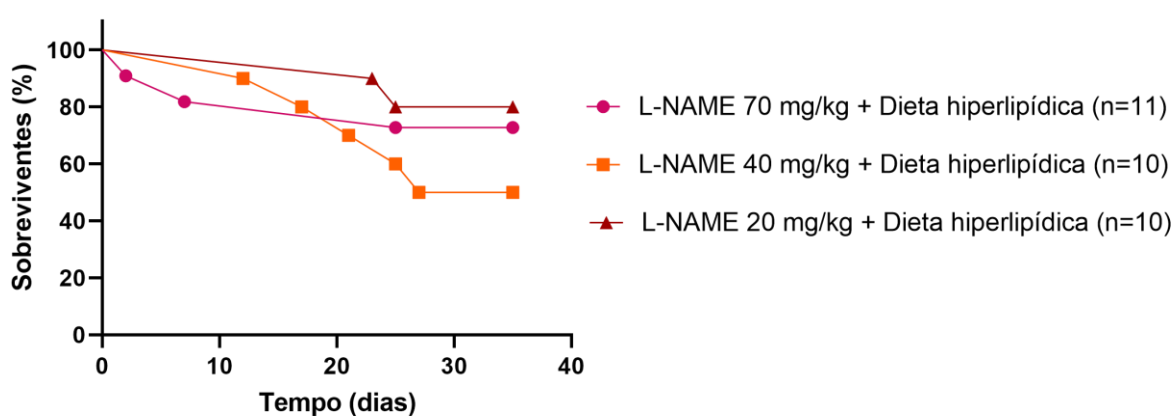
### 6.1. O TRATAMENTO COM L-NAME NA DOSE DE 20 MG/KG/DIA APRESENTOU A MAIOR PORCENTAGEM DE SOBREVIVENTES EM RELAÇÃO ÀS DOSES DE 40 MG/KG/DIA E 70 MG/KG/DIA

Em experimentos preliminares, para a padronização do modelo de ICFEp, três doses de L-NAME (20 mg/kg/dia, 40 mg/kg/dia e 70 mg/kg/dia) foram administradas

durante 28 dias, concomitantemente com a dieta hiperlipídica por 35 dias, em três grupos diferentes de ratos.

As doses de 40 mg/kg/dia e 70 mg/kg/dia apresentaram 50% e 73% de sobrevivência, respectivamente, enquanto que a dose de 20 mg/kg/dia apresentou 80% de sobrevivência ( $p=0,3450$ ; Figura 7), assim sendo a dose com a maior porcentagem de sobreviventes.

**Figura 7: Curva de sobrevivência de ratos submetidos ao tratamento de L-NAME nas doses de 20 mg/kg/dia, 40 mg/kg/dia e 70 mg/kg/dia.**



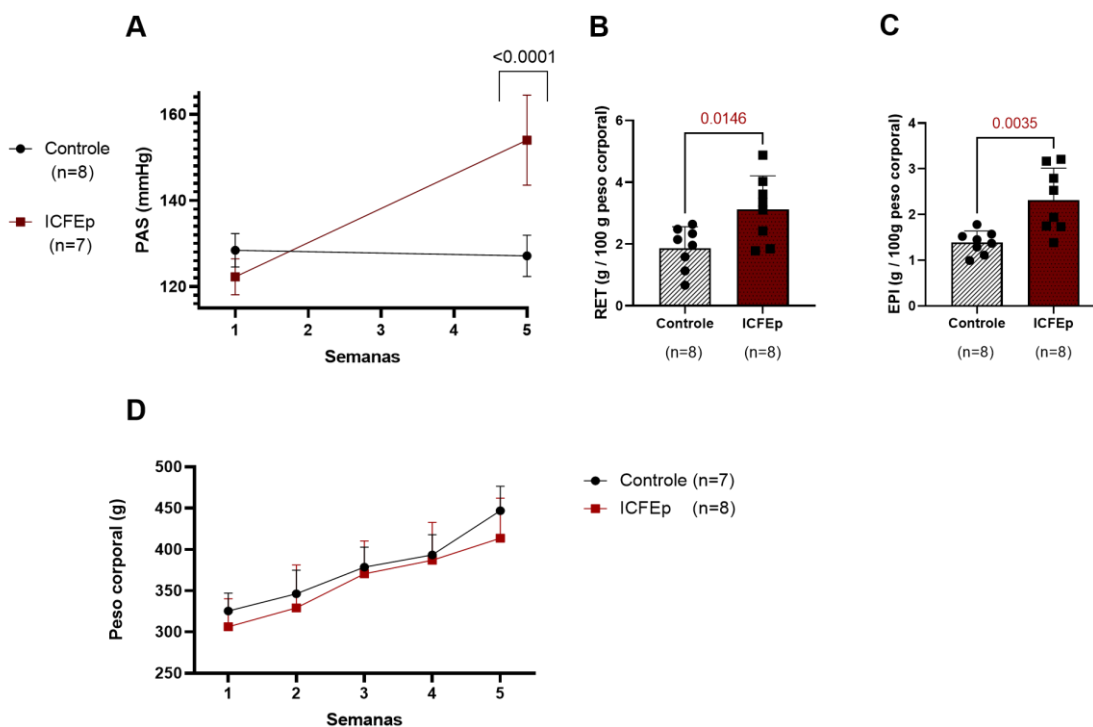
Os ratos foram submetidos ao tratamento de L-NAME nas doses de 20 mg/kg/dia, 40 mg/kg/dia e 70 mg/kg/dia, por 28 dias, concomitantemente com a administração de dieta hiperlipídica por 35 dias. O tratamento com L-NAME na dose de 20 mg/kg/dia, concomitantemente com a administração de dieta hiperlipídica, apresentou a maior porcentagem de sobrevivência de ratos. As diferenças foram analisadas com o teste de Mantel-Cox. L-NAME = N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster.

## 6.2. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA AUMENTOU A PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA, A GORDURA CORPORAL E NÃO ALTEROU O PESO CORPORAL DOS RATOS

Os ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram aumento da PAS ( $p<0,0001$ ; Figura 8A), da gordura retroperitoneal ( $p=0,0146$ ; Figura 8B) e da gordura epididimal ( $p=0,0035$ ; Figura 8C), quando comparados ao grupo controle.

No entanto, o ganho de peso corporal não foi diferente ao longo das cinco semanas de tratamento entre os dois grupos experimentais ( $p= 0,0539$ ; Figura 8D).

**Figura 8: O tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica aumentou a pressão arterial sistólica, a gordura corporal e não alterou o peso corporal dos ratos.**



**(A)** Ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram maiores valores de PAS na quinta semana de tratamento, avaliada por pletismografia de cauda, e **(B)** aumento de gordura retroperitoneal e **(C)** epididimal quando comparados ao grupo controle. **(D)** Não houve diferença no peso corporal entre os dois grupos ao longo das cinco semanas de tratamento. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP. As diferenças na PAS e peso corporal foram analisadas por ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* de *Sidak*. As diferenças em RET e EPI foram analisadas pelo T-test de *Student*. PAS = Pressão arterial sistólica; RET = gordura retroperitoneal; EPI = gordural epididimal.

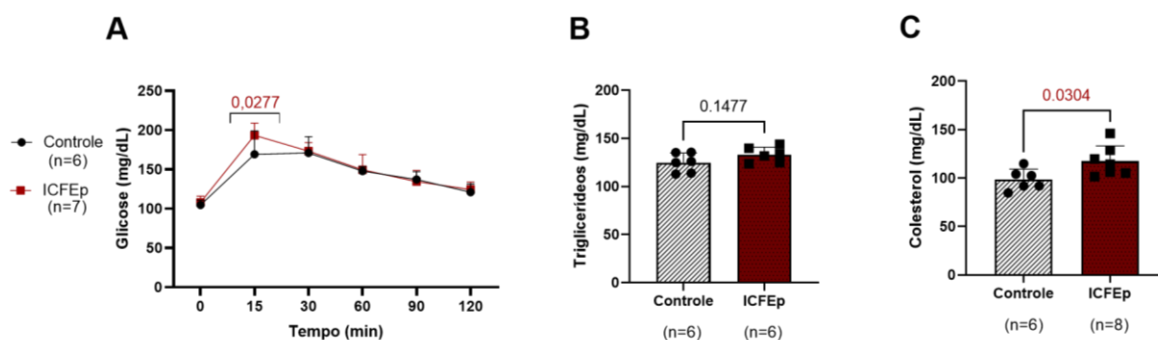
### 6.3. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA REDUZIU A TOLERÂNCIA À GLICOSE, NÃO ALTEROU OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TRIGLICERÍDEOS, PORÉM, AUMENTOU OS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE COLESTEROL DOS RATOS

Ao avaliar a tolerância à glicose nos ratos, foi observado que após 15 minutos da administração intraperitoneal de glicose, houve uma redução na depuração da glicose em ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica ( $p=0,0277$ ; Figura 9A). No entanto, a depuração da glicose foi recuperada nos tempos seguintes (30, 60, 90 e 120 min; Figura 9A). Esses resultados mostram uma redução na tolerância à glicose

nos ratos submetidos ao tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica em comparação aos ratos do grupo controle.

