FRHANCIELLY SHIRLEY SOUZA SODRÉ

Efeitos do jejum prolongado sobre o metabolismo do músculo cardíaco e função cardíaca em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

FRHANCIELLY SHIRLEY SOUZA SODRÉ

Efeitos do jejum prolongado sobre o metabolismo do músculo cardíaco e função cardíaca em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Profa. Dra. Silvana Auxiliadora Bordin da Silva

Versão original.

São Paulo 2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

SODRÉ, FRHANCIELLY SHIRLEY SOUZA Efeitos do jejum prolongado sobre o metabolismo do músculo cardíaco e função cardíaca em ratos / FRHANCIELLY SHIRLEY SOUZA SODRÉ; orientador SILVANA BORDIN. -- São Paulo, 2018. 96 p. Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Jejum. 2. Metabolismo. 3. Músculo cardíaco. 4. Função cardíaca. I. BORDIN, SILVANA, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Frhancielly Shirley Souza Sodré		
Titulo da Dissertação/Tese:	Efeitos do jejum prolongado sobre o metabolismo do músculo cardíaco e função cardíaca em ratos		

Orientador: Profa. Dra. Silvana Bordin

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a, considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Examinador(a):	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:
Presidente:	Assinatura:
	Nome:
	Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 00 CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito do jejum sobre a lesão causada por isquemia-reperfusão

em coração de ratos", registrado sob o protocolo nº *93/2016*, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em *12/09/2016* pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: Dr.(a.) Rui Curi

- Departamento: Fisiologia e Biofísica

- Membros da Equipe: Frhancielly Shirley Souza Sodré (Pós-graduando), Alcione Lescano de Souza Junior (Pesquisador colaborador), Tatiana Carolina Alba Loureiro (Especialista em laboratório), Gilson Masahiro Murata (Especialista em laboratório)

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico <u>www.icb.usp.br/ceua</u>. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Effect of fasting on the injury caused by ischemiareperfusion in rat heart*", protocol nº *93/2016*, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on *9/12/2016* by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: Dr.(a.) Rui Curi

- Team members: Frhancielly Shirley Souza Sodré (Graduate Student), Alcione Lescano de Souza Junior (Colaborator Researcher), Tatiana Carolina Alba Loureiro (Laboratory Technician), Gilson Masahiro Murata (Laboratory Technician).

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhag	em/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
Rattus norvegicus	Wistar		Macho/Male	60 dias/days	100

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes Coordenador CEUA-ICB/USP São Paulo, 13 de setembro de 2016.

Eliane games

Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento Secretária CEUA-ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Deus, pai amado

A professora Silvana Bordin, por quem tenho sincero respeito e admiração, não somente por ser uma brilhante cientista, mas também por ser amável, carinhosa e parceira, obrigada pela orientação e pela amizade

Ao Professor Rui Curi pela oportunidade de entrar na pós-graduação e pelo carinho

Ao professor Alcione Lescano de Souza Junior, por todo incentivo durante minha trajetória acadêmica, obrigada por me achar capaz

Ao Dr. Gilson Murata, meu melhor amigo, obrigada por me ensinar todas as técnicas necessárias para realização deste trabalho, sua ajuda e amizade foram essenciais

A professora Lisete Michelini por me oportunizar realizar parte deste trabalho em seu laboratório e por todas as contribuições

Ao Dr. Alexandre Ceroni por ensinar e realizar os procedimentos cirúrgicos necessários

Aos professores Carla e João Paulo por todas as contribuições durante os seminários do laboratório 105

Ao Zé Maria e Paloma, por esclarecer todas as dúvidas do programa da pós-graduação

Aos amigos Gilson, Takeo, Joice, Amandão, Gizela, Carolzinha, Tany, Mary, Tiff, Lais, Amanda SchuSchu, Amanda Monteiro, Bruna, Sandro, Laynane e Gabi, pelo companheirismo de sempre

A minha mãe lone, meu porto seguro e minha maior e melhor amiga

Ao meu pai Rylton, por todo apoio

Ao meu namorado Washington por compreender minha ausência e me apoiar, mesmo com a distância

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro

Meu muito obrigada a todos!

RESUMO

SODRÉ, F. S. S. **Efeitos do jejum prolongado sobre o metabolismo do músculo cardíaco e função cardíaca em ratos.** 2018. 96 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos do jejum de 48 h sobre o metabolismo do músculo cardíaco e sobre a função cardíaca. Para isso, ratos machos com 60 dias foram separados em dois grupos: jejuados por 48 h (grupo experimental) e alimentados (grupo controle). Após eutanásia, sangue e coração foram coletados. O coração foi excisado e a aurícula do átrio direito (AAD), a aurícula do átrio esquerdo (AAE), parede do ventrículo direito (PVD), septo interventricular (SIV) e parede do ventrículo esquerdo (PVE) foram separadas e analisadas individualmente. Análises de parâmetros bioquímicos plasmáticos, dosagem de metabólitos, atividade máxima de enzimas, assim como expressão gênica e proteica foram realizadas. O jejum promoveu alterações metabólicas em todas as regiões, sendo mais intensas na PVE. Registros ventriculares e hemodinâmicos também foram obtidos. O jejum diminuiu a força de contração (dP/dt+), a força de relaxamento (dP/dt-) e a frequência cardíaca (FC), aumentou o tempo de enchimento diastólico e o hematócrito. Apesar de observamos aumento do potencial oxidativo e aumento da concentração disponível de ATP, é possível que 48 h de jejum comprometa a volemia e por consequência a função cardíaca.

Palavras-chave: Jejum. Metabolismo. Músculo cardíaco. Função cardíaca.

ABSTRACT

SODRÉ, F. S. S. **Effects of prolonged fasting on cardiac muscle metabolism and cardiac function in rats.** 2018. 96 f. Dissertation (Master thesis in Human Physiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The present study aimed to investigate the effects of 48 h fasting on cardiac muscle metabolism and cardiac function. For this, male rats with 60 days were separated into two groups: fasted for 48 h (experimental group) and fed (control group). After euthanasia, blood and heart were collected. The heart was excised and the right atrial atrium (RAA), left atrial atrium (LAA), right ventricular wall (RVW), interventricular septum (IVS) and left ventricular wall (LVW) were separated and analyzed individually. Analyzes of plasma biochemical parameters, dosage of metabolites, maximum activity of enzymes, as well as gene and protein expression were performed. Fasting promoted metabolic alterations in all regions, being more intense in PVE. Ventricular and hemodynamic records were also obtained. Fasting decreased contraction force (dP / dt +), relaxation force (dP / dt-) and heart rate (HR), increased diastolic filling time and hematocrit. Although we observed an increase in the oxidative potential and an increase blood volume and, consequently, cardiac function.

