ALCIONE LESCANO DE SOUZA JUNIOR

Efeito do Pré-Tratamento com Óleo de Peixe sobre o
Infarto Agudo do Miocárdio em Ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2013

ALCIONE LESCANO DE SOUZA JUNIOR

Efeito do Pré-Tratamento com Óleo de Peixe sobre o
Infarto Agudo do Miocárdio em Ratos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão original

São Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Souza Junior, Alcione Lescano de.

Efeito do pré-tratamento com óleo de peixe sobre o infarto agudo do miocárdio em ratos / Alcione Lescano de Souza Junior. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Metabolismo celular e sua regulação.

Versão do título para o inglês: Effect of the pretreatment with fish oil on myocardial infarction in rats.

1. Infarto agudo do miocárdio 2. Ácidos graxos ômega-3
3. Metabolismo de glicose 4. Inflamação 5. Fluxo sanguíneo coronariano I. Curi, Prof. Dr. Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0193/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Alcione Lescano de Souza Junior.

Título da Tese: Efeito do pré-tratamento com óleo de peixe sobre o infarto agudo do miocárdio em ratos.

Orientador(a): Prof. Dr. Rui Curi.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **115** nas fls. **75** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Joaquim Procópio de Araújo Filho, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito dos ácidos graxos no infarto do miocárdio** do qual participou(arão) o(s) alunos **Alcione Lescano de Souza Júnior e os Pesquisadores Rui Curi, Maria Cláudia Irigien**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **22.09.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 08 de outubro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRICIA GAMA
Secretária
CEEA - ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA.....19/10/09.....
REL. N.º.....5017.....

Retirei copia
03/03/2011
Alcione

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA. 014.13

São Paulo, 07 de março de 2013.

REF.: Protocolo nº 115/09.

"Efeito dos ácidos graxos no infarto do miocárdio"

Prezado Professor,

Sua licença para uso de animais em experimentação, constante no protocolo em epígrafe, **foi prorrogada até 22.09.2015**. Informo ainda que a coordenação do protocolo passará sob sua responsabilidade.

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA/ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador - CEUA-ICB/ /USP

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Rui Curi
Departamento de Fisiologia e Biofísica
Instituto de Ciências Biomédicas - USP

“O pensamento pode ter elevação sem ter elegância, e, na proporção em que não tiver elegância, perderá a ação sobre os outros. A força sem a destreza é uma simples massa”.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Aos amigos Diogo, Renato, Willian, Hosana, Marco Vinolo, Guga, Andressa, Alice, Adilson, André, Amanda Rabelo, Amada Roque, Gabriel, Sandro e Kaio que tornaram os dias para mim mais agradáveis

Aos amigos Laurê e Carlão, quase irmãos

Aos colegas Phablo, Mit, Renata, Takeo, Haroldo, Marcos Fortes, Juliana, Vivian, Kátia, Roberta, Thiago e Maisa.

Aos colaboradores Chris, Diego, Raquel Sirvente e Carlos Hermano, pelo meu crescimento

Aos que deram suporte para o meu trabalho: Zé Maria, Tati, Gilson e Bob

Aos técnicos Michael e Leandro, que sem eles o trabalho não seria possível

A minha esposa Eliane Ignotti, com todo amor e carinho

A minha filha Luiza, que amo muito

E aqueles que no passado foram importantes para meu crescimento e minha caminhada até aqui

Ao Professor Andre Marrete, pela oportunidade

A Professora Maria Cláudia Irigoyen, a minha gratidão

Ao Professor Rui, que mais que um orientador foi um amigo que serei grato para sempre

À CAPES, CNPq, UNEMAT e FAPESP, pelo suporte financeiro

Enfim, a todos que me fizeram rir durante esse período

RESUMO

De Souza Jr AL. Efeito do pré-tratamento com óleo de peixe sobre o infarto agudo do miocárdio em ratos. [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Os efeitos do pré-tratamento com o óleo de peixe sobre a área de infarto e alterações inflamatórias, metabólicas e de fluxo coronariano associadas ao infarto agudo do miocárdio (IAM) foram avaliados. A hipótese de que os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ômega-3, presentes no óleo de peixe, reduziriam a área de infarto devido aos efeitos anti-inflamatórios foi testada. Como referência, os dados foram comparados com aqueles obtidos pela administração de óleo de soja (rico em AGPI ômega 6 que têm efeitos pró-inflamatórios). Ratos Wistar machos foram suplementados com salina, óleos de peixe ou soja na dose de 3g/Kg de peso corpóreo por via intragástrica durante 20 dias antes da indução do IAM. O IAM foi induzido por ligamento da artéria descendente. Foram avaliados 24 horas após a indução do infarto a área de infarto, parâmetros inflamatórios (conteúdos de citocinas no ventrículo esquerdo e fígado e de C3, C4 e PCR no plasma) e parâmetros metabólicos (glicogênio, lactato e ATP) no ventrículo esquerdo. A área de infarto, determinada por ecocardiografia, foi menor no grupo suplementado com óleo de peixe comparada aos grupos salina ou soja. Foi observada menor atividade da creatina quinase no plasma e da caspase 3 no ventrículo esquerdo (VE) de animais infartados pré-tratados com óleo de peixe. Houve aumento na incorporação de AGPI n-3 e diminuição de AGPI n-6 (determinado por cromatografia gasosa) no VE dos animais suplementados com óleo de peixe. Os conteúdos de IL-1 β , TNF- α , CINC 2 α/β , IL-6 e VEGF- α , determinadas por ELISA, no VE e de IL-1 β , TNF- α , MIP-3, IL-6 e VEGF- α no fígado de animais infartados aumentou quando suplementados com óleo de soja. O pré-tratamento com óleo de peixe aumentou o conteúdo de ATP e de lactato e diminuiu de glicogênio no VE. A redução do fluxo coronariano no VE dos animais infartados (determinado pela técnica de infusão vascular de microesferas coloridas) foi prevenida pelo óleo de peixe. O pré-tratamento com óleo de peixe aumentou a expressão gênica da iNOS, eNOS, HIF-1 α , GLUT-1, VEGF- α , p53 e Bax2 no VE dos animais infartados. A função sistólica dos animais infartados, determinada pela fração de ejeção, fração de encurtamento e velocidade de encurtamento das fibras cardíacas, foi melhor no grupo suplementado com óleo de peixe comparado ao grupo salina. Portanto, o tratamento com óleo de peixe induziu um estado de pré-condicionamento que conferiu proteção do miocárdio à injúria isquêmica.

Palavras-chave: Infarto agudo do miocárdio. Ácidos graxos ômega-3. Metabolismo de glicose. Inflamação. Fluxo sanguíneo coronariano.

ABSTRACT

De Souza Jr AL. Effect of the pretreatment with fish oil on myocardial infarction in rats. [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

The effects of the pretreatment with fish oil on size infarction, coronary blood flow, inflammatory and metabolic parameters associated with myocardial infarction (MI) were investigated. The hypothesis that omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) may provide protective effect on heart from ischemic injury due antiinflammatory properties was tested. Fish oil effects were compared with those of soybean oil effects (rich in proinflammatory omega-6 fatty acid). The rats were supplemented with saline, fish or soybean oils, by gavage, 3g/Kg b.w., for 20 days before MI induction. The rats underwent MI induction by left coronary artery ligation. Twenty four hours post-MI, the infarcted area was determined by echocardiography. Coronary blood flow, inflammatory state in the LV and liver and metabolic parameters (glycogen, lactate, and ATP in the LV and liver) were also measured. There was increase in PUFA n-3 and decreased in PUFA n-6 incorporation in the LV by pretreatment with fish oil. The echocardiographic evaluation showed significant reduction of the infarct size in the infarcted group pretreated with fish oil as compared with saline or soybean oil. Fish oil augmented ATP, lactate and attenuated caspase 3 activity in the LV. Plasma CK activity was lowered in the fish oil when compared with saline or soybean oil groups. The contents of IL-1 β , TNF- α , CINC 2 α/β , IL-6, VEGF- α in the LV and IL-1 β , TNF- α , MIP-3, IL-6, VEGF- α in the liver were increased by soybean oil supplementation. Fish oil supplementation prevented the decrease in the coronary blood flow in the LV of infarcted rats. The mRNA contents of iNOS, eNOS, HIF-1 α , GLUT 1, VEGF- α , p53 and Bax2 in the VE of infarcted rats were increased by fish oil. Systolic function in the infarcted heart as indicated by fraction ejection, fractional shortening and velocity of circumferential fiber-shortening, was ameliorated by fish oil supplementation. So, treatment with fish oil leads to a preconditioning state that protected the heart from MI injury.

Keywords: Myocardial infarction. Omega-3 fatty acids. Inflammation. Glucose metabolism. Coronary blood flow.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ΔD	Fração de encurtamento
AA	Ácido araquidônico
ADP	Adenosina difosfato
AFC	Asp-7-amino-4-trifluorometil cumarina
AGL	Ácido graxo livre
AGPI n-3	Ácidos graxos poliinsaturados da família ômega 3
AGPI n-6	Ácidos graxos poliinsaturados da família ômega 6
AGs	Ácidos graxos
ALA	Ácido alfa linolênico
ALT	Alanina transaminase
AMP	Adenosina monofosfato
Apo B	Apoproteína B
AST	Aspartato transaminase
BHT	Hidroxitolueno butilado
C3	Fração do complemento 3
C4	Fração do complemento 4
CK	Creatina quinase
CoA	Coenzima A
COX	Ciclooxigenase
CS	Citrato sintase
DC	Débito cardíaco
DGLA	Ácido diomo γ -linolênico
DHA	Ácido docosaexanóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
DTA	Ácido docosatetraenóico
DTNB	Ácido 5,5` ditio-bis 2 nitrobenzóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção

Gama GT	Gama glutamil transferase
HCl	Ácido clorídrico
HDL	<i>High density lipoprotein</i> – Lipoproteína de alta densidade
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IL	Interleucina
Kcal	Kilocaloria
LA	Ácido linoleico
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	<i>Low density lipoprotein</i> – Lipoproteína de baixa densidade
LOX	Lipoxigenase
LPL	Lipase de lipoproteína
LTB4	Leucotrieno da série B4
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
nTRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado
PCR	Proteína C reativa
PFK	Fosfofrutoquinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i> – Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substancias reativa do ácido tiobarbitúrico
TDE	Tempo de desaceleração da onda E
TG	Triacilglicerol
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
Vcf	Velocidade de encurtamento circunferencial
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo
VLDL	<i>Very low density lipoprotein</i> – Lipoproteína de densidade muito baixa

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1	O Infarto agudo do miocárdio	15
1.2	A área de infarto	16
1.3	A concepção de cardioproteção	16
1.4	Inflamação e a expansão do infarto	18
1.5	Metabolismo energético do coração e IAM	19
1.6	Os ácidos graxos	20
1.7	Ácidos graxos ômega 3 e 6	23
1.8	Ácidos graxos ômega 3 e cardioproteção	25
1.9	O modelo de infarto	27
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVO	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	Animais	31
4.2	Desenho experimental	31
4.2.1	<i>Descrição dos grupos experimentais</i>	31
4.2.2	<i>Protocolo de suplementação</i>	31
4.2.3	<i>Parâmetros avaliados</i>	32
4.2.4	<i>Características dos óleos</i>	34
4.3	Eutanásia dos animais e obtenção de amostras	35
4.4	Determinação da ingestão diária de ração e calorias	37
4.5	Preparação de amostras de plasma para determinação dos parâmetros bioquímicos	37
4.5.1	<i>Determinação da concentração de creatinina no plasma</i>	37
4.5.2	<i>Determinação da concentração de uréia no plasma</i>	37
4.5.3	<i>Determinação da concentração de bilirrubina total no plasma</i>	38
4.5.4	<i>Método para determinação da atividade da gama GT</i>	38
4.5.5	<i>Método para determinação da atividade da ALT no plasma</i>	39
4.5.6	<i>Método para determinação da atividade da AST no plasma</i>	39
4.5.7	<i>Método para determinação da atividade da LDH no plasma</i>	40
4.5.8	<i>Método para determinação da atividade da CK no plasma</i>	40
4.5.9	<i>Determinação da concentração de albumina no plasma</i>	40
4.5.10	<i>Determinação da concentração de triacilglicerol no plasma</i>	40

4.5.11	<i>Concentrações de colesterol e frações</i>	41
4.6	Determinação das concentrações de C3 e C4 no plasma	42
4.7	Extração dos lipídeos, derivatização e condições cromatográficas	42
4.8	Avaliação dos lipídios totais do fígado e ventrículo esquerdo.....	43
4.9	Indução de infarto do miocárdio.....	44
4.10	Atividade da Caspase 3	44
4.11	Conteúdo de citocinas no ventrículo esquerdo e fígado.....	45
4.12	Produtos da peroxidação lipídica no ventrículo esquerdo e fígado	46
4.13	Determinação do conteúdo de ATP no ventrículo esquerdo e fígado	46
4.14	Determinação do conteúdo de glicogênio do ventrículo esquerdo	46
4.15	Determinação do conteúdo de lactato do ventrículo esquerdo	47
4.16	Determinações das atividades de enzimas no ventrículo esquerdo.....	47
4.16.1	<i>Fosfofrutoquinase</i>	47
4.16.2	<i>Citrato sintase</i>	48
4.17	Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR.....	48
4.18	Fluxo sanguíneo coronariano através de microesferas coloridas	50
4.18.1	<i>Infusão das microesferas na circulação</i>	50
4.18.2	<i>Processamento do ventrículo esquerdo</i>	51
4.18.3	<i>Determinação do número de microesferas:</i>	51
4.19	Função cardíaca e determinação da área de Infarto.....	52
4.19.1	<i>Função sistólica</i>	52
4.19.2	<i>Função diastólica</i>	53
4.19.3	<i>Área de infarto</i>	54
4.20	Análise estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Ingestão de ração e calorias.....	55
5.2	Ganho de massa corpórea	56
5.3	Massas de órgãos	57
5.4	Avaliação da hepatotoxicidade da suplementação com os óleos.....	58
5.5	Avaliação da suplementação com os óleos na função renal	60
5.6	Taxa de mortalidade dos animais infartados	61
5.7	Concentrações de lipídeos no plasma.....	62
5.8	Incorporação de ácidos graxos no ventrículo esquerdo	64
5.8.1	<i>Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a incorporação dos ácidos graxos da família ômega 3 no VE</i>	64

5.8.2	<i>Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a incorporação de ácidos graxos da família ômega 6</i>	65
5.9	Conteúdo de AGL e TG no VE, VD e fígado.....	68
5.10	Área de infarto.....	70
5.11	Atividade da creatina quinase no plasma.....	71
5.12	Atividade da caspase 3 no ventrículo esquerdo.....	72
5.13	Efeitos dos óleos sobre o conteúdo de citocinas no ventrículo esquerdo	73
5.14	Efeitos dos óleos sobre o conteúdo de citocinas no fígado.....	75
5.15	Efeitos dos óleos de peixe ou soja sobre as concentrações de TBARS no ventrículo esquerdo e fígado.....	77
5.16	Efeitos dos óleos sobre as concentrações plasmáticas de C3 e C4	78
5.17	Concentração plasmática de Proteína C Reativa (PCR).....	79
5.18	Conteúdo de ATP do ventrículo esquerdo e fígado	80
5.19	Efeitos dos óleos sobre o conteúdo de glicogênio do ventrículo esquerdo ..	81
5.20	Conteúdo de lactato do ventrículo esquerdo.....	82
5.21	Efeitos dos óleos sobre a atividade da fosfofrutoquinase e da citrato sintase do ventrículo esquerdo.....	83
5.22	Efeito do óleo de peixe na expressão de genes relacionados a produção de NO, metabolismo e apoptose no ventrículo esquerdo.....	84
5.23	Efeito do óleo de peixe sobre o fluxo coronariano do ventrículo esquerdo ..	85
5.24	Função cardíaca	86
6	DISCUSSÃO	88
7	SÍNTESE DOS RESULTADOS	100
8	CONCLUSÃO	101
	REFERENCIAS	102
	APÊNDICE A – Composição de ácidos graxos no VE	116
	APÊNDICE B – Quadro de Resultados	117

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 O Infarto agudo do miocárdio

As doenças cardiovasculares são responsáveis por 16,7 milhões de mortes por ano no mundo. Dentre essas, 7,2 milhões correspondem a doenças coronarianas, cujos principais fatores de risco são: fumo, obesidade, hipertensão arterial, disposição hereditária, processos inflamatórios, inatividade física e diabetes (World Health Organization - WHO, 2011). Esta ocorrência deve aumentar nos próximos anos devido ao envelhecimento da população (WHO, 2011). No Brasil, o infarto agudo do miocárdio (IAM) é responsável por 25% dos óbitos decorrentes de problemas de saúde. No período de 2001 a 2010, o coeficiente de mortalidade por IAM cresceu de 46,1 para 52,4 mortes por 100 mil habitantes (DATASUS – www.datasus.gov.br). O aumento está relacionado com as mudanças de hábito de vida do brasileiro. Em estudo realizado com 9.211 pessoas, entre 30 a 69 anos, distribuídas em 16 capitais do Brasil, demonstrou-se que a combinação de fatores de risco para doenças cardiovasculares, tais como, tabagismo, hipertensão, inatividade física e obesidade, ocorrem em mais de 25% de homens e mulheres (Pereira et al., 2009).

O IAM é definido como dano celular irreversível no coração decorrente da baixa ou falta de perfusão tecidual. A privação de oxigênio para o miocárdio provoca morte celular que leva a mudanças funcionais do coração. O infarto ocasiona redução de diversas variáveis hemodinâmicas como: débito cardíaco, volume sistólico, pressão sistólica do ventrículo esquerdo, primeira derivada positiva e derivada negativa de pressão, e, em contraposição, a pressão diastólica final do VE aumenta (De Felice et al., 1989; Pfeffer et al., 1979).

Em condições de baixa atividade, o miocárdio extrai quase todo conteúdo de oxigênio do sangue (75%) que passa através dos capilares sanguíneos (Tune et al., 2004). Assim, durante o aumento na atividade do músculo cardíaco o fornecimento de oxigênio necessário para atender o consumo depende quase exclusivamente da capacidade das artérias coronárias se dilatarem, processo esse denominado reserva coronariana (Tune et al., 2004). Na doença aterosclerótica, que é a principal causa de IAM, a redução na luz da artéria coronária e a disfunção endotelial presente na região acometida pela placa de ateroma impedem a artéria de ajustar-se às necessidades

de oxigênio (diminuição da reserva coronariana), instalando assim a isquemia e, conseqüentemente, o infarto agudo do miocárdio (WHO, 2011).

1.2 A área de infarto

No IAM, observa-se um núcleo de tecido necrótico circundado por uma área com células viáveis, porém sob-baixa tensão de oxigênio, denominada área de risco (Hearse, 1998). A relação entre o núcleo de tecido necrótico e a área de risco aumenta com a progressão temporal da isquemia, fenômeno denominado expansão do infarto (Hearse, 1998). Em 1979, Reimer e Jennings demonstraram, em cães, que o núcleo necrótico corresponde a 28, 70 e 72% da área de risco em 40 minutos, 3 e 6 horas, respectivamente, atingido 79% no quarto dia de isquemia. O fenômeno de expansão também ocorre em humanos e sua intensidade é determinada, em parte, pela presença de vasos colaterais (Ortiz-Pérez et al., 2007; Piek, Becker, 1988). A região endocárdica é mais suscetível à isquemia do que o epicárdio devido ao maior requerimento energético pelo endocárdio e a menor perfusão sanguínea durante a sístole ventricular (Hearse, 1998). Porém, em ratos, devido a escassa circulação colateral, os infartos por ligadura permanente da artéria descendente esquerda (LAD) acometem toda a parede ventricular (transmural) e raramente compromete somente a região endocárdica (Zornoff et al., 2009).

1.3 A concepção de cardioproteção

Nas décadas de 40 e 50, ocorreram avanços importantes na eletrocardiografia e na enzimologia. Neste período, as arritmias eram consideradas como principal causa de óbito nos pacientes infartados, o que levou, ao longo dos anos de 1960, o surgimento de Unidades de Cuidados Intensivos para coronarianos destinadas à monitoração e tratamento das arritmias (Ferreira, 2010).

Durante as décadas de 1980 e 1990, novas descobertas modificaram o entendimento da patologia do infarto. O conhecimento dos mecanismos moleculares de morte e defesa à agressão isquêmica possibilitou a investigação e identificação de drogas e nutrientes com potencial para reduzir a área de infarto (Kroner, Longacre, 2011). Estabeleceu-se assim o conceito de cardioproteção, que pode ser enunciado como: qualquer intervenção que aumenta a tolerância do músculo cardíaco à isquemia (Herse, 2001; Maroko et al., 1971).

A reperfusão coronariana imediata após o IAM é a intervenção mais eficiente em reduzir a área de infarto (Kloner, Longrace, 2011). Contudo, outras intervenções mostraram-se efetivas em promover cardioproteção. A administração de adenosina logo após o evento isquêmico e o pré-condicionamento isquêmico, como terapia adjuvante à reperfusão, reduzem em até 30% a área do núcleo necrótico (Kloner, Longrace, 2011). Estas medidas cardioprotetoras retardam a expansão do infarto por restabelecerem o fluxo sanguíneo e/ou por conferirem tolerância contra a isquemia às células miocárdicas.

Existem mecanismos cardioprotetores naturais. Fatores como adenosina, opióides e bradicinina são liberados no tecido cardíaco imediatamente após o IAM e ligam-se a receptores acoplados a proteína G ativando vias de sinalização envolvidas nos mecanismos de sobrevivência celular à isquemia (Liu et al., 2011).

Vias como a da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), proteína quinase C (PKC), *agammaglobulinaemia tyrosine kinase* (Akt), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e canal de potássio mitocondrial ATP sensível (K_{ATP}), quando ativadas, apresentam efeitos anti-apoptóticos nos cardiomiócitos (Liu et al., 2011).

Após este período inicial, ocorre uma segunda resposta cardioprotetora, que permanece por vários dias após o infarto. Esta envolve fatores de crescimento como: fator de crescimento endotelial (VEGF), fator de crescimento como a insulina (ILGF), fator de crescimento de hepatócito (HGF) e fator derivado da célula estromal I (SDF-I). Estes participam da angiogenese, reparação tecidual e ativam vias de sobrevivência celular como a PI3K/Akt (Liu et al., 2011).

Respostas cardioprotetoras sistêmicas também ocorrem no IAM. Fator de crescimento de fibroblasto 21 (FGF21) e *trefoil factor 3* (TFF3) secretados pelo fígado agem no coração ativando vias de sobrevivência (Liu et al., 2011).

Murry e colaboradores (1986) demonstraram em cães que períodos breves de isquemia, seguidos de períodos curtos de reperfusão (4 seções de 5 minutos de isquemia com 5 minutos de reperfusão), confere ao miocárdio menor área de lesão quando submetido a uma isquemia mais prolongada (30 a 60 minutos). Este fenômeno denominado “pré-condicionamento isquêmico” ocorre também em ratos, camundongos, coelhos e humanos (Yang et al., 2010). Os efeitos cardioprotetores do pré-condicionamento isquêmico são atribuídos a menor depleção de ATP durante a isquemia (Jennings et al., 2001), redução de lactato e íons H^+ (Fleet et al., 1985) e aumento na utilização de glicogênio pelo músculo cardíaco (Soares et al., 1997). Além

destes efeitos metabólicos, o pré-condicionamento isquêmico ativa vias de sobrevivência do cardiomiócito que envolve fosforilação da Akt, ativação da PKC ϵ , eNOS, iNOS e produção de óxido nítrico (Li et al., 2000; Xia, Vanhoutte, 2011). Em adição, Cai e colaboradores (2013) demonstraram ausência de efeito cardioprotetor pelo pré-condicionamento isquêmico em camundongos *knockout* para fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1). Desta forma, o músculo cardíaco é passível de condicionamento que o torna mais resistente a condição de baixa tensão de oxigênio.

1.4 Inflamação e a expansão do infarto

O processo de reparo do tecido infartado é dividido em três fases que se sobrepõem, são elas: 1) inflamatória; 2) proliferativa e 3) maturativa (Frangogiannis 2006). As células ao morrerem por necrose liberam conteúdo intracelular (ADP, K⁺, fosfolipase, Ca⁺⁺, etc) que iniciam a resposta inflamatória e quanto maior o número de células comprometidas pela isquemia maior será esta resposta (Frangogiannis, 2006).

Em humanos, a inflamação é intensa entre 1 a 2 semanas e entra em declínio entre 3 a 4 semanas após o infarto (Sun, 2009). Em ratos e camundongos, o período inflamatório é mais curto do que em humanos, ocorrendo entre 3 a 72 horas, atingindo o pico em 48 horas (Frangogiannis, 2006).

A inflamação inicia-se pela ativação de metaloproteínases que degradam a matrix extracelular e pela infiltração de neutrófilos e monócitos/macrófagos. Estas últimas células removem o tecido necrosado e debris de matrix extracelular que, enquanto presentes, impedem a cicatrização (Frangogiannis, 2006).

Deve haver equilíbrio entre a intensidade da agressão e a resposta inflamatória. A inflamação excessiva pode expandir a área de necrose e agravar a disfunção sistólica causada pelo infarto (Cleutjens et al., 1995a; Frangogiannis, 2013; Kempf et al., 2012). Neutrófilos secretam enzimas como elastases, collagenases e oxidases, que fragilizam a parede do ventrículo infartado, com risco de ruptura (Anzai, 2013). Ainda, macrófagos secretam uma variedade de citocinas pró-inflamatórias que em excesso podem agravar a lesão tecidual causada pelo infarto (Anzai, 2013). As primeiras citocinas liberadas no tecido cardíaco (TNF- α , IL-1 β e CINC 2 α/β) exercem efeitos pró-inflamatórios tais como: aumento na expressão de moléculas de adesão, ativação de fagócitos, vasodilatação e permanecem elevadas entre o primeiro e quarto dias pós infarto. Por sua vez as concentrações no coração de IL-10, TGF β e VEGF

elevadas a partir do quinto dia de infarto estão envolvidas com a angiogênese e formação de tecido cicatricial (Kempf et al., 2012). Portanto, a conduta terapêutica com drogas antiinflamatórias é controversa, pois a inflamação que surge após o IAM é um processo necessário, participando do processo de reparo do miocárdio necrosado, mas quando excessiva e/ou prolongada pode causar danos.

Na fase proliferativa, ocorre ativação de miofibroblastos, formação de vasos sanguíneos e fibrinogênese. A fibrogênese caracteriza-se pela síntese de colágeno dos tipo III e I que continua na fase maturativa, onde ocorre reorganização das fibras tornando-as mais resistentes (Tuner, Poter, 2013). Nesta fase, há aumento na expressão de genes de fatores de crescimento (TGF- α e β , bFGF, Angio II, IGF-1, ET-1 e VEGF) que estão ativos normalmente durante a vida fetal e encontram-se reprimidos no coração de adultos (Cleutjens et al., 1995b; Swynghedauw, 2006). Estes mediadores levam à alteração anatômica adaptativa do ventrículo (denominada remodelamento ventricular), caracterizada por hipertrofia das áreas não afetadas pelo infarto que compensam a perda da força contrátil do miocárdio isquêmico. Contudo, como ocorre na inflamação excessiva, o aumento na espessura das paredes ventriculares pode levar a diminuição da cavidade de enchimento do ventrículo (hipertrofia concêntrica) e prejudicar a função cardíaca, desencadeando, em longo prazo, insuficiência cardíaca (Swynghedauw, 2006). O IAM é responsável por 50% das Insuficiências cardíacas diagnosticadas (Colucci, Brounwald, 2003).

1.5 Metabolismo energético do coração e IAM

O coração utiliza como fonte energética ácidos graxos, glicose, corpos cetônicos, piruvato, aminoácidos e proteína intracelular (Fillmore, Lopaschuk, 2013). O metabolismo energético do músculo cardíaco é um fator determinante da extensão da área de infarto e das complicações pós-infarto (Horowitz et al., 2010). O músculo cardíaco obtém energia na forma de ATP principalmente pela oxidação de ácidos graxos (Taegtmeyer, 2004). Contudo, durante um processo isquêmico, como no IAM, a oxidação da glicose torna-se muito ativa, pois pode produzir ATP mesmo na ausência de oxigênio (Abozguia, 2009). Existem duas fontes de glicose para o músculo cardíaco: 1) meio extracelular; esta fonte depende da concentração plasmática de glicose, produção hepática e do fluxo coronariano e 2) da reserva de glicogênio no cardiomiócito. Existem evidências de que a concentração plasmática

elevada de glicose tem efeito cardioprotetor. Schaffer e colaboradores (2000) observaram que cardiomiócitos cultivados com glicose na concentração de 25 mM durante 3 dias resistem à apoptose pela prevenção do acúmulo de cálcio no citoplasma que ocorre durante a hipóxia. Posteriormente, Xu e colaboradores (2004) observaram que animais infartados com quatro semanas de diabetes, induzida por estreptozotocina, apresentam uma área de infarto de cerca de 20% menor se comparadas com os animais infartados não diabéticos. Malfitano e colaboradores (2010) observaram menor área de infarto, melhor função cardíaca, redução de citocinas pró-inflamatória e maior angiogênese em coração de ratos diabéticos e infartados. Estes autores atribuíram esses efeitos a hiperglicemia presente nos ratos diabéticos.