Além disso, não houve diferença na concentração plasmática de triglicerídeos ( $p=0,1477$ ; Figura 9B) entre os dois grupos. Porém, os ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram maior concentração plasmática de colesterol ( $p=0,0304$ ; Figura 9C) quando comparados aos ratos do grupo controle.

**Figura 9: O tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica reduziu a tolerância à glicose, não alterou os níveis plasmáticos de triglicerídeos, porém, aumentou os níveis plasmáticos de colesterol dos ratos.**



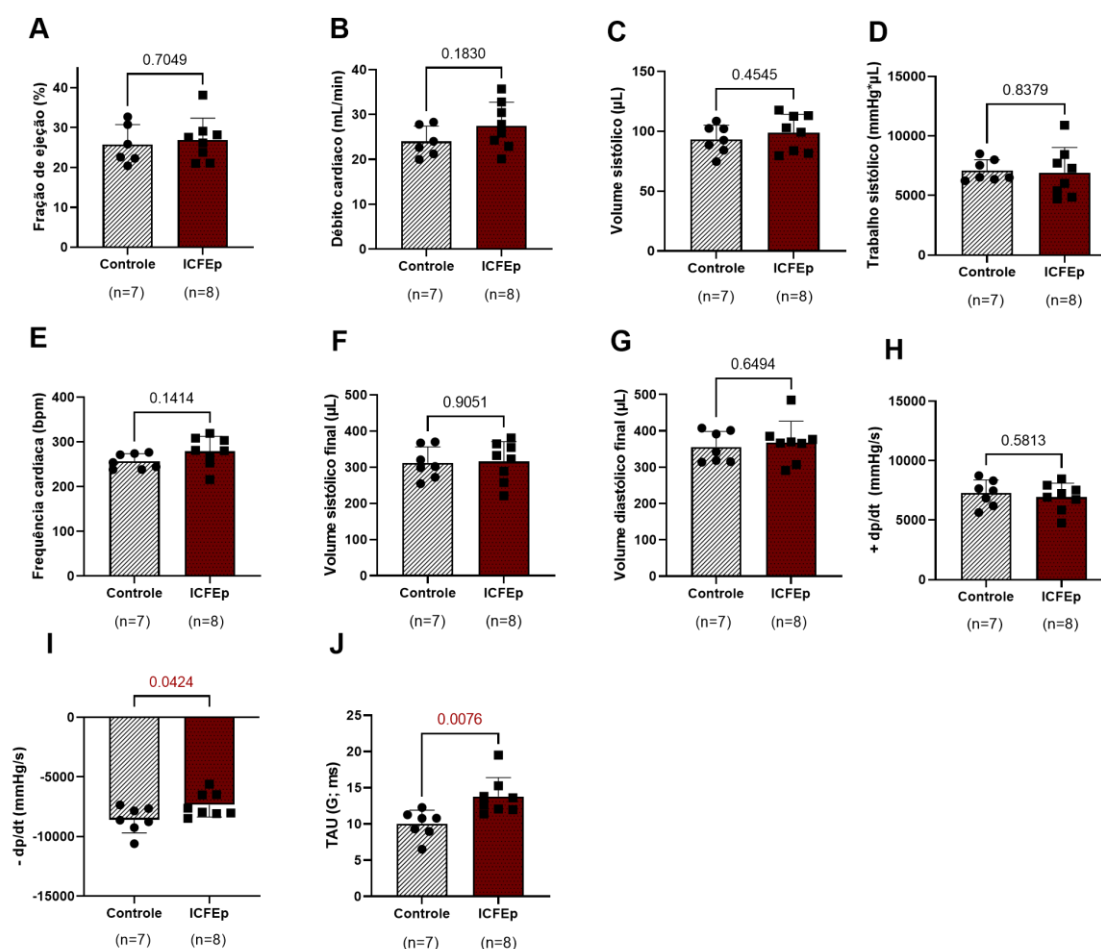
(A) Ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram maiores níveis plasmáticos de glicose 15 minutos após administração intraperitoneal de solução de glicose, porém não houve diferença nos níveis de glicose entre os grupos no tempo 0 e após a aplicação de solução de glicose, nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos. (B) A concentração plasmática de triglicerídeos foi semelhante nos dois grupos experimentais. (C) Houve aumento da concentração plasmática de colesterol nos ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP. Os dados de glicemia foram avaliados pela ANOVA de duas vias seguido de *post-hoc* de Sidak. As diferenças na concentração plasmática de colesterol e triglicerídeos foram analisadas com T-test de Student.

#### 6.4. DISFUNÇÃO DIASTÓLICA E FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA EM RATOS TRATADOS COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA

Ao analisar a função cardíaca dos ratos não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais nos valores de fração de ejeção ( $p=0,7049$ ; Figura 10A), débito cardíaco ( $p=0,1830$ ; Figura 10B), volume sistólico ( $p=0,4545$ ; Figura 10C), trabalho sistólico ( $p=0,8379$ ; Figura 10D), frequência cardíaca ( $p=0,1414$ ; Figura 10E), volume sistólico final ( $p=0,9051$ ; Figura 10F), volume diastólico final ( $p=0,6494$ ; Figura 10G) e  $+dp/dt$  ( $p=0,5813$ ; Figura 10H). No entanto, os ratos tratados com dieta hiperlipídica e L-NAME apresentam menores valores de  $-dp/dt$  ( $p=0,0424$ ; Figura 10I), indicando um menor índice de relaxamento do VE, e maiores valores de TAU

( $p=0,0076$ ; Figura 10J), caracterizando uma disfunção diastólica do VE, apesar da fração de ejeção preservada.

**Figura 10: O tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica levou à redução da função diastólica sem alterar a fração de ejeção.**



(A) A fração de ejeção, (B) débito cardíaco, (C) volume sistólico, (D) trabalho sistólico, (E) frequência cardíaca, (F) volume sistólico final, (G) volume diastólico final e (H) +dp/dt foram semelhantes em ambos os grupos. (I) Os ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram menores valores de  $-dp/dt$  e (J) maiores valores de TAU, caracterizando a disfunção diastólica do VE. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP. T-test de *Student*. +dp/dp = valor máximo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda;  $-dp/dt$  = valor mínimo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda; TAU = tempo de relaxamento isovolumétrico ventricular.

## 6.5. RATOS TRATADOS COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA APRESENTARAM PREJUÍZO NA FUNÇÃO DIASTÓLICA DURANTE A RESPOSTA CARDÍACA À DOBUTAMINA

Com o cateter de pressão-volume posicionado no VE dos ratos, após o registro basal, foi registrado o efeito da dobutamina, um agente inotrópico positivo, na pressão e volume intraventricular, conforme os dados apresentados na Tabela 1. As variações de fração de ejeção ( $p=0,9407$ ), débito cardíaco ( $p=0,9658$ ), trabalho sistólico ( $p=0,6107$ ), volume sistólico ( $p=0,7300$ ), volume sistólico final ( $p=0,2037$ ), volume diastólico final ( $p=0,1811$ ), frequência cardíaca ( $p=0,9352$ ), pressão diastólica final ( $p=0,4942$ ), pressão sistólica final ( $p=0,8533$ ) e  $+dp/dt$  ( $p=0,5764$ ), após a administração de dobutamina, foram semelhantes entre os grupos experimentais. Entretanto, os ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram menores valores no delta da  $-dp/dt$  quando comparados ao grupo controle ( $p=0,0265$ ), indicando um prejuízo no relaxamento do VE. No entanto, não houve diferença entre no delta dos valores de TAU ( $p=0,8003$ ) entre os grupos.