Keywords: Fasting. Metabolism. Cardiac muscle. Cardiac function.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Etapas da oxidação de glicose pela via glicolítica	. 25
Figura 2 – Etapas da oxidação de ácidos graxos no interior da mitocôndria	. 26
Figura 3 – Representação de um canal de registro do software LabChart I	Pro
(ADInstruments) ilustrando as diferenças entre o padrão de registro	da
pressão arterial e da pressão ventricular	. 40
Figura 4 – Janela de visualização do software LabChart Pro (ADInstruments)	. 40
Figura 5 – Peso corporal	. 42
Figura 6 – Peso da gordura periepididimal, fígado e músculo cardíaco	. 42
Figura 7 – Concentrações de parâmetros bioquímicos no plasma e soro	. 43
Figura 8 – Concentração de ATP na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE	. 44
Figura 9 - Concentração de lactato na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE	. 45
Figura 10 - Concentração de glicogênio na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE	. 45
Figura 11 – Concentração de piruvato, ADP e glicerol na PVE	. 46
Figura 12 - Atividade da hexoquinase (HK) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE	. 47
Figura 13 - Atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK1) na AAD, AAE, SIV, PVD e	PVE
	. 47
Figura 14 – Atividade da piruvato quinase (PK) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE.	. 48
France AF ANTI LA LA STATE STATE (00) AAD AAF ON DAD AND AND	
Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE	. 48
Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A	. 48 AE,
Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE	. 48 AE, . 49
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE 	. 48 AE, . 49 . 49
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 49
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 49 . 51
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 20 – Expressão gênica de <i>Idha</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 49 . 51 . 51
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 20 – Expressão gênica de <i>Idha</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 21 – Expressão gênica de <i>cs</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 49 . 51 . 51 . 52
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 20 – Expressão gênica de <i>ldha</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 21 – Expressão gênica de <i>cs</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 22 – Expressão gênica de <i>cpt1a</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE e express 	. 48 AE, . 49 . 49 . 51 . 51 . 52 são
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 20 – Expressão gênica de <i>ldha</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 21 – Expressão gênica de <i>cs</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 22 – Expressão gênica de <i>cpt1a</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE e express de <i>cpt1b</i> na PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 51 . 51 . 52 . 52 . 52
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 20 – Expressão gênica de <i>ldha</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 21 – Expressão gênica de <i>cs</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 22 – Expressão gênica de <i>cpt1a</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 23 – Expressão gênica de <i>pdk1</i> na PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 51 . 51 . 52 . 52 . 52 . 53
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 20 – Expressão gênica de <i>ldha</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 21 – Expressão gênica de <i>cpt1a</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE e expression de <i>cpt1b</i> na PVE Figura 23 – Expressão gênica de <i>pdk1</i> na PVE Figura 24 – Expressão gênica de <i>prkaca, ppargc1</i> e <i>sirt1</i> na PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 51 . 51 . 52 . 53 . 53 . 53
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 20 – Expressão gênica de <i>ldha</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 21 – Expressão gênica de <i>cs</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 22 – Expressão gênica de <i>cpt1a</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE e express de <i>cpt1b</i> na PVE Figura 23 – Expressão gênica de <i>pdk1</i> na PVE Figura 24 – Expressão gênica de <i>gys2, gsk3b</i> e <i>pygm</i> na PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 51 . 51 . 52 . 53 . 53 . 53 . 53
 Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, A SIV, PVD e PVE Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT I) na PVE Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE Figura 19 – Expressão gênica de <i>pfkm</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 20 – Expressão gênica de <i>ldha</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 21 – Expressão gênica de <i>cs</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE Figura 22 – Expressão gênica de <i>cpt1a</i> na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE e express de <i>cpt1b</i> na PVE Figura 23 – Expressão gênica de <i>prkaca, ppargc1</i> e <i>sirt1</i> na PVE Figura 25 – Expressão gênica de <i>gys2, gsk3b</i> e <i>pygm</i> na PVE Figura 26 – Expressão gênica de <i>pck1</i> na PVE 	. 48 AE, . 49 . 49 . 51 . 51 . 52 . 53 . 53 . 53 . 53 . 54

LISTA DE TABELAS

 Tabela 1 - Primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-PCR....37

LISTA DE ABREVIATURAS

AAD	aurícula do átrio direito
AAE	aurícula do átrio esquerdo
AD	átrio direito
AE	átrio esquerdo
AG	ácido graxo
AMPK	proteína quinase ativada por AMP
AQP7	aquoporina 7
BSA	albumina sérica bovina
Ca	cálcio
CPT I	carnitina palmitoil transferase I
CPT II	carnitina palmitoil transferase II
CS	citrato sintase
СТ	cicle threshold
DTNB	5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico)
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EERα	receptor alfa dependente de estrógeno
FATP	proteína de transporte de ácido graxo
FC	frequência cardíaca
F6P	frutose-6-fosfato
G6P	glicose-6-fosfato
G6PDH	glicose-6-fosfato desidrogenase
GS	glicogênio sintase
GLUT	transportador de glicose
HCIO ₄	ácido perclórico
НК	hexoquinase
HOADH	β-hidroxiacil-CoA desidrogenase
KH_2PO_4	fosfato monopotássico
KCI	cloreto de potássio
KHCO ₃	bicarbonato de potássio

LDH	lactato desidrogenase
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MgSO ₄	sulfato de magnésio
Na	sódio
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
PDK1	piruvato desidrogenase quinase 1
pD₁VE	pressão diastólica inicial do ventrículo esquerdo
pD ₂ VE	pressão diastólica final do ventrículo esquerdo
PEP	fosfoenolpiruvato
PFK	fosfofrutoquinase
PGC1α	coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador peroxissoma
PK	piruvato quinase
PPAR	receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PSVE	pressão sistólica do ventrículo esquerdo
PVD	parede do ventrículo direito
PVE	parede do ventrículo esquerdo
SIRT1	sirtuína 1
SIV	septo interventricular
Tris-HCI	cloridrato de tris
VD	ventrículo direito
VE	ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 Jejum	15
1.2 Sistema cardiovascular	17
1.2.1 Anatomia cardíaca	17
1.2.2 Eventos elétricos e mecânicos	19
1.2.3 Regulação da força de contração e relaxamento do músculo cardíaco	22
1.3 Metabolismo do músculo cardíaco	23
1.3.1 Oxidação de glicose	24
1.3.2 Oxidação de ácido graxo (AG)	25
1.3.3 Ciclo de Randle	27
1.3.4 Mecanismos envolvidos na interação ácido graxo-glicose	27
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVO	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 Animais e protocolo experimental	31
4.2 Análise do peso corporal, gordura periepididimal, fígado e músculo cardíao	;032
4.3 Análise de parâmetros bioquímicos no plasma e soro	32
4.4 Determinação das concentrações de substratos no músculo cardíaco	32
4.4.1 Determinação das concentrações de ATP, lactato e glicogênio	32
4.4.2 Determinação das concentrações de ADP, piruvato e glicerol na PVE	34
4.5 Atividade máxima de enzimas de vias metabólicas	34
4.6 Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR	36
4.7 Expressão proteica pela técnica Western Blot	38
4.8 Registros hemodinâmicos e ventriculares e hematócrito	39

4.8.1 Registros hemodinâmicos e ventriculares	39
4.8.2 Hematócrito	41
4.9 Análise estatística	41
5 RESULTADOS	42
5.1 Peso corporal e peso da gordura periepididimal, fígado e músculo cardíaco	42
5.2 Parâmetros bioquímicos no plasma e soro	43
5.3 Concentrações de ATP, lactato e glicogênio	44
5.4 Concentrações de piruvato, ADP e glicerol na PVE	46
5.5 Atividade máxima das enzimas	46
5.6 Expressão gênica pela técnica RT- PCR	50
5.7 Expressão proteica por Western Blot	55
5.8 Variáveis hemodinâmicas e função ventricular esquerda	55
5.9 Hematócrito	57
6 SÍNTESE DOS RESULTADOS	58
7 DISCUSSÃO	59
8 CONCLUSÃO	71
REFERÊNCIAS	72
APÊNDICE	84

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Jejum

Por definição, jejum é a abstenção total de alimentos por um determinado período de tempo, sendo frequentemente realizado por motivos culturais, de saúde e religiosos (KERNDT et al., 1982; MAUGHAN; FALLAH; COYLE, 2010).