Há evidências de que o glicogênio é um metabólito cardioprotetor durante condições isquêmicas (Doenst et al., 1996; Lagerstom et al., 1988; Scheur, Stezoski 1970). Coração isolado de ratos submetidos ao jejum por 24 horas apresentam maior conteúdo de glicogênio do que os alimentados e apresentam ainda menor morte celular quando avaliado pela liberação de CK (Schaefer, Ramasamy, 1997). Schneider and Taegtmeyer (1991) utilizando modelo de isquemia em coração isolado de rato, demonstraram que o aumento no conteúdo de glicogênio no músculo cardíaco induzido pelo jejum melhora a função cardíaca e reduz a morte de cardiomiócitos por necrose. Estes achados apontam para estratégias terapêuticas a serem utilizadas no IAM baseadas em medidas que aumentam a disponibilidade de glicose para o tecido cardíaco, seja através da maior oferta plasmática desta ou da utilização do glicogênio.

1.6 Os ácidos graxos

Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos representados pela fórmula $R-CO_2-H$. Em mamíferos, o radical R é geralmente uma cadeia hidrocarbônica longa, não ramificada, com número par de átomos de carbono. Essas moléculas possuem uma região polar ($-CO_2-H$), insolúvel em lipídios e solúvel em água, e uma porção apolar (R-), insolúvel em água e solúvel em lipídios.

Quanto ao tamanho da cadeia carbônica, os AG podem ser classificados em AG de cadeia curta (contêm dois a quatro átomos de carbono), cadeia média (seis a dez átomos de carbono), cadeia longa (quando contêm mais de doze átomos de carbono) (Curi et al., 2002). Os AG de cadeia curta são hidrossolúveis e absorvidos

diretamente da luz intestinal para a corrente sanguínea. São formados a partir da degradação bacteriana de carboidratos e bactérias provenientes da dieta. São usualmente metabolizados para fonte imediata de energia. Os AG de cadeia longa são constituintes das membranas celulares e precursores de mediadores de vias de sinalização intracelular além de exercerem efeito nas proteínas de membranas.

As ligações entre dois carbonos podem ser do tipo sigma (ligação simples) e do tipo pi (duplas ligações), denominada também de insaturação. Os ácidos graxos podem ser classificados quanto ao número de insaturações na molécula em: saturados (AGS) – sem insaturações na molécula, monoinsaturados (AGMI) – presença de uma insaturação na cadeia carbônica e poliinsaturados (AGPI) - com mais de uma insaturação (Curi et al., 2002).

Os ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados podem, ainda, serem classificados em *cis* ou *trans*. Quando *cis*, os átomos de hidrogênio ligados aos átomos de carbono adjacentes à dupla ligação estão do mesmo lado da cadeia hidrocarbônica, ao passo que quando o AG é *trans*, os átomos de hidrogênio estão em lados opostos da cadeia. A rigidez da dupla ligação mantém a conformação da molécula e, no caso da conformação *cis*, causa curvamento da cadeia, restringindo a liberdade conformacional do AG. As duplas ligações *trans* não causam curvamento da cadeia hidrocarbônica e por isso AG *trans* apresentam estrutura espacial similar à de AG saturados. Disto resulta que lipídeos compostos majoritariamente por AG insaturados e poliinsaturados apresentam menor ponto de fusão e se encontram no estado líquido à temperatura ambiente, sendo denominados genericamente de óleos. Lipídeos compostos por AG de cadeia saturada apresentam-se sólidos à temperatura ambiente e são chamados de gorduras.

Há três formas de identificar os ácidos graxos, são elas: pelo nome comum, geralmente deriva da fonte onde foi primeiramente isolado; por abreviatura e pelo nome químico conforme o sistema IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). As duas primeiras nomenclaturas são mais usuais nas ciências biológicas e da saúde. O ácido oleico é um exemplo de nome comum. Este ácido é encontrado em altas concentrações no óleo de oliva. Outro exemplo é o ácido araquidônico que foi primeiramente obtido do óleo de amendoim que tem o nome científico *Arachis hypogaea* L, daí o nome araquidônico. No sistema IUPAC, os átomos de carbono recebem números a partir do grupamento carboxílico (numeração Δ). Eles são representados indicando a configuração da dupla ligação (*cis* ou *trans*), seguido das

posições das duplas ligações e do nome que representa o número de carbonos (ex: tetra - 4 carbonos ou eicosa – 20 carbonos). Por fim, o nome deve ser adicionado do sufixo “oico” que indica ser um ácido carboxílico. Desta forma, pelo sistema IUPAC o ácido araquidônico é representado como *ácido cis-5-cis-8-cis-11-cis-14-eicosatetraenóico*. Pelo sistema por abreviaturas, o ácido graxo é representado pelo número de carbonos seguido pelo número de duplas ligações, estes separados por dois pontos, adicionado da posição da primeira dupla ligação mais próxima do carbono do terminal metila, ou carbono ω , que pode ser substituído pela letra “n”. Desta forma, o ácido araquidônico é representado como 20:4 ω 6 ou 20:4n6. Pelo sistema de nomenclatura os ácidos graxos podem ser classificados em 4 classes distintas: ω -3, ω -6, ω -7 e ω -9, baseado na localização da primeira dupla ligação (Figura 1).

Figura 1- Sistema de identificação de ácidos graxos; A) nome comum, B) nome químico e C) abreviatura.

1.7 Ácidos graxos ômega 3 e 6

Os ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 e 6 não podem ser sintetizados pelo organismo humano e são obtidos somente através da dieta (Pompeia, 2000). Estas duas classes de AGs são imprescindível ao organismo. Aron (1918) descreveu a morte de animais submetidos a dietas pobres em lipídios, mas que foi prevenida pela adição de gordura. Essa descoberta levou o pesquisador a sugerir que haveriam AGs essenciais. A partir deste estudo pioneiro, outros autores demonstraram efeitos deletérios em animais e humanos causados pela deficiência dos AGPI ômega 6 (Burr, 1973) e posteriormente do ômega 3 (Holman, 1998; Innis, 1991).

Os ácidos graxos ômega 3 e 6 provenientes da dieta podem ser oxidados nos tecidos, incorporados em fosfolípides de membrana e/ou serem metabolizados a outros ácidos graxos (Tabelas 1 e 2) e metabólitos biologicamente ativos pela ação da COX e/ou LOX (Figura 2) (Schmitz, Ecker, 2008).

Os ácidos linoleico (18:2n-6) e araquidônico são fontes primárias de AGPI n-6 para os humanos (Calder et al., 2010). O ácido linoleico é encontrado em óleos vegetais, principalmente na semente de girassol, milho e soja (Calder et al., 2010).

Quando metabolizado, o ac. linoléico é inicialmente convertido ao ácido γ -linolênico (18:3n6) pela delta-6 dessaturase. A seguir, este AG é transformado no ácido diomo- γ -linolênico 20:3n6) pela elongase 5 (ENLOVL5). O ácido diomo- γ -linolênico, sob ação da delta-5-dessaturase, é convertido no ácido araquidônico (20:4n6). Este pode seguir a via sendo transformado em ácido docosapentaenóico (22:5n6) e/ou, sob ação das enzimas COX e LOX, desviar para a síntese de eicosanóides (Figura 2).

Os ácidos docosaexanóico (DHA) e eicosapentaenóico (EPA) são provenientes de fontes marinhas (peixes e mariscos). Por sua vez, o ácido alfa-linolênico (ALA) é encontrado na semente de linhaça, colza, nozes e soja (Calder et al., 2010). Os ácidos EPA e DHA podem ser sintetizados a partir do ácido α -linolênico (ALA) (Figura 2). Contudo, a taxa de síntese é baixa, menos de 6 e 0,1 % de ALA são convertidos em EPA e DHA, respectivamente (Calder et al., 2010; Harris et al., 2009). O ALA é, inicialmente, transformado em ácido octadecatetraenóico (18:4n3), pela ação da delta-6-dessaturase. Em seguida, pela ação da ELOVL5, o ácido octadecatetraenóico é transformado no ácido eicosatetraenóico (20:4n3) e este em ácido EPA. O EPA pode sofrer ação da COX e/ou LOX e gerar eicosanóides de classes distintas (prostaglandinas e leucotrienos das séries 3 e 5, respectivamente) daquelas geradas a partir do ácido AA (prostaglandinas e leucotrienos das séries 2 e 4, respectivamente). A formação do DHA ocorre nos peroxissomos pela beta oxidação do ácido tetracosaexaenóico (24:6n3)(Russo, 2009).

TABELA 1 - Ácidos graxos ômega 6

Nome comum	Abreviatura	Nome químico
Ác. α-linolêico (LA)	18:2 n-6	all-cis-9,12-octadecadienóico
Ác. γ-linolênico (GLA)	18:3 n-6	all-cis-6,9,12-octadecatrienóico
Ác. diomo-γ-linolênico (DGLA)	20:3 n-6	all-cis-8,11,14-eicosatrienóico
Ác. araquidônico (AA)	20:4 n-6	all-cis-5,8,11,14-eicosatetraenóico
Ác. docosatetraenóico (DTA)	22:4 n-6	all-cis-7,10,13,16,-docosatetraenóico
Ác. docosapentaenóico (DPA)	22:5 n-6	all-cis-4,7,10,13,16-docosapentaenóico

TABELA 2 - Ácidos graxos ômega 3

Nome comum	Abreviatura	Nome químico
Ác. Alfa linolênico (ALA)	18:3 n-3	all-cis-9,12,15-octadecatrienóico
Ác. octadecatetraenóico	18:4 n-3	all-cis-6,9,12,15-octadecatetraenóico
Ác. eicosatetraenóico (ETA)	20:4 n-3	all-cis-8,11,14,17-eicosatetraenóico
Ác. eicosapentaenóico (EPA)	20:5 n-3	all-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenóico
Ác. docosapentaenóico (DPA)	22:5 n-3	all-cis-7,10,13,16,19-docosapentaenóico
Ác. docosaexanóico (DHA)	22:6 n-3	all-cis-4,7,10,13,16,19-docosaexanóico
Ác. tetracosapentaenóico (TPA)	24:5 n-3	all-cis-9,12,15,18,21-tetracosapentaenóico
Ác. tetracosaxanóico (THA)	24:6 n-3	all-cis-6,9,12,15,18,21-tetracosenóico

(Adaptado de Russo, 2009)

1.8 Ácidos graxos ômega 3 e cardioproteção

Desde os estudos pioneiros de Dyerberg e colaboradores (1975) e Bang e colaboradores (1976) mostrando que a ingestão de ácidos graxos ômega 3 protegia os povos Inuits que habitam a região ártica de doenças cardiovasculares, outros foram realizados para elucidar os mecanismos cardioprotetores envolvidos (Adkins, Kelley, 2010; Culp et al., 1980; Hock et al., 1990; Oskarsson et al., 1993; Ogita et al., 2003; Zhu et al., 1994).

Os ácidos graxos tais como DHA e EPA apresentam efeitos antiinflamatórios conhecidos (Calder, 2010, 2013). O efeito antiinflamatório do AGPI ômega 3 ocorre, pelo menos em grande parte, pelo antagonismo exercido pelos eicosanoides gerados a partir do EPA (PGE₃, PGI₃, TXA₃, LTB₅, LTC₅ e LTE₅) sobre os eicosanoides provenientes do AA (Schmitz, Ecker, 2008). Recentemente, foi demonstrado que macrófagos e adipócitos expressam o receptor GPR120 em grandes quantidades (Oh et al., 2010). Este receptor está acoplado a proteína G e tem como ligante principal ácidos graxos de cadeia longa (Hirasawa et al., 2005). Oh e colaboradores (2010)

demonstraram que EPA e DHA, ligantes deste receptor, apresentam efeito anti-inflamatório por inibir a via de sinalização do “Toll like receptor” (TLR) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) no macrófago, além de diminuir a resistência à insulina em camundongos obesos. Desta forma, os ácidos graxos da família ômega-3 também apresenta efeito anti-inflamatório que independem da formação de mediadores inflamatórios lipídicos.

Propriedades antitrombótica, antioxidante, antiarrítmica e vasodilatadora contribuem para a ação cardioprotetora do AGPI ômega 3 (Adkins, Kelley, 2010; Culp et al., 1980; Hock et al., 1990; Oskarsson et al., 1993; Ogita et al., 2003; Zhu et al., 1994). Okuda e colaboradores (1997) demonstraram redução na área de infarto em coração de coelhos suplementados com EPA. Este efeito foi abolido pela administração de L-NAME (inibidor da NO sintase) antes da indução do infarto. Yanasigawa e Lefer (1987) utilizando artérias isoladas de coelhos e gatos demonstraram ação vasodilatadora do EPA independente da inibição da COX e LOX. Isso indica que EPA tem efeito vasodilatador independente da formação de eicosanóides. O EPA parece ter efeito cardioprotetor em períodos curtos de suplementação. McGuinness e colaboradores (2006) observaram que a infusão venosa de uma emulsão contendo EPA durante quatro dias, antes da indução de infarto, protege o coração de coelhos da injúria causada pela isquemia/reperfusão. Neste estudo, foi observado aumento na expressão da proteína HSP72 no coração dos animais suplementados com EPA antes da indução do infarto. O aumento na expressão das HSPs (*heat shock proteins*) no coração tem sido usado como indicador de pré-condicionamento e cardioproteção (Hutter et al., 1994).

Apesar de haver muitas evidências experimentais de que AGPI n-3 confere cardioproteção, estudos epidemiológicos não são conclusivos quanto a este efeito. Estudos observacionais evidenciam forte relação entre o consumo de peixe com a baixa mortalidade ou morbidade por doenças isquêmicas do coração (Dolecek, 1992; Kromhout et al., 1985; Rodriguez et al., 1996). Contudo, em trabalhos de intervenção clínica de prevenção secundária dos AGPI n-3 no IAM os resultados são divergentes. Nos estudos GISSI-Prevenzione Investigators (1999) e DART (1989) foi observada redução na mortalidade em pacientes infartados suplementados com óleo de peixe em relação aos que receberam placebo. Porém, nos ensaios ORIGIN Trial Investigators (2012), Omega (2010), Alpha-Omega (2010) e SU.FOL.OM3 (2010) não foram observados efeitos benéficos dos AGPI n-3 nas doenças isquêmicas do

coração. A presença de comorbidades como diabetes e hipertensão, uso de estatinas e anticoagulantes, diferentes doses de AGPI n-3 e diferenças genética entre as populações estudadas são alguns fatores que levaram à resultados divergentes nestes estudos (Barringer, 2012).

Figura 2 – Vias de metabolização dos ácidos graxos poliinsaturados ômega 6 e 3. COX- ciclooxygenase, LOX – lipooxygenase (Adaptado de Schmitz, Ecker, 2008)

1.9 O modelo de infarto

O modelo por ligadura permanente da artéria descendente (LAD) foi inicialmente descrito por Heimbürger em 1946. A técnica baseia-se na ligadura da coronária esquerda descendente com fio de sutura (descrição da técnica ver item 4.9).

Diferente do infarto induzido por fármaco (isoproterenol), onde ocorrem áreas difusas de necrose, o IAM induzido por LAD gera um núcleo necrótico circundado por

uma região de risco que pode ser quantificada por métodos histoquímicos ou ecocardiográfico (Santos et al., 2009). Outra vantagem deste método é a rapidez com que o infarto se instala o que possibilita investigar alterações metabólicas, inflamatórias e de função imediatas após a indução do infarto. Uma área esbranquiçada surge imediatamente após o bloqueio do fluxo sanguíneo e aparecem disfunções sistólica e diastólica já nas primeiras 3 horas após a oclusão coronariana (De Felice et al., 1989).

Existem dois tipos de ligaduras, a permanente da artéria descendente e a temporária chamada de isquemia e reperfusão. Na isquemia e reperfusão, bloqueia-se o fluxo coronariano por alguns minutos (fase de isquemia) e se restabelece o mesmo em seguida (fase de reperfusão). Embora a reperfusão restaure o suprimento de oxigênio, nutrientes e drena os produtos do metabolismo celular que se acumulam na isquemia, ela pode desencadear um processo conhecido como “lesão de reperfusão”, que exacerba o dano tecidual provocado pela isquemia (Sanada et al., 2011). No infarto por ligadura permanente, o dano tecidual, assim como as alterações metabólicas e inflamatórias decorrentes do infarto, são consequências unicamente do processo isquêmico, sem a interferência das alterações provocadas pela reperfusão. Isso permite avaliar os efeitos de drogas, nutrientes e/ou procedimentos sobre a tolerância do tecido cardíaco à isquemia.

A taxa elevada de mortalidade, entre 40 a 60 %, é uma desvantagem do modelo de ligadura permanente da coronária. A principal causa de óbito neste modelo é a prevalência alta de arritmias, como a taquicardia e fibrilação ventricular (Zornoff et al., 2009). Outro fator a ser considerado é a variabilidade no tamanho do infarto. A oclusão muito próxima da origem da artéria descendente esquerda pode gerar área de infarto muito grande, maior que 65% do ventrículo esquerdo, que obviamente, provoca taxa alta de mortalidade (Zornoff et al., 2009). Contudo, quando consideradas as medidas adequadas de suporte pós-cirúrgicos e a habilidade cirúrgica do experimentador estas desvantagens são minimizadas. Apesar disso, modelo de ligadura permanente continua sendo amplamente utilizado para avaliar função cardíaca (Fosshaug et al., 2011), controle autonômico (de La Fuente et al., 2013), resposta ao exercício físico (Rodrigues et al., 2012), processo inflamatório (Malfitano et al., 2010) e o metabolismo energético (Wan et al., 2010) no IAM.

2 JUSTIFICATIVA

O infarto agudo do miocárdio é responsável por 43 % das mortes por doenças cardiovasculares (WHO, 2011). A maioria delas ocorre nas primeiras horas de manifestação da doença, sendo 40 % a 65 % na primeira hora e, aproximadamente, 80% no período de 24 horas (Kannel et al., 1987; Myerburg, Castellanos, 2001). Assim, a maior parte das mortes ocorre fora do ambiente hospitalar, antes dos infartados sofrerem qualquer terapia de reperfusão (Timerman, Feitosa, 2003).

Há evidências de que a resposta inflamatória desencadeada pela lesão isquêmica determina a extensão do infarto, os ácidos linoleico e araquidônico apresentam ação pró-inflamatória e o EPA anti-inflamatória e o metabolismo energético do músculo cardíaco é um fator determinante da extensão da área de infarto e das complicações pós-infarto. Diversos autores demonstraram em animais o efeito cardioprotetor do óleo de peixe na isquemia e reperfusão (Abdukeyum et al., 2008; Gao et al., 2011; Ogita et al., 2003; Zeghichi-Hamri et al., 2010). Contudo, os efeitos do óleo de peixe sobre a área de infarto e as alterações inflamatórias e metabólicas, sistêmicas e locais, causadas unicamente pela isquemia não foram ainda investigados.

3 OBJETIVO

Avaliar os efeitos de um óleo rico em EPA (óleo de peixe) e outro rico nos ácidos linoleico e araquidônico (óleo de soja) sobre a área de lesão, função cardíaca, respostas inflamatória e metabólica no infarto induzido por ligadura permanente da coronária esquerda em ratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos com 2 meses de idade obtidos do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas sob ciclo de claro-escuro de 12:12 h, à 23 °C $\pm$ 1°C, com livre acesso à água e ração (NUVILAB CR-1, Nuvital, Curitiba, PR). O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética do Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (protocolo n° 115/09).

4.2 Desenho experimental

4.2.1 Descrição dos grupos experimentais

Os animais foram separados em dois grupos: não infartado e infartado. Cada grupo foi dividido em três subgrupos: salina, óleo de peixe e óleo de soja (Figura 1). No grupo não infartado (SHAM), os tórax dos animais foram abertos e os pericárdios rompidos, sem promover a ligadura da artéria coronária. O infarto foi induzido por ligadura da coronária descendente esquerda (ver subitem 4.9).

4.2.2 Protocolo de suplementação

Os animais receberam, diariamente, por via intragástrica, salina, óleo de peixe ou óleo de soja na dose de 3 g/Kg de peso corpóreo por dia, durante 20 dias. No vigésimo primeiro dia foram realizadas a indução do infarto ou a cirurgia (SHAM). A dose de óleo utilizada foi previamente testada e não apresentou alteração na consistência das fezes. As análises da área do infarto, função cardíaca, parâmetros metabólicos e inflamatórios foram realizadas 24 horas após a indução do infarto ou da cirurgia (SHAM) (Figura 3).

A dose de 3g/Kg utilizada no presente trabalho foi baseada nos achados de Miyasaka e colaboradores (2001) que demonstraram que o óleo de peixe,

administrado por via intragástrica, na dose de 4 g/Kg de peso corpóreo, altera a composição de ácidos graxos de membranas de linfócito, macrófagos e neutrófilos de ratos sem apresentar efeito tóxico.

Figura 3 - Representação esquemática dos grupos e subgrupos estudados. IAM – infarto agudo do miocárdio, SHAM – operação sem indução do infarto

4.2.3 Parâmetros avaliados

Para avaliação da toxicidade, foram investigados os seguintes parâmetros em animais controles (não submetido a nenhum tipo de cirurgia):

- Ingestão de ração e calorias
- Ganho de massa corpórea
- Massa de órgãos (coração, fígado e depósitos de gordura)
- Atividade plasmática das enzimas hepáticas ALT, AST, LDH, CK e gama GT
- Concentração plasmática de glicose, bilirrubina e albumina

Para investigar os efeitos do pré-tratamento com os óleos sobre o IAM, os seguintes parâmetros foram avaliados nos animais infartados ou SHAM:

- Taxa de mortalidade
- Concentração de AGL, triacilglicerol, colesterol total, HDL-C, LDL-C e VLDL-c no plasma
- Incorporação de ácidos graxos no VE
- Conteúdo de AGL e triacilglicerol no VE, VD e fígado
- Área de infarto
- Atividade plasmática da creatina quinase
- Atividade da caspase 3 no VE
- Conteúdos de IL-1 β , TNF- α , CINC 2 α/β , MIP-3 e IL-6 no VE e fígado e concentração das frações C3 e C4 do complemento e proteína C reativa (PCR) no plasma
- Conteúdo de produtos da peroxidação lipídica no VE e fígado
- Conteúdo de glicogênio, lactato no VE e ATP no VE e fígado
- Atividades máximas da fosfofrutoquinase e citrato sintase no VE
- Conteúdo de RNAm no VE de genes relacionados a produção de NO (*iNOS* e *eNOS*), angiogênese (*VEGF*), metabolismo (PFK 1, PDK 4, glicogênio fosforilase, citrato sintase, HIF 1, hexoquinase, GLUT 1 e UCP 3), reparação tecidual (MG53) e apoptose (p53, Fas, Bax2 e Bcl2). As expressões destes genes foram avaliadas nos grupos SHAM e infartado, suplementados com salina ou óleo de peixe
- Fluxo sanguíneo coronariano do VE avaliado nos grupos SHAM e infartado, suplementados com salina ou óleo de peixe.
- Parâmetros funcionais do coração (fração de ejeção, fração de encurtamento, velocidade de encurtamento circunferencial, tempo de relaxamento isovolumétrico, relação entre as ondas pico E e pico A, tempo de desaceleração da onda E e frequência cardíaca). Estes parâmetros foram avaliados nos grupos SHAM e infartado, suplementados com salina ou óleo de peixe

4.2.4 Características dos óleos

Como fonte de AGPI n-3 foi utilizado óleo de peixe, rico em EPA e DHA na forma de etil éster (Figura 4), fornecido pela Naturalis (Alimentos Naturais LTDA, São Paulo-SP) com o nome comercial de Hi-Omega®. Como fonte de AGPI n-6 foi utilizado óleo de soja da marca Soya (Bungue, São Paulo, SP). As composições dos óleos estão demonstradas na Tabela 3.

Etil éster do ácido eicosapentaenóico

Etil éster do ácido docosaexaenóico

Figura 4 – Estrutura química dos ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenóico (DHA) na forma de etil éster. (Adaptado de Mozaffarian, 2012)

Tabela 3 – Composição de ácidos graxos dos óleos de peixe e de soja determinada por CG (Cromatografia gasosa).

Abreviatura	Nome comum dos ácidos	Óleo de Soja (%)	Óleo de Peixe (%)
16 : 0	Palmitico	10,67 ± 0,04	ND
16 : 1 (n-7)	Palmitoleico	ND	ND
17 : 0	Margárico	ND	ND
17 : 1 (n-7)	Heptadecenóico	ND	ND
18 : 0	Estearico	4,11 ± 0,08	0,34 ± 0,01
18 : 1 (n-9)	Oleico	24,19 ± 0,04	1,53 ± 0,03
18 : 1 (n-7)	Vacênico	ND	ND
18 : 2 (n-6)	Linoleico	53,23 ± 0,09	2,87 ± 0,04
20 : 0	Eicosanóico	ND	ND
18 : 3 (n-6)	γ-Linolênico	ND	0,64 ± 0,01
20 : 1 (n-9)	Eicosenóico	ND	0,23 ± 0,01
18 : 3 (n-3)	α-Linolênico	6,80 ± 0,08	0,26 ± 0,01
18 : 4 (n-3)	Octadecatetraenóico	ND	8,15 ± 0,08
22 : 0	Docosanóico	ND	0,28 ± 0,00
22 : 1	Docosenóico	ND	ND
20 : 4 (n-6)	Araquidônico	ND	2,80 ± 0,04
20 : 4 (n-3)	Eicosatetraenóico	ND	0,74 ± 0,02
24 : 0	Lignocérico	ND	ND
20 : 5 (n-3)	Eicosapentaenóico	ND	60,90 ± 0,25
24 : 1	Nervônico	ND	ND
21 : 5	Eneicosapentaenóico	ND	ND
22 : 5 (n-6)	Docosapentaenóico	ND	0,43 ± 0,00
22 : 5 (n-3)	Docosapentaenóico	ND	1,24 ± 0,02
22 : 6 (n-3)	Docosahexaenóico	ND	16,32 ± 0,31
Totais	Saturados	14,78 ± 0,07	0,83 ± 0,19
	Monoiinsaturados	24,19 ± 0,04	2,46 ± 0,05
	Poliinsaturados	60,03 ± 0,08	95,85 ± 0,18
	AGs ω-3	6,8	87,61
	AGs ω-6	53,23	6,7
	Não identificados	0,99 ± 0,03	1,00 ± 0,09

ND – Não detectado.

Σ AGPI n-3 – somatória dos ácidos graxos ômega 3

Σ AGPI n-6 – somatória dos ácidos graxos ômega 6

4.3 Eutanásia dos animais e obtenção de amostras

Os animais foram eutanasiados utilizando método de exsanguinação associada à anestesia (80 mg/Kg p.c. de cloridrato de ketamina – Francotar® e 12 mg/Kg p.c. de cloridrato de xilazina - Vibraxyl®). Após 6 horas de jejum, os animais foram anestesiados e uma incisão foi feita na linha mediana do abdome. As vísceras foram afastadas e o coração puncionado através do diafragma utilizando uma agulha 25x8 mm acoplada a seringa de 10 mL previamente lavada com EDTA a 10%. Após a retirada do sangue (entre 7 a 10 mL) foi realizado deslocamento cervical, o tórax foi aberto rapidamente e o coração excisado. O ventrículo esquerdo foi separado dos átrios, VD e artérias e dividido, transversalmente, em três porções, de acordo com a área de necrose. Nos tubos 1 e 2, foram colocadas porções de VE contendo áreas necrosadas e não necrosadas. Essas foram posteriormente utilizadas para

determinações de citocinas, conteúdo de lipídeos e atividades da creatina quinase e caspase 3. No tubo 3 foi colocada porção não necrosada do VE, utilizada para determinação do conteúdo de glicogênio, ATP, lactato e atividades da fosfofrutoquinase e citrato sintase (Figura 5). Amostras de fígado foram armazenadas em tubos e mantidas à menos 80°C até o momento das determinações bioquímicas.

Figura 5 – Excisão do coração e fígado e preparação das amostras. VE – ventrículo esquerdo (Figura cedida por Fábio Takeo Sato)

4.4 Determinação da ingestão diária de ração e calorias

Na última semana de suplementação com os óleos (entre o 10º e 20º dia) os animais foram separados em gaiolas individuais e por quatro dias consecutivos, no horário das 17 horas, foi avaliado o consumo alimentar através das pesagens da ração colocada no dia e a restante do dia anterior. A partir dos valores foi realizada a média dos consumos diários de cada animal e posteriormente a média dos grupos. Os animais foram colocados em gaiolas individuais dois dias antes da primeira medida do consumo alimentar para se adaptarem.

4.5 Preparação de amostras de plasma para determinação dos parâmetros bioquímicos

O sangue foi coletado em tubos contendo EDTA e centrifugados a 3000 rpm a 4°C, durante 15 minutos. Atividades da gama GT, ALT, AST, LDH, CK e concentrações de creatinina, uréia, bilirrubina, albumina, triacilglicerol, colesterol total, HDL-C e LDL-C no plasma foram determinadas utilizando kits comerciais (Bioclin, Belo Horizonte, MG).

4.5.1 *Determinação da concentração de creatinina no plasma*

A creatinina e outros cromogênios inespecíficos presentes no plasma, em pH básico, reagem com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhada. Em pH ácido, a cor gerada pela formação do complexo creatinina-picrato é desfeita, permanecendo a cor referente aos cromogênios inespecíficos. Por diferença entre as leituras em 500 nm obtém-se o valor real da creatinina (Jaffé, 1886).