**Tabela 1: Delta dos efeitos da dobutamina sobre a função cardíaca.**

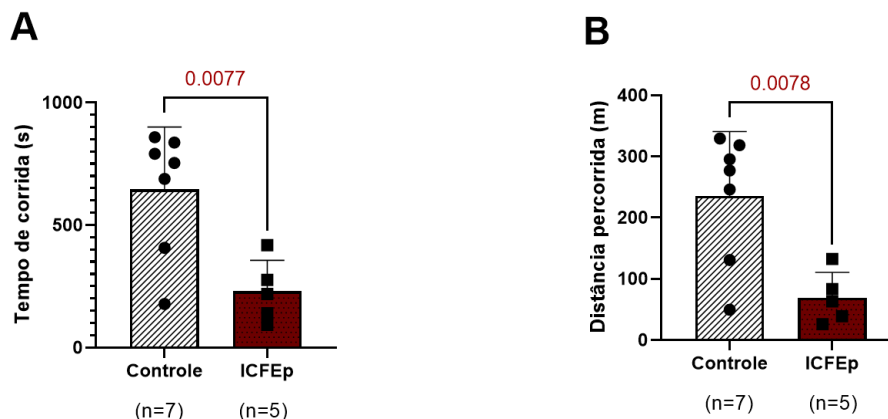
	Controle	ICFep	Valor de p
FEVE (%)	4,326 ± 2,745	4,326 ± 2,745	0,9407
DC (mL/min)	8,884 ± 4,863	8,713 ± 7,590	0,9658
TS (mmHg*µL)	3340 ± 2443	4125 ± 2616	0,6107
VS (µL)	20,97 ± 9,443	17,56 ± 19,75	0,7300
VSF (µL)	15,280 ± 23,13	15,24 ± 27,39	0,2037
VDF (µL)	17,28 ± 11,85	10,37 ± 4,318	0,1811
FC (bpm)	35,52 ± 27,67	36,69 ± 21,01	0,9352
PDF (mmHg)	0,061 ± 4,479	1,363 ± 1,730	0,4942
PSF (mmHg)	33,45 ± 10,65	31,99 ± 14,61	0,8533
+ dp/dt (mmHg/s)	4565 ± 1821	5291 ± 2340	0,5764
- dp/dt (mmHg/s)	-4155 ± 1182	-2366 ± 1302*	0,0258
TAU (G; ms)	0,814 ± 1,792	1,32 ± 4,037	0,8003

Ao registrar os efeitos da dobutamina (30 nmol/kg) na pressão e volume intraventricular, foi observado valores semelhantes no delta da FEVE, DC, TS, VS, VSF, VDF, FC, PDF, PSF e +dp/dt entre os grupos experimentais. No entanto, ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram uma resposta reduzida no delta da -dp/dt quando comparados ao grupo controle, enquanto que os valores de Tau se mantiveram semelhantes entre os dois grupos. Os valores são apresentados como médias ± DP. T-test de *Student*. (Controle n=5; ICFep n =7); FEVE = Fração de ejeção do ventrículo esquerdo; DC = débito cardíaco; TS = trabalho sistólico; VS = volume sistólico; VSF = volume sistólico final; VDF = volume diastólico final; FC = frequência cardíaca; PDF = pressão diastólica final; PSF = pressão sistólica final; +dp/dt = valor máximo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda; -dP/dt = valor mínimo da primeira derivada da pressão ventricular esquerda; TAU = tempo de relaxamento isovolumétrico ventricular.

## 6.6. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA REDUZIU A TOLERÂNCIA AO EXERCÍCIO DOS RATOS

Os ratos foram submetidos ao teste gradativo de exercício na esteira com aumento de velocidade a cada 3 minutos para avaliação da tolerância ao exercício. Ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram redução no tempo de corrida (p=0,0077; Figura 11A) e na distância percorrida (p=0,0078; Figura 11B) em relação ao grupo controle.

**Figura 11: O tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica reduziu a tolerância ao exercício dos ratos.**

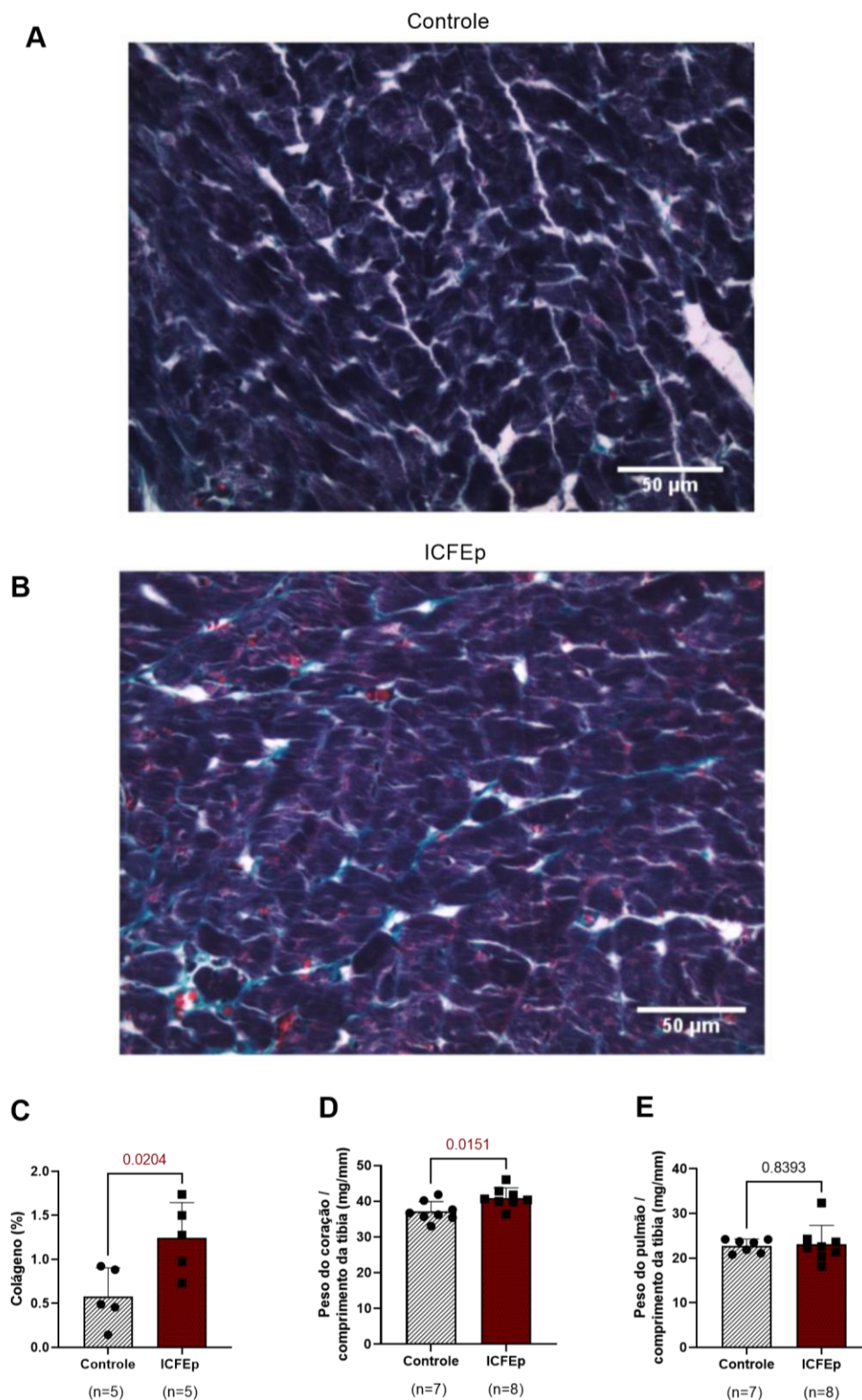


**(A)** Ratos submetidos ao tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram redução no tempo de corrida e **(B)** na distância percorrida quanto comparados ao grupo controle. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP. T-test de *Student*.

#### 6.7. RATOS TRATADOS COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA APRESENTARAM HIPERTROFIA E FIBROSE CARDÍACA, PORÉM, NÃO APRESENTARAM ALTERAÇÃO NO PESO DO PULMÃO

A partir de análises histológicas de corações corados com tricomo de Gomori, responsável pela coloração de colágeno em verde, foi observado que ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram maior porcentagem de colágeno intersticial ( $p=0,0204$ ; Figuras 12A, B e C) em relação ao grupo controle, indicando fibrose cardíaca. Observou-se, também, maiores valores da razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia ( $p=0,0151$ ; Figura 12D), indicando hipertrofia cardíaca nesses ratos, em relação ao grupo controle. No entanto, os valores da razão entre o peso do pulmão e o comprimento da tíbia foram semelhantes em ambos os grupos ( $p=0,8393$ ; Figura 12E).