Desde o século passado o jejum tem sido utilizado em estudos de controle de peso, prevenção e tratamento de doenças (KERNDT et al., 1982; LONGO; MATTSON, 2014). O jejum também foi instituído como um tradicional cuidado préoperatório solicitado e realizado antes de procedimentos cirúrgicos para prevenção de aspiração do conteúdo gástrico durante a indução anestésica (MENDELSON, 1946). Porém, vários autores contestam esse tradicional cuidado e questionam a falta de respaldo científico na conduta (NYGREN; THORELL; LJUNGQVIST, 2003; FEGURI et al., 2012; MACHADO, 2012).

Em animais de experimentação o jejum também é frequentemente realizado antes de cirurgias, e geralmente precede análises de parâmetros sanguíneos, dosagem de compostos e testes comportamentais, objetivando reduzir variabilidade durante a investigação desses parâmetros (NOWLAND; HUGUNIN; ROGERS, 2011; JENSEN et al., 2013). Vale ressaltar que na maioria dos estudos o período de jejum não inclui ausência de ingesta de água, a privação é somente alimentar.

O jejum realizado em animais de experimentação pode variar de curtos (menos de 24 horas) a longos (mais de 24 horas) períodos (NOWLAND; HUGUNIN; ROGERS, 2011). Na literatura, privação de alimento por longos períodos de tempo podem desencadear várias alterações fisiológicas, metabólicas e comportamentais (ABRAHAMSEN; BERMAN; CARR, 1995; DUFFY et al., 1997; HEIDERSTADT et al., 2000; CARR, 2002; SMITH; METZ, 2005; O'MALLEY; DAMBROSIA; DAVIS, 2008). Períodos intermitentes de jejum também tem sido objeto de estudo de muitos pesquisadores, demonstrando efeitos contrários ao jejum prolongado (AHMET et al., 2005; HEILBRONN et al., 2005; SOETERS et al., 2009; WAN et al., 2010; AZEVEDO; IKEOKA; CARAMELLI, 2013).

Sabe-se que, no estado de jejum, o organismo passa a depender de substratos endógenos. Durante longos períodos de jejum as reservas de energia vão sendo aos poucos mobilizadas e tudo que é passível de metabolização é utilizado. Nas primeiras horas de jejum, visando manter os parâmetros vitais (como a glicemia) e garantir aporte de substratos aos tecidos, as reservas de glicogênio, principalmente do fígado, são mobilizadas (CARLSON; SNEAD; CAMPBELL, 1994; AGUILAR-NASCIMENTO; PERRONE; PRADO, 2009; FEGURI et al., 2012). Porém, essas reservas são rapidamente depletadas, passando a ser necessário mobilização de outras reservas, como por exemplo as reservas de gordura (LONGO; MATTSON, 2014).

Intensa lipólise após jejum prolongado foi descrita por vários autores que em seus estudos observaram diminuição de insulina plasmática e aumento de ácidos graxos circulantes (OPIE, 1968; BOTAS, 1989; CARLSON; SNEAD; CAMPBELL, 1994; JENSEN et al., 2013). Os ácidos graxos podem ser fonte de energia para a maioria dos tecidos e, como consequência de maior oferta e oxidação, podem promover acúmulo de acetil-CoA e gerar grande quantidade de corpos cetônicos (KERNDT et al., 1982; LONGO; MATTSON, 2014). Intenso jejum também mobiliza rapidamente as reservas proteicas, pois, para manter glicose circulante, metabólitos não glicídicos, como as proteínas, podem ser utilizados para síntese *de novo* de glicose via gliconeogênese (CARLSON; SNEAD; CAMPBELL, 1994; NYGREN, 2006). Outros substratos e intermediários metabólicos também podem ser direcionados a essa via.

Além dessas alterações metabólicas, já foram descritas numerosas alterações fisiológicas provocadas pelo jejum. Em trabalho publicado por Kerndt et al. (1982), o jejum foi capaz de alterar parâmetros cardiovasculares, diminuindo significativamente a pressão arterial (PA) e o balanço negativo de sódio (Na). Goldhamer et al. (2002), também descreveram diminuição da PA, após jejum prolongado, de indivíduos hipertensos. Snorek et al. (2012), observaram menor incidência de arritmias pós-infarto em ratos previamente submetidos a curto período de jejum. Por outro lado, Liepinsh et al. (2014), observaram maior proteção à isquemia cardíaca em animais alimentados quando comparados a animais jejuados.

Nitidamente, implicações do jejum no sistema cardiovascular se mostram bem abrangentes e alterações significativas tem sido descrita. Assim, investigações mais detalhadas são pertinentes.

1.2 Sistema cardiovascular

O sistema cardiovascular é constituído por uma bomba percussora, o coração, e por uma rede vascular por onde o sangue circula. A principal função do sistema cardiovascular é manter a reperfusão tecidual, e para isso, o sangue contendo material nutritivo e oxigênio deve ser constantemente propelido pelo coração (VASSALO; OLIVEIRA; STEFANON, 2012; MICHELINI, 2017; SANTOS et al., 2017).

1.2.1 Anatomia cardíaca

A parede do coração é formada por várias camadas sendo elas: o pericárdio, o epicárdio, miocárdio e o endocárdio (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). É a camada média e mais espessa do coração, chamada miocárdio, a mais envolvida na contratilidade cardíaca. Essa camada é constituída de músculo estriado cardíaco permitindo os movimentos de contração e relaxamento do coração (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Internamente o coração possui quatro câmaras cardíacas: átrios direito e esquerdo e ventrículos direito e esquerdo. Essas câmaras cardíacas estão fixadas ao esqueleto fibroso do coração, constituído de colágeno denso, que além de manter a estrutura do coração, circunda válvulas existentes entre átrios e ventrículos e atua como isolante elétrico (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O átrio direito (AD) é separado do átrio esquerdo (AE) pelo septo interatrial e o ventrículo direito (VD) é separado do esquerdo (VE) pelo septo interventricular (SIV). Esses dois septos são considerados parte da parede das câmaras cardíacas, possuindo também em sua estrutura fibras musculares (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). Por outro lado, átrios são separados de ventrículos por um arcabouço fibroso constituído principalmente de tecido conjuntivo denso (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Cada câmara cardíaca tem função e estrutura bem específica. O AD recebe sangue venoso da veia cava superior e inferior e do seio coronário (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). Para isso, conta com uma bolsa cônica, constituída principalmente de fibras musculares (*músculos pectíneos*), chamada aurícula direita que amortece o sangue que chega e ainda atua como uma câmara adicional, aumentando a capacidade do átrio (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; NETTER, 2014). Após contração (sístole), o AD direciona o sangue recebido para o VD através da válvula atrioventricular direita, também denominada valva tricúspide (formada por três cúspides) (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