4.5.2 *Determinação da concentração de uréia no plasma*

O método utilizado para determinação da concentração de uréia baseia-se na hidrólise desta pela urease à íons amônio e CO₂. Os íons amônio reagem, em pH alcalino, com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, formando indolfenol (Fawcett, Scott, 1960), segundo a reação abaixo:

O indolfenol gera cor com absorção máxima em 600 nm. A intensidade da cor é proporcional à quantidade de uréia na amostra.

4.5.3 Determinação da concentração de bilirrubina total no plasma

O método para determinação da concentração de bilirrubina total foi inicialmente desenvolvido por Mather (1960) e posteriormente modificado por Martineck (1965). Este método baseia-se na diazotização (reação de uma amina com ácido nitroso) gerando um sal de diazônio, azobilirrubina, que apresenta cor vermelha com absorção máxima em 525 nm.

4.5.4 Método para determinação da atividade da gama GT

A atividade da gama glutamiltransferase (gama GT) foi determinada segundo método descrito por Goldbarg e colaboradores (1960). A gama-GT catalisa a transferência do grupamento glutamil da L-gama-glutamil-3-carboxi-4-nitroanilida para a glicilclicina, formando L-glutamilglicilglicina e p-nitroanilina. A p-nitroanilina apresenta absorbância elevada em 405 nm. A concentração deste composto é proporcional à atividade da gama-GT.

4.5.5 Método para determinação da atividade da ALT no plasma

O método para a determinação da atividade da ALT foi desenvolvido por Wróblewski, Ladue (1956). Este método baseia-se nas seguintes reações:

A velocidade de formação de NAD^+ a partir da redução do piruvado pelo NADH catalisado pela lactato desidrogenase (LDH) é proporcional à atividade da ALT na amostra. A formação de NAD^+ foi determinada por espectrofotometria em 340 nm utilizando placa de quartzo com 96 poços (Spectra Plate™ – Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

4.5.6 Método para determinação da atividade da AST no plasma

O método para determinação da atividade da AST foi desenvolvido por Karmen e colaboradores (1955) e baseia-se nas seguintes reações:

O oxalacetato em presença da malato desidrogenase (MDH) reage com o NADH, reduzindo-se a malato e o NADH oxida-se a NAD^+ . A velocidade da oxidação do NADH a NAD^+ é proporcional à atividade da AST. A produção de NAD^+ foi determinada por espectrofotometria em 340 nm utilizando placas de quartzo contendo 96 poços.

4.5.7 Método para determinação da atividade da LDH no plasma

A lactato desidrogenase (LDH) catalisa a redução do piruvato com o NADH, obtendo-se lactato e NAD^+ (Amador et al., 1963). A velocidade da decomposição do NADH foi determinada por espectrofotometria em 340 nm.

4.5.8 Método para determinação da atividade da CK no plasma

A atividade da creatina quinase foi determinada segundo o método desenvolvido por Tanzer, Gilvarg (1959). O princípio baseia-se nas seguintes reações:

A produção de NADPH foi determinada por espectrometria em 340 nm utilizando placas de quartzo contendo 96 poços. A velocidade de redução do NADP^+ a NADPH é proporcional à atividade da CK.

4.5.9 Determinação da concentração de albumina no plasma

A concentração de albumina no plasma foi determinada segundo o método de Weichselbaum (1946). Na presença da Albumina, o Verde de Bromocresol forma um complexo corado, que exibe um espectro de absorção diferente do corante no seu estado livre, permitindo, assim, a determinação da albumina.

4.5.10 Determinação da concentração de triacilglicerol no plasma

O método utilizado para determinação da concentração plasmática de TG foi desenvolvido por McGowan e colaboradores (1983). O princípio do ensaio baseia-se

na liberação do glicerol do triacilglicerol pela ação de uma lipase de lipoproteína e posterior determinação da concentração do glicerol, como segue a reação abaixo:

4.5.11 Concentrações de colesterol e frações

O colesterol total (somatória do colesterol presente nas partículas de HDL, LDL, IDL e VLDL) foi determinado segundo método descrito por Allain e colaboradores (1974). Este método baseia-se em três reações enzimáticas acopladas como segue abaixo:

A intensidade da cor cereja formada é diretamente proporcional à concentração de colesterol na amostra.

Para determinação seletiva da concentração de colesterol na partícula de HDL, foram adicionados poliânions que adsorvem nas superfícies da LDL e VLDL impedindo que as enzimas ajam sobre o colesterol nelas presente.

Para determinação do colesterol presente na partícula de LDL, inicialmente quilomicros, HDL e VLDL foram solubilizados e seus conteúdos de colesterol determinado. O colesterol restante, presente nas partículas de LDL, sob ação da colesterol oxidase gera peróxido de hidrogênio que ao reagir com N,N,bis(4-sulfobutil)-m-toluidina disodium (DSBmt) gera cor, determinada por espectrometria em 600 nm.

O conteúdo de colesterol da VLDL foi determinada pela divisão da concentração plasmática de triacilglicerol por 5 (Friedewald et al, 1972).

4.6 Determinação das concentrações de C3 e C4 no plasma

As frações de C3 e C4 no plasma foram determinadas através do método de turbidimetria. Este método baseia-se na medida da redução da transmissão de luz em um meio causado pela formação de partículas insolúveis. Os anticorpos anti-C3 e C4 formam compostos insolúveis quando se combinam com C3 e C4 da amostra, de tal forma que a absorbância é proporcional à concentração destas frações na amostra.

4.7 Extração dos lipídeos, derivatização e condições cromatográficas

Os lipídeos foram quantificados pelo método 996.06 da “The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence” (AOAC) com modificações. Este método consiste de extração de lipídeos por hidrólise ácida que quebra a matrix do tecido orgânico, seguida de extração etérea, transesterificação dos ácidos graxos para os seus ésteres metílicos (processo denominado derivatização) e quantificação por cromatografia gasosa (CG) capilar.

Os óleos de peixe e soja e porções do ventrículo esquerdo foram aliquotados e colocados em tubos de ensaio de 30 mL (Pyrex 9826), com rosca e tampa de teflon. Foram adicionados: o triacilglicerol do ácido tridecanóico (5 mg/ mL clorofórmio) como padrão interno, com volumes variando de 100 a 400 μ L; conforme a quantidade de tecido utilizada; 25 mg de ácido pirogálico para minimizar a oxidação dos ácidos graxos, 0,5 mL de etanol 95% e algumas pérolas de vidro. As amostras foram submetidas à hidrólise ácida com 2,5 mL de HCl 8,3 M e agitadas em banho termostatzado à temperatura de 75 °C por 40 min. Depois de resfriados à temperatura ambiente, foram adicionados 6 mL de éter etílico e cada tubo foi mantido em agitador tipo vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados 6 mL de éter de petróleo e novamente agitados. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min e a fase superior (etérea) foi transferida para outro tubo. O solvente foi evaporado lentamente em banho termostatzado em temperatura menor do que 40 °C, utilizando N₂ gasoso. Após a evaporação do solvente orgânico, foi adicionado 1 mL de trifluoreto de boro 7% em metanol, 0,5 mL de tolueno e algumas pérolas de vidro. Os tubos foram bem

tampados e colocados em banho fervente por 45 minutos. Depois de resfriados à temperatura ambiente, foram adicionados 2,5 mL de água, 1 mL de hexano e aproximadamente 0,5 g de Na₂SO₄ anidro. Após agitação, os tubos ficaram em repouso até a separação das fases e em seguida a fase superior foi transferida para um “vial”. O solvente foi evaporado completamente. Foram adicionados 100 µL de hexano, o precipitado ressuspense e o volume total transferido para um *insert* de 100 µL. Um microlitro das amostras foi analisado em cromatógrafo à gás GC 2010 Plus da Shimadzu (Shimadzu do Brasil – SP- Brasil), Workstation GC solution, equipado com injetor automático AOC-20, detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar de sílica fundida SP-2560 (bis cianopropil polisiloxana) de 100 m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura da fase estacionária. A programação de temperatura da coluna foi de 140 °C por 5 min, aquecimento a 4 °C/min até 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 20 min. As temperaturas do injetor e detector foram 250 °C e 260°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio a um fluxo de 1 mL/min e a razão de divisão da amostra 1/50. Um microlitro do extrato lipídico derivatizado foi injetado. Os tempos de retenção dos ácidos graxos foram comparados com o padrão 189 19 Sigma. Os cálculos foram baseados na área e concentração do padrão interno, utilizando-se os fatores de resposta teóricos do FID (*flame ionization detector*) do método Ce 1j-07 da AOCS (AOCS International, 2002).

4.8 Avaliação dos lipídios totais do fígado e ventrículo esquerdo

As amostras de fígado e VE (35 – 50 mg) foram homogeneizadas em 500 µL de metanol utilizando Polytron PT 3100. Após essa etapa, foram adicionados 1 mL de clorofórmio e 500 µL de água. A mistura foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 6.000 rpm para separação das fases. A fase inferior foi transferida para um novo microtubo.

Foram adicionados novamente 500 µL de metanol, 1 mL de clorofórmio e 500 µL de água à fase superior restante da extração e a mistura foi homogeneizada em vórtex. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 6.000 rpm para nova separação das fases. A fase inferior foi transferida para o microtubo contendo a fase orgânica da primeira extração. As amostras foram secas no *speed vac* à temperatura ambiente por 30 minutos e, em seguida, o precipitado foi ressuspense em 100 µL de

etanol absoluto. As determinações de triacilgliceróis e ácidos graxos livres foram realizadas utilizando kits específicos (Bioclin, Belo Horizonte, MG) seguindo as recomendações do fabricante.

4.9 Indução de infarto do miocárdio

Após vinte dias de suplementação, no vigésimo primeiro dia, os ratos foram anestesiados (80 mg/kg de p.c. Ketamina e Xilazina 12 mg/kg de p.c., intraperitoneal), colocados em decúbito dorsal e entubados (Gelko-14G). Um pequeno corte foi realizado na pele e os músculos peitorais afastados, assim mantidos sob respiração artificial (Harvard Aparatus, Boston EUA). O terceiro espaço intercostal esquerdo foi aberto para exposição do coração. Após a exposição do coração, foi feita oclusão da artéria coronária descendente esquerda por ligadura direta. Foi utilizado um fio de nylon (6,0) de sutura a cerca de um milímetro distal da aurícula esquerda, provocando isquemia miocárdica. Após a ligadura, a incisão torácica foi fechada com linha de nylon (5,0) e o pneumotórax revertido mediante a sucção do ar com uma agulha (27x8) conectada a uma seringa de 10 mL. Logo após, os animais foram retirados da ventilação artificial e a respiração natural foi restabelecida. Os músculos afastados para cirurgia foram reposicionados e a pele suturada com fio de seda (4,0). Os animais foram colocados em ambiente aquecido para recuperação. Os infartos foram realizados no Laboratório de Hipertensão do Instituto do Coração – INCOR, São Paulo-SP.

4.10 Atividade da Caspase 3

As amostras de VE (50 mg) foram homogeneizadas em tampão de extração adquirido da BioVision® (Caspase-3/CPP32 Fluorometric Assay Kit), utilizando Polytron PT 3100. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm, 4 °C, durante 20 minutos. A atividade da caspase 3 foi determinada incubando-se 50 µL do sobrenadante com 50 µL de tampão de reação e 5 µL de DEVD-AFC durante 1 hora a 37 °C. (Tampão de reação e DEVD-AFC foram adquiridos da Biovision®). O substrato DEVD-AFC emite fluorescência máxima em comprimento de onda de 400 nm. Quando o DEVD-AFC é clivado pela caspase 3 libera a fração AFC que emite uma fluorescência no comprimento de 500 nm (luz amarelo verde). As leituras foram

realizadas usando um espectrofluorímetro (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT, USA). Os resultados estão expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (AU) por miligrama de proteína.

4.11 Conteúdo de citocinas no ventrículo esquerdo e fígado

As proteínas do VE ou fígado para determinação do conteúdo de citocinas foram extraídas em tampão contendo inibidores de proteases (Tris base 100 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; fluoreto de sódio 100 mM; pirofosfato de sódio 100 mM; ortovanadato de sódio 10 mM; aprotinina 10 µg/mL; leupeptina 1 µg/ml, PMSF 2 mM) e incubadas com Triton X-100 a 1 % por 30 minutos em gelo. As amostras foram imediatamente centrifugadas a 12.000 rpm, 4 °C, durante 20 minutos. A quantificação das citocinas foi realizada por ensaio de ELISA utilizando Duo-set kits para IL-1β, CINC -2α/β, MIP-3, TNF-α, PCR, IL-6 e IL-10 (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). As absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas utilizando-se uma placa de 96 poços de alta capacidade de ligação (Costar - Corning Incorporated, CA, EUA) em espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos) a 450 nm. Os valores obtidos em picogramas foram normalizados pelo conteúdo protéico das amostras em miligrama, determinado pelo método Bradford (1976).

4.12 Produtos da peroxidação lipídica no ventrículo esquerdo e fígado

A peroxidação lipídica no VE e fígado de animais infartados e não infartados foi avaliada a partir da concentração de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) conforme método descrito por Buege et al.(1978) e Draper et al. (1993). Os tecidos foram homogenizados com uma tesoura em tampão de extração contendo Tris HCl 10mM, Triton X-100 a 0,1 % e EDTA 0,5 mM. Foram adicionados ao tampão de extração, 15 µL de BHT a 29,5 mM (diluído em álcool etílico absoluto) para cada grama de VE ou fígado. Ao homogenato (0,05 mL) foram adicionados 0,2 mL de uma solução de TBA a 0,73 % e 0,2 mL de ácido tricloroacético a 30 %. A solução obtida foi aquecida até a ebulição durante 30 minutos. A seguir, a solução foi centrifugada e a absorbância do sobrenadante foi lida utilizando-se uma placa de 96 poços em espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices, Sunnyvale, Califórnia, Estados Unidos) a 535 nm. A concentração de TBARS foi calculada utilizando tetraetoxipropano como padrão. Os resultados estão expressos como µmol de TBARS por miligrama de proteína.

4.13 Determinação do conteúdo de ATP no ventrículo esquerdo e fígado

Amostras de ventrículo esquerdo e fígado foram homogeneizadas com ácido perclórico (0,6 N) utilizando Polytron PT 3100. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm, 4 °C, durante 20 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi neutralizada com K₂CO₃ 1M para quantificar ATP utilizando um kit comercial fluorimétrico (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA). A fluorescência da amostra foi determinada utilizando um leitor da Biotek Synergy de placas com 96 escavações (Bio Tek Instruments, Inc. Vermont, USA). O conteúdo de ATP está expresso em µmol normalizado pelo peso do tecido em gramas.

4.14 Determinação do conteúdo de glicogênio do ventrículo esquerdo

O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo método da amiloglicosidase (Keppler, Decker, 1974). Este método é baseado na conversão do glicogênio em glicose pela ação da amiloglicosidase (Sigma, St. Louis. MO, EUA). Amostras de ventrículo esquerdo foram homogeneizadas com ácido perclórico (0,6 N). Alíquota do

sobrenadante foi neutralizada com K_2CO_3 a 1 M e utilizada para determinação de glicogênio. A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico (Trinder, 1969), utilizando o kit da Bioclin (Belo Horizonte, MG). O conteúdo de glicogênio foi obtido pela concentração de glicose na amostra após digestão enzimática, subtraída da concentração de glicose antes da digestão. Os valores foram expressos como miligramas de unidade glicosil por peso de tecido, em gramas.

4.15 Determinação do conteúdo de lactato do ventrículo esquerdo

Para determinação do conteúdo de lactato no VE foi utilizado kit comercial (Lactato UV enzimático, Bioclin, Belo Horizonte, MG, cod. K-084). O método baseia-se na formação de piruvato a partir do lactato presente, através da atividade da lactato desidrogenase, formando NADH (Engel, Jones, 1978). O NADH absorve luz no comprimento ultravioleta (340 nm) e a sua formação é, portanto, proporcional ao conteúdo de lactato da amostra.

As amostras de ventrículo esquerdo (50 a 70 mg) foram desproteinizadas com ácido perclórico (0,6 N). O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm, 4°C, durante 20 minutos. Uma alíquota (5µL) do sobrenadante ou padrão (fornecido pelo kit) foram adicionadas em 200 µL de tampão de reação (fornecido pelo kit) e incubadas a 37 °C durante 5 minutos. As absorbâncias das amostras e do padrão foram lidas utilizando-se uma placa de 96 poços em espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices) a 340 nm. Os valores estão expressos como µmol de lactato por grama de ventrículo esquerdo.

4.16 Determinações das atividades de enzimas no ventrículo esquerdo

4.16.1 Fosfofrutoquinase

A fosfofrutoquinase, enzima chave da via glicolítica, catalisa a formação de frutose 1,6 bisfosfato e ATP a partir de frutose 6 fosfato e ADP. A determinação de sua atividade baseia-se na formação de NAD^+ a partir do NADH resultado de uma série de reações acopladas as enzimas aldolase, triose-fosfato-isomerase e

glicerolfosfato desidrogenase, em meio adequado para promover a atividade enzimática máxima (Mansour, 1964).

O tampão de extração (pH 7,4) consistiu de Tris-HCl (50 mM), EDTA (1mM), $MgCl_2$ (5 mM) e β -mercaptoetanol (5 mM). O tampão de ensaio (pH 8,2) consiste de Tris/HCl 0,04 M, ATP 200 mM, NADH 13 mM, AMP 100 mM, glicerolfosfato desidrogenase 0,08 unidades, aldolase 0,4 unidades e triosefosfato isomerase 0,08 unidades. A taxa de oxidação do NADH à NAD^+ foi avaliado utilizando-se espectrofotômetro SpectraMax Plus (Molecular Devices) a 340 nm. Os resultados estão expressos em $\mu\text{mol/min}$ por grama de tecido úmido

4.16.2 Citrato sintase

A citrato sintase catalisa a entrada de carbono no ciclo de Krebs, reação entre acetil-CoA e oxalacetato para formar citrato e Coenzima A (CoA) livre. O método baseia-se na ligação da CoA livre gerada pela atividade da citrato sintase com DTNB, adicionado ao meio, formando um complexo amarelo. A formação deste complexo (DTNB-CoA) é proporcional à atividade da enzima, segundo método descrito por Alp et al. (1976).

Para determinação da atividade da citrato sintase, amostras de ventrículos foram pesadas e homogeneizadas em tampão de extração (pH 7,4) contendo: Tris/HCl 50 mM e EDTA 1 mM. O tampão de ensaio (pH 8,1) consistiu de Tris/aminometano 100 mM, DTNB 0,2 mM, acetil-CoA 0,1 mM, Triton X-100 0,05% (v/v) e o homogeneizado. A reação foi iniciada com a adição de 10 μL de oxalacetato (10 mM) e as absorbâncias determinadas a cada 30 segundos durante 600 segundos, em 412 nm. Os resultados estão expressos como $\mu\text{mol/min}$ por grama de tecido úmido.

4.17 Extração de RNA total do VE, síntese de cDNA e RT-PCR

O ventrículo esquerdo foi separado dos átrios e ventrículo direito e o RNA total foi extraído utilizando-se o kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme instruções do fabricante.

A concentração de RNA foi estimada por densidade óptica no comprimento de onda 260 nm (cada unidade de leitura corresponde a 40 µg/mL de RNA), utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).

Foram utilizados 2 µg de RNA para transcrição reversa e confecção do cDNA, utilizando primers oligo-dT e o kit de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) de acordo com especificações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi feita na ordem: 70 °C por 10 minutos, 37 °C por 60 minutos e 95 °C por 10 minutos.

Para amplificação das seqüências de interesse do cDNA, foram usados 2 µL de cDNA, 5 µL de SYBR Green (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), 1 µL (10 µM) de cada primer sense e anti-sense do gene-alvo (Tabela 4) e 1 µL de água Milli-Q autoclavada. A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*) foi realizada utilizando-se as seguintes etapas: 50 °C por 2 minutos (ativação da enzima), 95 °C por 10 minutos (desnaturação) e 45 ciclos de três fases – a primeira a 95 °C por 20 segundos (desnaturação), a segunda a 58 °C, por 30 segundos (anelamento) e a terceira a 72 °C, por 30 segundos (extensão). A análise da fluorescência proporcionada pelo SYBR Green, conforme amplificação específica da seqüência de interesse, foi feita no detector Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha). O *cycle threshold* (CT), ciclo no qual a sequência de interesse já foi amplificada o suficiente para gerar fluorescência distinguível da fluorescência de fundo (Livak e Schmittgen, 2001) foi avaliado em triplicata para cada amostra. A subtração do CT do gene de interesse pelo CT do gene de referência ou *housekeeping* tem como resultado a variação de CT (Δ CT). As amostras avaliadas foram normalizadas pela média do Δ CT dos animais controle (Δ CT amostra – média Δ CT controle), obtendo-se o valor de $\Delta\Delta$ CT. A expressão relativa dos genes de interesse, em unidades arbitrárias, foi calculada através da fórmula $2^{-\Delta\Delta$ CT (Livak, Schmittgen, 2001). O gene de referência utilizado foi o gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

TABELA 4 - Primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-PCR

Gene	Sense	Antisense
iNOS	5'-ACGAGGTGTTTCAGCGTGCTC-3'	5'-GTCAGAGTCTTGTGCCTTTGGG-3'
eNOS	5'-TTCTGGCAAGACCGATTACACG-3'	5'-TAGAGATGGTCCAGTTGGGAGC-3'
VEGF	5'- GCGTTGCTCTGATGATGGTGAC-3'	5'-GCGTGATGATGGTAAGGATGG-3'
PFK	5'-GGCATGGAAGCCTATCTC-3'	5'- CCATACCCATCTTGCTACTCA-3'
MG53	5'-CGAGCAGGACCGCACACTT-3'	5'-CCAGGAACATCCGCATCTT-3'
PDK4	5'-AGCATCTTCGAGAGAAGGCAGGTG-3'	5'-GCCACAATGAACCATGGAATA-3'
Glicogênio fosforilase	5'-ACCCGGGTACCACATGGCTA-3'	5'-TGTACCCTCTCTGGTCCAGC-3'
Citrato sintase	5'- CGGTTCTTGATCCTGATGAGGG-3'	5'-ACTGTTGAGGGCTGTGATGGC-3'
HIF 1	5'-TGGCTTTGGAGTTTCAGAGGC-3'	5'- GACTTCGGCAGCGATGACAC-3'
Hexoquinase 1	5'-AGACGCTGATGGAGGTGAAGAAGA-3'	5'-ACGATGTGGTCAAACAGCTCAT-3'
GLUT 1	5'-GAGCATCTTCGAGAAGGCAGGTGT-3'	5'-GGCCACAATGAACCATGGAATA-3'
UCP 3	5'-AGCAGTTCTACACCCCAAAGG-3'	5'-TTTACCACATCCACTGGGGAGG-3'
p53	5'- GCGTTGCTCTGATGGTGAC-3'	5'-GCGTGATGATGGTAAGGATGG-3'
Fas	5'-GGTGGCTCTGGTTGGAATG-3'	5'-GATACTCTAAGGCTGTGGTTGG-3'
Bax2	5'-GGAGATGAAGTGGACAATAATATGG-3'	5'-GCAAAGTAGAAGAGGGCAACC-3'
Bcl2	5'-GCAGAGATGTCCAGTCAGC-3'	5'-CCCACCGAACTCAAAGAAGG-3'

iNOS- óxido nítrico-sintase induzível; eNOS – óxido nítrico-sintase endotelial; VEGF – fator de crescimento vascular endotelial; PFK – fosfofrutooquinase; MG53 - *mitsugumin* 53; PDK 4- piruvato quinase desidrogenase 4; HIF1 α - *hypoxia-inducible factor 1-alpha*; UCP 3- uncoupling protein 3; Fas - *Fas receptor*; Bax2 - *Bcl-2-associated X protein*; Bcl2- *B-cell lymphoma 2*.

4.18 Fluxo sanguíneo coronariano através de microesferas coloridas

Este método, descrito por Hakkinen e colaboradores (1995), fornece informações sobre a perfusão sanguínea nos órgãos e baseia-se na infusão de microesferas coloridas na circulação dos animais e posterior quantificação nos órgãos. O fluxo sanguíneo é diretamente proporcional ao número de esferas presentes nas amostras de órgãos, determinado por espectrometria.

4.18.1 Infusão das microesferas na circulação

Uma solução contendo 300.000 esferas brancas/180 μ l foi infundida no ventrículo esquerdo por meio da extensão de cateter P50 (75cm) conectada a uma seringa de 1ml com salina pré-aquecida (40 °C) contendo Tween 80 (0,01 %). A outra cânula posicionada na aorta abdominal foi conectada a uma seringa de 1ml pré-

heparinizada para retirada de sangue durante a infusão. Dez segundos antes da injeção das esferas iniciou-se a retirada de sangue através de uma bomba (Infusion and Withdrawl Pump, Harvard Apparatus, South Natick, Mass, EUA) a um fluxo de 0,5 ml/min, contínuo por 75 segundos após o início da infusão. Cada amostra de sangue retirada foi pesada e identificada. Um total de 4 ml de reagente de hemólise foi adicionado e a amostra foi centrifugada durante 30 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e 4ml de hidróxido de sódio (2 N) foi acrescentado ao tubo. As amostras foram incubadas em banho-maria (BM) a uma temperatura de 70 °C, seguindo a partir deste momento o mesmo procedimento para as amostras de VE.

4.18.2 Processamento do ventrículo esquerdo

Os ventrículo esquerdo foi processado segundo técnica adaptada de Hakkinen e colaboradores (1995). Após a adição de 4ml de hidróxido de sódio (2 N), os tubos foram tampados e colocados em banho-maria a 70 °C por aproximadamente duas horas. As amostras foram agitadas (Vortex Maxi Mix II, Thermolyne, Dubuque, Iowa, EUA) a cada 15 minutos. As amostras foram centrifugadas 30 minutos a 4.000 rpm e o pellet foi homogeneizado com salina para leitura no espectro. As leituras de absorbância no espectrofotômetro (DU-640 Spectrophotometer, Beckmann Instruments, Inc., Fullerton, CA, EUA) foram realizadas em cubeta de quartzo de 0,7 ml (Sigma), onde foram colocados 200 µl do sobrenadante de cada amostra centrifugada. Os picos dos espectros de absorbância das microesferas brancas foi 370 nm. A absorbância mínima aceitável foi de 0,01 AU.

4.18.3 Determinação do número de microesferas

A média da absorbância destas amostras permite determinar uma constante de leitura do espectrofotômetro para as microesferas brancas. Cálculo do número de microesferas nos tecidos:

$$\text{Nº esferas na amostra} = \frac{\text{AU amostra} \times \text{Nº de esferas padrão}}{\text{AU padrão}}$$

(AU amostra = absorbância da amostra no tecido; Nº esferas padrão = número de esferas na solução padrão; AU padrão = média das absorbâncias das soluções padrão).

4.19 Função cardíaca e determinação da área de Infarto

A função cardíaca e a área de infarto foram avaliadas por ecocardiografia. As análises ecocardiográficas foram realizadas 24 h após a indução do infarto. Em cada exame, foram realizadas três medidas para cada variável, sendo calculadas a média e o erro padrão da média dessas, de acordo com as orientações da American Society of Echocardiography. Os ratos foram anestesiados (80 mg/kg p. c. Ketamina e Xilazina 12 mg/kg p. c., intraperitoneal) e a região torácica tricotomizada. As imagens foram obtidas utilizando um transdutor linear e multifrequencial (10-14 mHz), que permite imagens bidimensionais e determinação do fluxo sanguíneo por efeito Doppler espectral acoplado em um sistema ecocardiográfico SEQUOIA 512 (ACUSON Corporation, Mountain View, CA, USA). Os ecocardiogramas foram realizados no Laboratório de Hipertensão do Instituto do Coração – INCOR, São Paulo-SP.

4.19.1 Função sistólica

A função sistólica foi determinada pela fração de encurtamento, fração de ejeção e velocidade de encurtamento circunferencial. A fração de encurtamento (ΔD %) foi determinada a partir dos diâmetros transversais do ventrículo esquerdo, obtidos no final da diástole e final da sístole, cujo cálculo é $\Delta D \% = (Dd - Ds) / Dd$, onde Dd = diâmetro diastólico final e Ds = diâmetro sistólico final. A fração de encurtamento foi expressa em porcentagem. O cálculo para fração de ejeção (FE) foi baseado na variação dos volumes ventriculares conforme a fórmula $FE = (VDF - VSF) / VDF$, onde VDF = volume diastólico final e VSF = volume sistólico final. A fração de ejeção foi expressa em porcentagem. A velocidade de encurtamento circunferencial (Vcf) do ventrículo esquerdo baseia-se no tempo para diminuição da circunferência ventricular durante a sístole, utilizando-se de parâmetros referentes aos diâmetros ventriculares, conforme a seguinte fórmula: $Vcf = (Dd - Ds) / (Dd \times \Delta t)$, onde Δt = tempo de ejeção. Os valores de Vcf estão expressos em cm/s (Graziosi, 1998a).