**Figura 12: Ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram fibrose e hipertrofia cardíaca, porém não houve diferença no peso do pulmão.**

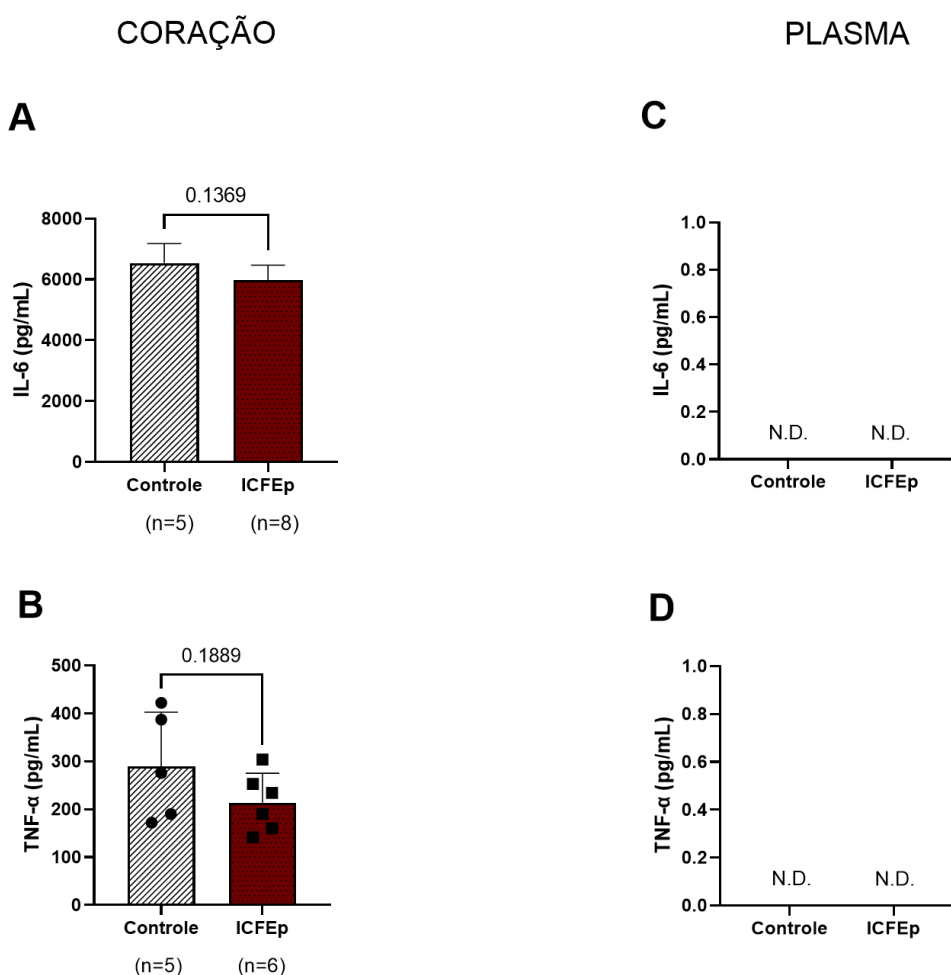


**(A)** Imagens representativas da parede livre do VE de um rato controle e **(B)** de um rato tratado com dieta hiperlipídica e L-NAME, corados com tricomo de Gomori (colágeno em verde). **(C)** Ratos expostos ao tratamento com dieta hiperlipídica e L-NAME apresentaram maior porcentagem de colágeno no coração e **(D)** maiores valores na razão entre o peso do coração e o comprimento da tibia. **(E)** Não houve diferença na razão entre o peso do pulmão e o comprimento da tibia entre os dois grupos. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP. T-test de *Student*.

## 6.8. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA NÃO ALTEROU OS NÍVEIS CARDÍACOS DE CITOCINAS (IL-6 E TNF- $\alpha$ )

A partir da dosagem de IL-6 e TNF- $\alpha$  no coração e no plasma, por *ELISA*, foi observado que não houve diferença nos níveis cardíacos de IL-6 ( $p=0,1369$ ; Figura 13A) e TNF- $\alpha$  ( $p=0,1889$ ; Figura 13B) entre os grupos e não foram detectados IL-6 (Figura 13C) e TNF- $\alpha$  (Figura 13D) no plasma de ambos os grupos experimentais.

**Figura 13: O tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica não alterou os níveis cardíacos de citocinas (IL-6 e TNF- $\alpha$ ).**

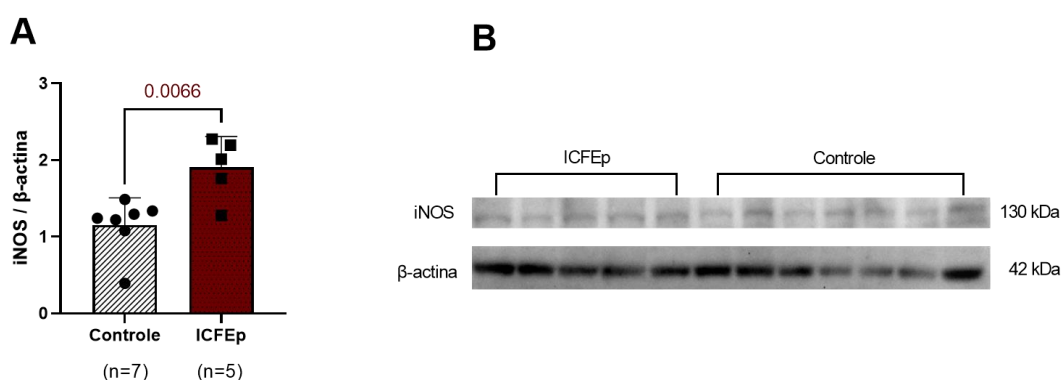


(A) Não foi observada diferença nos níveis cardíacos de IL-6 e (B) TNF- $\alpha$  entre os grupos experimentais e não foram detectados (C) IL-6 e (D) TNF- $\alpha$  no plasma dos ratos. Os valores são apresentados como médias  $\pm$  DP. T-test de *Student*. IL-6 = Interleucina 6; TNF- $\alpha$  = Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ; N.D. = Não detectado.

## 6.9. O TRATAMENTO COM L-NAME E DIETA HIPERLIPÍDICA AUMENTOU A EXPRESSÃO DE INOS NO CORAÇÃO DOS RATOS

A análise da expressão da enzima iNOS, por *Western Blotting*, no coração, mostra que os ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram uma expressão aumentada de iNOS no coração em relação ao grupo controle ( $p=0,0066$ ; Figura 14A e 14B).

**Figura 14: Aumento na expressão de iNOS nos corações de ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica.**



**(A)** Ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram maior razão entre iNOS e β-Actina, obtida por densitometria, comparados ao grupo controle. **(B)** Imunodeteção para iNOS (130 kDa) e β-Actina (42 kDa). Os valores são apresentados como médias ± DP. T-test de *Student*.

## 7. DISCUSSÃO

A ICFEp é predominantemente caracterizada pela presença de múltiplas comorbidades, as quais por meio da inflamação sistêmica e cardíaca, levam a alterações na estrutura e na função do coração, caracterizando um prejuízo na função diastólica do VE, mantendo-se a fração de ejeção preservada (TANAI; FRANTZ, 2015).

A reprodução dessas características observadas em pacientes com ICFEp em modelos animais é considerada um desafio. Este fato resulta em tratamentos limitados para estes pacientes, que sejam capazes de diminuir as hospitalizações por eventos cardiovasculares e a mortalidade, e de aumentar a qualidade de vida dos pacientes (WITHAAR *et al.*, 2021; DESAI *et al.*, 2023). Além disso, limitações em modelos pré-

clínicos de ICfEp também contribuem para limitações na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos desta doença (WITHAAR *et al.*, 2021; DESAI *et al.*, 2023).

No presente estudo, a partir do tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica, um protocolo experimental utilizado para induzir ICfEp em camundongos, proposto por Schiattarella e colaboradores (2019), buscou-se, pela primeira vez, replicar as características encontradas em humanos com ICfEp, em ratos, com o objetivo de auxiliar na busca por um modelo animal adequado para pesquisa e ampliar as possibilidades de escolha da espécie a ser utilizada neste modelo em futuros estudos, atualmente restrita aos camundongos.

Para isso, foi utilizado o L-NAME, um inibidor não-seletivo da enzima óxido nítrico sintase, atuando como um agente hipertensor e determinante para o estresse hemodinâmico induzido nestes ratos. Assim, o primeiro resultado desse estudo mostra que a PAS dos ratos estava elevada ao final das cinco semanas de tratamento. É importante mencionar que um dos principais fatores envolvidos nas alterações observadas no VE em pacientes com ICfEp é a pressão arterial elevada (TANAI; FRANTZ, 2015). Isso porque a hipertensão arterial causa uma sobrecarga no coração, sendo determinante para o remodelamento cardíaco, levando a alterações estruturais em cardiomiócitos, proteínas sarcoméricas e fibroblastos (TANAI; FRANTZ, 2015).

A obesidade e a hipertensão arterial são as comorbidades mais prevalentes na ICfEp (SINGH; MEHTA, 2018). Devido ao fato de que grande parte dos indivíduos com ICfEp apresentam sobrepeso ou obesidade, e que o aumento da adiposidade está associado a uma piora dos parâmetros funcionais na ICfEp (KITZMAN; LAM, 2017; OBOKATA *et al.*, 2017), utilizamos a dieta hiperlipídica para induzir o estresse metabólico nos ratos. Em camundongos, essa dieta foi responsável pelo aumento de peso e gordura corporal, intolerância à glicose e aumento do perfil lipídico (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019). Em pacientes com ICfEp, a obesidade e síndrome metabólica contribuem para o desenvolvimento e progressão da doença pelo aumento da inflamação, disfunção endotelial, alterações hemodinâmicas e ativação neuro-humoral (KITZMAN; LAM, 2017; OBOKATA *et al.*, 2017).