O ventrículo direito (VD), por sua vez, direciona o sangue recebido para o pulmão e para isso conta com várias estruturas importantes. Para que o sangue não retorne para o AD (prolapso) e siga somente para o pulmão, as três cúspides que compõem a válvula atrioventricular esquerda estão fixadas, por estruturas chamadas cordas tendíneas, em pequenas projeções musculares irregulares com bases fixadas na parede ventricular denominada músculos papilares (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; NETTER, 2014). Antes da contração ventricular, ocorre a contração dos músculos papilares, tensionando as cordas tendíneas que por sua vez aproximam as cúspides. É desta forma que durante a contração do ventrículo (sístole ventricular) o prolapso é impedido e o sangue segue para o tronco pulmonar. Para seguir esse caminho, o sangue passa por outra válvula chamada válvula do tronco pulmonar ou válvula semilunar pulmonar (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

Através dos pares de veias pulmonares direita a esquerda, sangue oxigenado entra no AE (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). Assim como o AD, o AE também possui uma aurícula muscular, porém, menor (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; NETTER, 2014). O AE direciona o sangue oxigenado para o VE através da válvula atrioventricular esquerda, também denominada válvula bicúspide ou mitral, formada por duas cúspides (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

A principal função do VE é propelir o sangue oxigenado para todos os órgãos e tecidos (VASSALO; OLIVEIRA; STEFANON, 2012; MICHELINI, 2017; SANTOS et al., 2017). Assim como o VD, o VE também possui músculos papilares que tencionam cordas tendíneas aproximam as duas cúspides da válvula atrioventricular esquerda, impedindo que o sangue retorne para o AE (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; NETTER, 2014). Assim, o sangue segue para a aorta, passando pela válvula da aorta, sendo direcionado para todo o corpo.

Por ter que enfrentar uma PA muito maior e ter que exercer mais força, a espessura da parede do VE é duas a três vezes maior que a do VD (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). Apesar do septo interventricular ser uma divisória entre VD e VE, e formar parte da parede de ambas, a maior parte muscular do septo interventricular é parede do VE (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014).

Além das diferenças estruturais gerais e funcionais, existem diferenças celulares entre as câmaras cardíacas. Segundo Kane e Terracciano (2017), os miócito do miocárdio (cardiomiócitos) que compõe o músculo cardíaco possuem características diferentes quando comparado átrios e ventrículos. Cardiomiócitos que compõe o tecido contrátil ventricular apresentam-se maiores, mais organizadas, com estrutura tubular melhor desenvolvida, sarcômeros alinhados e maior número de mitocôndrias, quando comparados a cardiomiócitos atriais (SHIMADA et al., 2004; LUKYANENKO; CHIKANDO; LEDERER, 2009).

Outras diferenças entre átrios e ventrículos foram descritas, incluindo expressão diferencial de vários canais iônicos (RAVENS; CERBAI, 2008), ampla gama de proteínas específicas (FENG et al., 1997; GARBORIT et al., 2007) e genes expressos de forma preferencial ou única em cada câmara cardíaca (BIRD et al., 2003). O gene MLC2V *(myl2)*, por exemplo, que codifica cadeia leve de miosina, tem sido frequentemente atribuído como marcador ventricular (LEE et al., 1992; BRUNEAU et al., 2000; NG; WONG; TSANG, 2010).

1.2.2 Eventos elétricos e mecânicos

Os eventos mecânicos de contração e relaxamento do coração são precedidos de eventos elétricos. Esses eventos são gerados e transmitidos pelo complexo estimulador do coração constituído de tecido nodal (nó sinoatrial e nó atrioventricular) e fibras condutoras (His-Purkinje) (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; NETTER, 2014).

O tecido nodal inicia os batimentos cardíacos e coordena a contração das quatro câmaras cardíacas (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). O ritmo cardíaco é determinado pelo nó sinoatrial (marca-passo cardíaco) que após atingir limiar de despolarização desenvolve potencial de ação que se propaga célula a célula rapidamente por todo o átrio, tanto esquerdo como direito (VASSALO; OLIVEIRA; STEFANON, 2012). Essa rápida transmissão de sinal elétrico é facilitada por vias especializadas presentes nos átrios, sendo elas: os tratos intermodais anterior, médio e posterior, localizado na parede do AD, e o feixe de Bachmann, localizado no AE (SANTOS et al., 2017).

A sincronização da despolarização de todas as células atriais é possível devido a propriedade de sincício funcional do músculo cardíaco. Todas as células miocárdicas se apresentam interconectadas por discos intercalares nos quais existem junções comunicantes, que permitem a comunicação direta entre os citoplasmas das células e facilitam a rápida propagação do potencial de ação (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017;). Essa característica do músculo cardíaco é muito importante tendo em vista que sem sinal elétrico não há evento mecânico (contração e relaxamento).

Devido a presença do arcabouço fibroso entre átrios e ventrículos, cardiomiócitos atriais não transmitem sinal elétrico para cardiomiócitos ventriculares (MICHELINI, 2017). Porém, perfurando o arcabouço fibroso, outro tecido nodal, denominado nó atrioventricular, recebe o potencial de ação, despolariza e transmite o sinal para fibras condutoras (fibras do feixe de His e fibras de Purkinje) propagando rapidamente o impulso para todas as células ventriculares (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; SANTOS et al., 2017). Esse sistema de condução é muito rápido e apropriado para contração simultânea dos ventrículos.

Nessa sequência de eventos, átrio e ventrículo atuam juntos como bomba. Duas bombas, portanto, podem ser consideradas: bomba direita e bomba esquerda. Cada uma das bombas ejeta sangue para um circuito específico. A bomba direta ejeta sangue para os pulmões (circulação pulmonar) enquanto que a bomba esquerda bombeia sangue para o corpo (circulação sistêmica) (SANTOS et al., 2017; MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). É imprescindível que as duas bombas funcionem em sintonia, ejetando o mesmo volume sanguíneo na mesma unidade de tempo. As ações sincrônicas das duas bombas cardíacas constituem o clico cardíaco (VASSALO; OLIVEIRA; STEFANON, 2012; MICHELINI, 2017; SANTOS et al., 2017).

O impulso gerado pelo nó sinoatrial (marca-passo do coração) pode sofrer influência do sistema nervoso simpático, acelerando a frequência cardíaca (FC), e pelo parassimpático, cuja regulação é inibitória (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014). O simpático e o parassimpático podem ainda atuar sobre a velocidade de condução do impulso elétrico e sobre a força de contração (inotropismo), cuja ação simpática intensifica os eventos e a parassimpática atua de forma antagônica (VASSALO; OLIVEIRA; STEFANON, 2012; COOTE, 2013; GOURINE et al., 2016; MICHELINI, 2017).

Para gerar pressão necessária e permitir a circulação do sangue por todo o corpo, eventos mecânicos cardíacos como contração (sístole) e relaxamento (diástole) são essenciais.

A unidade estrutural e funcional de contração nos cardiomiócitos são os sarcômeros (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; MICHELINI, 2017). Nos sarcômeros, miofibrilas contráteis estão simetricamente arranjadas em filamentos finos de actina e filamentos grossos de miosina (MOORE; DALLEY; AGUR, 2014; MICHELINI, 2017).