4.19.2 Função diastólica

A função diastólica foi analisada utilizando-se índices derivados da curva de velocidade de fluxo diastólico mitral e fluxo sistólico da via de saída do VE, obtidos pela técnica de Doppler pulsátil. A curva de velocidade do fluxo diastólico foi obtida a partir da imagem apical quatro câmaras posicionando-se o volume-amostra próximo à face ventricular da valva mitral. A imagem obtida pelo corte apical quatro câmaras refere-se ao posicionamento do transdutor no tórax do animal e o plano em que os feixes de ultra som incidem no coração. Neste corte, o transdutor é posicionado no ponto de contato entre a porção anterior do ventrículo esquerdo com a parede interna do tórax (*Ictus cordis*) e os feixes de ultra som são incididos no plano sagital do coração. Os parâmetros de fluxo diastólicos determinados foram: a) onda E – velocidade de fluxo inicial do enchimento ventricular (enchimento rápido do ventrículo); b) onda A – velocidade de fluxo telediastólico mitral (corresponde a contração atrial); c) a relação E/A – razão entre a velocidade máxima da onda E e a velocidade máxima da onda A; d) tempo de desaceleração da onda E (TDE) – tempo em milissegundos (ms) entre o pico da onda E e o ponto em que a rampa de desaceleração intercepta a linha de base da curva de velocidade do fluxo diastólico mitral (Figura 6). A relação E/A é maior que 1 em condições de relaxamento normal, visto que a maior parte do enchimento diastólico ocorre na fase rápida (onda E), seguido do período de equilíbrio pressórico entre o átrio esquerdo e o ventrículo esquerdo (diástase), por fim, a fase de contração atrial representado entre 15% a 20% do fluxo (onda A) (Graziosi, 1998b; Mostarda, et al., 2010).

A curva de velocidade dos fluxos transmitral para análise do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) foi obtida posicionando-se o volume-amostra numa posição intermediária entre a valva mitral e a via de saída do ventrículo esquerdo. Este índice indica basicamente a fase de relaxamento do miocárdio, que ocorre após o pico sistólico, no período entre o fechamento da valva aórtica e a abertura da valva mitral, no qual o VE não altera seu volume (Figura 6). Quando o relaxamento do VE torna-se prejudicado, o TRIV está prolongado (Mostarda et al., 2009). No presente estudo, o TRIV foi corrigido pelo intervalo R-R ao quadrado (nTRIV) visto que anula a interferência da frequência cardíaca neste parâmetro.

Figura 6- Representação esquemática da curva do fluxo transmitral em relação ao tempo, determinado pela técnica de Doppler pulsátil. TRIV – tempo e relaxamento isovolumétrico; TDE- tempo de desaceleração da onda E; FVAo – fechamento da válvula aórtica; AVMi- abertura da válvula mitral; FVMi – fechamento da válvula mitral. (Adaptado de Graziosi, 1998)

4.19.3 Área de infarto

O tamanho do infarto foi estimado com base na identificação de áreas acinéticas (ausência de movimento) e discinéticas (movimento paradoxal) do VE após 24 h da oclusão da artéria coronária. A extensão linear do segmento infartado IM (região acinética e/ou discinética) e o perímetro total da borda endocárdica do ventrículo esquerdo (PE) foram avaliados. O tamanho do infarto foi calculado utilizando a fórmula: $IM (\%) = IM/PE \times 100$.

4.20 Análise estatística

Os resultados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste de *Newman-Keuls Multiple Comparison* ou *Bonferroni*. Foi aplicada ANOVA *one-way* para comparar os grupos (salina, soja e peixe) nas condições não infartado e infartado, separadamente. ANOVA *two-way* foi aplicada quando os grupos foram comparados conjuntamente nas condições não infartado e infartado. As diferenças foram consideradas significativas para valores de $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ingestão de ração e calorias

Estão representadas na Tabela 5 as médias de ingestão diária de ração e calorias pelos animais não infartados durante a última semana de suplementação com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. A ingestão de ração foi menor nos grupos suplementados com o óleo de peixe ($22,3 \pm 0,5$ g/dia) e óleo de soja ($22,3 \pm 0,3$ g/dia) quando comparados com o grupo salina ($24,9 \pm 0,1$ g/dia). A ingestão calórica de ração nos grupos óleo de peixe e óleo de soja foi 10,2 % menor em relação ao grupo salina. Em relação à ingestão total de calorias (calorias obtidas da ração somadas aquelas calorias obtidas da suplementação de óleos), não houve diferença significativa entre os grupos: óleo de peixe ($76,9 \pm 1,5$ Kcal/dia), óleo de soja ($76,9 \pm 0,96$ Kcal/dia) e salina ($74,7 \pm 0,3$ Kcal/dia).

Tabela 5 – Média da ingestão diária de ração e calorias pelos animais não infartados entre o 13° e 20° dia de suplementação com salina e óleos de peixe e soja

Parâmetros	Grupos		
	Salina	Óleo de Peixe	Óleo de Soja
Ingestão de ração (g/dia)	$24,9 \pm 0,1$	$22,3 \pm 0,5^*$	$22,3 \pm 0,3^*$
Calorias ingeridas de ração (Kcal/dia)	$74,7 \pm 0,3$	$67,05 \pm 1,5^*$	$67,05 \pm 0,9^*$
Calorias ingeridas dos óleos (Kcal/dia)	0,0	$9,9 \pm 0,2$	$9,9 \pm 0,2$
Total de calorias ingeridas (Kcal/dia)	$74,7 \pm 0,3$	$76,9 \pm 1,5$	$76,9 \pm 0,96$

Os resultados estão representados como média $\pm$ E.P.M de 4 animais por grupo. Os valores individuais estão na A1. * $p < 0,05$ para comparação com o grupo salina. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA *one-way* seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

5.2 Ganho de massa corpórea

Na figura 7 está representado o ganho de massa corpórea dos animais não infartados durante o período de suplementação. A suplementação com os óleos não alterou o ganho de massa dos animais em relação ao grupo salina. Os animais ganharam em média 84,6 gramas de massa corpórea após 20 dias de suplementação com salina, óleo de peixe ou óleo de soja.

Figura 7 - Massa corpórea dos animais durante 20 dias de suplementação com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Os dados estão expressos como médias dos pesos em gramas $\pm$ E.P.M de 8 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A2a,A2b e A2c. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

5.3 Massas de órgãos

A suplementação com óleo de peixe ou óleo de soja não provocou alteração nas massas absolutas (dados não mostrados) e relativas do coração, fígado, gordura retroperitoneal e gordura epididimal (Figura 8).

Figura 8- Massas relativas dos órgãos de ratos não infartados determinadas no 20º dia de suplementação com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Os dados estão expressos como relação entre as médias dos pesos dos órgãos e do animal $\pm$ E.P.M. para 5 animais por grupo. Os valores individuais estão na tabela A3. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

A razão entre as massas do VE e coração não foi modificada pela suplementação com os óleos de peixe ou soja indicado que os óleos não provocaram hipertrofia do VE (Figura 9).

Figura 9- Razão entre as massas do ventrículo esquerdo e coração total de ratos não infartados determinadas no 20º dia de suplementação com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Os dados estão expressos como relação entre as médias dos pesos dos órgãos e do animal $\pm$ E.P.M. para 5 animais por grupo. Os valores individuais estão na tabela A3. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

5.4 Avaliação da hepatotoxicidade da suplementação com os óleos

Na tabela 6 estão apresentadas as atividades das enzimas hepáticas no plasma e concentrações de metabólitos marcadores de hepatotoxicidade e função do fígado nos animais não infartados e suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Após 20 dias de suplementação com os óleos, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na atividade plasmática da CK, LDH, AST, ALT, Gama GT e concentrações plasmáticas de albumina, bilirrubina ou glicose entre os grupos.

Tabela 6 – Atividades das enzimas no plasma dos ratos, determinadas no 20º dia de suplementação com salina, óleo de peixe ou óleo de soja

Parâmetro	Grupos		
	Salina	Óleo de peixe	Óleo de soja
CK (U/L)	305 ± 47	425 ± 71	323 ± 56
LDH (U/L)	331 ± 75	377 ± 94	229 ± 77
AST (U/L)	24.4 ± 1.7	25.7 ± 3.9	21.6 ± 3.7
ALT (U/L)	17.9 ± 3.0	23.6 ± 4.2	13.4 ± 0.7
Gama GT (U/L)	79,4 ± 4,3	66,2 ± 7,9	66,3 ± 6,4
Bilirrubina (mg/dL)	0,24 ± 0,02	0,22 ± 0,026	0,19 ± 0,017
Albumina (g/dL)	2.68 ± 0.54	3.1 ± 0.39	3.7 ± 0.38
Glicemia (mg/dL)	116 ± 2,7	111 ± 2,7	110,1 ± 2,7

CK- Creatina quinase, LDH- Lactato desidrogenase, AST- Aspartato transaminase, ALT- Alanina transaminase e Gama GT- Gama glutamil transferase. Os dados estão apresentados como média ± E.P.M de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A4a e A4b. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

5.5 Avaliação da suplementação com os óleos na função renal

As concentrações plasmáticas de uréia e creatina dos grupos suplementados com óleo de peixe ou óleo de soja não apresentaram diferenças quando comparadas com os valores obtidos no grupo salina (Tabela 7)

Tabela 7 – Concentrações plasmáticas de uréia e creatinina determinadas no 20º dia de suplementação com salina, óleo de peixe ou óleo de soja

Parâmetros	Grupos		
	Salina	Óleo de peixe	Óleo de soja
Uréia plasmática (mg/dL)	34,9 ± 1,5	36 ± 1,2	33 ± 2,9
Creatinina plasmática (mg/dL)	0,57 ± 0,06	0,67 ± 0,03	0,66 ± 0,04

Os dados são apresentados como média ± E.P.M. de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão na tabela A5. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls.

5.6 Taxa de mortalidade dos animais infartados

A taxa de mortalidade foi avaliada durante o período de 24h de isquemia do VE (Tabela 8).

Tabela 8- Taxa de mortalidade no período de 24 h após a indução do infarto

	Operado (n)	Mortos (n)	Vivos (n)	Mortalidade (%)
Grupos				
SHAM	23	1	22	4,3
Salina	33	11	22	33.3
Óleo de peixe	29	9	20	31.0
Óleo de soja	33	12	21	36.4

5.7 Concentrações de lipídeos no plasma

A concentração plasmática de AGL foi cerca de duas vezes mais elevada no grupo infartado em relação aos não infartados. A suplementação com os óleos não modificou as concentrações plasmáticas de AGL dos animais não infartados e infartados (Figura 10-A).

A concentração plasmática de colesterol total foi maior nos grupos infartados em relação aos não infartados (Figura 10-B). Nos ratos infartados, a suplementação com óleo de peixe reduziu em 20 % a concentração de colesterol total em relação ao grupo suplementado com óleo de soja (Figura 10-B).

As concentrações de LDL-C não foram alteradas pelo infarto ou pela suplementação com os óleos de peixe ou soja (Figura 10-C). Nos animais infartados, as concentrações de HDL-C foram 60 % e 37 % mais elevadas no grupo suplementado com óleo de peixe em relação aos grupos suplementados com salina ou óleo de soja, respectivamente (Figura 10-D).

Nos animais infartados, o óleo de peixe reduziu em 46% a concentração de VLDL-C em relação aos grupos suplementados com salina e óleo de soja (Figura 10-F).

A suplementação com óleo de peixe preveniu o aumento da concentração plasmática de TG observado nos animais infartados e suplementados com salina ou óleo de soja (Figura 10-E).

Figura 10 – Efeito da suplementação com óleos de peixe ou soja sobre a concentração de lipídeos no plasma. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais. Os valores individuais estão nas tabelas A6a a A6f. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni.

5.8 Incorporação de ácidos graxos no ventrículo esquerdo

Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) na composição de ácidos graxos do VE entre os grupos não infartados e infartados (Figura 11).

5.8.1 *Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a incorporação dos ácidos graxos da família ômega 3 no VE*

A suplementação com óleo de peixe elevou o conteúdo total de ácidos graxos da família ômega-3 no ventrículo esquerdo de ratos não infartados e infartados em comparação com os grupos que receberam salina ou óleo de soja (Apêndice A).

Na figura 12 está apresentada a composição de ácidos graxos no VE de ratos suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. No grupo não infartado, o conteúdo de EPA dos animais suplementados com óleo de peixe correspondeu a 0,035 % do peso do VE enquanto que não foi detectado EPA nos grupos salina ou soja (Figura 12-H). O conteúdo de EPA no grupo infartado correspondeu a 0,016 % do peso do VE quando suplementado com óleo de peixe e 0,006 % no grupo suplementado com óleo de soja (Figura 12-H). O conteúdo de DPA (n-3) no VE dos grupos não infartado e infartado aumentou 2 vezes, em relação aos grupos salina e soja, quando suplementados com óleo de peixe (Figura 12-I). O conteúdo de DHA no VE dos animais suplementados com óleo de peixe foi 97 % maior em animais não infartados e 59 % em animais infartados, quando comparado com o grupo suplementado com salina (Figura 12-J). Quando comparado com o grupo óleo de soja, o aumento no conteúdo de DHA no VE de animais suplementados com óleo de peixe foi em 91 % e 35 % nos animais não infartados e infartados, respectivamente (Figura 12-J).

5.8.2 Efeito da suplementação com óleo de peixe sobre a incorporação de ácidos graxos da família ômega 6

No grupo infartado, o óleo de peixe reduziu em 37 % a concentração de ácido araquidônico em comparação com o grupo que recebeu salina (Figura 12-C). O conteúdo de DTA n-6 no grupo não infartado foi reduzido em 70 % e 64 % pela suplementação com óleo de peixe quando comparado aos animais que receberam salina ou óleo de soja, respectivamente (Figura 12-D). Nos animais não infartados e infartados, a suplementação com óleo de peixe reduziu em 66 % e 54 % a incorporação de DPA (n-6) em relação aos grupos que receberam salina ou óleo de soja, respectivamente (Figura 12-E).

A suplementação com os óleos de peixe ou soja não modificou a proporção de ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) ou poliinsaturados (AGPI) no ventrículo esquerdo de animais não infartados e infartados (Tabela no apêndice A). Porém, a razão AGPI n-6/n3 foi reduzida em 4 vezes pela suplementação com óleo de peixe e 1,7 vezes pela suplementação com óleo de soja em relação ao grupo salina (Tabela no apêndice A). O decréscimo da razão n-6/n- no VE pelo óleo de peixe foi atribuído principalmente pelo aumento da incorporação de AGPI n-3 e de redução de n-6. Enquanto que, o óleo de soja provocou diminuição na incorporação de AGPI n-6 sem mudar o conteúdo de n-3 no VE.

Figura 11 - Composição de ácidos graxos no ventrículo esquerdo de ratos não infartados e infartados. Valores apresentados como média $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais. Os valores individuais estão na tabela A7. Foi aplicado o Teste t de *student* para comparação das médias entre os grupos não infartado e infartado.

Figura 12 - Análise da composição de ácidos graxos no ventrículo esquerdo de ratos suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. LA – ácido linoleico (A), DGLA (n-6) – ácido diomo γ -linolênico (B), AA – ácido araquidônico (C), DTA (n-6) – ácido docosatetraenóico da família ômega 6 (D), DPA (n-6) – ácido docosapentaenóico da família ômega 6 (E), ALA - ácido α -linolênico (F), ácido dodecatetraenóico (G), EPA (n-3) – ácido eicosapentaenóico (H), DPA (n-3) - ácido docosapentaenóico da família ômega 3 (I) e DHA (n-3) – ácido docosaexaenóico (J). Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A8a a A8j. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni. ND- não detectado.

A incorporação de DPA n-3 e DHA foi maior que EPA no VE de animais suplementados com óleo de peixe. A relação DHA/EPA foi maior no grupo infartado quando comparado ao grupo não infartado (Figura 13)

Figura 13- Razão DPA/EPA e DHA/EPA no VE de ratos suplementados com óleo de peixe. Foi aplicado o Teste “t” de *student* para comparação das médias de pelo menos 4 animais por grupo entre os grupos não infartado e infartado. Os valores individuais estão na tabela A9.

5.9 Conteúdo de AGL e TG no VE, VD e fígado

O infarto aumentou o conteúdo de AGL no ventrículo esquerdo, ventrículo direito e fígado (Figuras 14-A, 14-B e 14-C). A suplementação com óleo de soja reduziu o conteúdo de AGL no ventrículo esquerdo dos animais não infartados em 45 e 56 % quando comparada aos animais suplementados com salina ou óleo de peixe, respectivamente (Figura 14-A).

O conteúdo de TG no VE dos animais infartado aumentou em 50 % em relação aos grupos não infartados (Figura 14-D). A suplementação com óleo de peixe aumentou em 3 vezes o conteúdo de TG no VD do grupo não infartado quando comparada à suplementação com salina ou óleo de soja (Figura 14-E). Não houve alteração no conteúdo de TG no fígado dos animais infartados e não infartados (Figura 14-F).

Figura 14- Conteúdo de ácidos graxos livres e triacilglicerol no ventrículo esquerdo (A e D), ventrículo direito (B e E) e fígado (C e F) de ratos não infartados e infartados suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Os dados estão expressos com média $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A10a a A10f. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos. VE- ventrículo esquerdo, AGL- ácidos graxos livres, TG- triacilglicerol

5.10 Área de infarto

A área de infarto do grupo suplementado com óleo de peixe foi 20,5 % menor ($22,8 \pm 2,4$ % do perímetro do VE), em comparação ao grupo salina ($28,6 \pm 1,4$ % do perímetro do VE) e 26,0 % menor em comparação ao grupo óleo de soja ($30,81 \pm 3,5$ % do perímetro do VE). Não houve diferença na área de infarto entre os grupos óleo de soja e salina (Figura 15).

Figura 15 - Porcentagem do perímetro do VE acinético ou discinético (área de infarto). Os dados estão expressos como média $\pm$ E.P.M das porcentagens da circunferência ventricular de pelo menos 10 animais por grupo. Os valores individuais estão na tabela A11. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls para a comparação entre os grupos. VE- ventrículo esquerdo

5.11 Atividade da creatina quinase no plasma

A atividade da CK no plasma dos ratos infartados e suplementados com óleo de peixe foi 46% (409 ± 56 U/L) menor em relação ao grupo suplementado com salina ($758,8 \pm 68,2$ U/L) e 37 % menor em relação ao grupo suplementado com óleo de soja ($648,7 \pm 58$ U/L). Não houve diferença entre os grupos suplementados com óleo de soja e salina. A diminuição da atividade da CK no plasma é indicativa de menor lise celular e, conseqüentemente, menor área de infarto.

Figura 16 – Efeito dos óleos de peixe e soja sobre a atividade da creatina quinase (CK) no plasma de ratos infartados e não infartados. Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M de pelo menos 4 animais. Os valores individuais estão na tabela A12. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

5.12 Atividade da caspase 3 no ventrículo esquerdo

A atividade da caspase 3 foi 3 vezes mais elevada no grupo salina em relação ao grupo SHAM. Não houve mudança na atividade da caspase 3 no grupo suplementado com óleo de peixe em relação ao SHAM (suplementado com salina). As caspases são responsáveis pelo desencadeamento do processo apoptótico.

Figura 17 – Efeito dos óleos de peixe ou soja sobre a atividade da caspase 3 no ventrículo esquerdo de ratos infartados. Os valores estão expressos como médias $\pm$ E.P.M de pelo menos 4 animais. Os valores individuais estão na tabela A13. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls para a comparação entre os grupos.

5.13 Efeitos dos óleos sobre o conteúdo de citocinas no ventrículo esquerdo

O infarto por si só aumentou os conteúdos de TNF- α , IL-1 β , CINC- 2 α/β e MIP-3 no VE. O óleo de soja aboliu o aumento no conteúdo de MIP-3 pelo infarto (Figura 18-F). A suplementação com óleo de soja elevou os conteúdos de TNF- α , IL-1 β e CINC- 2 α/β no VE nos animais infartados, quando comparados aos grupos salina ou óleo de soja (Figuras 18-A, 18-B e 18-C). A suplementação com óleo de soja aumentou o conteúdo de IL-6 no VE de ratos infartados quando comparado ao respectivo grupo de animais não infartados (Figura 18-D). O infarto ou a suplementação com os óleos não provocou alteração do conteúdo da citocina anti-inflamatória IL10 no VE (Figuras 18-E). O conteúdo de VEGF- α aumentou no VE dos animais infartados e suplementados com os óleos de peixe ou soja (Figura 18-G).

Figura 18 – Efeito da suplementação com óleos de peixe ou de soja sobre o conteúdo de citocinas no ventrículo esquerdo 24 h após a indução do infarto. (A) TNF- α ; (B) IL-1 β ; (C) CINC-2 α/β ; (D) IL-6, (E) IL-10, (F) MIP-3 e (G) VEGF- α . Os dados estão expressos como médias do conteúdo de citocinas normalizado pelo conteúdo de proteína do ventrículo esquerdo $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A14a a A14g. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

5.14 Efeitos dos óleos sobre o conteúdo de citocinas no fígado

Foi avaliado o conteúdo de citocinas no fígado dos animais infartados e não infartados suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. O infarto por si só reduziu o conteúdo de IL-1 β , MIP-3 e VEGF- α no fígado. A suplementação com óleo de soja impediu a redução de IL-1 β e MIP-3 no fígado enquanto que o óleo de peixe não apresentou este efeito (Figuras 19-A e 19-C). A suplementação com óleo de soja aumentou o conteúdo de IL-1 β , MIP-3 e VEGF- α no fígado de animais não infartados de IL-6 e TNF- α nos animais infartados.

Figura 19 – Efeito da suplementação com óleos de peixe ou de soja sobre o conteúdo de citocinas no fígado 24 h após a indução do infarto. (A) IL-1 β ; (B) TNF- α ; (C) MIP-3, (D) IL-6 e (E) VEGF- α . Os dados estão expressos como médias do conteúdo de citocinas normalizado pelo conteúdo de proteína do ventrículo esquerdo $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais. Os valores individuais estão nas tabelas A15a a A15e. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

5.15 Efeitos dos óleos de peixe ou soja sobre as concentrações de TBARS no ventrículo esquerdo e fígado

O conteúdo de TBARS no VE foi mais elevado nos grupos infartados em relação aos não infartados (Figura 20-A). Este efeito não foi observado no fígado dos grupos infartados (Figura 20-B). A suplementação com óleo de soja ou de peixe não modificou o conteúdo de TBARS no VE ou fígado de animais infartados e não infartados.

Figura 20 – Conteúdo de TBARS nos ventrículos esquerdos (A) e fígados (B) de animais não infartados e infartados suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Os dados estão expressos com média $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A16a e A16b. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos. VE – Ventrículo esquerdo, TBARS-Substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico

5.16 Efeitos dos óleos sobre as concentrações plasmáticas de C3 e C4

Houve aumento nas concentrações das frações C3 e C4 do complemento no plasma dos animais infartados. A suplementação com os óleos não modificou as concentrações destas frações (Figuras 21-A e 21-B).

Figura 21 – Concentração plasmática das frações C3 e C4 do complemento 24 horas após a indução do infarto. (A) concentração plasmática de C3; (B) concentração plasmática de C4. Os valores estão expressos como médias $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A17a e A17b. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls Multiple Comparison para a comparação entre os grupos.

5.17 Concentração plasmática de Proteína C Reativa (PCR)

Conforme mostrado na Figura 22, a concentração plasmática da proteína C reativa não foi alterada pelo infarto ou pela suplementação com os óleos.

Figura 22 – Concentração plasmática da proteína C reativa 24 h após a indução do infarto. Os valores estão expressos como médias $\pm$ EPM de pelo menos 5 animais por grupo. Os valores individuais estão na tabela A18. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

5.18 Conteúdo de ATP do ventrículo esquerdo e fígado

Nos animais não infartados, a suplementação com óleo de peixe aumentou o conteúdo de ATP em 1,7 e 2,6 vezes em relação aos grupos suplementados com salina ou óleo de soja, respectivamente (Figura 23-A). Esta mesma resposta foi também observada nos animais infartados (Figura 23-A). A suplementação com óleo de peixe aumentou em 1,9 e 2,1 vezes o conteúdo de ATP no fígado de animais não infartados em relação aos grupos salina e óleo de soja, respectivamente (Figura 23-B).

Figura 23 – Conteúdo de ATP no ventrículo esquerdo (A) e fígado (B) dos ratos infartados e não infartados. Os valores estão expressos como médias das concentrações em μmol de ATP normalizado pelo peso úmido do ventrículo esquerdo ± EPM de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A19a e A19b. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

5.19 Efeitos dos óleos sobre o conteúdo de glicogênio do ventrículo esquerdo

O conteúdo de glicogênio do VE de ratos não infartados e suplementados com óleo de peixe foi 61,6 % e 44,2 % menor em comparação aos grupos salina e óleo de soja, respectivamente. Não houve diferença no conteúdo de glicogênio entre os grupos infartados (Figura 24).

Figura 24 – Conteúdo de glicogênio no ventrículo esquerdo de ratos infartados e não infartados.

Animais não infartados e infartados foram suplementados com: salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Os resultados estão expressos como médias das concentrações de unidades de glicosil normalizadas pelo peso úmido do ventrículo esquerdo $\pm$ EPM de pelo menos 6 animais. Os valores individuais estão na tabela A20. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

5.20 Conteúdo de lactato do ventrículo esquerdo

Nos animais infartados, a suplementação com óleo de peixe aumentou o conteúdo de lactato do VE em 33 % e 76 % em relação aos animais suplementados com salina ou óleo de soja, respectivamente (Figura 25).

Figura 25- Conteúdo de lactato no ventrículo esquerdo de animais não infartados e infartados.

Animais não infartados e infartados foram suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Os valores estão expressos como médias das concentrações em μmol de lactato normalizadas pelo peso úmido do ventrículo esquerdo $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais. Os valores individuais estão na tabela A21. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

5.21 Efeitos dos óleos sobre a atividade da fosfofrutoquinase e da citrato sintase do ventrículo esquerdo

A suplementação com óleo de soja em animais infartados levou a redução em 73,2 % e 74,8 % na atividade da PFK quando comparada com o grupo salina e óleo de peixe, respectivamente (Figura 26-A). Não foi observada diferença na atividade da citrato sintase no VE de animais infartados e não infartados (Figura 26-B).

Figura 26 – Atividades da citrato sintase (A) e fosfofrutoquinase (B) no ventrículo esquerdo de ratos infartados e não infartados. Animais não infartados e infartados foram suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja. Os valores estão expressos como médias das concentrações em $\mu\text{mol}/\text{min}$ e normalizados pelo peso úmido do ventrículo esquerdo $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais. Os valores individuais estão nas tabelas A22a e A22b. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA two-way seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos.

5.22 Efeito do óleo de peixe na expressão de genes no ventrículo esquerdo

Os conteúdos de RNAm da NO sintase induzida (iNOS) e a endotelial (eNOS) no VE de animais infartados foram os que mais aumentaram com a suplementação com óleo de peixe. As expressões gênicas de VEGF, GLUT 1 e HIF 1 aumentaram discretamente em relação ao grupo controle (suplementado com salina e infartado). O óleo de peixe aumentou os RNAm dos genes p53 e BAX2 em relação ao grupo controle.

Figura 27 – Conteúdo de RNAm do VE de ratos infartados e suplementados com óleo de peixe.

Valores estão expressos como média $\pm$ EPM de pelo menos 7 animais por grupo. Valores maiores de 1 indica aumento no conteúdo de RNAm em relação ao grupo infartado e suplementado com salina (controle). Valores menores de 1 indica aumento no conteúdo de RNAm em relação ao grupo infartado e suplementado com salina. Os valores individuais estão na tabela A23. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls para a comparação entre os grupos. * $P < 0.05$ vs controle

5.23 Efeito do óleo de peixe sobre o fluxo coronariano do ventrículo esquerdo

Foi observado redução em 77 % no fluxo de sangue coronário do VE de animais infartado e suplementados com salina quando comparado ao grupo SHAM ($0,79 \pm 0,12$ vs $3,497 \pm 0,25$ ml/min/grama de tecido úmido). A redução do fluxo sanguíneo coronariano no grupo infartado e suplementado com salina foi de 71 % quando comparado ao infartado e suplementado com óleo de peixe ($0,79 \pm 0,12$ vs $2,761 \pm 0,64$ ml/min/grama de tecido úmido). Não houve diferença entre os grupos infartados suplementado com óleo de peixe em relação ao grupo salina.

Figura 28- Fluxo sanguíneo coronário do ventrículo esquerdo de ratos infartados. Os valores estão expressos como média $\pm$ EPM de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A24. Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls para a comparação entre os grupos.

5.24 Função cardíaca

Houve redução de 38% na fração de ejeção nos animais infartados e suplementados com salina ($FE = 43,88 \pm 3,08 \%$) em relação ao grupo salina não infartado ($70,75 \pm 1,79 \%$). A redução da fração de ejeção no grupo óleo de peixe infartado foi 30 % ($56,4 \pm 3,67 \%$) menor em relação ao grupo não infartado com o mesmo tratamento ($81,00 \pm 2,00 \%$). Entre os animais infartados o grupo pré-tratado com óleo de peixe teve a FE 28 % maior em relação ao grupo salina (Tabela 9).

A fração de encurtamento do grupo infartado salina ($\Delta D = 20,33 \pm 1,94 \%$) foi reduzida em 42,6 % comparada ao controle não infartado ($35,43 \pm 1,68 \%$). Houve redução em 41 % da ΔD do grupo infartado que recebeu óleo de peixe ($26,30 \pm 2,30 \%$) em relação ao não infartado com o mesmo tratamento ($44,66 \pm 2,10 \%$). Entre os animais infatados a ΔD do grupo suplementado com óleo de peixe foi 29% maior em relação ao grupo salina.