Em nosso estudo, observou-se que ao final das cinco semanas de tratamento, os ratos expostos ao tratamento de L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram aumento de gordura corporal e dos níveis plasmáticos de colesterol. Além disso, após 15 minutos da administração intraperitoneal de glicose, foi observada uma redução na depuração da glicose em ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica. No entanto,

a depuração da glicose foi recuperada nos tempos seguintes (30, 60, 90 e 120 min). Assim, nossos resultados mostram uma redução na tolerância à glicose nos ratos submetidos ao tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica em comparação aos ratos do grupo controle, convergindo com dados descritos em relatos da literatura (ANDRIKOPOULOS *et al.*, 2008; BATTISTON *et al.*, 2017).

Nossos resultados mostram, também, que o peso corporal e os níveis plasmáticos de triglicerídeos dos ratos tratados foram semelhantes aos dos ratos controles. Esses resultados contrastam com os observados em camundongos por Schiattarella e colaboradores (2019). Essas divergências podem ser explicadas pela diferença no metabolismo entre ratos e camundongos e, também, pela diferença na composição da dieta hiperlipídica utilizada no nosso protocolo experimental, a qual foi composta por 40% kcal de gordura, em comparação com a dieta hiperlipídica composta por 60% kcal de gordura, utilizada por Schiattarella e colaboradores (2019).

Além disso, é importante destacar que, embora não tenha sido observado o aumento do peso corporal nos ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica, houve o aumento de gordura epididimal e retroperitoneal nestes ratos. Assim, em conjunto, esses dados mostram que nosso protocolo experimental foi capaz de induzir um estresse metabólico e aumento da PAS nos ratos, mimetizando as comorbidades mais prevalentes nos pacientes com ICfEp, sendo essas a obesidade/síndrome metabólica e a hipertensão arterial (SINGH; MEHTA, 2018).

Ao analisar a função cardíaca dos ratos, por meio do registro de pressão e volume intraventricular, observamos que a FEVE foi semelhante entre os dois grupos, caracterizando, assim, fração de ejeção preservada neste modelo. No entanto, ambos os grupos apresentaram FEVE em torno de 30%, sendo este um valor abaixo do esperado. Esses valores da FEVE podem ser explicados pela escolha do anestésico utilizado para os experimentos de cateterismo do VE. A literatura mostra que o uso de cetamina e xilazina como agentes anestésicos resulta em uma redução na frequência cardíaca e na diminuição na função da bomba cardíaca em ratos *Wistar*, o que impacta a FEVE (KAWAHARA *et al.*, 2005; GONCA 2015; SHEKARFOROUSH *et al.*, 2016).

Além disso, ao analisar a função cardíaca, foi observado que o débito cardíaco, o trabalho sistólico, o volume sistólico, o volume sistólico final e a  $+dp/dt$  foram semelhantes entre os ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica e os ratos controles, indicando função sistólica preservada nos ratos tratados. Foi observado, também, que os ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram

valores de volume diastólico final semelhantes aos dos ratos controles, assim, sugerindo que a capacidade da câmara cardíaca de receber o volume de sangue adequado durante a diástole se manteve preservada. No entanto, observou-se que isso se manteve às custas do prolongamento no tempo de relaxamento do VE, devido aos menores valores de  $-dp/dt$  e maiores valores de TAU. Isso porque nossos resultados mostram que ratos submetidos ao tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram menores valores de  $-dp/dt$ , o que indica um menor índice de relaxamento do VE. Ou seja, menores valores de  $-dp/dt$  demonstram uma menor queda de pressão em um determinado intervalo de tempo, caracterizando um prejuízo na função diastólica deste ventrículo.

Além disso, ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram maiores valores de TAU, que representa o tempo de relaxamento isovolumétrico do VE. O valor de TAU reflete o tempo de relaxamento ventricular esquerdo durante a diástole e, quanto maior esse valor, maior o tempo que é necessário para o relaxamento do VE. Assim, os maiores valores de TAU, encontrados em ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica, também sugerem um prolongamento no tempo de relaxamento ventricular, contribuindo para a redução na função diastólica destes ratos.

Além das análises dos parâmetros basais também foi avaliada a resposta cardíaca à dobutamina por meio do registro de pressão e volume intraventricular. Sabe-se que a dobutamina é um agonista dos receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, e seus efeitos são o aumento do cálcio intracelular e da força de contração da musculatura cardíaca (ZIMPFER *et al.*, 1982). Nossos resultados mostram que, após a administração de dobutamina, o delta da FEVE, débito cardíaco, trabalho sistólico, volume sistólico, frequência cardíaca, volume sistólico e diastólico final, pressão sistólica e diastólica final e  $+dp/dt$  foram semelhantes entre os grupos. Assim, nossos dados demonstram que, ao desafiar o coração com a dobutamina, os parâmetros dependentes da força de contração do coração mantiveram-se preservados, indicando que não houve um prejuízo sistólico. Esses resultados convergem com o que é observado na clínica, como mostra o estudo de Sengupta e colaboradores (2020), no qual foi demonstrado que pacientes com ICfEp, ao serem submetidos ao desafio cardíaco com dobutamina, apresentaram aumento da frequência cardíaca, débito cardíaco, volume sistólico e pressão arterial sistólica e diastólica (SENGUPTA *et al.*, 2020).



Além disso, nossos resultados mostram que ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica apresentaram uma menor resposta de  $-dp/dt$  à dobutamina, em relação ao grupo controle, confirmando um prejuízo na capacidade de relaxamento do VE nestes ratos. Assim, esses dados indicam uma redução na função diastólica do VE, porém, a força contrátil cardíaca manteve-se preservada nestes ratos mesmo durante um desafio farmacológico com um agente inotrópico positivo.

Assim, em conjunto, nossos dados mostram que foi possível reproduzir a disfunção diastólica observada em pacientes com ICFEp, mantendo-se a FEVE preservada, sendo essas as principais características dos pacientes com ICFEp.

A disfunção diastólica, observada nestes pacientes, ocorre devido à rigidez do miocárdio, resultante do remodelamento cardíaco, o qual é caracterizado pela hipertrofia e fibrose cardíaca (BORLAUG 2014). Como mencionado anteriormente, o aumento do estresse metabólico e da pressão arterial são fatores determinantes para o remodelamento cardíaco observado na ICFEp (TANAI; FRANTZ, 2015; SCHIATTARELLA *et al.*, 2019). O remodelamento cardíaco é resultante de alterações estruturais, celulares e moleculares como a hipertrofia dos cardiomiócitos, aumento de moléculas pró-inflamatórias, proliferação de fibroblastos e acúmulo de colágeno na matriz extracelular, responsável pela indução da fibrose cardíaca (HAHN *et al.*, 2020).

Assim, nossos resultados mostram que a administração de L-NAME e dieta hiperlipídica induziu o remodelamento cardíaco nos ratos. Observou-se aumento nos valores da razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia, sugerindo hipertrofia cardíaca nestes ratos. Além disso, também foi observado um aumento da porcentagem de colágeno intersticial no coração dos ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica, indicando o aumento de fibrose cardíaca, a qual contribui para a rigidez cardíaca.

No entanto, ao avaliar a razão entre o peso do pulmão e o comprimento da tíbia, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. Sendo assim, estes resultados contrastam com os dados observados em humanos, que demonstram que a congestão pulmonar é uma das características observadas nos pacientes com ICFEp, sendo um fator importante para o diagnóstico destes pacientes (BOZKURT *et al.*, 2021) e, também, com os resultados apresentados por Schiattarella e colaboradores (2019), em camundongos. Essa diferença pode ser explicada pelo método de avaliação, pois Schiattarella e colaboradores (2019) utilizaram a razão entre o peso do pulmão molhado e o peso do pulmão seco como um indicativo de

edema e congestão pulmonar. Sendo assim, em estudos futuros, pretendemos utilizar esse método para avaliar edema e congestão pulmonar de modo mais fidedigno e, também, estudar a histologia pulmonar dos ratos para a obtenção de dados mais conclusivos.

Por outro lado, a congestão pulmonar é uma característica observada em pacientes com ICFEp ao longo da progressão da doença, visto que a literatura mostra que a congestão pulmonar nos estágios iniciais da ICFEp pode ser intermitente, desenvolvendo-se apenas durante insultos hemodinâmicos de curto prazo, como em exercícios físicos (REDDY *et al.*, 2019; JAIN *et al.*, 2022). Assim, nossos resultados podem indicar que, os ratos ao final de cinco semanas de tratamento, podem ter desenvolvido a ICFEp em seus estágios iniciais.

Além disso, nossos resultados mostram, também, que o tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica reduziu a tolerância ao exercício físico dos ratos, avaliada pelo menor tempo de corrida e menor distância percorrida quando submetidos ao teste de tolerância ao exercício na esteira. A menor tolerância ao exercício, caracterizada pela fadiga ao esforço e dispneia, é um dos principais sintomas presentes em pacientes com ICFEp, sendo um fator decisivo para o diagnóstico destes pacientes (ZILE *et al.*, 2013). Esses sintomas são atribuídos ao enchimento ventricular inadequado, por conta da redução na reserva da pré-carga, e a incapacidade de aumentar o débito cardíaco suficientemente para atender às demandas metabólicas durante o exercício, refletindo em uma resposta lusitrópica deficiente e incompetência cronotrópica, respectivamente (PAULUS 2010; YOUN *et al.*, 2021).