Todos os eventos contráteis são dependentes de cálcio (RINGER, 1882). Em período de repouso, a concentração de íons cálcio (Ca²⁺) citoplasmático é pequena estando a maior parte desse íon armazenada no retículo sarcoplasmático, organela fundamental para os eventos mecânicos, ou fora da célula (VASSALO; OLIVEIRA; STEFANON, 2012; COOTE, 2013; GOURINE et al., 2016; MICHELINI, 2017). Durante a excitação do cardiomiócito, canais de Ca voltagem dependente (tipo L) abrem-se, permitindo entrada de Ca²⁺ para dentro da célula, que por sua vez, atuam sobre canais de liberação de Ca, localizados nas cisternas do retículo sarcoplasmático, liberando mais Ca²⁺ para o citoplasma (OPIE, 2005).

O aumento da concentração de Ca²⁺ no citoplasma desencadeia o processo contrátil. Esse processo ainda é alvo de estudos, porém, é sabido que esse íon interage com uma proteína do complexo troponina, a tropinina C, existente no filamento fino de actina, movimentando moléculas de tropomiosina, liberando sítios específicos do filamento fino e permitindo assim interação entre o filamento fino e grosso (OPIE, 2005).

Segundo Rayment, Holden e Whittaker (1993), o contato entre os filamentos se dá pelo encaixe da cabeça da miosina, presente no filamento grosso de miosina, com a região descoberta do filamento fino de actina. O movimento entre os filamentos é possível devido a mudanças conformacionais que ocorrem na base da cabeça (RAYMENT; HOLDEN; WHITTAKER, 1993). Esse evento necessita de ATP e de seus produtos de degradação para acontecer. O ATP também é importante para separação da cabeça da miosina da região descoberta do filamento fino de actina, permitindo repetição do ciclo. Ainda segundo Rayment, Holden e Whittaker (1993), enquanto houver Ca²⁺ suficiente para continuar ligado a troponina C, vários ciclos podem ocorrer. Esses ciclos deslocam ativamente os filamentos finos de actina em direção ao centro do sarcômero, encurtando-o. A soma do encurtamento dos sarcômeros leva a contração, promovendo a sístole cardíaca (OPIE, 2005).

A fase diastólica, por sua vez, tem início com o sequestro de Ca²⁺ citoplasmático por bombas localizadas no retículo sarcoplasmático (tipo SERCA, cujo funcionamento requer ATP), e pela saída de Ca²⁺ para o meio extracelular (OPIE,

2005). Assim, a diminuição de Ca²⁺ citoplasmático promove o relaxamento das fibras cardíacas.

1.2.3 Regulação da força de contração e relaxamento do músculo cardíaco

Muitos mecanismos podem regular a força de contração (inotropismo) e a força de relaxamento (lusitropismo) do músculo cardíaco. Essa regulação pode ser intrínseca, realizada pelo próprio músculo cardíaco, ou extrínseca, através do controle neural e hormonal (VASSALO; OLIVEIRA; STEFANON, 2012; COOTE, 2013; GOURINE et al., 2016; MICHELINI, 2017).

De duas formas o próprio musculo cardíaco regula sua força contrátil. Ele possui a capacidade de alterar a disponibilidade de Ca²⁺ e também o tamanho inicial do sarcômero, em decorrência de alterações no enchimento da câmara cardíaca na diástole (MICHELINI, 2017).

O tamanho inicial do sarcômero é muito importante para determinar a força de contração. Quanto maior a distenção do sarcômero na diástole, melhor a sobreposição ideal dos filamentos de actina e miosina e maior a força de contração na sístole cardíaca. Redução do tamanho inicial do sarcômero, por sua vez, diminui parcialmente a força contrátil. Essas relações foram propostas por Frank e Starling, sendo hoje conhecida como mecanismo de Frank-Starling (OPIE, 2005). A distenção do sarcômero também aumenta a sensibilidade das miofibrilas contráteis ao Ca²⁺, sendo seu efeito inotrópico maior quanto maior o tamanho inicial do sarcômero na diástole (OPIE, 2005).

Como dito anteriormente, o principal determinante da contração e do relaxamento é a concentração citoplasmática de Ca²⁺. Tanto a estimulação simpática quanto aumento de catecolaminas circulantes podem modular essas concentrações, interferindo no processo contrátil (VASSALO; OLIVEIRA; STEFANON, 2012; COOTE, 2013; GOURINE et al., 2016; MICHELINI, 2017). A estimulação simpática também regula de outras formas a contratilidade cardíaca, podendo, por exemplo, estimular o metabolismo celular e estimular a fosforilação de canais de Ca²⁺, via AMP cíclico, aumentando a força contrátil (OPIE, 2005). O AMPc cíclico gerado nesse processo pode ainda atuar sobre a fosfolamban, uma proteína moduladora localizada no reticulo sarcoplasmático que aumenta a recapitação de Ca²⁺ citoplasmático pela SERCA e, por consequência, aumenta a velocidade de relaxamento cardíaco (OPIE, 2005).

O efeito regulatório hormonal sobre a força de contração pelas catecolaminas secretadas pelas glândulas adrenais também é conhecido; estas atuam de forma muito semelhantes aos efeitos do sistema nervoso simpático (MICHELINI, 2017). Porém, os efeitos persistem por mais tempo, sendo muito importantes em situações crônicas como hipotensão, hipovolemia e até mesmo insuficiência cardíaca (OPIE, 2005).

Além dos mecanismos de regulação citados, alterações hemodinâmicas também podem alterar a força de contração do músculo cardíaco (MURRAY; KORY; CLARKSON, 1969; TRABER; MEYER; TRABER, 1993). Os eventos envolvendo essa modulação estão muito associados com o mecanismo de Frank-Starling.

1.3 Metabolismo do músculo cardíaco

Para realizar o trabalho mecânico contínuo, exercer função de bomba e garantir perfusão tecidual, o coração necessita de oferta contínua de substratos para produção de moléculas energéticas. O ATP é a principal molécula energética do coração e perturbações na sua produção interferem diretamente no trabalho cardíaco (OPIE, 1968; DOENST et al., 2013). Além da contratilidade cardíaca, o ATP é também importante na manutenção da homeostase iônica, garantindo o funcionamento das bombas (GIBBS, 1978; GERTZ et al., 1988; SUGA, 1990). A quantidade de ATP requerida pelo coração é grande e contínua (DOENST et al., 2013). Além do ATP, o coração tem fosfocreatina, que constitui um sistema de vai e vem, transportando ligação fosfato de alta energia da mitocôndria para o citoplasma e contribuindo para suprir as necessidades energéticas (COOK et al., 2001; BEER et al., 2002).

O músculo cardíaco é o tecido que apresenta o maior consumo de oxigênio por grama de tecido do organismo (OPIE, 1968; ALLEN; ORCHAND, 1987; GLATZ; LUIKEN; BONEN, 2001). Para atender o intenso metabolismo aeróbio, o miocárdio apresenta em suas células mioglobinas e numerosas mitocôndrias (GIBBS, 1978). Grande parte do ATP do coração é produzido pela oxidação de ácido graxo (AG), sendo a β-oxidação (via aeróbia) a principal fonte geradora deste (OPIE, 1968).

Outros metabólitos como glicose, lactato, corpos cetônicos e aminoácidos também são usados pelo músculo cardíaco para produção de ATP (OPIE, 1968; WISNESKI et al., 1985; GERTZ et al., 1988). A escolha do substrato energético a ser metabolizado pelo coração pode ser influenciada pela disponibilidade de substratos

na corrente sanguínea (OPIE, 1968). Durante o exercício físico, por exemplo, o aumento da produção de lactato o torna substrato de escolha do músculo cardíaco, o mesmo ocorre com corpos cetônicos durante o jejum e com a glicose no período pósprandial (OPIE, 1968).