A Vcf do grupo salina infartado ($0,2431 \pm 0,022 \text{ cm/s}$) foi 41,7 % menor em relação ao controle não infartado ($0,417 \pm 0,04 \text{ cm/s}$). Entre os grupos que receberam óleo de peixe a Vcf foi 28,5 % menor no grupo infartado ($0,346 \pm 0,02 \text{ cm/s}$) em relação ao não infartado ($0,484 \pm 0,03 \text{ cm/s}$). Entre os animais infartados a Vcf no grupo óleo de peixe foi 42 % maior em relação ao grupo salina.

O nTRIV foi menor nos animais infartados suplementados com óleo de peixe ($1,73 \pm 0,11 \text{ ms}$) em relação ao grupo não infartado com o mesmo tratamento ($2,39 \pm 0,29 \text{ ms}$). Contudo, nos animais não infartados, o TDE foi maior com óleo de peixe ($47,4 \pm 6,12 \text{ ms}$) em relação a salina ($34,00 \pm 1,58 \text{ ms}$).

A frequência cardíaca nos animais infartados e pré-tratados com óleo de peixe ($298,8 \pm 7,1 \text{ bpm}$) foi maior comparado aos controles não infartado ($260 \pm 15,97 \text{ bpm}$) e infartado ($271 \pm 8,39 \text{ bpm}$).

Tabela 9 - Avaliação funcional do ventrículo esquerdo nos grupos SHAM e infartado suplementados com salina ou óleo de peixe

	Não infartado		Infartado	
	Salina	Óleo de peixe	Salina	Óleo de peixe
Função sistólica				
FE (%)	70,75 ± 1,79	81,00 ± 2,00^{\$}	43,88 ± 3,08*	56,40 ± 3,67**
ΔD (%)	35,43 ± 1,68	44,66 ± 2,10^{\$}	20,33 ± 1,94**	26,30 ± 2,30**
Vcf (cm/s)	0,417 ± 0,04	0,484 ± 0,03	0,243 ± 0,02*	0,346 ± 0,02[#]
Função diastólica				
nTRIV (ms)	1,86 ± 0,24	2,39 ± 0,29	1,63 ± 0,10	1,73 ± 0,11*
TDE (ms)	34,00 ± 1,58	47,4 ± 6,12^{\$}	35,64 ± 2,08	35,43 ± 1,78*
E/A	2,03 ± 0,43	1,70 ± 0,15	2,36 ± 0,19	2,07 ± 0,27
FC (bpm)	285 ± 0,64	260 ± 15,97	271,1 ± 8,39	298,8 ± 7,1**

Os valores estão expressos como médias ± EPM de pelo menos 4 animais por grupo. Os valores individuais estão nas tabelas A25a a A25d. Fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (ΔD), velocidade de encurtamento circunferencial (Vcf), tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado (nTRIV), tempo de desaceleração da onda E (TDE), razão entre onda E/A do fluxo mitral (E/A) e frequência cardíaca (FC). Foi Para a comparação entre os grupos SHAM foi aplicado o Teste t de *student* (^{\$}P<0,05), Foi aplicado o teste de análise de variância ANOVA one-way seguido do pós-teste de Newman-Keuls para a comparação entre os grupos infartados e SHAM. *P<0,05 vs. SHAM; [#]P<0,05 vs. Infartado salina.

6 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram investigados os efeitos da suplementação com óleos de peixe ou soja sobre a área de infarto, função do coração e alterações inflamatórias e metabólicas agudas associadas ao infarto do miocárdio.

A área de infarto foi menor no coração dos ratos suplementados com óleo de peixe. Provavelmente ocorreu redução na proporção de células cardíacas em necrose e apoptoses como indicado pela diminuição das atividades da CK no plasma e da caspase 3 no VE, respectivamente. Animais suplementados com os óleos de peixe ou soja apresentaram queda menor da fração de ejeção e fração de encurtamento após o infarto. Não foi observada modulação da resposta inflamatória pelo óleo de peixe. Por sua vez, a suplementação com óleo de soja aumentou o conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no VE e fígado de animais infartados. Houve aumento nos conteúdos de ATP e lactato e diminuição do de glicogênio no VE do grupo suplementado com óleo de peixe. Os conteúdos de mRNAs de genes relacionados com o metabolismo da glicose (GLUT-1), defesa contra isquemia (HIF-1) e produção de óxido nítrico (eNOS e iNOS) no VE de animais infartados também foram elevados pelo óleo de peixe. Foi ainda observado, aumento no fluxo coronariano no coração dos animais infartados e suplementados com óleo de peixe.

Com o objetivo de verificar se os óleos poderiam causar alterações nutricionais ou hepatotoxicidade, avaliamos na última semana de suplementação a ingestão de ração/calorias e no 20º dia a massa corpórea, massa dos órgãos, atividade plasmática de enzimas hepáticas (CK, LDH, AST, ALT e Gama GT) e concentrações plasmáticas de albumina, bilirrubina e glicose.

Houve redução na ingestão de ração nos grupos suplementados com os óleos de peixe e de soja (Tabela 5). Contudo, essa redução não foi suficiente para alterar o crescimento dos animais e interferir nas massas do coração, fígado e depósitos de gordura (Figuras 7 e 8). Como foi observado por Borsonelo e colaboradores (2013), ratos alimentados com ração padrão adicionada de 11 % de óleo de soja ou de peixe durante 30 dias ingerem 27 % menos ração do que os animais que recebem somente ração padrão, sem alteração nas massas dos órgãos ou massa corpórea. Contudo, estes autores não expressaram a ingestão de ração em valores calóricos.

Observamos redução de 10 % na ingestão diária de ração pelos grupos suplementados com os óleos de peixe ou soja em relação aos ratos que receberam

salina (Tabela 5). Em termos calóricos, os animais suplementados com óleos de soja ou peixe ingeriram diariamente 7,7 Kcal menos de ração do que o grupo que recebeu salina. Porém, estes mesmos animais ingeriram diariamente 9,9 Kcal provenientes dos óleos. Quando somadas as calorias da ração com aquelas provenientes dos óleos não foram observadas diferenças na ingestão calórica entre os grupos (Tabela 5). Os animais suplementados com os óleos deixaram de ingerir a quantidade de ração equivalente em calorias que receberam através dos óleos. Esses resultados refletem a eficiência com que a ingestão calórica nos roedores é controlada e explicam o fato de não haver diferença na massa corpórea entre os grupos estudados.

Os óleos não provocaram alterações no sistema hepatobiliar quando avaliados pelos indicadores de lesão (atividades no plasma das enzimas CK, LDH, ALT, AST e gama GT) ou da função hepática (concentração plasmática de albumina, bilirrubina e glicose) (Tabela 6). A função renal, estimada pelas concentrações plasmáticas de creatinina e ureia, também não foi modificada pela suplementação com os óleos (Tabela 7).

Segundo Zornoff (2009) a taxa de mortalidade animal no modelo de infarto por ligadura permanente da artéria descendente varia entre 40 a 60 %. Observamos variação de 31 % a 36m% na taxa de mortalidade (Tabela 8). Isto pode ser devido ao curto período em que foi avaliada a taxa de mortalidade dos animais (durante 24 horas após a indução da isquemia).

A concentração plasmática de TG aumentou nos animais infartados quando comparada com a dos grupos não infartados (Figura 10-E). Contudo, a suplementação com óleo de peixe preveniu o aumento de TG no plasma deste grupo (Figura 10-E). Outros autores também relataram aumento na concentração plasmática de TG após o infarto (Barth et al., 2010; Rosenson, 1993). Isso pode ser explicado pelo suprimento aumentado de AGL para o fígado provindo da lipólise. A síntese hepática de TG e VLDL depende da disponibilidade de ácidos graxos no sangue e/ou da síntese *de novo* no fígado (Nielsen e Karpe, 2012).

Os efeitos hipotrigliceridêmicos dos AGs n-3 (Abeywardena, Patten, 2011; Eslick et al., 2009) são bem conhecidos. Os mecanismos propostos são: supressão da lipogênese hepática, aumento da proteólise de Apo B no retículo endoplasmático, aumento da oxidação de AGs no fígado e músculo esquelético e desvio do fluxo de glicose para a síntese de glicogênio. Outros autores demonstraram aumento no *clearance* de lipoproteínas ricas em TG devido à ativação da lipase de lipoproteína

pelos AGs ômega 3 (Harris et al., 1997; Park et al., 2004). A concentração plasmática de TG foi reduzida pelo óleo de peixe apesar das concentrações de AGL estarem elevadas no plasma e no tecido hepático (Figuras 10-A e 14-C). Isso indica que o óleo de peixe reduz a síntese de VLDL através de outro mecanismo que não pela redução da disponibilidade de substrato. Efeito do óleo de peixe sobre a LPL não parece provável visto que não foi observado aumento na concentração plasmática de LDL neste grupo. Com atividade aumentada da LPL atuando sobre os TG contidos nas partículas de VLDL esperar-se-ia maior formação de partículas de LDL.

A suplementação com óleo de peixe reduziu a concentração de colesterol total no plasma dos animais infartados quando comparada com o grupo suplementado com óleo de soja (Figura 10-B). Os efeitos dos ácidos graxos ômega-3 sobre a concentração plasmática de colesterol total, HDL-C e LDL-C ainda não estão definidos (Hoy, Keating 2009; Maki et al., 2008; Stalenhoef et al., 2000). Os efeitos do óleo de peixe sobre as concentrações de LDL-C e HDL-C dependem da proporção de EPA e DHA presentes no óleo (Eslick et al., 2009). Wei e Jacobson (2011) avaliaram 21 estudos de intervenção clínica com o objetivo de apontar diferenças entre os efeitos de DHA e EPA sobre as concentrações dos lipídios no plasma. Ambos EPA e DHA reduziram TG e aumentaram HDL-C no plasma em comparação ao placebo. Contudo, neste mesmo estudo, foram observados efeitos diferentes de EPA e DHA sobre a concentração de LDL-C. A suplementação com uma preparação pura de DHA aumentou a concentração de LDL-C enquanto que o EPA não apresentou efeito significativo sobre esta lipoproteína (Wei, Jacobson. 2011). Mizuguchi e colaboradores (1993) demonstraram em ratos que a suplementação com uma preparação rica em EPA na forma etil-éster, durante sete dias por via intragástrica, reduz a concentração plasmática de [^{14}C]colesterol após administração oral deste radioativo. Em adição, EPA reduz a conversão de [^{14}C]HMG-CoA à [^{14}C]ácido mevalônico no fígado. Estes resultados são indicativos de efeito inibitório do EPA sobre a absorção e síntese hepática de colesterol. No presente trabalho, utilizamos óleo de peixe que contém 3,7 vezes mais EPA do que DHA (Tabela 3). Aproximadamente 61% dos ácidos graxos presentes neste óleo corresponde a EPA na forma de etil éster (Figura 4). A suplementação com óleo de peixe diminuiu a concentração de VLDL-C (Figura 10-F), aumentou a concentração de HDL-C (Figura 10-D) e não modificou a concentração de LDL-C em relação aos grupos salina ou óleo de soja (Figura 10-C). Estes efeitos do óleo de peixe sobre as concentrações de VLDL-C, HDL-C e LDL-C assemelham-

se aos observados em trabalhos que utilizaram preparações ricas em EPA na forma de etil éster (Mizuguchi et al., 1993; Wei, Jacobson, 2011).

A elevação na concentração de AGL no plasma após o infarto (Figura 10-A) foi relatada em humanos e roedores (Kleinfeld et al., 1996; Vijaya Padma et al., 2006). A ativação da lipólise no tecido adiposo pelas catecolaminas é considerada a principal causa da elevação de AGL no plasma de indivíduos infartados (Ebbert, Jensen, 2013). No presente trabalho, a concentração de AGL foi determinada no período em que o organismo ainda está respondendo ao estresse (24h após a indução do infarto), como indicado pela concentração elevada de proteínas de “fase aguda” como as frações do complemento C3 e C4 no plasma (Figuras 21-A e 21-B). Desta forma, o aumento de AGL no plasma foi devido à lipólise intensa induzida pelo estresse do infarto. A suplementação com óleos de peixe e soja não reverteu o aumento na concentração plasmática de AGL nesta condição.

O mecanismo cardioprotetor dos ácidos graxos ômega-3 depende da presença destes nas membranas dos cardiomiócitos (Fosshaug et al., 2011; McLennan et al., 2007). No presente trabalho, não foi observada diferença na composição de ácidos graxos do VE entre os grupos infartado e não infartado (Figura 11). Esta observação está em concordância com o trabalho de Shearer e colaboradores (2009) que também não constataram diferenças na composição de ácidos graxos de hemácias e coração entre ratos infartados e o grupo SHAM.

A suplementação com óleo de peixe aumentou o conteúdo de EPA, DPA-n-3 e DHA no VE quando comparado com salina ou óleo de soja (Figuras 12-H, 12-I e 12-J). Contudo, a incorporação de EPA no VE foi menor quando comparada a de DPA-n-3 e DHA (Figura 13). Resultados semelhantes foram obtidos por Rousseau e colaboradores (2003). Eles observaram que nos ratos submetidos à dieta enriquecida com EPA há diminuição da incorporação de AA e aumento de DHA e DPA-n-3 sem alterar o conteúdo de EPA nos fosfolípidios cardíacos de ratos.

A formação de DPA-n-3 a partir do EPA ocorre pela adição de dois carbonos à molécula. Este processo envolve quatro reações enzimáticas: 1) condensação de acil-CoA com malonil-CoA para formar 3-cetoacil-CoA, etapa catalisada pela isoforma 2 da elongase; 2) redução eletroquímica do 3-cetoacil-CoA para formar 3-hidroxicetoacil-CoA; 3) desidratação do 3-hidroxicetoacil-CoA para formar trans-2-enoil-CoA e 4) redução eletroquímica do trans-2-enoil-CoA para formar o acil-CoA adicionado de dois carbonos (DPA) (Guillou et al., 2010). Contudo, a transformação

do EPA no tecido cardíaco pelas dessaturases e elongases não pode explicar o acúmulo de DPA e DHA no coração. Igarashi e colaboradores (2008) demonstraram que, ao contrário da elongase 5 (ELOVL5), isoforma que catalisa a conversão do ácido estearidônico (18:4 n-3) em eicosatetraenóico (20:4 n-3), o coração não expressa a isoforma 2 da elongase (ELOVL2), enzima chave para a formação de DPA e DHA a partir do EPA (Figura 2). Sendo assim, o acúmulo de DHA e DPA-n3 depende de maior incorporação nas membranas ou menor utilização destes pelas células cardíacas em relação ao EPA. Leroy e colaboradores (2008) demonstraram que em cardiomiócitos de ratos neonatos tratados com EPA, os conteúdos de DPA n-3 e DHA nas membranas aumentam quando cultivados por 48 horas. Sendo assim, é provável que o coração obtém DPA e DHA do meio extracelular e/ou utiliza menos estes ácidos graxos quando o EPA é fornecido. No presente trabalho, é provável que muitos dos efeitos cardioprotetores observados, são, pelo menos em parte, decorrentes da incorporação de DPA-n-3 e DHA no ventrículo esquerdo.

Ratos infartados e não infartados que receberam óleo de peixe apresentaram redução no conteúdo de ácidos graxos ômega 6 no VE (AA, DTA-n-6 e DPA-n-6) quando comparados com salina ou óleo de soja (Figuras 12-C, 12-D e 12-E). O ácido linoleico é fonte primária de AGPI n-6 e precursor do AA (CALDER, 2010). O ácido araquidônico (20:4 n-6) ao sofrer elongação no retículo endoplasmático gera DTA-n-6 (22:4 n-6). O DTA-n-6 é transformado em DPA-n-6 (22:5 n-6) através de três reações: elongação (adição de dois carbonos na molécula de AG), dessaturação (inserção de uma dupla ligação no AG) e β -oxidação (retirada de dois carbonos do AG). Em células de mamíferos, a última etapa na formação do DPA-n-6 ocorre nos peroxissomos (Schmitz, Ecker, 2008). Uma vez formada, DPA-n-6 volta para o retículo endoplasmático (*shunt* de Sprecher) onde poderá ser incorporado em fosfolípidos e/ou triacilgliceróis (Russo 2009). A $\Delta 6$ dessaturase é enzima chave (determina a velocidade da reação) da metabolização de AGPI n-3 e n-6. Esta enzima catalisa a inserção de uma dupla ligação na molécula de AG na presença de oxigênio e NADH como cofator (Guillou et al., 2010). Os ácidos graxos n-3 e n-6 competem entre si pela $\Delta 6$ dessaturase e elongases (Lands et al., 1992). O fornecimento de AGPI n-3 em quantidades superiores a AGPI n-6 pode diminuir a formação de metabólitos derivados do AA por competirem pelas dessaturases e elongases o que explica a redução do conteúdo de AA e de seus metabólitos como DTA-n-6 e DPA-n-6 no VE dos animais suplementados com óleo de peixe. Em adição, os AGPI n-3 competem

pela acil-CoA transferase e assim reduzem a incorporação de AA nos fosfolipídeos presentes nas membranas celulares (Lands et al., 1992).

Houve pequeno aumento de EPA no VE de animais infartados quando suplementados com óleo de soja (Figura 12-H). A porcentagem de EPA ou DHA no óleo de soja é nula enquanto que de ALA (ácido graxo n-3 presente em óleos de origem vegetal) é de 6,8% (Tabela 3). Dieta rica em ALA aumenta a concentração de EPA no plasma (Wallace et al., 2003), neutrófilos (Mantzioris et al., 1994), plaquetas (Sanders et al., 1981) e coração (Barceló-Coblijn et al., 2005). Esses resultados podem resultar da conversão de ALA em EPA e outros AGs ômega 3. Contudo, a taxa de conversão de ALA para outros AGs n-3 é baixa: 0,2% para EPA, 0,13% para DPA e 0,05% para DHA (Burdge, Calder, 2005). Isso explica porque foi encontrada baixa quantidade de EPA no coração de ratos suplementados com óleo de soja (Figura 12-H).

Acúmulo de lipídios no coração após infarto agudo do miocárdio foi relatado por vários autores (Bilheime et al., 1978; Perman et al., 2011; Windt et al., 2001). Como observado por esses autores, o conteúdo de AGL no ventrículo esquerdo dos animais infartados aumentou em relação aos não infartados. O acúmulo de AGL no músculo cardíaco está associado a maior ativação da fosfolipase A2 durante a isquemia (Nasa et al., 1997). Windt e colaboradores (2001) demonstraram menor liberação de AGL no tecido cardíaco de camundongos *knockout* para fosfolipase A2 submetidos à isquemia quando comparados ao grupo selvagem. Durante a isquemia, a oxidação de ácidos graxos pelos cardiomiócitos diminui devido à baixa tensão de oxigênio e o miocárdio passa a obter ATP a partir da utilização de glicose por via anaeróbia (Doenst et al., 1996). A substituição na utilização de ácidos graxos por glicose é um mecanismo que ajuda a manter a integridade do cardiomiócito na condição de isquemia (Hochachka et al., 1996). Além disso, essa mudança contribui para o acúmulo de AGs no tecido cardíaco (Huss et al., 2001). No presente trabalho, foi observado que áreas não isquêmicas do coração como o ventrículo direito (Figura 14-B) e o fígado (Figura 14-C) de animais infartados também apresentam aumento do conteúdo de AGL em relação aos mesmos tecidos dos animais não infartados. Sendo assim, é provável que a captação de AGs pelos tecidos está aumentada devido à grande quantidade desses na circulação. Contudo, um processo ativo de captação de AGL pelas células miocárdicas não pode ser descartado, como descrito por Perman e colaboradores (2011). Esses autores demonstraram aumento na expressão proteica do receptor da

VLDL em células HL-1 (linhagem de cardiomiócito) e coração de camundongos submetidos à isquemia.

As células cardíacas ao morrerem por necrose liberam o conteúdo intracelular que dispara eventos como ativação do complemento, produção de radicais livres, ativação da cascata de coagulação e liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (Frangogiannis, 2006). Estes processos são cruciais para o restabelecimento da função cardíaca após a lesão isquêmica. As células inflamatórias circulantes como neutrófilos e monócitos são atraídas para a área infartada e contribuem, respectivamente, para digestão proteolítica e fagocitose da área necrosada e assim levam à formação subsequente de tecido cicatricial e o remodelamento cardíaco (Anzai, 2013). Contudo, a resposta inflamatória, quando exacerbada, pode aumentar o dano no miocárdio causado pela isquemia e desencadear respostas inflamatórias sistêmicas que envolvem produção de citocinas e proteínas de fase aguda pelo fígado (Kempf et al., 2012; Serteser et al., 2002). Sendo assim, investigamos se os óleos de peixe e soja afetariam a produção de citocinas pró-inflamatórias, frações do complemento, PCR e conteúdo de TBARS no VE e fígado 24 h após a indução do infarto.

O conteúdo de TBARS no VE de animais infartados aumentou quando comparados aos não infartados (Figura 20-A). O mesmo não foi observado no fígado de animais infartados (Figura 20-B) apesar de possuírem conteúdo elevado de AGL (substrato para peroxidação). Isso demonstra que a injúria foi o fator determinante do aumento do conteúdo de TBARS no VE. A suplementação com os óleos não modificou o conteúdo de TBARS no VE e no fígado.

O infarto por si só aumentou os conteúdos de TNF- α , IL-1 β , CINC 2 α/β e MIP-3 no VE (Figuras 18-A, 18-B, 18-C e 18-F). A suplementação com óleo de soja elevou ainda mais os conteúdos de TNF- α , IL-1 β , CINC 2 α/β e IL-6 no VE de animais infartados (Figura 18-A, 18-B, 18-C e 18D). Foi observado efeito semelhante do óleo de soja sobre os conteúdos de IL-1 β , TNF- α , MIP-3 e IL-6 no fígado (Figura 19-A, 19-B, 19-C e 19-D). Contudo, o óleo de soja não alterou as concentrações de proteínas de fase aguda (Figuras 21 e 22). O óleo de soja é rico em ácido linoléico (Tabela 3), que, como citado acima, é precursor do AA. Este ácido graxo é o primeiro componente da cascata de formação dos eicosanóides, sua metabolização pelas cicloxigenases e lipoxigenases gera mediadores pró-inflamatórios como prostaglandinas da série E2, leucotrienos da série B4 e tromboxana A2 (Figura 2) (Kinsella et al., 1990). Contudo,

não foi observado aumento na incorporação de ácido linoleico ou AA no VE de ratos suplementados com óleo de soja. Em adição, a suplementação com óleo de soja diminuiu o conteúdo de DPA-n-6 no VE em relação à salina (Figura 12-E). Outros autores também não encontraram aumento na concentração de AA no plasma de indivíduos que receberam dietas ricas em ácido linoleico (Blanchard et al., 2013; Liou et al., 2007; Rett, Whelan 2011). Rodrigues e colaboradores (2010) observaram que neutrófilos obtidos de ratos suplementados via oral com ácido linoleico puro apresentam aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias sem alterar a composição de AA na membrana destas células. É possível que o ácido linoleico exerça seus efeitos sobre as citocinas pró-inflamatórias por mecanismo independente dos conteúdos de AA ou de seus metabólitos no VE. Hennig e colaboradores (1996) observaram ativação do fator $\text{N}\kappa\text{B}$ em células endoteliais cultivadas com ácido linoleico. Este efeito parece depender da formação de hidroperóxidos visto que foi abolida pela adição de antioxidantes como n-acetilcisteína e vitamina D.

O óleo de peixe não alterou o conteúdo de citocinas pró-inflamatórias no VE ou fígado. Este resultado não suporta a hipótese inicial de que o óleo de peixe poderia conferir cardioproteção devido as suas propriedades anti-inflamatórias. Hall e colaboradores (2012), utilizando um modelo de lesão da medula espinal de rato, demonstraram que ambos DHA e EPA conferem neuroproteção sem afetar a resposta inflamatória decorrente da lesão. Estes autores não encontraram alteração nos conteúdos de $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{CINC 2}\alpha/\beta$ na medula espinal e plasma, após 4h e 24h da indução da injúria. Eles levantaram a possibilidade de outros mecanismos dos AGPI n-3 participarem da neuroproteção tais como: ativação de receptores do ácido retinóico e de fatores de transcrição como dos PPARs alfa e gama que são conhecidos por conferirem proteção a neurônios e células da glia. Foi demonstrado também efeito protetor do DHA em células nervosas cultivadas com indutores de apoptose como $\text{TNF-}\alpha$ e H_2O_2 (Mukherjee et al., 2004; Rotstein, 2003) ou na ausência de fatores de crescimento (Akbar, Kim, 2002).

Tomando estes resultados em conjunto pode-se concluir que o tamanho da área de infarto não está associado com a intensidade do processo inflamatório. A área de infarto no grupo suplementado com óleo de soja não mudou em relação ao controle mesmo apresentando processo inflamatório mais intenso. Por outro lado, a área de infarto do grupo suplementado com óleo de peixe foi menor sem diminuição no

processo inflamatório. Portanto, outro fator deve estar envolvido à cardioproteção conferida pelo óleo de peixe.

No infarto, os cardiomiócitos morrem por três mecanismos: necrose, apoptose e autofagia. Nas primeiras 24 horas após o evento isquêmico, a necrose é a forma de morte mais frequente, sendo seguida por apoptose que atinge ocorrência máxima em 48 horas persistindo por até sete dias. A autofagia inicia-se após alguns meses e perdura por anos. As células viáveis presentes ao redor da área necrosada estão sob baixa tensão de oxigênio (Dorn, Diwan, 2008). A sobrevivência destas ao longo da isquemia depende do tempo de restabelecimento do fluxo sanguíneo no coração (tempo de isquemia) e ou da resistência inerente dos cardiomiócitos à hipóxia (Kloner, Longrace, 2011). Em nosso estudo, a suplementação prévia com óleo de peixe reduziu em 28 % a área de infarto no período de 24 horas de isquemia (Figura 15). Este foi acompanhado por redução em 46 % na atividade da CK (Figura 16) em relação à suplementação com salina ou óleo de soja. Otsuji e colaboradores (1993) utilizando modelo de infarto por ligadura permanente da artéria descendente, observaram menor área de infarto (31 % menor que o controle) em cães suplementados com 100 mg/Kg/dia de EPA durante 8 semanas. Coelhos suplementados com 600 mg/Kg/dia de EPA na forma de etil éster durante duas semanas apresentaram redução da área de infarto em 70 % quando comparados com animais não suplementados (Ogita et al., 2003). A resistência do coração à isquemia varia conforme a espécie utilizada (Hearse, 1998). A diferença parece estar nas vias de sobrevivência do cardiomiócito à isquemia (Hausenloy et al., 2010). A inibição da fosforilação da Akt em ratos e coelhos anula a cardioproteção conferida pelo pós-condicionamento isquêmico (processo que caracteriza-se por episódios rápidos de isquemia durante a reperfusão do coração que previamente sofreu oclusão da coronária), mas isso não ocorre em camundongos (Przyklenk et al., 2008). A ativação da via RISK protege o coração contra isquemia em ratos e camundongos mas não parece estar envolvida na resposta cardioprotetora em porcos (Skyschally et al., 2009). Estas diferenças nas vias de sinalização cardioprotetora entre as espécies podem explicar as discrepâncias observadas no tamanho do infarto entre os estudos prévios e o presente trabalho.

Diferente dos grupos salina e óleo de soja, não foi observado aumento na atividade da caspase 3 no ventrículo esquerdo dos animais infartados previamente suplementados com óleo de peixe em relação ao grupo SHAM (Figura 17). A

apoptose ocorre por ativação de uma série de caspases. Essas são proteases que clivam proteínas na posição onde possui aspartato (Khoynezhad et al., 2004). As caspases 3, 6 e 7 são chamadas de efetoras, pois, quando ativadas, o processo apoptótico ocorre inevitavelmente (Khoynezhad et al., 2004). A redução na concentração de ATP é um fator indutor de apoptose (Khoynezhad et al., 2004). No presente estudo, foi observado que a concentração de ATP no VE de animais suplementados com óleo de peixe é mais elevada comparada aos grupos salina e óleo de soja nos animais não infartados e infartados (Figura 23-A). Este efeito parece não ser tecido específico, visto que foi também observado no fígado de animais não infartados (Figura 23-B). O aumento na concentração de ATP no VE de ratos suplementados com óleo de peixe foi acompanhado de redução no conteúdo de glicogênio nos animais não infartados (Figura 24) e aumento de lactato no grupo infartado (Figura 25). Estas alterações são sugestivas de que o óleo de peixe aumenta a oxidação da glicose através da via anaeróbia, gerando ATP mesmo em condição de baixa tensão de oxigênio. Em concordância com esta proposição houve aumento na expressão gênica de GLUT-1 no VE de animais infartados (Figura 27).

Embora, em termos quantitativos, a produção ATP pela glicólise anaeróbia seja menor em relação à oxidação mitocondrial de ácidos graxos, esta é mais rápida. Este fato associado à redução no consumo energético pode resultar em aumento no conteúdo de ATP no músculo cardíaco. Há evidências de que a incorporação de AGPI n-3 na membrana do cardiomiócito reduz a demanda de oxigênio por diminuir a atividade dos transportadores de Na^+ e K^+ na membrana plasmática (McLennan, Abeywardena, 2005; Ruf, Arnold, 2008).

As alterações nos conteúdos de ATP, lactato e glicogênio no VE de animais suplementados com óleo de peixe não resultaram da modificação nas atividades da PFK e da CS (Figuras 26-A e 26-B), enzimas chaves do metabolismo anaeróbio e aeróbio de glicose, respectivamente. Contudo, foi observado que o fluxo sanguíneo coronariano do VE de animais suplementados com óleo de peixe foi preservado quando estes foram infartados (Figura 28). A manutenção do fluxo sanguíneo nas áreas não necróticas garante o aporte de glicose e oxigênio para as células cardíacas manter a produção de ATP e consequentemente sua viabilidade.