A literatura aponta que a menor tolerância ao exercício em pacientes com ICFEp está associada ao remodelamento cardíaco, avaliado pelo aumento da massa e da espessura relativa da parede do VE (ZILE *et al.*, 2013). Assim, a menor tolerância ao exercício observada nos ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica pode estar associada ao aumento da hipertrofia cardíaca, rigidez miocárdica e, conseqüente, disfunção diastólica, também observados em nossos resultados.

A inflamação é um processo determinante na fisiopatologia da ICFEp (SHIRAZI *et al.*, 2017). Devido a este fato, buscamos investigar o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias nas alterações cardíacas observadas em ratos submetidos ao tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica. Para isso, foram realizados ensaios imunoenzimáticos para dosagem das citocinas no coração e no plasma. Nossos resultados mostram que não foi possível detectar IL-6 e TNF- $\alpha$  no plasma dos ratos e

que os níveis dessas citocinas no coração foram semelhantes entre os grupos experimentais. A literatura mostra que o aumento dos níveis circulantes de TNF- $\alpha$  nos pacientes com ICFEp está associado ao aumento da mortalidade (DUNLAY *et al.*, 2008). Além disso, relatos da literatura também mostram que o TNF- $\alpha$  é uma molécula pró-inflamatória que desempenha um papel fundamental durante a fase inflamatória inicial (ROLSKI; BŁYSZCZUK, 2020). No entanto, nossos resultados mostram níveis de TNF- $\alpha$  ao final de 5 semanas de tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica, refletindo uma fase mais tardia da inflamação, podendo ser o motivo pelo qual não foi observado o aumento dessa citocina no plasma e no coração destes ratos.

Relatos da literatura também mostram que grande parte dos pacientes com ICFEp apresentam níveis plasmáticos elevados de IL-6, o que associa-se a maior gravidade dos sintomas, menor capacidade de exercício e maior acúmulo de gordura nestes pacientes (ALOGNA *et al.*, 2023). Além disso, Markousis-Mavrogenis e colaboradores (2019) mostraram níveis elevados de IL-6 em mais da metade dos pacientes com ICFEp, e os níveis aumentados de IL-6 estavam associados ao aumento da mortalidade e/ou hospitalização por IC (MARKOUSIS-MAVROGENIS *et al.*, 2019). Apesar disso, este estudo também mostrou que nem todos os pacientes com ICFEp apresentaram níveis aumentados de IL-6 (MARKOUSIS-MAVROGENIS *et al.*, 2019).

Os nossos resultados mostram que não houve o aumento nas concentrações plasmáticas e cardíacas de IL-6, no entanto, apesar dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  se apresentarem semelhantes entre os grupos experimentais, observamos um aumento da expressão da enzima iNOS, por *Western Blotting*, no coração, dos ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica. Esse resultado converge com o que é observado na clínica, pois foi demonstrado que pacientes com ICFEp também apresentam aumento nos níveis cardíacos de iNOS (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019).

Schiattarella e colaboradores (2019) foram os primeiros a mostrar que o aumento da iNOS no coração está associado ao aumento de S-nitrosilação da IRE1 $\alpha$ , uma proteína transmembrana envolvida na via UPR, que detecta estresse do retículo endoplasmático, levando à redução do *splicing* da XBP1s, um fator de transcrição importante para a efetividade da via UPR (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019).

Assim, o aumento nos níveis cardíacos de iNOS está associado à disfunção da via UPR e ao acúmulo de proteínas não dobradas ou mal dobradas na matriz extracelular (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019). Essa quebra na homeostase da via UPR

está associada a exacerbação da inflamação, eventualmente induzindo a disfunção e morte celular (WANG *et al.*, 2012). Desse modo, o aumento de iNOS no coração, observada em indivíduos com ICfEp e em nosso estudo, contribui para a fisiopatologia da ICfEp.

Além disso, a literatura mostra que o aumento da iNOS no coração está associado ao aumento da inflamação e do estresse nitrosativo na ICfEp, e que a iNOS desempenha um papel crucial no processo inflamatório e na fisiopatologia da ICfEp (SCHIATTARELLA *et al.*, 2019).

Sendo assim, em conjunto, nossos resultados mostram que houve aumento da PAS, gordura corporal, perfil lipídico e, também, de iNOS no coração dos ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica e que, a combinação desses insultos, resultou em alterações estruturais e funcionais do coração, como hipertrofia cardíaca, aumento de fibrose cardíaca, redução da função diastólica do VE, mantendo a FEVE preservada e redução da tolerância ao exercício nos ratos.

No entanto, o tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica em ratos não foi capaz de reproduzir características importantes observadas na clínica, como a congestão pulmonar, o aumento do peso corporal e o aumento de citocinas no coração e no plasma.

Assim, os resultados apresentados neste estudo demonstram que o modelo de ICfEp em ratos, induzido pela combinação de L-NAME e dieta hiperlipídica, reproduziu, pela primeira vez, grande parte das principais características encontradas em pacientes com ICfEp, auxiliando na busca por um modelo animal adequado para pesquisa e ampliando as possibilidades de escolha da espécie a ser utilizada em futuros estudos da ICfEp, atualmente restrita aos camundongos.

## **8. SUMÁRIO E CONCLUSÃO**

Os ratos submetidos ao tratamento com L-NAME, na dose de 20 mg/kg/dia por quatro semanas, e dieta hiperlipídica, por cinco semanas, apresentaram FEVE preservada, disfunção diastólica, hipertrofia e fibrose cardíaca, aumento de gordura corporal, de níveis plasmáticos de colesterol, da pressão arterial sistólica, redução na tolerância à glicose e na tolerância ao exercício e aumento da expressão de iNOS no coração. Assim, o tratamento com L-NAME e dieta hiperlipídica em ratos reproduziu

grande parte das características observadas no modelo de ICfEp em camundongos, também induzido por L-NAME e dieta hiperlipídica, e em pacientes com ICfEp.

Portanto, a partir dos resultados apresentados nesta pesquisa, conclui-se que ratos tratados com L-NAME e dieta hiperlipídica desenvolveram ICfEp. Além disso, este modelo de ICfEp em ratos, considerando suas limitações, poderá ser utilizado em futuros estudos que busquem investigar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na ICfEp e novas terapias para o tratamento destes pacientes, assim, contribuindo para novas abordagens terapêuticas direcionadas a aumentar a qualidade de vida e reduzir as hospitalizações e mortalidade de pacientes com ICfEp.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR AS JR, SPECK AE, AMARAL IM, CANAS PM, CUNHA RA. The exercise sex gap and the impact of the estrous cycle on exercise performance in mice. **Sci Rep.** 8(1):10742., 2018.

ANDRIKOPOULOS S, BLAIR AR, DELUCA N, FAM BC, PROIETTO J. Evaluating the glucose tolerance test in mice. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 295(6):E1323-E1332, 2008.

ALFLEN, L. et al. Characterization of heart failure with preserved ejection fraction model induced by l-name and high-fat diet in rats. In: ANAIS DA XXXVII REUNIÃO ANUAL DA FESBE, 2023, Búzios. Anais eletrônicos... Campinas, Galoá, 2023.

ALLAN A, FENNING A, LEVICK S, HOEY A, BROWN L. Reversal of cardiac dysfunction by selective ET-A receptor antagonism. **Br J Pharmacol.** 146(6):846-853, 2005.

ALOGNA A, KOEPP KE, SABBAH M, et al. Interleukin-6 in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. **JACC Heart Fail.** S2213-1779(23)00384-0, 2023.

ASHRAFIAN H, CZIBIK G, BELLAHCENE M, et al. Fumarate is cardioprotective via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. **Cell Metab.**15(3):361-371, 2012.

BARNES PJ, KARIN M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N Engl J Med.** 336(15):1066-1071, 1997.

BATTISTON FG, DOS SANTOS C, BARBOSA AM, et al. Glucose homeostasis in rats treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide is not worsened by dexamethasone treatment. **J Steroid Biochem Mol Biol.** 165(Pt B):170-181, 2017.

BERGMAN MR, KAO RH, MCCUNE SA, HOLYCROSS BJ. Myocardial tumor necrosis factor-alpha secretion in hypertensive and heart failure-prone rats. **Am J Physiol.** 277(2):H543-H550, 1999.

BHATIA RS, TU JV, LEE DS, et al. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. **N Engl J Med.** 355(3):260-269, 2006.

BREWER L, ROGERS S. Fumaric acid esters in the management of severe psoriasis. **Clin Exp Dermatol.** 32(3):246-249, 2007.

BORLAUG BA, Paulus WJ. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Eur Heart J.** 32(6):670-679, 2011.

BORLAUG BA. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. **Nat Rev Cardiol.** 11(9):507-515, 2014.