O músculo cardíaco também apresenta modulação na seleção do substrato e na atividade metabólica. Interações entre substratos, ação hormonal, expressão gênica de enzimas do metabolismo energético e modificações pós-transcricionais são alguns exemplos (DOENST et al., 2013). A elucidação dessas interações é de grande relevância, principalmente em situações patológicas.

1.3.1 Oxidação de glicose

A glicose é transportada, para o interior do cardiomiócito, por transportadores de glicose (GLUTs), tais como GLUT 1 e GLUT 4 (transportadores clássicos de glicose no músculo cardíaco), sendo este último predominante no coração do adulto (ABEL, 2004; AERNI-FLESSNER et al., 2012). No citoplasma, a glicose é oxidada pela via glicolítica gerando, ao final de sua oxidação, NADH, ATP e piruvato (Figura 1) (NELSON; COX, 2014).

O piruvato gerado na via glicolítica pode ser convertido em lactato, por ação da enzima lactato desidrogenase (LDH), ou ser oxidado, pelo complexo da desidrogenase pirúvica, durante transporte para a matriz mitocondrial, para formar acetil-CoA (BOTAS, 1989; DOENST et al., 2013). Quando a concentração de glicose se eleva na circulação esta pode seguir para a síntese de glicogênio, que constitui uma reserva energética importante para o miocárdio, principalmente em situações de hipóxia (OPIE, 1968; HENNING et al., 1996).

Glicose ATP. Hexocinase ADP < Glicose-6-fosfato Fosfo-hexose-isomerase Frutose-6-fosfato ATP. Fosfofrutocinase-1 Frutose -1,6-bifosfato Aldolase Gliceraldeído-3-fosfato Di-hidroxiacetona-fosfato Tiosefosfato-isomerase (2) Gliceraldeído-3-fosfato (2)Pi (2)NAD+ Gliceraldeido-3-fosfato-desidrogenase (2)NADH + (2)H+ < (2) 1,3-bifosfoglicerato (2)ADP. Fosfoglicerato-cinase (2)ATP (2) 3-fosfoglicerato Fosfoglicerato-mutase (2) 2-fosfoglicerato Enolase 2H₂O (2) Fosfoenolpiruvato (2)ADP-Piruvato-cinase (2)ATP < (2) Piruvato



1.3.2 Oxidação de ácido graxo (AG)

Apesar de ser uma molécula lipossolúvel, podendo por definição passar livremente pela membrana plasmática, o transporte de AG da corrente sanguínea para o interior das células, principalmente AG de cadeia longa, é facilitado por proteínas de transporte de ácido graxo (FATP) (van der VUSSE; van BILSEN; GLATZ, 2000; GLATZ; LUIKEN; BONEN, 2001). No coração, a principal FATP é a FATP6 (GIMERO et al., 2003). No citosol, o AG é esterificado em acil-CoA graxo, que pode seguir para a mitocôndria ou ser esterificado em triglicérides (BOTAS, 1989). O transporte para o interior da mitocôndria envolve conversão do acil-CoA graxo em acil-graxo-carnitina pela enzima carnitina palmitoil transferase I (CPT I), enzima localizada na membrana mitocondrial externa. Vale ressaltar que essa etapa, realizada pela CPT I, representa uma etapa reguladora da oxidação de AG (DOENST et al., 2013). Após a entrada na mitocôndria, e por ação da enzima carnitina palmitoil transferase II (CPT II), o grupo acil se desliga da carnitina e volta a se associar com uma molécula de Coenzima A mitocondrial formando novamente o acil-CoA graxo.

Dentro da mitocôndria o acil-CoA graxo sofre oxidação, pela via da β-oxidação, e gera como produto várias moléculas redutoras (NADH e FADH₂) e acetil-CoA (LOPASCHUK et al., 2010; NELSON; COX, 2014). Tanto o acetil-CoA gerado pela glicólise quanto o acetil-CoA gerado pela β-oxidação podem seguir para o ciclo de Krebs (OPIE, 1968). Os redutores, NADH e FADH₂, gerados no ciclo de Krebs e na βoxidação seguem para as cristas mitocôndriais onde sofrem fosforilação oxidativa (na cadeia respiratória), gerando grande quantidade de ATP (Figura 2) (COOK et al., 2001).



Figura 2 – Etapas da oxidação de ácidos graxos no interior da mitocôndria (adaptado de NELSON; COX, 2014)

Como dito anteriormente, a utilização do substrato pelo tecido cardíaco pode ser modulada por diversos fatores, incluindo interações entre os substratos (DOENST et al., 2013).

Em 1963, Randle e colaboradores propuseram o "ciclo ácido graxo-glicose", ou ciclo de Randle, descrevendo a interação entre esses substratos no músculo cardíaco. Randle propôs que, como consequência da maior disponibilidade de AG, há redução na oxidação de glicose, ou seja, a maior utilização de um substrato pode inibir a utilização do outro. Esse mecanismo foi considerado um ajuste fino na seleção de substrato a ser metabolizado (HUE; TAEGTMEYER, 2009).

O ciclo de Randle foi confirmado e contestado por muitos pesquisadores. No músculo esquelético, por exemplo, o ciclo de Randle parece explicar a preferência desse tecido por AG durante atividade moderada de longa duração, porém, o princípio é falho durante exercício intenso (SILVEIRA et al., 2011).

1.3.4 Mecanismos envolvidos na interação ácido graxo-glicose

Antes de Randle e colaboradores (1963) descreverem o ciclo ácido graxoglicose como mecanismo regulador da utilização desses substratos, os efeitos de hormônios sobre o metabolismo já eram conhecidos (HUE; TAEGTMEYER, 2009). Era sabido, por exemplo, que a diminuição da insulina, que ocorre durante o jejum, estimula a lipólise aumentando assim a oferta de AG para os tecidos e como consequência maior oxidação deste (FRAYN; ARNE; YKI-JARVINEN, 2006).

Randle e colaboradores introduziram um novo mecanismo no controle da utilização de substratos energéticos. O controle do metabolismo, até então assumido ser mediado somente por hormônios, passou também a considerar as interações entre os próprios substratos. A oferta aumentada de AG, causa inibição de várias etapas da via glicolítica tais como: captação de glicose e atividade da hexoquinase e do complexo da desidrogenase pirúvica (RANDLE, 1998).

Após a publicação dos trabalhos de Randle, outros mecanismos relacionados ao controle da utilização de glicose e ácidos graxo foram descobertos. Os receptores ativados por proliferador de peroxissoma (PPAR), por exemplo, foram descritos como sendo importantes reguladores transcricionais do metabolismo lipídico (LOPASCHUK et al., 2010). No coração, o aumento da expressão de PPARα, membro da família PPAR, modula o metabolismo induzindo oxidação de AGs (FINCK et al., 2002). A deleção de PPARα, por sua vez, não somente reduz a oxidação de AG como também aumenta a oxidação de glicose (CAMPBELL et al., 2002). O metabolismo da glicose também pode ser estimulado por ERRα (receptor alfa dependente de estrógeno) por meio da estimulação da transcrição de genes envolvidos no metabolismo desse substrato (HUSS et al., 2004). Tanto PPARα como ERRα podem ainda ser co-ativados pelo coativador 1-alfa do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC1α), e, como consequência, estimular captação de AG e sua oxidação (ROWE; JIANG; ARANY, 2010).