Observamos que óleo de peixe rico em EPA aumenta o conteúdo de mRNA da NO sintase endotelial (eNOS) no VE de ratos infartados (Figura 27). Esta enzima gera óxido nítrico (NO) quando catalisa a conversão de L-arginina a L-citrulina na presença

de cofatores como NADH, Ca^{2+} /calmodulina, dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), mononucleotídeo de flavina (FMN) e tetra-hidrobiopterina (BH_4) (Balligand et al., 1993). A diminuição na produção endotelial de NO está associada a doenças isquêmicas do coração e hipertensão (Luscher et al., 1989). Muitos autores demonstraram efeitos cardioprotetores do NO (Luscher et al., 1989; Burkard et al., 2010). A vasodilatação, inibição da adesão leucocitária e redução da agregação plaquetária são alguns efeitos cardioprotetores do NO (Balakumar, Taneja, 2012). Outro efeito cardioprotetor do NO é a ativação da isoforma ϵ (epsilon) da PKC (Xia, Vanhoutte, 2011). A PKC ϵ inibe, diretamente, ou através do $\text{NF}\kappa\text{B}$, a formação de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (PTP) que induzem morte celular na isquemia e reperfusão (Li et al., 2000). A via da PKC ϵ torna-se mais ativa a medida que mais NO é formado a partir da indução da expressão gênica da iNOS pelo $\text{NF}\kappa\text{B}$ (Li et al., 2000; Xia, Vanhoutte, 2011).

Há evidências de que AGPI n-3 estimulam a produção de NO em endotélio isolado e artérias coronárias (Lópes et al., 2004; Li et al., 2007). Omura e colaboradores (2001) demonstraram aumento na produção de NO pelas células endoteliais cultivadas com EPA, efeito este não observado com DHA ou DPA. Aorta de ratos que receberam uma dieta contendo 5% de óleo de peixe durante 8 semanas apresentam aumento no conteúdo de mRNA de eNOS e maior atividade desta enzima. Embora não avaliamos a produção de NO, é provável que, como no pré-condicionamento isquêmico, os ácidos graxos ômega 3 ativem a via da PKC ϵ , visto que foi observado aumento na expressão gênica de eNOS e da iNOS no VE de animais suplementados com óleo de peixe. Em adição, o óleo de peixe aumentou o conteúdo de ATP e reduziu o de glicogênio, assim como a atividade das caspase 3 no VE. Estas alterações foram observadas em estudos com pré-condicionamento isquêmico (Jennings et al., 2001; Soares et al., 1997).

O tratamento com o óleo de peixe atenuou a queda da fração de ejeção e fração de encurtamento causados pelo infarto (Tabela 9). Durante a isquemia há redução do pH intracelular devido ao aumento do metabolismo aeróbio. O excesso de H^+ ativa o trocador de Na^+/H^+ e assim eleva a concentração de Na^+ no cardiomiócito. Isto, ativa o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ de forma reversa e aumenta a retirada de íons sódio em troca da entrada de Ca^{++} (Sanada et al., 2011). O aumento do influxo de Ca^{++} no cardiomiócito provoca o acúmulo deste na região isquêmica (Sanada et al., 2011). A concentração

elevada de Ca^{++} , assim como a acidose provocada pela isquemia, estão associadas à disfunção sistólica no IAM (Liou, Chang, 2004).

Ferrier e colaboradores (2002) observaram redução na atividade de canais de cálcio voltagem dependente do tipo L em cardiomiócitos isolados de porcos da Índia tratados com DHA. Xiao e colaboradores (1997) demonstraram o efeito inibitório do EPA sobre a corrente elétrica dos canais de cálcio voltagem dependentes do tipo L ($I_{\text{cal,L}}$) e menor liberação de cálcio do retículo sarcoplasmático em cardiomiócitos isolados. Este efeito foi associado a redução na concentração de Ca^{++} intracelular e ao efeito anti-arritmogênico do EPA. É provável que o aumento da FE e ΔD observados no presente estudo estejam relacionados com os efeitos do AGPI n-3 sobre a concentração de Ca^{++} intracelular. Em adição, o tratamento com óleo de peixe aumentou a FE e ΔD nos animais não infartados (Tabela 9). Isso sugere que a função sistólica também é pré-condicionada pelo tratamento com o óleo de peixe.

Nos animais infartados a Vcf apresentou-se mais elevada no grupo pré-tratado com óleo de peixe em relação a salina, efeito este não observado entre os animais não infartados (Tabela 9). A região cardíaca afetada pela isquemia diminui ou perde os movimentos contráteis (áreas hipocinéticas e acinéticas, respectivamente), ou seja, a velocidade com que as fibras musculares encurtam diminui. Segundo Fayssoil (2009) a Vcf é o parâmetro que melhor indica a função contrátil do miocárdio, pois este é menos afetado por alterações hemodinâmicas. No presente estudo foi constatada menor área de infarto no grupo pré-tratado com óleo de peixe em relação aos animais que receberam salina (Figura 15). Este resultado está em concordância com o valor aumentado da Vcf observado no grupo óleo de peixe.

O tratamento prévio com óleo de peixe modificou a composição lipídica do coração e isso provocou alterações moleculares, metabólicas e funcionais no coração que conferiram menor área de infarto, função cardíaca preservada e aumento do fluxo coronariano. Estas alterações causadas pelo óleo de peixe caracterizam um estado de pré-condicionamento que confere proteção do miocárdio à injúria isquêmica.

7 SÍNTESE DOS RESULTADOS

Os principais achados foram: 1) a suplementação com óleo de peixe conferiu cardioproteção, como indicado pela menor área de infarto observado 24 horas após a indução do infarto em ratos; 2) o óleo de peixe diminuiu a razão n-6/n-3 no ventrículo esquerdo; 3) o óleo de peixe preveniu o aumento nas concentrações plasmáticas de TG e VLDL-C causado pelo infarto e elevou a concentração de HDL-C; 4) os óleos de peixe e de soja não reverteram o acúmulo de AGL ou TG no ventrículo esquerdo e fígado dos ratos infartados; 5) a extensão da área de infarto não foi acompanhada de alterações no processo inflamatório, visto que, a área de infarto no grupo suplementado com óleo de soja não alterou em relação ao controle mesmo apresentando processo inflamatório mais intenso, no grupo suplementado com óleo de peixe, a área de infarto foi menor sem diminuição da inflamação; 6) o aumento no conteúdo de ATP no ventrículo esquerdo acompanhou à cardioproteção conferida pelo óleo de peixe e isso ocorreu mesmo antes da indução do infarto (pré-condicionamento) mantendo o tecido viável durante a isquemia cardíaca; 7) A suplementação com óleo de peixe aumentou o conteúdo de mRNA de genes relacionados ao metabolismo (GLUT-1), defesa à isquemia (HIF-1) e produção de NO (eNOS e iNOS) no VE de animais infartados; 8) óleo de peixe preveniu a redução do fluxo sanguíneo nas coronárias após a indução do IAM; 9) a suplementação com óleo de peixe reduziu a queda da fração de ejeção, fração de encurtamento e a velocidade de encurtamento circunferencial dos cardiomiócitos causada pelo infarto agudo do miocárdio.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho concluímos que a suplementação com óleo de peixe durante 20 dias confere alterações metabólicas e de fluxo coronariano no ventrículo esquerdo que associa-se com menor área de infarto e melhora na função sistólica 24h após a indução do infarto.

REFERENCIAS*

Abdukeyum GG, Owen AJ, McLennan PL. Dietary (n-3) long-chain polyunsaturated fatty acids inhibit ischemia and reperfusion arrhythmias and infarction in rat heart not enhanced by ischemic preconditioning. *J Nutr*. 2008 Oct;138(10):1902-9.

Abeywardena MY, Patten GS. Role of ω 3 long chain polyunsaturated fatty acids in reducing cardio-metabolic risk factors. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011 Sep 1;11(3):232-46.

Abozguia K, Nallur Shivu G, Ahmed I, Phan TT, Frenneaux MP. The heart metabolism: pathophysiological aspects in ischaemia and heart failure. *Curr Pharm Des*. 2009;15(8):827-35.

Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem*. 2010 Sep;21(9):781-92.

Akbar M, Kim HY, "Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway." *Journal of Neurochemistry*. 2002 Aug;82(3):655-65.

Allain CC, Poon LS, Chan CS, Richmond W, Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin Chem*. 1974 Apr;20(4):470-5.

Alp PR, Newsholme EA, Zammit VA. Activities of citrate synthase and NAD⁺-linked and NADP⁺-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J*. 1976 Mar;154(3):689-700.

Amador E, Dorfman LE, Wacker WE. Serum lactic dehydrogenase activity: an analytical assessment of current assays. *Clin Chem*. 1963 Aug;12:391-9.

Anzai T. Post-Infarction inflammation and left ventricular remodeling. *Circ J*. 2013; 77(3):580-7.

Balakumar P, Taneja G. Fish oil and vascular endothelial protection: Bench to bedside. *Free Radic Biol Med*. 2012 Jul;53(2):271-9.

Balligand J, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Jan 1;90(1):347-51.

Bang HO, Dyerberg J, Hjorne N. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Med Scand*. 1976;200(1-2):69-73.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Barceló-Coblijn G, Collison LW, Jolly CA, Murphy EJ. Dietary alpha-linolenic acid increases brain but not heart and liver docosahexaenoic acid levels. *Lipids*. 2005 Aug;40(8):787-98.

Barringer TA. Do omega-3 Fatty acids have a role in prevention of cardiovascular disease? *Front Physiol*. 2012 Oct 5;3:395.

Barth JH, Jackson BM, Farrin AJ, Efthymiou M, Worthy G, Copeland J, Bailey KM, Romaine SPR, Balmforth AJ, McCormack T, Whitehead A, Flather MD, Nixon J, Hall AS. Change in serum lipids after acute coronary syndromes: secondary analysis of SPACE ROCKET study data and a comparative literature review. *Clin Chem*. 2010 Oct;56(10):1592-98.

Bilheimer DW, Buja M, Parkey RW, Bonte FJ, Willerson JT. Fatty acid accumulation and abnormal lipid deposition in peripheral and border zones of experimental myocardial infarcts. *J Nucl Med*. 1978 Mar;19(3):276-83.

Blanchard H, Pédrone F, Boulier-Monthéan N, Catheline D, Rioux V, Legrand P. Comparative effects of well-balanced diets enriched in α -linolenic or linoleic acids on LC-PUFA metabolism in rat tissues. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2013 May;88(5):383-9.

Borsonelo EC, Vieira L, Galduróz JCF. The influence of the polyunsaturated fatty acids on body weight and anxiolytic-like behavior in female rats. *Nutr Neurosci*. 2013 Jan;16(1):2-5.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation methods. *Enzymol*. 1978;52:302 - 10.

Burr GO, Burr MM. Nutrition classics from *The Journal of Biological Chemistry* 82:345-67, 1929. A new deficiency disease produced by the rigid exclusion of fat from the diet. *Nutr Rev*. 1973 Aug;31(8):248-9.

Burdge GC, Calder PC. Conversion of α -linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev*. 2005 Sep-Oct;45(5):581- 97.

Burkard N, Williams T, Czolbe M, Blömer N, Panther F, Link M, Fraccarollo D, Widder JD, Hu K, Han H, Hofmann U, Frantz S, Nordbeck P, Bulla J, Schuh K, Ritter O. Conditional over expression of neuronal nitric oxide synthase is cardioprotective in Ischemia/Reperfusion. *Circulation*. 2010 Oct;122(16):1588- 603.

Cai Z, Luo W, Zhan H, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Oct 22;110(43):17462-7.

Calder PC, Dangour AD, Diekman C, Eilander A, Koletzko B, Meijer GW, Mozaffarian D, Niinikoski H, Osendarp SJ, Pietinen P, Schuit J, Uauy R. Essential fats for future health. *Proceedings of the 9th Unilever Nutrition Symposium*. *Eur J Clin Nutr*. 2010 Dec;64(4):S1-13.

Calder PC. n-3 fatty acid, inflammation and immunity new mechanisms to explain old actions. *Proc Nutr Soc*. 2013 Aug;72(3):326-36.

Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. *Nutrients*. 2010 Mar; 2(3):355-74.

Cleutjens JP, Kandala JC, Guarda E, Guntaka RV, Weber KT. Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1995a Jun; 27(6):1281-92.

Cleutjens JP, Verluyten MJA, Smits JFM, Daemen MJAP. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J of Pathol*. 1995b Aug; 147(2): 325-38.

Colucci WS, Braunwald E. Fisiopatologia da insuficiência cardíaca. In: Braunwald E, Zipes DP, Libby P. *Tratado de medicina cardiovascular*. 6ª edição. São Paulo: Roca; 2003. v. 1, p. 506-38.

Culp BR, Lands WE, Lucches BR, Pitt B, Romson J. The effect of dietary supplementation of fish oil on experimental myocardial infarction. *Prostaglandins*. 1980 Dec;20(6):1021-31.

Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK. Procópio, J (editores). *Entendendo a gordura: os ácidos graxos*. Manole, São Paulo, 2002. Capítulo Estrutura química e classificação dos ácidos graxos (Fabiana Graziola, Victor Sotero Solis e Rui Curi).

De Felice A, Frering R, Horan P. Time course of hemodynamic changes in rats with healed severe myocardial infarction. *Am J Physiol*. 1989 Jul;257:H289-96.

De La Fuente RN, Rodrigues B, Moraes-Silva IC, Souza LE, Sirvente R, Mostarda C, De Angelis K, Soares PP, Lacchini S, Consolim-Colombo F, Irigoyen MC. Cholinergic stimulation with pyridostigmine improves autonomic function in infarcted rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013 Sep;40(9):610-6.

Doenst T, Guthrie PH, Chemnitius JM, Zech R, Taegtmeyer H. Fasting, lactate and insulin improve ischemia tolerance: a comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol*. 1996 May;270:H1607-15.

Dolecek TA. Epidemiological evidence of relationships between dietary polyunsaturated fatty acids and mortality in the multiple risk factor intervention trial. *Proc Soc Exp Bio Med*. 1992 Jun;200(2):177-82.

Dorn GW 2nd, Diwan A. The rationale for cardiomyocyte resuscitation in myocardial salvage. *J Mol Med*. 2008 Oct;86(10):1085-95.

Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med*. 1993 Oct;15(4):353-63.

Dyerberg J, Bang HO, Hjerne N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Clin Nutr*. 1975 Sep;28(9):958-66.

Ebbert JO, Jensen MD. Fat depots, free fatty acids, and dyslipidemia. *Nutrients*. 2013 Feb 7;5(2):498-508.

Engel PC, Jones JB. Causes and elimination of erratic blanks in enzymatic metabolite assays involving the use of NAD⁺ in alkaline hydrazine buffers: improved conditions for the assays of L-glutamate, L-lactate, and other metabolites. *Anal Biochem*. 1978 Aug 1;88(2):475-84.

Eslick GD, Howe PR, Smith C, Priest R, Bensoussan A. Benefits of fish oil supplementation in hyperlipidemia: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cardiol*. 2009 Jul 24;136(1):4-16.

Fawcett JK, Scott JE. A rapid and precise method for the determination of urea. *J Clin Pathol*. 1960 Mar;13:156-9.

Fayssoil A. Which application for systolic wall stress and circumferential fiber velocity shortening in echocardiography in the tissue Doppler imaging era? *Int J Cardiol*. 2010 Oct;144(2):252-3.

Ferreira R. Redução do tamanho do enfarte – Quarenta anos de investigação. *Rev Port Cardiol*. 2010;29(7-8):1037-53.

Ferrier GR, Redundo I, Zhu J, Murphy MG. Differential effects of docosahexaenoic acid on contractions and L-type Ca²⁺ current in adult cardiac myocytes. *Cardiovasc Res*. 2002;54:601–10.

Fillmore N, Lopaschuk GD. Targeting mitochondrial oxidative metabolism as an approach to treat heart failure. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Apr;1833(4):857-65.

Fleet WF, Johnson TA, Graebner CA, Gettes LS. Effect of serial brief ischemic episodes on extracellular K⁺, pH, and activation in the pig. *Circulation*. 1985 Oct;72(4):922-32.

Fosshaug LE, Berge RK, Beitnes JO, Berge K, Vik H, Aukrust P, Gullestad L, Vinge LE, Øie E. Krill oil attenuates left ventricular dilatation after myocardial infarction in rats. *Lipids Health Dis*. 2011 Dec 29;10:245.

Frangogiannis NG. The mechanistic basis of infarct healing. *Antioxid Redox Signal*. 2006 Nov-Dec;8(11-12):1907-39.

Frangogiannis NG. The immune system and the remodeling infarcted heart: cell biological insights and therapeutic opportunities. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2013 Sep 25.

Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*. 1972 Jun;18(6):499-502.

Gao JY, Yasuda S, Tsuburaya R, Ito Y, Shioto T, Hao K, Aizawa K, Kikuchi Y, Ito K, Shimokawa H. Long-term treatment with eicosapentaenoic acid ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in pigs in vivo. -Involvement of Rho-kinase pathway inhibition. *Circ J*. 2011;75(8):1843-51.

Goldbarg JA, Friedman OM, Pineda EP, Smith EE, Chatterji R, Stein EH, Rutenburg AM. The colorimetric determination of gamma-glutamyl transpeptidase with a synthetic substrate. *Arch Biochem Biophys*. 1960 Nov;91:61-70.

Graziosi P. Análise ecocardiográfica da estrutura e da função sistólica ventricular esquerda na hipertensão arterial. *HiperAtivo*. 1998a;3:161-74.

Graziosi P. Análise ecocardiográfica da função diastólica do ventrículo esquerdo na hipertensão arterial. *HiperAtivo*. 1998b;3:175-88.

Guillou H, Zadavec D, Martin PGP, Jacobsson A. The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Progr Lipid Res*. 2010 Apr;49(2):186-99.

Hakkinen JP, Miller MW, Smith AH, Knight DR. Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat. *Cardiovasc Res*. 1995 Jan;29(1):74-9.

Hall JCE, Priestley JV, Perry VH, Michael-Titus AT. Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, reduces the early inflammatory response following compression spinal cord injury in the rat. *J Neurochem*. 2012;121:738–750.

Harris WS, Lu G, Rambjør GS, Wålen AI, Ontko JA, Cheng Q, Windsor SL. Influence of n-3 fatty acid supplementation on the endogenous activities of plasma lipases. *Am J Clin Nutr*. 1997 Aug;66(2):254-60.

Harris WS, Mozaffarian D, Lefevre M, Toner CD, Colombo J, Cunnane SC, Holden JM, Klurfeld, DM, Morris MC, Whelan J. Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *J Nutr*. 2009 Apr;139(4):804S-19.

Hausenloy DJ, Baxter G, Bell R, Bøtker HE, Davidson SM, Downey J, Heusch G, Kitakaze M, Lecour S, Mentzer R, Mocanu MM, Ovize M, Schulz R, Shannon R, Walker M, Walkinshaw G, Yellon DM. Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol*. 2010 Nov;105(6):677-86.

Hearse DJ. Ischaemia, reperfusion and cardioprotection: successes and failures in the journey from molecule to man. *Eur Heart J Supplements*. 2001;3:C11-21.

Hearse DJ. Myocardial protection during ischemia and reperfusion. *Mol Cell Biochem*. 1998;186:177-84.

Heimburger RF. Injection into pericardial sac and ligation of coronary artery of the rat. *Arch Surg*. 1946;52:677-89.

Hennig B, Toborek M, Joshi-Barve S, Barger SW, Barve S, Mattson MP, McClain CJ. Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and induces NF-kappa B-dependent transcription in cultured endothelial cells. *Am J Clin Nutr*. 1996 Mar;63(3):322-8.

Hirasawa A, Tsumaya K, Awaji T, Katsuma S, Adachi T, Yamada M, Sugimoto Y, Miyazaki S, Tsujimoto G. Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120. *Nat Med*. 2005 Jan;11(1):90-4.

Hochachka PW, Buck LT, Doll CJ, Land SC. Unifying theory of hypoxia tolerance: Molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc Natl Acad Sci* 1996 Sep;93(18):9493-8.

Hock CE, Beck LD, Bodine RC, Reibel DK. Influence of dietary n-3 fatty acids on myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1990 Nov;259: H1518-26.

Holman RT. The slow discovery of the importance of omega 3 essential fatty acids in human health. *J Nutr*. 1998 Feb;128(2):427S-33S.

Horowitz JD, Chirkov YY, Kennedy JA, Sverdlov AL. Modulation of myocardial metabolism: an emerging therapeutic principle. *Current Opinion in Cardiology*. 2010 Jul;25(4):329–34.

Hoy SM, Keating GM. Omega-3 ethylester concentrate: a review of its use in secondary prevention post-myocardial infarction and the treatment of hypertriglyceridaemia. *Drugs* 2009 May;69 (8):1077-105.

Huss JM, Levy FH, Kelly DP. Hypoxia inhibits the peroxisome proliferator-activated receptor α /retinoid X receptor gene regulatory pathway in cardiac myocytes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(29):27605–12.

Hutter MM, Sievers RE, Barbosa V, Wolfe CL. Heat-shock protein induction in rat hearts. A direct correlation between the amount of heat-shock protein induced and the degree of myocardial protection. *Circulation*. 1994 Jan;89(1):355-60.

Igarashi M, Ma K, Chang L, Bell JM, Rapoport SI. Rat heart cannot synthesize docosahexaenoic acid from circulating α -linolenic acid because it lacks elongase-2. *Journal of Lipid Research*. 2008 Aug;49(8):1735-45.

Innis SM. Essential fatty acids in growth and development. *Prog Lipid Res*. 1991;30(1):39-103.

Jaffé MZ. *Physiol Chem*. 1886;10:391.

Jennings RB, Sebbag L, Schwartz LM, et al. Metabolism of preconditioned myocardium: effect of loss and reinstatement of cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*. 2001 Sep;33(9):1571-88.

Kannel WB, Cupples LA, D'Agostino RB. Sudden death risk in overt coronary heart disease: the Framingham Study. *Am Heart J*. 1987 Mar;113(3):799-804.

Karmen A. A note on the spectrometric assay of glutamic-oxalacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest*. 1955 Jan;34(1):131-3.

Kempf T, Zarbock A, Vestweber D, Wollert KC. Anti-inflammatory mechanisms and therapeutic opportunities in myocardial infarct healing. *J Mol Med*. 2012 Apr; 90(4):361-9.

Kepler D, Decker K. Glycogen Determination with Amyloglucosidase. In: Bergmeyer HU, editor. *Methods of Enzymatic Analyses*. 4th ed. Weinheim; Verlag Chemie; 1974. vol 3, p. 1127-31.

Khoynezhad A, Jalali Z, Tortolani AJ. Apoptosis: pathophysiology and therapeutic implications for the cardiac surgeon. *Ann Thorac Surg* 2004 Sep;78(3):1109 -18.

Kinsella JE, Lokesh B, Broughton S, Whelan J. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. *Nutrition*. 1990 Jan-Feb;6(1):24-44.

Kleinfeld AM, Prothro D, Brown DL, Davis RC, Richieri GV, Demaria A. Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. *Am J Cardiol*. 1996 Dec;78(12):1350- 4.

Kloner RA, Longrace LS. State of the science of cardioprotection. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Pherapeutics*. 2011 Sep-Dec;16(3-4);223-32.

Kromhout, D., Bosschieter, E. B., and de Lezenne Coulander, C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med*. 1985 May;312(19):1205–9.

Lagerstrom CF, Walker WE, Taegtmeyer H. Failure of glycogen depletion to improve left ventricular function of the rabbit heart after hypothermic ischemic arrest. *Circ Res*. 1988 Jul;63(1):81-6.

Lands WEM, Libelt B, Morris A, Kramer NC, Prewitt TE, Bowen P, Schmeisser D, Davidson MH, Burns JH. Maintenance of lower proportions of (n-6) eicosanoid precursors in phospholipids of human plasma in response to added dietary (n-3) fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1992 Dec 10;1180(2):147-62.

Leroy C, Tricot S, Lacour B, Grynberg A. Protective effect of eicosapentaenoic acid on palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov-Dec;1781(11-12):685-93.

Li Q, Zhang Q, Wang M, Zhao S, Ma J, Luo N, Li N, Li Y, Xu G, Li J. Eicosapentaenoic acid modifies lipid composition in caveolae and induces translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Biochimie*. 2007 Jan;89(1):169-77.

Li RC, Ping P, Zhang J, Wead WB, Cao X, Gao J, Zheng Y, Huang S, Han J, Bolli R. PKCepsilon modulates NF-kappaB and AP-1 via mitogen-activated protein kinases in adult rabbit cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Oct;279(4):H1679-89.

Liou YA, King DJ, Zibrik D, Innis SM. Decreasing linoleic acid with constant α -linolenic acid in dietary fats increases (n-3) eicosapentaenoic acid in plasma phospholipids in healthy men. *J Nutr*. 2007 Apr;137(4):945-52.

Liou YM; Chang JCH. Differential pH Effect on Calcium-Induced Conformational Changes of Cardiac Troponin C Complexed with Cardiac and Fast Skeletal Isoforms of Troponin I and Troponin T. *J Biochem*. 2004;136:683–92.

Liu SQ, Tefft BJ, Zhang D, Roberts D, Schuster DJ, Wu A. Cardioprotective mechanisms activated in response to myocardial ischemia. *Mol Cell Biomech*. 2011 Dec;8(4):319-38.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.

López D, Orta X, Casós K, Sáiz MP, Puig-Parellada P, Farriol M, Mitjavila MT. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase in rat aorta after ingestion of fish oil-rich diet. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 Aug;287(2):H567-72.

Lüscher TF, Yang ZH, Diederich D, Bühler FR. Endothelium-derived vasoactive substances: potential role in hypertension, atherosclerosis, and vascular occlusion. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1989;14(6):S63-9.

Maki KC, McKenney JM, Reeves MS, Lubin BC, Dicklin MR. Effects of adding prescription omega-3 acid ethyl esters to simvastatin (20 mg/day) on lipids and lipoprotein particles in men and women with mixed dyslipidemia. *Am J Cardiol*. 2008 Aug 15;102(4):429-33.

Malfitano C, Loureiro TCA, Rodrigues B, Sirvente R, Salemi VMC, Rabechi NB, Lacchini S, Curi R, Irigoyen MCC. Hyperglycaemia protects the heart after myocardial infarction: aspects of programmed cell survival and cell death. *Eur J Heart Fail*. 2010 Jul;12(7):659–67.

Mansour TE. Studies on heart phosphofructokinase. Active and inactive forms of the enzyme. *J Biol Chem*. 1965 May;240:2165-72.

Mantzioris E, James MJ, Gibson RA, Cleland LG. Dietary substitution with an α -linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations in tissues. *Am J Clin Nutr*. 1994 Jun;59(6):1304-9.

Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J Jr, Braunwald E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation*. 1971 Jan;43(1):67-82.

Martinek RG. Spectrophotometric determination of abnormal hemoglobina pigments in blood. *Clin Chim Acta*. 1965 Feb;11:146-58.

Mather A. Reliability of bilirubin determinations in icterus of the newborn infant. *Pediatrics*. 1960 Sep;26:350-4.

Myerburg RJ, Castellanos A. Cardiac arrest and sudden death. In: Braunwald E, editor. *Textbook of cardiovascular medicine*. 6th ed. Philadelphia: W.B.Saunders; 2001. p. 890-923.

McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR, Zak B. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem*. 1983 Mar;29(3):538-42.

McGuinness J, Neilan TG, Sharkasi A, Bouchier-Hayes D, Redmond JM. Myocardial protection using an omega-3 fatty acid infusion: quantification and mechanism of action. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Jul;132(1):72-9.

McLennan PL, Abeywardena MY. Membrane basis for fish oil effects on the heart: linking natural hibernators to prevention of human sudden cardiac death. *J Membrane Biol*. 2005 Jul;206(2):85–102.

McLennan PL, Owen AJ, Slee EL, Theiss ML. Myocardial function, ischaemia and n-3 polyunsaturated fatty acids: a membrane basis. *J Cardiovasc Med*. 2007 Sep;8(1):S15-8.

Miyasaka CK, Mendonça JR, Nishiyama A, de Souza JA, Pires de Melo M, Pithon-Curi TC, Curi R. Comparative effects of fish oil given by gavage and fish oil-enriched diet on leukocytes. *Life Sci*. 2001 Aug 31;69(15):1739-51.

Mizuguchi K, Yano T, Tanaka Y, Ishibashi M, Masada A, Mizota M, Fukutake K, Saito Y. Mechanism of the lipid-lowering effect of ethyl all-cis-5,8,11,14,17-icosapentaenoate. *European Journal of Pharmacology*. 1993 Jan 26;231(1):121-7.

Mostarda C, Rodrigues B, Vane M, Moreira ED, Rosa KT, Moraes-Silva IC, Lacchini S, Casarini DE, De Angelis K, Irigoyen MC. Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodeling and Mortality. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010; Apr;37(4):447-52.

Mostarda C, Rogow A, Silva IC, De La Fuente RN, Jorge L, Rodrigues B, Heeren MV, Caldini EG, De Angelis K, Irigoyen MC. Benefits of exercise training in diabetic rats persist after three weeks of detraining. *Auton Neurosci*. 2009 Jan 28;145(1-2):11-6.