BORLAUG, BA. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. In: Baliga, Ragavendra R.; Haas, Garrie J., editors. **Management of Heart Failure.** Springer Verlag; 2015.

BOZKURT B, COATS AJ, TSUTSUI H, et al. Universal Definition and Classification of Heart Failure: A Report of the Heart Failure Society of America, Heart Failure Association of the European Society of Cardiology, Japanese Heart Failure Society and Writing Committee of the Universal Definition of Heart Failure. **J Card Fail.** S1071-9164(21)00050-6, 2021.

CHEN H, CHARLAT O, TARTAGLIA LA, et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. **Cell**. 84(3):491-495, 1996.

CHIRINOS JA, ZAMANI P. The Nitrate-Nitrite-NO Pathway and Its Implications for Heart Failure and Preserved Ejection Fraction. **Curr Heart Fail Rep**. 13(1):47-59, 2016.

COLLIER P, WATSON CJ, VOON V, et al. Can emerging biomarkers of myocardial remodelling identify asymptomatic hypertensive patients at risk for diastolic dysfunction and diastolic heart failure?. **Eur J Heart Fail**. 13(10):1087-1095, 2011.

CORRÊA, T. Disfunção cardíaca durante a sepse: da fase aguda à sobrevivência. Tese (doutorado em Farmacologia). Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2021.

D'ELIA E, VADUGANATHAN M, GORI M, GAVAZZI A, BUTLER J, SENNI M. Role of biomarkers in cardiac structure phenotyping in heart failure with preserved ejection fraction: critical appraisal and practical use. **Eur J Heart Fail**. 17(12):1231-1239, 2015.

DENG Y, XIE M, LI Q, et al. Targeting Mitochondria-Inflammation Circuit by  $\beta$ -Hydroxybutyrate Mitigates HFpEF [published correction appears in *Circ Res*. 2022 Apr;130(7):e24]. **Circ Res**. 128(2):232-245, 2021.

DOI R, MASUYAMA T, YAMAMOTO K, et al. Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. **J Hypertens**. 18(1):111-120, 2000.

DOS SANTOS FM, MARTINS DIAS DP, DA SILVA CA, FAZAN R JR, SALGADO HC. Sympathetic activity is not increased in L-NAME hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 298(1):R89-R95, 2010.

DESAI AS, LAM CSP, MCMURRAY JJV, REDFIELD MM. How to Manage Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Practical Guidance for Clinicians. **JACC Heart Fail.** 11(6):619-636, 2023.

DUNLAY SM, WESTON SA, REDFIELD MM, KILLIAN JM, ROGER VL. Tumor necrosis factor-alpha and mortality in heart failure: a community study. **Circulation.** 118(6):625-631, 2008.

DUNLAY SM, ROGER VL, REDFIELD MM. Epidemiology of heart failure with preserved ejection fraction. **Nat Rev Cardiol.** 14(10):591-602, 2017.

ESTADELLA D, OYAMA LM, DAMASO AR, RIBEIRO EB, OLLER DO NASCIMENTO CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition.**20(2):218–24, 2004.

FERREIRA-MELO SE, YUGAR-TOLEDO JC, COELHO OR, et al. Sildenafil reduces cardiovascular remodeling associated with hypertensive cardiomyopathy in NOS inhibitor-treated rats. **Eur J Pharmacol.** 542(1-3):141-147, 2006.

FÖRSTERMANN U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.** 5(6):338-349, 2008.

FRANÇA, A. Associação de cafeína e exercício físico como estratégia terapêutica nos prejuízos comportamentais e neuroquímicos observados em um modelo animal do Transtorno do Déficit de Atenção e Hiperatividade (TDAH). Tese (doutorado em Neurociências). Programa de Pós-Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2018.

FREED BH, DARUWALLA V, CHENG JY, et al. Prognostic Utility and Clinical Significance of Cardiac Mechanics in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Importance of Left Atrial Strain. **Circ Cardiovasc Imaging.** 9(3):10.1161, 2016.



GOLD, R. et al. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. **N. Engl. J. Med.** 367, 1098–1107, 2012.

GONCA E. Comparison of thiopental and ketamine+xylazine anesthesia in ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in rats. **Turk J Med Sci.** 45(6):1413-1420, 2015.

HAHN VS, YANEK LR, VAISHNAV J, et al. Endomyocardial Biopsy Characterization of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Prevalence of Cardiac Amyloidosis. **JACC Heart Fail.** 8(9):712-724, 2020.

HEUSCH G. Coronary blood flow in heart failure: cause, consequence and bystander. **Basic Res Cardiol.** 117(1):1, 2022.

ICHIHARA S, SENBONMATSU T, PRICE E JR, ICHIKI T, GAFFNEY FA, INAGAMI T. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. **Circulation.** 104(3):346-351, 2001.

JAIN CC, TSCHIRREN J, REDDY YNV, MELENOVSKY V, REDFIELD M, BORLAUG BA. Subclinical Pulmonary Congestion and Abnormal Hemodynamics in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **JACC Cardiovasc Imaging.** 15(4):629-637, 2022.

JASINSKA-PIADLO A, CAMPBELL P. Management of patients with heart failure and preserved ejection fraction. **Heart.** 109(11):874-883, 2023.

KASPAR JW, NITURE SK, JAISWAL AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. **Free Radic Biol Med.** 47(9):1304-1309, 2009.

KAWAHARA Y, TANONAKA K, DAICHO T, et al. Preferable anesthetic conditions for echocardiographic determination of murine cardiac function. **J Pharmacol Sci.** 99(1):95-104, 2005.

KITZMAN DW, HIGGINBOTHAM MB, COBB FR, SHEIKH KH, SULLIVAN MJ. Exercise intolerance in patients with heart failure and preserved left ventricular systolic function: failure of the Frank-Starling mechanism. **J Am Coll Cardiol.** 17(5):1065-1072, 1991.

KITZMAN DW, LAM CSP. Obese Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Phenotype: From Pariah to Central Player. **Circulation.** 136(1):20-23, 2017.

LINDSTRÖM P. The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. **ScientificWorldJournal.** 7:666-685, 2007.

LOESCHER CM, BREITKREUZ M, LI Y, et al. Regulation of titin-based cardiac stiffness by unfolded domain oxidation (UnDOx). **Proc Natl Acad Sci U S A.**117(39):24545-24556, 2020.

LOEWE R, HOLNTHONER W, GRÖGER M, et al. Dimethylfumarate inhibits TNF-induced nuclear entry of NF-kappa B/p65 in human endothelial cells. **J Immunol.** 168(9):4781-4787, 2002.

MARKOUSIS-MAVROGENIS G, TROMP J, OUWERKERK W, et al. The clinical significance of interleukin-6 in heart failure: results from the BIOSTAT-CHF study. **Eur J Heart Fail.** 21(8):965-973, 2019.

MCMURRAY JJ, PFEFFER MA. Heart failure. **Lancet.** 365(9474):1877-1889, 2005.

MORENO H JR, PIOVESAN NATHAN L, PEREIRA COSTA SK, et al. Enalapril does not prevent the myocardial ischemia caused by the chronic inhibition of nitric oxide synthesis. **Eur J Pharmacol.** 287(1):93-96, 1995.

MURDOCH CE, CHAUBEY S, ZENG L, et al. Endothelial NADPH oxidase-2 promotes interstitial cardiac fibrosis and diastolic dysfunction through proinflammatory effects and endothelial-mesenchymal transition. **J Am Coll Cardiol.** 63(24):2734-2741, 2014.

OBOOKATA M, REDDY YNV, PISLARU SV, MELENOVSKY V, BORLAUG BA. Evidence Supporting the Existence of a Distinct Obese Phenotype of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **Circulation**. 136(1):6-19, 2017.

PACHER P, NAGAYAMA T, MUKHOPADHYAY P, BÁT KAI S, KASS DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. **Nat Protocol** 3: 1422–1433, 2008.

PAULIS L, ZICHA J, KUNES J, ET AL. Regression of L-NAME-induced hypertension: the role of nitric oxide and endothelium-derived constricting factor. **Hypertens Res**. 31(4):793-803, 2008.

PAULUS WJ. Culprit Mechanism(s) for Exercise Intolerance in Heart Failure With Normal Ejection Fraction. **J Am Coll Cardiol**. 56(11):864-866, 2010.

PAULUS WJ, VAN BALLEGOIJ JJ. Treatment of heart failure with normal ejection fraction: an inconvenient truth!. **J Am Coll Cardiol**. 55(6):526-537, 2010.

PAULUS WJ, TSCHÖPE C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. **J Am Coll Cardiol**. 62(4):263-271, 2013.

PAULUS WJ, ZILE MR. From Systemic Inflammation to Myocardial Fibrosis: The Heart Failure With Preserved Ejection Fraction Paradigm Revisited. **Circ Res**. 128(10):1451-1467, 2021.

PECHÁNOVÁ O, BERNÁTOVÁ I, PELOUCH V, BABÁL P. L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart. **Physiol Res**. 48(5):353-362, 1999.