Outro mecanismo de regulação do metabolismo de glicose e AG envolve a proteína quinase ativada por AMP (AMPK). A diminuição de substratos energéticos e o aumento da demanda por ATP podem ativar a AMPK (HARDIE; CARLING; CARLSON, 1998; HARDIE, 2007). Uma vez ativada, a AMPK estimula a oxidação de AG e glicose, vias geradores de ATP (HARDIE; CARLING; CARLSON, 1998; HUE; RIDER, 2007; NAGOSHI et al., 2011). A AMPK pode ainda ativar o PGC1α (ZAHA; YOUNG, 2012).

Também já foi descrito forte regulação pós-transcricional de enzimas do metabolismo de glicose e AGs. Vários miRNAs parecem participar deste tipo de regulação (TSUKAMOTO et al., 2010; SANG et al., 2013).

Em vista do exposto, fica claro que os mecanismos envolvidos na utilização de substratos energéticos e no metabolismo são mais complexos do que parecem. Entendê-los se torna muito relevante, principalmente em condições específicas como o jejum.

2 JUSTIFICATIVA

Em trabalho publicado pelo nosso grupo foi observado redução na área de infarto no coração de ratos submetidos a 48 h de jejum. Esse efeito protetor foi associado a alterações no metabolismo energético do músculo cardíaco, tais como acúmulo de glicogênio e de ATP. Como observado no estudo de Souza Junior et al. (2015), o conteúdo de glicogênio, acumulado no VE do coração de ratos durante o jejum, compensaria a baixa oxidação de AGs na vigência de baixo suprimento de oxigênio, o que manteria a síntese de ATP e consequentemente a viabilidade celular. Em 2009, Kokubun e colaboradores também haviam descrito mudanças induzidas pelo jejum de 48 h, identificando o mesmo aumento do conteúdo de glicogênio no ventrículo esquerdo de ratos.

Como descrito acima, mesmo em situação de jejum prolongado (48h), o músculo cardíaco mantém a produção de ATP e o trabalho cardíaco contínuo. Esse período de jejum deve promover alterações importantes no metabolismo do ventrículo esquerdo que, porém, são pouco conhecidas. Também permanecem desconhecidas as alterações provocadas por esse período de jejum em outras câmaras cardíacas e no septo interventricular. Ademais, não se sabe se existe influência dessas alterações metabólicas, provocadas pelo jejum, na função cardíaca. Frente a isso, a motivação deste estudo foi elucidar as alterações metabólicas provocados pelo jejum de 48h de modo sistemático e detalhado no coração de ratos, assim como alterações causadas por esse mesmo tempo de jejum na função cardíaca.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

O presente estudo teve por objetivo investigar os efeitos do jejum de 48 h no metabolismo e na função cardíaca.

3.2 Objetivos específicos

Investigar no coração de ratos as alterações metabólicas provocadas pelo jejum de 48 h. Para isso, a aurícula do átrio direito (AAD), a aurícula do átrio esquerdo (AAE), parede do ventrículo direito (PVD), septo interventricular (SIV) e parede do ventrículo esquerdo (PVE) foram separados e estudados;

Investigar os efeitos do jejum de 48 h no metabolismo de glicose e AG nas diferentes regiões do coração;

Investigar as alterações provocadas pelo jejum de 48 h na função cardíaca;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e protocolo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pelo CEUA do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), certificado nº 93/2016. Ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos, obtidos do biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica, ICB-USP, foram mantidos em sala com ciclo claro-escuro de 12-12 h e temperatura de 23±2° C, com dieta comercial para ratos (Nuvilab CR-1, Curitiba, PR, BR) e água *ad libitum* até completarem 60 dias. Após esse período, os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: jejuados por 48 h (grupo experimental) e alimentados (grupo controle). Os animais do grupo experimental não tiveram acesso à ração por 48 h antes de serem submetidos à eutanásia, porém, tiveram acesso à água livremente. Os animais do grupo controle foram mantidos com livre acesso à alimentação e água. Os animais foram pesados diariamente, durante o protocolo experimental.

Após eutanásia por decapitação, sangue e coração foram coletados. O coração foi excisado e as quatro câmaras cardíacas separadas. A aurícula do átrio direito (AAD), a aurícula do átrio esquerdo (AAE), a parede do ventrículo direito (PVD), o septo interventricular (SIV) e a parede do ventrículo esquerdo (PVE) foram separadas, pesadas e congeladas imediatamente em nitrogênio líquido. O sangue de cada animal foi coletado em dois tubos, um contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para obter plasma e outro sem EDTA para obter soro. Todo o material coletado foi mantido em congelador a -80°C. O fígado e as gorduras periepididimais dos animais também foram pesadas. Para normalização do peso dos órgãos e tecidos a tíbia direita de cada animal foi removida e medida.

Outro lote de animais da mesma espécie, idade e sexo, também foi separado aleatoriamente nos dois grupos (experimental e controle) para avaliação de variáveis hemodinâmicas e ventriculares. Para isso, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg de p.c; *Syntec*, Cotia, SP, BR), xilazina (10 mg/kg de p.; *Syntec*) e acepromazina (1 mg/kg de p.c; *Syntec*) intraperitoneal, mantidos em respiração espontânea e colocados em decúbito dorsal sobre placa aquecida para realização do cateterismo da carótida. Após perda completa dos reflexos de dor, foi realizado incisão mediana na região ventral do pescoço, com afastamento da musculatura, seguida do

isolamento da artéria carótida direita. A carótida foi canulada com um cateter de polietileno *Tygon (Medical Tubing Saint Gobain*, Akron, OH, EUA) preenchido com salina heparinizada (100 U/mL) e introduzido (após pequena abertura da parede vascular) em direção à aorta. Após registros hemodinâmicos o cateter foi avançado suavemente em direção ao coração até alcançar o VE para obter registros de variáveis desta câmara cardíaca. Ao final dos registros os animais foram submetidos a eutanásia cujo método foi excesso de anestésico.

4.2 Análise do peso corporal, gordura periepididimal, fígado e músculo cardíaco

Os animais dos dois grupos (jejuados por 48 h e alimentados) foram pesados diariamente durante todo o protocolo experimental objetivando identificar possíveis alterações no peso corporal. Os valores do peso corporal dos animais foram expressos em gramas (g). Após eutanásia, além do músculo cardíaco (somatória da AAD, AAE, SIV, PVD e da PVE), o fígado e as gorduras periepididimais também foram pesadas. O peso desses tecidos e órgãos foram normalizados pela medida em milímetros (mm) da tíbia direita de cada animal. Os resultados foram expressos como g/mm (para fígado e gordura periepididimal) e mg/mm (para músculo cardíaco).

4.3 Análise de parâmetros bioquímicos no plasma e soro

As concentrações de glicose, triacilglicerol, colesterol total, HDL, LDL e lactato foram determinadas utilizando kits comerciais específicos (Labtest, Belo Horizonte, MG, BR). O plasma foi utilizado para determinar lactato, seguindo recomendações específicas do fabricante (Lactato enzimático, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, código 138). Para a determinação dos demais parâmetros bioquímicos foi utilizado soro. Glicerol (*Sigma*, Saint Louis, MO, EUA) e β-hidroxibutirato (*Cayman chemical*, Ann Arbor, MI, EUA) também foram mensurados com kits comerciais específicos.