Mozaffarian D, Wu JHY. (n-3) Fatty acids and cardiovascular health: are effects of EPA and DHA shared or complementary? *J Nutr*. 2012 Mar;142(3):614S–25S.

Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG. “Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress.” *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Jun 1;101(22):8491-6.

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986 Nov;74(5):1124-36.

Nasa Y, Sakamoto Y, Sanbe A, Sasaki H, Yamaguchi F, Takeo S. Changes in fatty acid compositions of myocardial lipids in rats with heart failure following myocardial infarction. *Mol Cell Biochem*. 1997 Nov;176(1-2):179-89.

Nielsen S, Karpe F. Determinants of VLDL-triglycerides production. *Curr Opin Lipidol*. 2012 Aug;23(4):321-6.

Ogita H, Node K, Asanuma H, Sanada S, Takashima S, Minamino T, Soma M, Kim J, Hori M, Kitakaze M. Eicosapentaenoic acid reduces myocardial injury induced by

ischemia and reperfusion in rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003 Jun;41(6):964-9.

Oh DY, Talukdar S, Bae EJ, Imamura T, Morinaga H, Fan WG, Li P, Lu WJ, Watkins SM, Olefsky JM. GPR120 is an omega-3 fatty acid receptor mediating potent anti-inflammatory and insulin-sensitizing effects. *Cell*. 2010 Sep;142(5):687-8.

Okuda Y, Kawashima K, Sawada T, Tsurumaru K, Asano M, Suzuki S, Soma M, Nakajima T, Yamashita K. Eicosapentaenoic acid enhances nitric oxide production by cultured human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Mar 17;232(2):487-91.

Omura M, Kobayashi S, Mizukami Y, Mogami K, Todoroki-Ikedab N, Miyake T, Matsuzakia M. Eicosapentaenoic acid (EPA) induces Ca^{2+} -independent activation and translocation of endothelial nitric oxide synthase and endothelium-dependent vasorelaxation. *Letters*. 2001 Jan 5;487(3):361-6.

Ortiz-Pérez JT, Meyers SN, Lee DC, Kansal P, Klocke FJ, Holly TA, Davidson CJ, Bonow RO, Wu E. Angiographic estimates of myocardium at risk during acute myocardial infarction: validation study using cardiac magnetic resonance imaging. *Eur Heart J*. 2007 Jul;28(14):1750-8.

Oskarsson HJ, Godwin J, Gunnar RM, Thomas JX. Dietary fish oil supplementation reduces myocardial infarct size in a canine model of ischemia and reperfusion. *J Am Coll Cardiol*. 1993 Apr;21(5):1280-5.

Otsuji S, Shibata N, Hirota H, Akagami H, Wada A. Highly purified eicosapentaenoic acid attenuates tissue damage in experimental myocardial infarction. *Jpn Circ J*. 1993 Apr;57(4):335-43.

Park Y, Jones PG, Harris WS. Triacylglycerol-rich lipoprotein margination: a potential surrogate for whole-body lipoprotein lipase activity and effects of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. *Am J Clin Nutr*. 2004 Jul;80(1):45-50.

Pereira JC, Barreto SM, Passos VMA. Perfil de risco cardiovascular e autoavaliação da saúde no Brasil: estudo de base populacional. *Rev Panam Salud Publica*. 2009 Jun;25(6):491-8.

Perman JC, Boström P, Lindbom M, Lidberg U, Ståhlman M, Hägg D, Lindskog H, Täng MS, Omerovic E, Hultén LM, Jeppsson A, Petursson P, Herlitz J, Olivecrona G, Strickland DK, Ekroos K, Olofsson S, Borén J. The VLDL receptor promotes lipotoxicity and increases mortality in mice following an acute myocardial infarction. *Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2625-40.

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. 1979 Apr;44(4):503-12.

Piek JJ, Becker AE. Collateral Blood Supply to the Myocardium at Risk in Human Myocardial Infarction: A Quantitative Postmortem Assessment. *J Am Coll Cardiol*. 1988 Jun;1(6):1290-6.

Pompéia C, Lopes LR, Miyasaka CK, Procópio J, Sannomiya P, Curi R. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz J Med Biol Res.* 2000 Nov;33(11):1255-68.

Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, Whittaker P. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning. *J Am Coll Cardiol.* 2008 Apr 8;51(14):1393-8.

Reimer KA, Jennings RB. The "wavefront phenomenon" of myocardial ischemic cell death. II. Transmural progression of necrosis within the framework of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest.* 1979 Jun;40(6):633-44.

Rett BS, Whelan J. Increasing dietary linoleic acid does not increase tissue arachidonic acid content in adults consuming Western-type diets: a systematic review. *Nutr Metab.* 2011 Jun;8:36.

Rodrigues B, Jorge L, Mostarda CT, Rosa KT, Medeiros A, Malfitano C, de Souza AL Jr, Viegas KA, Lacchini S, Curi R, Brum PC, De Angelis K, Irigoyen MC. Aerobic exercise training delays cardiac dysfunction and improves autonomic control of circulation in diabetic rats undergoing myocardial infarction. *J Card Fail.* 2012 Sep;18(9):734-44.

Rodrigues HR, Vinolo MAR, Magdalon J, Fujiwara H, Cavalcanti DMH, Farsky SHP, Calder PC, Hatanaka R, Curi R. Dietary free oleic and linoleic acid enhances neutrophil function and modulates the inflammatory response in rats. *Lipids.* 2010 Sep;45(9):809–19.

Rodriguez BL, Sharp DS, Abbott RD, Burchfiel CM, Masaki K, Chyou PH et al. Fish intake may limit the increase in risk of coronary heart disease morbidity and mortality among heavy smokers. The Honolulu heart program. *Circulation.* 1996 Sep 1;94(5):952–6.

Rosenson RS. Myocardial injury: the acute phase response and lipoprotein metabolism. *J Am Coll Cardiol.* 1993 Sep;22(3):933-40.

Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R, "Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress induced apoptosis of retina photoreceptors." *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003 May;44(5):2252–9.

Rousseau D, Héliès-Toussaint C, Moreau D, Raederstorff D, Grynberg A. Dietary n-3 PUFAs affect the blood pressure rise and cardiac impairments in a hyperinsulinemia rat model in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Sep;285(3):H1294–H302.

Ruf T, Arnold W. Effects of polyunsaturated fatty acids on hibernation and torpor: a review and hypothesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008 Mar;294(3):R1044–R52.

Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: From biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochemical Pharmacology.* 2009 Mar 15;77(6):937-46.

Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011;301:H1723–H41.

Sanders TAB, Younger KM. The effect of dietary supplements of ω -3 polyunsaturated fatty acids on the fatty acid composition of platelets and plasma choline phosphoglycerides. *Br J Nutr*. 1981 May;45(3):613.

Santos AA, Helber I, Flumignan RL, Antonio EL, Carvalho AC, Paola AA, Tucci PJ, Moises VA. Doppler echocardiographic predictors of mortality in female rats after myocardial infarction. *J Card Fail*. 2009 Mar;15(2):163-8

Schaefer S, Ramasamy R. Glycogen utilization and ischemic injury in the isolated rat heart. *Cardiovas Res*. 1997 Jul;35(1):90-8.

Schaffer SW, Croft CB, Solodushko V. Cardioprotective effect of chronic hyperglycemia: effect on hypoxia-induced apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Jun;278(6):H1948–H54.

Schneider CA, Taegtmeyer H. Fasting in vivo delays myocardial cell damage after brief periods of ischemia in the isolated working rat heart. *Circ Res*. 1991 Apr;60(4):1045- 50.

Scheur J, Stezoski SW. Protective role of increased myocardial glycogen stores in cardiac anoxia in the rat. *Circ Res*. 1970 Nov;27(5):835-49.

Schmitz G, Ecker J. The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Prog Lipid Res*. 2008 Mar;47(2):147–55.

Serteser M, Koken T, Kahraman A, Yilmaz K, Akbulut G, Dilek ON. Changes in hepatic TNF- α levels, antioxidant status, and oxidation products after renal ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res*. 2002 Oct;107(2):234-40.

Shearer GC, Chen J, Chen Y, Harris WS. Myocardial infarction does not affect fatty-acid profiles in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009 Nov-Dec;81(5-6):411-6.

Skyschally A, van Caster P, Boengler K, Gres P, Musiolik J, Schilawa D, Schulz R, Heusch G. Ischemic postconditioning in pigs: no causal role for RISK activation. *Circ Res*. 2009 Jan 2;104(1):15-8.

Soares PR, de Albuquerque CP, Chacko VP, Gerstenblith G, Weiss RG. Role of preischemic glycogen depletion in the improvement of postischemic metabolic and contractile recovery of ischemiapreconditioned rat hearts. *Circulation*. 1997 Aug;96(3):975-83.

Stalenhoef AF, de Graaf J, Wittekoek ME, Bredie SJ, Demacker PN, Kastelein JJ. The effect of concentrated n-3 fatty acids versus gemfibrozil on plasma lipoproteins, low density lipoprotein heterogeneity and oxidizability in patients with hypertriglyceridemia. *Atherosclerosis*. 2000 Nov;153(1):129-38.

Sun Y. Myocardial repair/remodelling following infarction: roles of local factors. *Cardiovas Res*. 2009 Feb 15;81(3):482-90.

Swynghedauw B. Phenotypic plasticity of adult myocardium: molecular mechanisms. *J Exp Biol*. 2006 Jun;209(12):2320-7.

Taegtmeyer H. Gycogen in the heart – an expanded view. *J Mol Cell Cardiol*. 2004 Jul;37(1):7-10.

Tanzer ML, Gilvarg C. Creatine and creatine kinase measurement. *J Biol Chem*. 1959 Dec;234:3201-4.

Timerman A, Feitosa GA. Síndromes coronárias agudas. Rio de Janeiro: Atheneu; 2003.

Trinder P. Determination of blood glucose using an oxidaseperoxidase system with a non-carcinogenic chromogen. *J Clin Path*. 1969 Mar;22(2):158-61.

Tune JD, Gorman MW, Feigl EO. Matching coronary blood flow to myocardial oxygen consumption. *J Appl Physiol*. 2004;97:404-15.

Turner NA, Porter KE. Function and fate of myofibroblasts after myocardial infarction. *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2013 Mar 1;6(1):5.

Vijaya Padma V, Shyamala Devi CS, Ramkumar KM. Effect of fish oil pretreatment on isoproterenol-induced changes in myocardial membrane phospholipids. *Nutrition*. 2006 Nov-Dec;22(11-12):1171-6.

Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr*. 2003 May;89(5):679- 89.

Wan R, Ahmet I, Brown M, Cheng A, Kamimura N, Talan M, Mattson MP. Cardioprotective effect of intermittent fasting is associated with an elevation of adiponectin levels in rats. *J Nutr Biochem*. 2010;21:413–7.

Wei MY, Jacobson TA. Effects of eicosapentaenoic acid versus docosahexaenoic acid on serum lipids: a systematic review and meta-analysis. *Curr Atheroscler Rep*. 2011 Dec;13(6):474-83.

Weichselbaum TE. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am J Clin Pathol*. 1946 Mar;10:40-9.

WHO - World Health Organization (on line). Cardiovascular Disease and Control: Missed Opportunities. 2011. Available from:
http://www.who.int/cardiovascular_diseases/prevention_control/en/.

Windt LJ, Willems J, Roemen THM, Coumans WA, Reneman RS, Vusse GJV, Bilsen MV. Ischemic-reperfused isolated working mouse hearts: membrane damage and type IIA phospholipase A2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001 Jun;280(6):H2572–H80.

Wroblewski F, Ladue JS. Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac with hepatic disease. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956 Apr;91(4):569-71.

Xia Z, Vanhoutte PM. Nitric oxide and protection against cardiac ischemia. *Curr Pharm Des.* 2011;17(18):1774-82.

Xiao YF, Gomez AM, Morgan JP, Lederer WJ, Leaf A. Suppression of voltage-gated L-type Ca^{2+} currents by polyunsaturated fatty acids in adult and neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:4182–47.

Xu G, Takashi E, Kudo M, Ishiwata T, Naito Z. Contradictory effects of short- and long-term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway. *Exp Mol Pathol.* 2004 Feb;76(1):57-65.

Yanagisawa A, Lefer AM. Vasoactive effects of eicosapentaenoic acid on isolated vascular smooth muscle. *Basic Res Cardio.* 1987 Mar-Apr;182(2):186-96.

Yang X, Cohen MV, Downey JM. Mechanism of Cardioprotection by Early Ischemic Preconditioning. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2010 Jun;24(3):225-34.

Zeghichi-Hamri S, de Lorgeril M, Salen P, Chibane M, de Leiris J, Boucher F, Laporte F. Protective effect of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids on myocardial resistance to ischemia-reperfusion injury in rats. *Nutr Res.* 2010 Dec;30(12):849-57.

Zhu BQ, Sievers RE, Sun YP, Morse-Fisher N, Parmley WW, Wolfe CL. Is the reduction of myocardial infarct size by dietary fish oil the result of altered platelet function? *Am Heart J.* 1994 Apr;127:744-55.

Zornoff LAM, Paiva SAR, Minicucci MF, Spadaro J. Infarto do miocárdio experimental em ratos: análise do modelo. *Arq Bras Cardiol.* 2009 Oct;93(4):434-40.

APÊNDICE A – Composição de ácidos graxos no VE

Análise por cromatografia gasosa (CG) da composição de ácidos graxos do ventrículo esquerdo de ratos não infartados e infartados suplementados com salina, óleo de peixe ou óleo de soja.

Fórmula	Nome	Não Infartado			Infartado		
		Salina	Óleo de peixe	Óleo de soja	Salina	Óleo de peixe	Óleo de soja
14:0	Mirístico	0,005 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001	0,008 ± 0,002	0,005 ± 0,001	0,005 ± 0,001
15:0	Pentadecanóico	0,003 ± 0,000	0,003 ± 0,002	0,002 ± 0,001	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,000	0,003 ± 0,000
16:0	Palmitico	0,317 ± 0,056	0,289 ± 0,008	0,266 ± 0,008	0,319 ± 0,05	0,290 ± 0,039	0,320 ± 0,073
16:1 (n-7)	Palmitoleico	0,008 ± 0,004	0,007 ± 0,003	0,004 ± 0,003	0,009 ± 0,004	0,006 ± 0,001	0,014 ± 0,011
17:0	Margárico	0,014 ± 0,002	0,018 ± 0,005	0,011 ± 0,001	0,012 ± 0,002	0,011 ± 0,001	0,011 ± 0,002
17:1 (n-7)	Heptadecenóico	0,004 ± 0,001	0,005 ± 0,000	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,001	0,001 ± 0,001	0,002 ± 0,001
18:0	Estearico	0,513 ± 0,116	0,508 ± 0,038	0,513 ± 0,021	0,539 ± 0,095	0,492 ± 0,035	0,482 ± 0,031
18:1 (n-9)	Oleico	0,154 ± 0,059	0,118 ± 0,024	0,130 ± 0,002	0,176 ± 0,04	0,137 ± 0,029	0,264 ± 0,152
18:1 (n-7)	Vacênico	0,092 ± 0,021	0,070 ± 0,001	0,072 ± 0,002	0,074 ± 0,004	0,066 ± 0,004	0,072 ± 0,005
18:2 (n-6)	Linoleico	0,741 ± 0,154	0,596 ± 0,051	0,645 ± 0,054	0,606 ± 0,07	0,613 ± 0,085	0,645 ± 0,062
20:0	Eicosanóico	0,009 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,002	0,011 ± 0,005	0,008 ± 0,001	0,008 ± 0,001
20:1 (n-9)	Eicosenóico	0,003 ± 0,002	0,003 ± 0,001	0,003 ± 0,000	0,005 ± 0,001	0,004 ± 0,001	0,004 ± 0,001
18:3 (n-3)	α-Linolênico	0,014 ± 0,007	0,012 ± 0,001	0,012 ± 0,002	0,016 ± 0,002	0,012 ± 0,003	0,016 ± 0,003
18:4 (n-3)	Octadecatetraenóico	0,011 ± 0,002	0,010 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,021 ± 0,020	0,010 ± 0,003	0,011 ± 0,001
22:0	Docosanóico	0,009 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,009 ± 0,001	0,010 ± 0,004	0,008 ± 0,002	0,009 ± 0,001
20:3 (n-6)	Eicosatrienóico	0,009 ± 0,002	0,008 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,012 ± 0,011	0,009 ± 0,001	0,008 ± 0,001
20:4 (n-6)	Araquidônico	0,545 ± 0,115	0,406 ± 0,019	0,531 ± 0,028	0,503 ± 0,023	0,384 ± 0,036	0,439 ± 0,069
22:2 (n-6)	Docosadienóico	—	—	0,004 ± 0,004	—	—	0,003 ± 0,002
24:0	Lignocérico	—	—	0,007 ± 0,001	—	—	0,008 ± 0,001
20:5 (n-3)	Eicosapentaenóico	—	0,032 ± 0,006	—	—	0,019 ± 0,005	0,005 ± 0,005
22:4 (n-6)	Docosatetraenóico	0,037 ± 0,010	0,009 ± 0,001	0,031 ± 0,003	0,024 ± 0,026	0,008 ± 0,004	0,021 ± 0,013
22:5 (n-6)	Docosapentaenóico	0,030 ± 0,005	0,009 ± 0,001	0,022 ± 0,001	0,034 ± 0,006	0,010 ± 0,003	0,019 ± 0,006
22:5 (n-3)	Docosapentaenóico	0,044 ± 0,010	0,081 ± 0,013	0,043 ± 0,005	0,032 ± 0,003	0,083 ± 0,016	0,048 ± 0,009
22:6 (n-3)	Docosahexaenóico	0,177 ± 0,039	0,346 ± 0,040	0,182 ± 0,028	0,187 ± 0,011	0,299 ± 0,006	0,221 ± 0,038
Totais	Saturados	0,878 ± 0,175	0,845 ± 0,051	0,823 ± 0,016	0,902 ± 0,159	0,826 ± 0,077	0,861 ± 0,056
	Monoinsaturados	0,260 ± 0,077	0,202 ± 0,026	0,211 ± 0,023	0,264 ± 0,030	0,213 ± 0,035	0,356 ± 0,167
	Polinsaturados	1,608 ± 0,315	1,512 ± 0,110	1,488 ± 0,009	1,424 ± 0,100	1,447 ± 0,139	1,436 ± 0,095
	Σ AGPI n-3	0,246	0,481	0,247	0,256	0,423	0,301
	Σ AGPI n-6	2,11	1,02	1,24	1,78	1,02	1,135
	n6/n3	8,5	2,1	4,8	6,9	2,4	3,3

Os valores estão expressos como médias ± E.P.M. em gramas de ácidos graxos em relação a 100 g de ventrículo esquerdo. (n=5 por grupo).

Σ AGPI n-3 – somatória dos ácidos graxos ômega 3

Σ AGPI n-6 – somatória dos ácidos graxos ômega 6

[illegible][illegible]

Tabela A2c -Valores individuais das massas corpóreas (grama) de ratos não infartados suplementados durante 20 dias com óleo de soja

[illegible]

Tabela A4a- Valores individuais das atividades da creatina quinase (CK), lactato desidrogenase (LDH), aspartato transaminase (AST) e alanina transaminase (ALT) no plasma (U/L) de ratos não infartados e suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

Tabela A4a- Valores individuais das concentrações de glicose (mg/dL), albumina (g/dL) e bilirrubina (mg/dL) no plasma de ratos não infartados e suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S			OP			OS		
	Glicose	Albumina	Bilirrubina	Glicose	Albumina	Bilirrubina	Glicose	Albumina	Bilirrubina
	104	2,1	0,3	111	3,1	0,1	118	3,4	0,2
	133	2,9	0,2	113	3,6	0,2	102	4,2	0,3
	108	4,4	0,3	109	4,3	0,1	103	2,8	0,2
	118	1,1	0,2	100	2,6	0,2	99	3,4	0,2
	117	2,9		122	2	0,3	109	5	0,3
	115			123		0,2	106		0,2
	118			99		0,3	124		0,2
	120			121			118		0,1
	110			131			105		
				100			119		
				101					
				105					
				109					
				104					
Média	116	2,7	0,2	111	3,1	0,2	110,3	3,7	0,19
EPM	2,8	0,5	0	2,7	0,39	0	2,7	0,38	0,02
N	9	5	4	14	5	7	10	5	8

Tabela A5a- Valores individuais das concentrações de uréia e creatinina (mg/dL) no plasma de ratos não infartados e suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	Uréia	Creatinina	Uréia	Creatinina	Uréia	Creatinina
	34,6	0,54	35,3	0,68	25,3	0,8
	33,7	0,51	37,3	0,65	28,5	0,65
	31,6	0,4	40	0,77	42	0,56
	34	0,8	32,7	0,59	33,9	0,69
	40,6	0,63	34,8		35,8	0,618
Média	34,9	0,57	36	0,67	33	0,66
EPM	1,5	0,06	1,2	0,03	2,9	0,04
n	5	5	5	4	5	5

Tabela A6a- Valores individuais das concentrações de ácidos graxos livres (mM) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,172	0,25	0,172	0,43	0,135	0,32
	0,139	0,43	0,172	0,32	0,158	0,46
	0,253	0,2	0,167	0,5	0,217	0,25
	0,185	0,27	0,104	0,5	0,235	0,25
	0,153	0,48	0,22	0,36		0,59
		0,56				0,28
Média	0,180	0,365	0,167	0,422	0,186	0,358
EPM	0,020	0,059	0,018	0,036	0,024	0,056
N	5	6	5	5	4	6

Tabela A6b- Valores individuais das concentrações de colesterol total (mg/dL) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	40,6	57,5	29	58,5	29	54,3
	25,8	54,8	27,4	47,5	30,6	61,7
	35,3	57,5	31,6	52,7	31,1	55,9
	35,3	66	31,1	60,7	25,8	62,2
	41,1	68,5	32,7	52,7	54,3	49,5
		58,5		50,7		55,9
		71,2		25		
		50,7		36		
		54,8		41,1		
		45,21		40		
		47,3		36,4		
		48,5		52		
		30,3		36,4		
		49,7				
		36,8				
		43,6				
Média	35,6	52,6	30,4	45,4	34,2	56,6
EPM	2,8	2,7	1,0	2,9	5,1	1,9
n	5	16	5	13	5	6

Tabela A6c- Valores individuais das concentrações de colesterol em LDL (mg/dL) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	11,1	14,7	12,0	17,3	9,4	11,2
	12,8	11,2	11,1	13,8	9,4	13,8
	13,7	15,6	12,0	14,7	10,2	16,4
	12,0	14,7	10,3	14,7	6,0	15,6
	18,0	17,3	10,2	11,2	24,0	13,0
		15,6				13,8
Média	13,5	14,9	11,1	14,3	11,8	14,0
EPM	1,2	0,8	0,4	1,0	3,1	0,8
n	5	6	5	5	5	6

Tabela A6d -Valores individuais das concentrações de colesterol em HDL (mg/dL) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	11,5	11,5	10,0	17,2	8,6	8,6
	10,0	11,5	10,0	11,5	10,0	8,6
	5,7	10,0	8,6	23,0	8,6	15,7
	7,1	10,0	11,5	12,9	11,5	11,5
		11,5	7,2	15,8	15,7	12,8
						12,9
Média	8,6	10,9	9,5	16,1	10,9	11,7
EPM	1,3	0,4	0,7	2,0	1,3	1,1
n	4	5	5	5	5	6

Tabela A6e- Valores individuais das concentrações de triacilglicerol (mg/dL) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	38	55	20,7	42	14,9	73,5
	35	55	36,4	50	20,7	106
	46,3	51	44,6	45	32,2	68
	43	70,3	41,3	44	40,5	61
	56,2	127	28,1	58	81,8	65
		76		28		58
		45		42		113
		79		82		76
		79				26
						81
						69
Média	43,7	75,8	34,2	48,9	38,0	72,4
EPM	3,7	8,7	4,4	5,6	11,8	7,0
N	5	9	5	8	5	11

Tabela A6f- Valores individuais das concentrações de colesterol em VLDL (mg/dL) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	7,0	14,0	4,1	8,4	4,1	14,7
	9,3	29,0	7,3	10,0	6,4	21,2
	8,6	12,0	8,9	9,0	8,1	13,6
	11,2	11,0	8,3	8,8	16,4	12,2
	16,5	11,0	5,6	11,6	17,4	13,0
	12,7	10,0	13,5	5,6	12,7	11,6
	11,3	14,0	6,7	8,4	10,4	22,6
	15,4	25,0	8,0		9,6	15,2
	9,3	15,0	11,4		5,6	16,2
		9,0				13,8
		16,0				
		16,0				
Média	10,9	15,2	8,2	8,8	10,1	15,4
EPM	1,0	1,7	1,0	0,7	1,6	1,2
n	9	12	9	7	9	10

Tabela A7 -Valores individuais dos conteúdos de ácidos graxos obtidos por cromatografia gasosa (g/100g de tecido úmido) no ventrículo esquerdo de ratos não infartados (NI) e infartados (I)

	Ác. Palmítico		Ác. Estéárico		Ác. Oleico		Ác. Linoleico		Ác. Linolênico		Ác. Araquidônico		Ác. Eicosapentaenóico		Ác. Docosateranoico		Ác. Docosapentaenóico 16		Docosapentaenóico 13		Ác. docosanoico	
	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I	NI	I
	0,308	0,298	0,443	0,507	0,168	0,176	0,711	0,685	0,015	0,016	0,507	0,509	0	0	0,035	0,039	0,029	0,042	0,035	0,035	0,149	0,175
	0,323	0,322	0,447	0,51	0,226	0,213	0,779	0,642	0,024	0,019	0,47	0,511	0	0	0,038	0,003	0,027	0,026	0,037	0,032	0,157	0,182
	0,41	0,271	0,719	0,462	0,188	0,179	0,985	0,535	0,015	0,014	0,748	0,47	0	0	0,052	0,002	0,037	0,032	0,058	0,034	0,24	0,199
	0,27	0,387	0,469	0,677	0,091	0,136	0,589	0,561	0,007	0,016	0,481	0,522	0	0	0,025	0,053	0,024	0,035	0,049	0,028	0,19	0,193
	0,274		0,485		0,094		0,643		0,008		0,519				0,034		0,031		0,039		0,151	
Média	0,317	0,320	0,513	0,539	0,153	0,176	0,741	0,606	0,014	0,016	0,545	0,503	0,000	0,000	0,037	0,024	0,030	0,034	0,044	0,032	0,177	0,187
EPM	0,025	0,025	0,052	0,047	0,027	0,016	0,069	0,035	0,003	0,001	0,052	0,011	0,000	0,000	0,004	0,013	0,002	0,003	0,004	0,002	0,017	0,005
n	5	4	5	4	5	4	5	4	5	4	5	4	4	4	5	4	5	4	5	4	5	4

Tabela A8a- Valores individuais do conteúdo de ácido linoleico (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,711	0,685	0,557	0,549	0,594	0,714
	0,779	0,642	0,654	0,579	0,686	0,694
	0,985	0,535	0,578	0,71	0,619	0,601
	0,589	0,561	1,102	0,613	0,718	0,694
	0,643			0,85	0,608	0,585
						0,58
Média	0,741	0,606	0,723	0,660	0,645	0,645
EPM	0,069	0,035	0,128	0,055	0,024	0,025
n	5	4	4	5	5	6

Tabela A8b- Valores individuais do conteúdo de ácido diomo γ -linolênico (DGLA) (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,007	0,007	0,007	0,009	0,007	0,009
	0,009	0,008	0,009	0,008	0,008	0,008
	0,012	0,005	0,008	0,01	0,007	0,008
	0,009	0,028	0,012	0,009	0,008	0,008
	0,008			0,001	0,006	0,008
						0,01
Média	0,009	0,012	0,0072	0,0074	0,0072	0,0085
EPM	0,0008	0,0054	0,002	0,0016	0,0004	0,0003
n	5	4	4	5	5	6

Tabela A8c- Valores individuais do conteúdo de ácido araquidônico (AA) (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,507	0,509	0,405	0,347	0,549	0,467
	0,47	0,511	0,425	0,388	0,502	0,51
	0,748	0,47	0,387	0,418	0,552	0,499
	0,481	0,522	0,455	0,384	0,498	0,418
	0,519			0,036	0,553	0,324
						0,415
Média	0,545	0,503	0,418	0,3146	0,5308	0,4388
EPM	0,0515	0,0114	0,0146	0,0706	0,0126	0,0281
n	5	4	4	5	5	6

Tabela A8d- Valores individuais do conteúdo de docosatetraenóico (DTA n-6) (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,035	0,039	0,009	0,009	0,033	0,031
	0,038	0,003	0,01	0,011	0,031	0,034
	0,052	0,002	0,008	0,004	0,026	0,002
	0,025	0,053	0,016	0,008	0,033	0,029
	0,034			0,004	0,031	0,01
						0,019
Média	0,0368	0,0243	0,0108	0,0072	0,0308	0,0208
EPM	0,0044	0,0129	0,0018	0,0014	0,0013	0,0052
n	5	4	4	5	5	6

Tabela A8e- Valores individuais do conteúdo de ácido docosapentaenóico (DPA n-6) (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,029	0,042	0,01	0,008	0,022	0,023
	0,027	0,026	0,01	0,01	0,024	0,025
	0,037	0,032	0,008	0,013	0,023	0,024
	0,024	0,035	0,012	0,01	0,021	0,019
	0,031		0,009	0,003	0,021	0,009
						0,015
Média	0,0296	0,0338	0,0098	0,0088	0,0222	0,0192
EPM	0,0022	0,0033	0,0007	0,0017	0,0006	0,0025
n	5	4	5	5	5	6