PFEFFER MA, SHAH AM, BORLAUG BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction In Perspective. **Circ Res**. 124(11):1598-1617, 2019.

PIESKE, B. et al. How to diagnose heart failure with preserved ejection fraction: the HFA-PEFF diagnostic algorithm: a consensus recommendation from the Heart Failure

Association (HFA) of the European Society of Cardiology (ESC). **Eur. Heart J.** 40, 3297–3317, 2019.

REDDY YNV, OBOKATA M, WILEY B, et al. The haemodynamic basis of lung congestion during exercise in heart failure with preserved ejection fraction. **Eur Heart J.** 40(45):3721-3730, 2019.

REDFIELD MM. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. **N Engl J Med.** 375(19):1868-1877, 2016.

REDFIELD MM, BORLAUG BA. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Review. **JAMA.** 329(10):827-838, 2023.

ROBERTO IV, LATARO RM, HONORATO LA. Administração de substâncias em meio skim milk facilita a ingestão voluntária em ratos jovens. Resumos apresentados no XVI Congresso da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório e V Encontro Latino Americanos de Ciência em Animais de Laboratório. Goiania, 2021.

ROH J, HOUSTIS N, ROSENZWEIG A. Why Don't We Have Proven Treatments for HFpEF?. **Circ Res.** 120(8):1243-1245, 2017.

ROLSKI F, BŁYSZCZUK P. Complexity of TNF- $\alpha$  Signaling in Heart Disease. **J Clin Med.** 9(10):3267, 2020.

SAMSON R, JAISWAL A, ENNEZAT PV, CASSIDY M, LE JEMTEL TH. Clinical Phenotypes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **J Am Heart Assoc.** 5(1):e002477, 2016.

SCHULZ E, JANSEN T, WENZEL P, DAIBER A, MÜNDEL T. Nitric oxide, tetrahydrobiopterin, oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension. **Antioxid Redox Signal.** 10:1115–26, 2008.

SENGUPTA SP, MUNGULMARE K, OKWOSE NC, MACGOWAN GA, JAKOVLJEVIC DG. Comparison of cardiac output estimates by echocardiography and bioreactance

at rest and peak dobutamine stress test in heart failure patients with preserved ejection fraction. **Echocardiography**. 37(10):1603-1609, 2020.

SHAH SJ, KATZ DH, DEO RC. Phenotypic spectrum of heart failure with preserved ejection fraction. **Heart Fail Clin**. 10(3):407-418, 2014.

SHAH SJ, KITZMAN DW, BORLAUG BA, et al. Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. **Circulation**. 134(1):73-90, 2016.

SHAH SJ, BORLAUG BA, KITZMAN DW, et al. Research Priorities for Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group Summary. **Circulation**. 141(12):1001-1026, 2020.

SHAHIM B, KAPELIOS CJ, SAVARESE G, LUND LH. Global Public Health Burden of Heart Failure: An Updated Review. **Card Fail Rev**. Jul 27;9:e11, 2023.

SHEKARFOROUSH S, FATAHI Z, SAFARI F. The effects of pentobarbital, ketamine-pentobarbital and ketamine-xylazine anesthesia in a rat myocardial ischemic reperfusion injury model. **Lab Anim**. 50(3):179-184, 2016.

SHIRAZI LF, BISSETT J, ROMEO F, MEHTA JL. Role of Inflammation in Heart Failure. **Curr Atheroscler Rep**. 19(6):27, 2017.

SIEBENLIST U. NF kappa B/I kappa B proteins. Their role in cell growth, differentiation and development. Madrid, Spain, July 7-10, 1996. **Biochim Biophys Acta**. 1332(1):R7-R13, 1997.

SINGH A, MEHTA Y. Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF): Implications for the anesthesiologists. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**. 34(2):161-165, 2018.

SCHIATTARELLA GG, ALTAMIRANO F, TONG D, et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. **Nature**. 568(7752):351-356, 2019.

SCANNEVIN RH, CHOLLATE S, JUNG MY, et al. Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. **J Pharmacol Exp Ther.** 341(1):274-284, 2012.

SCHAUER A, ADAMS V, AUGSTEIN A, et al. Sacubitril/Valsartan Improves Diastolic Function But Not Skeletal Muscle Function in a Rat Model of HFpEF. **Int J Mol Sci.** 22(7):3570, 2021.

SPERETTA GF, ROSANTE MC, DUARTE FO, LEITE RD, LINO AD, ANDRE RA, SILVESTRE JG, ARAUJO HS, DUARTE AC. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. **Clinics** (Sao Paulo), 67, n.2,1469-77, 2012.

TANAI E, FRANTZ S. Pathophysiology of Heart Failure. **Compr Physiol.** 6(1):187-214, 2015.

TANAKA K, VALERO-MUÑOZ M, WILSON RM, et al. Follistatin like 1 Regulates Hypertrophy in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. **JACC Basic Transl Sci.** 1(4):207-221, 2016.

TONG D, SCHIATTARELLA GG, JIANG N, et al. Female Sex Is Protective in a Preclinical Model of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **Circulation.** 140(21):1769-1771, 2019.

UPADHYA B, KITZMAN DW. Heart failure with preserved ejection fraction: New approaches to diagnosis and management. **Clin Cardiol.**43(2):145-155, 2020.

WARDYN JD, PONSFORD AH, SANDERSON CM. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- $\kappa$ B response pathways. **Biochem Soc Trans.**43(4):621-626, 2015.

VAN HEEREBEEK L, HAMDANI N, FALCÃO-PIRES I, et al. Low myocardial protein kinase G activity in heart failure with preserved ejection fraction. **Circulation** 126:830–9, 2012.

WITHAAR C, MEEMS LMG, MARKOUSIS-MAVROGENIS G, et al. The effects of liraglutide and dapagliflozin on cardiac function and structure in a multi-hit mouse model of heart failure with preserved ejection fraction. **Cardiovasc Res.** 117(9):2108-2124, 2021.

WITHAAR C, LAM CSP, SCHIATTARELLA GG, DE BOER RA, MEEMS LMG. Heart failure with preserved ejection fraction in humans and mice: embracing clinical complexity in mouse models [published correction appears in Eur Heart J. 2022 May 21;43(20):1940]. **Eur Heart J.** 42(43):4420-4430, 2021.

YOUN JC, AHN Y, JUNG HO. Pathophysiology of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. **Heart Fail Clin.** 17(3):327-335. 2021.

ZAKERI R, CHAMBERLAIN AM, ROGER VL, REDFIELD MM. Temporal relationship and prognostic significance of atrial fibrillation in heart failure patients with preserved ejection fraction: a community-based study [published correction appears in Circulation. 2013 Dec 17;128(24):e465]. **Circulation.** 128(10):1085-1093, 2013.

ZEMANČÍKOVÁ A, TÖRÖK J. Cardiovascular effects of high-fructose intake in rats with nitric oxide deficiency. **Interdiscip Toxicol.** 7(3):159-164, 2014.

ZILE MR, GOTTDIENER JS, HETZEL SJ, et al. Prevalence and significance of alterations in cardiac structure and function in patients with heart failure and a preserved ejection fraction. **Circulation.** 124(23):2491-2501, 2011.

ZILE MR, KJELLSTROM B, BENNETT T, et al. Effects of exercise on left ventricular systolic and diastolic properties in patients with heart failure and a preserved ejection fraction versus heart failure and a reduced ejection fraction. **Circ Heart Fail.** 6(3):508-516, 2013.

ZIMPFER M, KHOSROPOUR R, LACKNER F. Effect of dobutamine on cardiac function in man: reciprocal roles of heart rate and ventricular stroke volume. **Crit Care Med.** 10(6):367-370, 1982.



## 10. APENDICE A



Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "EFEITOS DO DIMETIL FUMARATO NO DESENVOLVIMENTO DA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA", protocolada sob o CEUA nº 2123200622 (ID 002196), sob a responsabilidade de **Renata Maria Lataro e equipe; Lais Alfien** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 02/09/2022.

We certify that the proposal "EFFECTS OF DIMETHYL FUMARATE ON THE DEVELOPMENT OF HEART FAILURE WITH PRESERVED EJECTION FRACTION", utilizing 63 Heterogenics rats (63 males), protocol number CEUA 2123200622 (ID 002196), under the responsibility of **Renata Maria Lataro and team; Lais Alfien** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 09/02/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2022 a 09/2024

Área: Ciências Fisiológicas

Origem: Biotério Central  
Espécie: Ratos heterogênicos  
Linhagem: Wistar

sexo: Machos idade: 60 a 70 dias N: 63  
Peso: 200 a 250 g

Local do experimento: Os experimentos serão realizados no Laboratório de Fisiologia Cardiometabólica, localizado no Departamento de Ciências Fisiológicas CCB/UFSC

Florianópolis, 02 de setembro de 2022

Luciana Aparecida Honorato  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaella Foletto da Silva  
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Catarina