Tabela A8f- Valores individuais do conteúdo de ácido linolênico (ALA n-3) (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,015	0,016	0,01	0,01	0,01	0,019
	0,024	0,019	0,013	0,012	0,015	0,017
	0,015	0,014	0,011	0,015	0,012	0,013
	0,007	0,016	0,038	0,012	0,012	0,02
	0,008			0,003	0,009	0,015
						0,011
Média	0,0138	0,0163	0,018	0,0104	0,0116	0,0158
EPM	0,0031	0,001	0,0067	0,002	0,001	0,0014
n	5	4	4	5	5	6

Tabela A8g- Valores individuais do conteúdo de ácido octadecatetraenóico (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,0086	0,0121	0,0107	0,0083	0,0119	0,0109
	0,0109	0,0124	0,0108	0,0089	0,0107	0,0105
	0,0152	0,0092	0,0084	0,0132	0,0098	0,0122
	0,0113	0,0515	0,0149	0,0102	0,0098	0,0096
	0,0107			0,0027	0,0088	0,0101
						0,012
Média	0,0113	0,0213	0,0112	0,0087	0,0102	0,0109
EPM	0,0011	0,0101	0,0014	0,0017	0,0005	0,0004
n	5	4	4	5	5	6

Tabela A8h- Valores individuais do conteúdo de ácido eicosapentaenoico (EPA n-3) (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	ND	ND	0,037	0,017	ND	0,004
	ND	ND	0,035	0,016	ND	0,003
	ND	ND	0,025	0,025	ND	0,002
	ND	ND	0,043	0,019	ND	0,014
	ND			0,005	ND	0,006
Média	0	0	0,035	0,0164	0	0,0058
EPM	0	0	0,0037	0,0032	0	0,0022
n	5	4	4	5	5	5

Tabela A8i- Valores individuais do conteúdo de ácido docosapentaenóico (DPA n-3) (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,035	0,035	0,093	0,069	0,049	0,042
	0,037	0,032	0,081	0,079	0,04	0,046
	0,058	0,034	0,068	0,101	0,037	0,048
	0,049	0,028	0,112	0,083	0,041	0,037
	0,039			0,016	0,046	0,063
						0,054
Média	0,0436	0,0323	0,0885	0,0696	0,0426	0,0483
EPM	0,0043	0,0015	0,0093	0,0144	0,0022	0,0037
n	5	4	4	5	5	6

Tabela A8j- Valores individuais do conteúdo de ácido docosaexaenóico (DHA n-3) (g/100g de tecido) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,149	0,175	0,367	0,302	0,213	0,18
	0,157	0,182	0,37	0,301	0,173	0,233
	0,24	0,199	0,3	0,292	0,195	0,214
	0,19	0,193	0,358	0,299	0,139	0,186
	0,151				0,192	0,284
						0,231
Média	0,1774	0,1873	0,3488	0,2985	0,1824	0,2213
EPM	0,0173	0,0054	0,0164	0,0023	0,0126	0,0155
n	5	4	4	4	6	6

Tabela A9- Valores individuais da relação DPA/EPA e DHA/EPA no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,15	0,192	0,245	0,51	0,079	0,58
	0,15	0,436	0,239	0,53	0,081	0,4
	0,26	0,465	0,3	0,48	0,1	0,28
	0,29	0,72	0,27	0,47	0,136	0,59
		0,33	0,29		0,19	0,43
		0,33				
Média	0,2125	0,4122	0,2688	0,4933	0,1172	0,456
EPM	0,0366	0,0731	0,012	0,0186	0,0209	0,0584
n	4	6	5	4	5	5

Tabela A10a- Valores individuais do conteúdo de ácidos graxos livres (mg/g de tecido úmido) no ventrículo esquerdo (VE) ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,15	0,19	0,25	0,52	0,08	0,58
	0,15	0,44	0,24	0,53	0,08	0,40
	0,26	0,47	0,30	0,48	0,10	0,28
	0,29	0,72	0,27	0,47	0,14	0,59
		0,33	0,29		0,19	0,43
		0,33				
Média	0,21	0,41	0,27	0,50	0,12	0,46
EPM	0,04	0,07	0,01	0,01	0,02	0,06
n	4	6	5	4	5	5

Tabela A10b- Valores individuais do conteúdo de ácidos graxos livres (mg/g de tecido úmido) no ventrículo direito (VD) ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,19	0,22	0,22	0,47	0,11	0,76
	0,20	0,22	0,25	0,60	0,17	0,51
	0,21	0,50	0,25	0,47	0,19	0,31
	0,20	0,52	0,28	0,44	0,19	0,42
	0,24	0,58			0,17	0,42
		0,39				
Média	0,21	0,41	0,25	0,50	0,16	0,48
EPM	0,01	0,06	0,01	0,04	0,01	0,08
n	5	6	4	4	5	5

Tabela A10c- Valores individuais do conteúdo de ácidos graxos livres (mg/g de tecido úmido) no fígado de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,16	0,47	0,23	0,30	0,14	0,44
	0,15	0,38	0,26	0,48	0,18	0,44
	0,17	0,26	0,18	0,36	0,20	0,53
	0,23	0,30	0,15	0,35	0,21	0,36
	0,14			0,58	0,15	0,39
						0,36
Média	0,17	0,35	0,20	0,41	0,17	0,42
EPM	0,02	0,05	0,02	0,05	0,01	0,03
n	5	4	4	5	5	6

Tabela A10d- Valores individuais do conteúdo de triacilglicerol (mg/g de tecido úmido) no ventrículo esquerdo (VE) de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	2,78	1,8	3,2	3,9	1,9	3,9
	1,9	2,8	1,2	3,7	2,9	3,8
	1,7	3,7	3,3	2,5	1,9	1,7
	2,6	4,3	2,2	3,9	1,8	2,1
	1,7	3,8	2,3		2,4	3,7
	1,25	2,9	1,8		0,84	2,8
	1,51		1,5		1,05	
	1,7		1,4		1,14	
	2,05		1,9		1,63	
			2,0		2,1	
Média	1,9	3,2	2,1	3,5	1,8	3,0
EPM	0,2	0,4	0,2	0,3	0,2	0,4
n	9	6	10	4	10	6

Tabela A10e- Valores absolutos do conteúdo de triacilglicerol (mg/g de tecido úmido) no ventrículo direito (VD) de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,37	1,4	5,2	3,6	0,4	4,9
	2,9	2,2	6,5	9,7	2,2	4,1
	1,2	2,7	6,8	3,1	0,53	1,5
	0,52	2,4	3,4	3,6	3,3	2,5
	3,8	4,1	7	5,1	0,9	3,3
		3,4				
Média	1,76	2,70	5,78	5,02	1,47	3,26
EPM	0,68	0,39	0,67	1,22	0,56	0,59
n	5	6	5	5	5	5

Tabela A10f- Valores individuais do conteúdo de triacilglicerol (mg/g de tecido úmido) no fígado de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	1,29	1,26	0,68	0,66	0,67	2,72
	1,81	1,73	1,45	4,60	1,28	3,54
	3,37	0,94	1,68	2,54	2,89	1,19
	2,08	1,67	0,90	1,89	0,75	2,30
	1,41		1,31	2,13	2,98	2,01
	0,83				2,44	1,47
					2,11	
					1,06	
Média	1,80	1,40	1,20	2,36	1,77	2,20
EPM	0,36	0,19	0,18	0,64	0,33	0,35

Tabela A11- Valores individuais da área de infarto (% da circunferência do VE) de ratos suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S	OP	OS
	31	22,1	37,4
	30,3	11,9	27,9
	40,7	26,3	50,9
	31	22,6	16,1
	28,14	18,2	18,3
	24	20,4	16,8
	31,4	23,22	35,32
	26	13,65	33,8
	28,8	34,29	30,5
	16,5	35,09	41,12
	24,7		
	30,9		
	30,9		
	27,05		
Média	28,6	22,7	30,8
EPM	1,4	2,4	3,5
n	14	10	10

Tabela A12- Valores individuais da atividade da creatina quinase (U/L) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	89	621	84	378	99,5	724
	99,5	637	339	271	133	508
	73,6	953	138	453	118	750
	147	684	112	536	243	484
	68,8	663	388		291	633
		995				793
Média	96	759	212	410	177	649
EPM	14	69	63	56	38	53
n	5	6	5	4	5	6

Tabela A13- Valores individuais da atividade da caspase 3 (Fluorescência AU/mg de proteína) no VE de ratos infartados e SHAM suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	SHAM	S	OP	OS
	19	78	18	65
	20	22	17	39
	24	30	15	68
	14	80	10	74
	23	42		
	23			
Média	21	50	15	62
EPM	2	12	2	8
n	6	5	4	4

Tabela A14a- Valores individuais do conteúdo de TNF- α (pg/mg de proteína) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	125	374	34	568	73	869
	60	339	71	654	61	942
	43	436	38	541	46	752
	76	507	73	400	77	566
	91	331			31	410
						771
						382
Média	79	397	54	541	58	670
EPM	14	33	10	53	9	83
n	5	5	4	4	5	7

Tabela A14b- Valores individuais do conteúdo de IL-1 β (pg/mg de proteína) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	31,7	829,0	17,7	737,0	1,1	987
	8,6	564,0	21,4	402,0	2,4	1350
	23,7	452,0	2,0	591,0	0,9	1505
	25,3	556,0	29,5	568,0	24,0	1080
	1,5	708,0		1065,0	1,2	694
		830,0				1243
						550
Média	18,2	656,5	17,6	672,6	5,9	1058,4
EPM	5,6	64,0	5,8	111,6	4,5	130,5
n	5	6	4	5	5	7

Tabela A14c- Valores individuais do conteúdo de CINC-2 α/β (pg/mg de proteína) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	288	468	280	447	198	939
	290	293	340	426	289	866
	242	626	278	546	314	761
	355	390	301	384	289	707
	278	360		686		735
	307	472		490		
		675		405		
		586		480		
		794				
		560				
		516				
Média	293	522	300	483	273	802
EPM	15	44	14	34	26	44
n	6	11	4	8	4	5

Tabela A14d- Valores individuais do conteúdo de IL-6 (pg/mg de proteína) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	223,79	289	279	418	235	506
	226	288	302	482	198	357
	193	400	298	418	200	293
	267,4	323	189	251	265	355
	236,4	508		343		426
	276,2	229				600
						295
Media	237,1	339,5	267,0	382,4	224,5	404,6
EPM	12,5	40,7	26,5	39,5	16,0	43,1
n	6	6	4	5	4	7

Tabela A14e- Valores individuais do conteúdo de IL-10 (pg/mg de proteína) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	52	64,6	45	38	44	49,6
	43	43	67	108	36	122
	54	146	59	41	41	140,5
	62	42,2	70	78	23	49,5
	18	22,1		45,5		155
						51
Media	45,8	63,58	60,25	62,1	36	94,6
EPM	7,6	21,7	5,6	13,5	4,6	20,4
N	5	5	4	5	4	6

Tabela A14f- Valores individuais do conteúdo de MIP-3 (pg/mg de proteína) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	10,60	21,18	13,55	63,85	13,88	17,14
	12,62	46,67	10,93	50,34	12,05	26,52
	11,05	32,16	19,87	48,33	14,75	40,18
	15,68	38,18	13,18	32,76	17,09	29,07
			15,43	39,13	12,75	31,48
Media	12,49	34,55	14,59	46,88	14,10	28,88
EPM	1,15	5,36	1,50	5,30	0,88	3,73
n	4	4	5	5	5	5

Tabela A14g- Valores individuais do conteúdo de VEGF- α (pg/mg de proteína) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	1,26	2,77	5,22	12,59	7,87	18,86
	7,81	3,56	4,93	11,80	6,25	9,26
	7,65	5,66	6,22	9,21	5,19	14,16
	6,90	8,48	4,36	11,46	4,13	13,92
			3,85	19,37	2,93	5,68
Media	5,90	5,12	4,91	12,89	5,27	12,38
EPM	1,56	1,28	0,40	1,71	0,85	2,26
n	4	4	5	5	5	5

Tabela A15a- Valores individuais do conteúdo de IL-1 β (pg/g de proteína) no fígado de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	0,0116	0,0039	0,0072	0,0035	0,0098	0,0088
	0,0050	0,0052	0,0088	0,0022	0,0102	0,0076
	0,0098	0,0029	0,0074	0,0043	0,0107	0,0096
	0,0099	0,0060	0,0100	0,0030	0,0102	0,0081
		0,0055	0,0064	0,0050	0,0138	0,0088
		0,0026		0,0043		
				0,0061		
Media	0,0091	0,0043	0,0080	0,0041	0,0109	0,0086
EPM	0,0014	0,0006	0,0006	0,0005	0,0007	0,0003
n	4	6	5	7	5	5

Tabela A15b- Valores individuais do conteúdo de TNF- α (pg/g de proteína) no fígado de ratos suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) e óleo de soja (OS) em animais não infartados (NI) e infartados (I)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	22,4	6,6	8,7	6,5	16,9	40,7
	22,7	22,0	11,1	6,2	15,4	37,9
	21,9	3,2	8,3	12,0	12,9	15,0
	35,1	5,2	10,3	9,1	13,9	18,1
	17,7	14,8	7,4	16,4	10,6	35,5
		6,9		4,8		
		33,3		15,8		
Media	23,9	13,1	9,2	10,1	13,9	29,4
EPM	2,9	4,2	0,7	1,8	1,1	5,4
n	5	7	5	7	5	5

Tabela A15c- Valores individuais do conteúdo de MIP-3 (pg/g de proteína) no fígado de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	50,3	13,2	31,2	14,5	46,8	42,1
	39,3	17,4	43,9	10,1	38,9	39,2
	28,4	17,2	34,4	20,9	50,2	51,6
	40,2	16,7	36,2	13,6	61,3	37,3
	36,2	19,5	32,1	25,4	66,9	43,7
		14,6		9,9		
				25,6		
Media	38,9	16,4	35,6	17,1	52,8	42,8
EPM	3,5	0,9	2,3	2,6	5,0	2,5
n	5	6	5	7	5	5

Tabela A15d- Valores individuais do conteúdo de IL-6 (pg/g de proteína) no fígado de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	52,0	48,1	26,2	43,7	54,2	253,9
	36,0	123,0	34,2	45,4	46,7	153,8
	29,5	35,4	42,9	84,1	45,3	106,1
	44,2	39,4	28,5	90,7	47,3	128,8
	50,2	121,9	26,3	118,6	37,7	164,0
		59,7		149,3		
		207,9				
Media	42,4	90,8	31,6	88,6	46,2	161,3
EPM	4,3	24,0	3,2	16,8	2,6	25,3
n	5	7	5	6	5	5

Tabela A15e- Valores individuais do conteúdo de VEGF- α (pg/g de proteína) no fígado de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	16,2	6,8	16,1	7,7	19,1	12,9
	11,6	8,2	16,3	4,4	18,2	9,6
	10,6	8,7	15,2	12,3	20,0	11,5
	15,1	10,4	12,7	6,0	22,5	12,0
	15,7	9,4		12,1		
		5,1		6,3		
				12,5		
Media	13,9	8,1	15,1	8,8	19,9	11,5
EPM	1,1	0,8	0,8	1,3	0,9	0,7
n	5	6	4	7	4	4

Tabela A16a- Valores individuais da concentração de TBARS ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ de proteína) no VE de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	1,6	3,4	2,08	2,3	1,7	3,9
	1,4	3,2	2,3	2,8	2,1	4,3
	1,4	3,5	1,76	3,7	1,3	4,3
	1,3	3,1	1,7	3,5	2,4	3,5
		2,1	1,7	3,3	2	2,7
		4,4				3,1
Media	1,4	3,3	1,9	3,1	1,9	3,6
EPM	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2
n	4	6	5	5	5	6

Tabela A16b- Valores individuais da concentração de TBARS ($\mu\text{mol/mg}$ de proteína) no fígado de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	1,1	1,14	1,4	1,3	1,6	1,1
	1,3	1,11	1,4	1,12	1,3	1,38
	2,7	0,9	1,5	1,11	1,6	1,86
	1,4	1,61	2,4	1,21	2,4	1,21
		1,12	1,6	1,01		1,38
		1,03				1,22
						1,12
Media	1,63	1,15	1,66	1,15	1,73	1,32
EPM	0,36	0,10	0,19	0,05	0,24	0,10
n	4	6	5	5	4	7

Tabela A17a- Valores individuais da concentração de C3 (mg/dL) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	10,1	69	6,7	343	3,2	257
	9,7	198	17,6	153	8,1	147
	5,45	134	7,2	104	3,7	473
	9,8	178	5	500	6,6	231
	38,7		11,2		7,3	433
Media	14,8	144,8	9,5	275,0	5,8	308,2
EPM	6,0	28,6	2,3	91,0	1,0	62,2
n	5	4	5	4	5	5

Tabela A17b- Valores individuais da concentração de C4 (mg/dL) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	3,5	44	1,2	55	0,12	65
	6,7	56	11,5	42	5	44
	3,7	36	2	47	2,1	42
	6	61	3,6	36	5,9	52
	23	33	3,7	38	8,1	50
		47				61
Media	8,6	46,2	4,4	43,6	4,2	52,3
EPM	3,7	4,5	1,8	3,4	1,4	3,7
n	5	6	5	5	5	6

Tabela A18- Valores individuais da concentração de PCR (pg/mL) no plasma de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	6336	6665	5910	5765	5910	6441
	6559	15533	4755	10898	4755	9386
	5010	5677	7902	9291	7902	6183
	6191	5474	4809	7805	4809	5174
	4732	6157	6724	8578	6724	11549
		6917				6175
Media	5766	7737	6020	8467	6020	7485
EPM	372	1575	597	847	597	1000
n	5	6	5	5	5	6

Tabela A19a- Valores individuais do conteúdo de ATP ($\mu\text{mol/g}$ de tecido úmido) no ventrículo esquerdo de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	42,6	85,7	41	121,2	29	99,7
	38,5	41,8	91	79,5	22	38,3
	34,5	81,2	72	70,9	38	6,8
	26	41	104	118,4	36	65,9
	68	18,5	58	116,6	18,3	42,6
						45
						44
Media	41,9	53,6	73,2	101,3	28,7	48,9
EPM	7,1	12,9	11,3	10,8	3,8	10,7
n	5	5	5	5	5	7

Tabela A19b- Valores individuais do conteúdo de ATP ($\mu\text{mol/g}$ de tecido úmido) no fígado de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	128,7	36,7	182,5	16,3	52	20,9
	56,5	77,3	218,4	62,6	64	46,3
	113	32,4	97,4	52,1	85,4	22,9
	86	47,3	183,1	18,9	76,9	84,9
		45,5		60,5		
Media	96,1	47,8	170,4	42,1	69,6	43,8
EPM	15,9	7,9	25,7	10,2	7,3	14,9
n	4	5	4	5	4	4

Tabela A20- Valores individuais do conteúdo de glicogênio (mg/g de tecido úmido) no ventrículo esquerdo de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	3,1	5,5	1,3	2,1	1,5	8,5
	1,5	5,9	1,5	5,3	3,8	1,6
	4,4	7,8	2,1	4	3,3	12,3
	1,8	1,6	2,1	10,3	3,3	7,8
	5,9	19,8	1,4	6,1	2,4	14,1
	4,7	5	1,9	7,1	2,5	8
	9,2	6,9	1,2	8,1	3,1	
	3,8	4	1,3	3,5	3,4	
	3,7	4	1,9	6,1		
		6,6		6,4		
		4,7		5,6		
		6,9		4,4		
Media	4,2	6,6	1,6	5,8	2,9	8,7
EPM	0,8	1,3	0,1	0,6	0,3	1,8
n	9	12	9	12	8	6

Tabela A21- Valores individuais do conteúdo de lactato ($\mu\text{mol/g}$ de tecido úmido) no ventrículo esquerdo de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	6,5	13,5	8,7	12,9	7,1	6,6
	8,8	8,5	9,1	15,5	6,9	8,2
	9,8	14,7	5,2	10,9	5,0	8,8
	8,9	11,1	8,5	19	7,1	10,1
		13,1		13,3	5,7	7,7
		8,7		13,5		
		6,9		17,1		
Media	8,5	10,93	7,8	14,6	6,4	8,3
EPM	0,7	1,12	0,9	1,0	0,4	0,6
n	4	7	4	7	5	5

Tabela A22a- Valores individuais da atividade da citrato sintase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tecido úmido) no ventrículo esquerdo de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	15,6	18,0	18,0	11,2	19,2	22,1
	16,2	17,6	17,0	19,0	14,0	26,0
	19,0	25,8	14,5	20,1	20,7	22,2
	18,7	25,7	15,9	21,2	17,7	27,3
				28,9	11,9	23,2
Media	17,4	21,8	16,3	20,1	16,7	24,1
EPM	0,9	2,3	0,8	2,8	1,6	1,1
n	4	4	4	5	5	5

Tabela A22b-Valores individuais da atividade da PFK ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ de tecido úmido) no ventrículo esquerdo de ratos não infartados (NI) e infartados (I) suplementados com salina (S), óleo de peixe (OP) ou óleo de soja (OS)

	S		OP		OS	
	NI	I	NI	I	NI	I
	1,04	1,57	1,10	0,10	1,38	0,39
	1,74	1,33	0,97	1,43	1,16	0,02
	1,41	1,50	1,30	1,17	1,77	0,95
	1,00	1,52	1,50	1,23	0,93	0,02
		0,07		1,58		0,01
		0,95		0,73		
		1,05		0,64		
		0,75		0,91		
		0,59		1,27		
		1,18		1,04		
		0,87		1,50		
				1,62		
Media	1,30	1,04	1,22	1,10	1,31	0,28
EPM	0,17	0,14	0,12	0,13	0,18	0,18
n	4	11	4	12	4	5

Tabela A23- Quantificação relativa dos transcritos gênicos para Bcl2, Bax, Fas, p53, UCP3, GLUT1, Hex, HIF1, Citrato sintase, glycogenio fosforilase, PDK4, MG53, PFK 1, VEGF, eNos, iNos em ventrículo esquerdo de ratos infartados suplementados com óleo de peixe

	Genes alvos															
	Bcl2	Bax2	Fas	p53	UCP3	GLUT1	Hex	HIF1	Citr Synt	Glyc Phos	PDK4	MG53	PFK	VEGF	eNos	iNos
	1,35	1,41	1,37	1,18	0,87	1,12	1,01	1,51	0,96	0,89	0,98	0,87	1,21	1,01	1,56	2,02
	1,20	1,25	1,05	1,15	0,85	1,09	1,04	1,25	0,96	0,92	0,89	1,03	1,07	1,04	2,67	1,78
	0,85	1,00	0,85	1,02	1,10	1,03	0,99	0,80	0,95	1,02	1,03	1,04	0,87	0,99	1,11	0,83
	1,19	1,24	1,01	1,12	0,94	1,06	1,05	1,20	0,97	0,93	0,95	1,14	1,25	1,07	1,19	1,85
	0,88	1,20	1,03	1,12	0,97	1,10	0,97	1,22	1,09	1,01	1,03	0,91	1,05	1,03	1,90	2,26
	1,06	0,96	0,79	1,00	1,14	1,04	0,95	1,17	1,06	1,01	1,07	1,20	0,89	1,05	0,95	0,89
	1,07	1,10	1,10	1,08	1,10	1,09	1,03	0,94	0,84	1,12	1,04	0,95	0,90	1,04	1,23	1,18
	1,23	0,97	1,21	1,09	0,96		1,04	1,10	1,17	1,08	0,92	0,83	0,88	1,08	2,17	1,33
Média	1,10	1,14	1,05	1,10	0,99	1,07	1,01	1,15	1,00	1,00	0,99	1,00	1,02	1,04	1,60	1,52
EPM	0,06	0,06	0,06	0,02	0,04	0,01	0,01	0,07	0	0,03	0,02	0,05	0,05	0,01	0,21	0,19
n	8	8	8	8	8	7	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Valores maior que 1 indica aumento da expressão grupo óleo de peixe em comparação ao grupo salina. iNOS- óxido nítrico-sintase induzível; eNOS – óxido nítrico-sintase endotelial; VEGF – fator de crescimento vascular endotelial; PFK – fosfofrutooquinase; MG53 - *mitsugumin* 53; PDK 4- piruvato quinase desidrogenase 4; HIF1 α - *hypoxia-inducible factor 1-alpha*; UCP 3- uncoupling protein 3; Fas - *Fas receptor*; Bax2 - *Bcl-2-associated X protein*; Bcl2- *B-cell lymphoma 2*

Tabela A24- Valores individuais do fluxo coronariano (ml/min/g de tecido úmido) do VE de animais infartados suplementados com salina (S) ou óleo de peixe (OP)

	SHAM	S	OP
	3,37	1,20	1,01
	2,90	0,92	4,10
	4,10	0,65	1,87
	3,62	0,92	2,45
		0,29	4,37
		0,78	
Media	3,50	0,79	2,76
EPM	0,25	0,13	0,65
n	4	6	5

Tabela A25a- Valores individuais da fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (ΔD), velocidade de encurtamento circunferencial (Vcf), tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado (nTRIV), tempo de desaceleração da onda E (TDE), razão entre onda E/A do fluxo mitral (E/A) e frequência cardíaca (FC) de animais SHAM e suplementados com salina

	SHAM						
	FE (%)	ΔD (%)	Vcf (cm/s)	nTRIV (m/s)	TDE (m/s)	E/A	FC (bat/min)
	66	31,9	0,34	2,55	31,00	1,66	285
	74	37,8	0,40	1,70	38,00	1,62	286
	73	37,3	0,54	1,39	35,00	3,30	284
	70	34,7	0,38	1,82	32,00	1,53	287
Média	70,75	35,43	0,41	1,86	34,00	2,03	285,5
EPM	1,79	1,35	0,04	0,24	1,58	0,43	0,6
n	4	4	4	4	4	4	4

Tabela A25b- Valores individuais da fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (ΔD), velocidade de encurtamento circunferencial (Vcf), tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado (nTRIV), tempo de desaceleração da onda E (TDE), razão entre onda E/A do fluxo mitral (E/A) e frequência cardíaca (FC) de animais SHAM e suplementados com óleo de peixe

	SHAM						
	FE (%)	ΔD (%)	Vcf (cm/s)	nTRIV (m/s)	TDE (m/s)	E/A	FC (bat/min)
	76	39,7	0,36	2,11	65,00	1,77	256
	86	50,0	0,56	1,93	40,00	1,73	270
	85	49,0	0,49	2,20	29,00	1,33	202
	81	43,9	0,54	2,17	54,00	1,47	280
	77	40,7	0,45	3,54	49,00	2,23	295
Média	81,00	44,66	0,48	2,39	47,40	1,70	260,6
EPM	2,02	2,10	0,035	0,29	6,12	0,15	15,9
n	5	5	5	5	5	5	5

Tabela A25c- Valores individuais da fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (ΔD), velocidade de encurtamento circunferencial (Vcf), tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado (nTRIV), tempo de desaceleração da onda E (TDE), razão entre onda E/A do fluxo mitral (E/A) e frequência cardíaca (FC) de animais infartados e suplementados com salina

	Salina						
	FE (%)	ΔD (%)	Vcf (cm/s)	nTRIV (m/s)	TDE (m/s)	E/A	FC (bat/min)
	45	19	0,241	1,96	32	1,55	295
	33	14	0,249	1,45	42	3,31	251
	49	21	0,211	2,3	33	2,00	225
	43	19	0,173	1,7	48	2,00	224
	43	18	0,439	1,48	24	2,87	300
	39	16	0,232	1,75	35	3,19	300
	31	13	0,144	1,28	32	2,05	267
	58	27	0,228	1,93	42	2,15	278
	32	13	0,278	1,21	34	2,09	303
	63	30	0,241	1,62	41	3,10	300
	46	20	0,238	1,34	29	1,68	253
		34					309
							266
							225
Média	43,88	20,33	0,24	1,63	35,64	2,36	271,1
EPM	3,08	1,94	0,022	0,1	2,08	0,19	8,3
n	12	13	12	12	12	12	15

Tabela A25d- Valores individuais da fração de ejeção (FE), fração de encurtamento (ΔD), velocidade de encurtamento circunferencial (Vcf), tempo de relaxamento isovolumétrico normalizado (nTRIV), tempo de desaceleração da onda E (TDE), razão entre onda E/A do fluxo mitral (E/A) e frequência cardíaca (FC) de animais infartados e suplementados com óleo de peixe

	Óleo de peixe						
	FE (%)	ΔD (%)	Vcf (cm/s)	nTRIV (m/s)	TDE (m/s)	E/A	FC (bat/min)
	63	30	0,250	1,64	43	3,09	281
	72	37	0,264	2,35	33	1,30	284
	48	21	0,284	1,56	39	2,05	306
	66	32	0,491	1,90	34	1,51	295
	41	17	0,472	1,69	35	4,32	278
	45	19	0,273	1,51	36	2,89	288
	53	24	0,435	1,52	28	2,50	277
	67	33	0,485			1,23	323
	66	32	0,293			1,16	347
	43	18	0,421			1,45	309
			0,236			1,70	
			0,228			1,69	
			0,367				
Média	56,4	26,3	0,34	1,73	35,43	2,07	298,8
EPM	3,67	2,3	0,028	0,11	1,78	0,27	7,18
n	10	10	13	7	7	12	10