4.4 Determinação das concentrações de substratos no músculo cardíaco

4.4.1 Determinação das concentrações de ATP, lactato e glicogênio

Amostras da AAD, AAE, SIV, PVD e da PVE foram homogeneizadas com ácido perclórico (HClO₄) (0,6 N) utilizando pistilo estéril (*Axygen Scientific*) no mesmo dia da coleta. O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm, 4°C, durante 15 minutos. Uma alíquota do sobrenadante foi neutralizada com bicarbonato de potássio (KHCO₃) a 1M para a quantificação do ATP. O tampão de ensaio consistiu de 75mM cloridrato de Tris (Tris-HCl), 7,5mM cloreto de magnésio (MgCl₂), 0,8mM EDTA, 1,5mM cloreto de potássio (KCl), 4mM β-mercaptoetanol, 0,05% TritonX100, 0,4mM NADP+, 1mM glicose, 10 unidades de hexoquinase+glicose-6-fostato desidrogenase e o homogeneizado (LAMPRECHT; TRAUTSHOLD, 1965). As absorbâncias foram lidas utilizando placa UV em espectrofotômetro *SpectraMax Plus* (*Molecular Devices*, Sunnyvale, CA, EUA) a 340 nm. A concentração de ATP foi expressa em unidade relativa.

Para a determinação de lactato, amostras da AAD, AAE, SIV, PVD e da PVE também foram homogeneizadas com HClO₄ (0,6 N) utilizando pistilo estéril. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm, 4°C, durante 15 minutos e o sobrenadante separado e utilizado para determinar a concentração de lactato seguindo as instruções do fabricante (Lactato enzimático, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, código 138). As absorbâncias foram lidas utilizando placa de 96 poços em espectrofotômetro *SpectraMax Plus* a 340 nm. Os valores estão expressos como miligrama (mg) de lactato por grama (g) de tecido.

Para determinar a concentração de glicogênio nas aurículas dos átrios, na parede dos ventrículos e no septo interventricular, as amostras foram homogeneizadas como descrito acima. Uma alíquota do sobrenadante foi neutralizada com KHCO₃ a 1M e a concentração de glicogênio foi determinada pelo método da amiloglicosidase (KEPPLER; DECKER, 1974). Este método é baseado na conversão do glicogênio em glicose por ação da amiloglicosidase (*Sigma*, Saint Louis, MO, EUA). A concentração de glicose foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico utilizando kit comercial específico (Glicose Liquiform, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, código 133). A concentração de glicogênio foi obtida pela avaliação da glicose na amostra após digestão enzimática. Os valores foram expressos como mg por peso do tecido em gramas.

4.4.2 Determinação das concentrações de ADP, piruvato e glicerol na PVE

Amostras da PVE foram homogeneizadas com HClO₄ (0,6 N) utilizando pistilo estéril (*Axygen Scientific*). O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm, 4°C, durante 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante forem neutralizadas com KHCO₃ a 1M para quantificação de ADP, piruvato e glicerol.

Para determinar a concentração de ADP, do sobrenadante, o tampão de ensaio consistiu de 50mM de Tris-HCl, 2mM sulfato de magnésio (MgSO₄), 5mM de KCl, 0,05% Triton X 100, 2U de lactato desidrogenase (LDH), 4U de piruvato quinase (PK), 0,2mM NADH, 2mM de fosfoenolpiruvato (PEP) e o homogeneizado (ADAM, 1965). As absorbâncias foram lidas, utilizando placa UV, em espectrofotômetro *SpectraMax Plus* a 340 nm. A concentração de ADP foi expressa em unidade relativa.

Para piruvato, o tampão de ensaio consistiu de 100 mM fosfato monopotássico (KH₂PO₄), 10mM de MgCl₂, 80mM KCl, 0,05% TritonX100, 9U LDH, 0,17mM NADH e o homogeneizado (BUCHER et al., 1965). As absorbâncias foram lidas a 340 nm, também em placa UV, utilizando espectrofotômetro *SpectraMax Plus*. A concentração de piruvato foi expressa em micromol (µmol) por grama (g) de tecido.

A concentração de glicerol da PVE foi determinada utilizando kit comercial específico (*Sigma*, Saint Louis, MO, EUA). Os valores estão expressos como miligrama (mg) de glicerol por grama (g) de tecido.

4.5 Atividade máxima de enzimas de vias metabólicas

Amostras da AAD, AAE, da PVD, do SIV e da PVE foram homogeneizadas, utilizando pistilo estéril, em tampão de extração (pH 7,4) contendo: 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, coquetel de inibidor de protease e TritonX100 1%. A atividade máxima das enzimas hexoquinase (HK), fosfofrutoquinase 1 (PFK1), piruvato quinase (PK), citrato sintase (CS), β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH), carnitina palmitoil transferase I (CPTI) e lactato desidrogenase (LDH) foram determinadas a 25°C utilizando espectrofotômetro *SpectraMax Plus*.

Para determinar a atividade máxima da HK (EC 2.7.1.1) o tampão de ensaio consistiu de 75mM Tris-HCl, 7,5mM MgCl₂, 0,8mM EDTA, 1,5mM KCl, 4mM β-mercaptoetanol, 0,05% TritonX100, 0,4mM NADP⁺, 2,5mM ATP, 1,4 U glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e o homogeneizado. A reação foi iniciada com adição

de 1mM de glicose e as absorbâncias foram lidas em placas UV a 340nm (CRABTREE; NEWSHOLME, 1972).

A atividade máxima da PFK1 (EC 2.7.1.56) também foi avaliada em placa UV a 340nm e a reação constituiu de 50mM Tris-HCl, 2mM MgSO₄, 5mM KCl, 0,05% TritonX100, 2U LDH, 4U PK, 1mM ATP, 0,2mM NADH, 2mM PEP e o homogeneizado. A reação foi iniciada com adição de 3mM de frutose-6-fosfato (F6P) (OPIE; NEWSHOLME, 1967).

A reação para determinar a atividade da PK (EC 2.7.1.40) constituiu de 100mM KH₂PO₄, 10mM MgCl₂, 80mM KCl, 0,05% TritonX100, 9U LDH, 0,17mM NADH e 5mM ADP. A adição do homogeneizado e de 2mM de PEP iniciou a reação. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 340nm em placa UV de 96 poços (ZAMMIT; NEWSHOLME, 1978).

A atividade máxima da CS (EC 4.1.3.7) foi determinada em tampão de ensaio (pH 8,1) constituído de 100mM de Tris-HCI, 1mM EDTA, 0,2mM ácido ditionitrobenzóico (DTNB), 0,1mM acetil-CoA, TritonX100 0,05% (v/v) e o homogeneizado. A reação foi iniciada com a adição de 1mM de oxaloacetato e as absorbâncias lidas a 412 nm (ALP; NEWSHOLME; ZAMMIT, 1976).

A reação para determinação da atividade máxima da HOADH (EC 1.1.1.35) foi realizada em uma mistura de reação contendo 100mM KH₂PO₄, 0,4 mM NADH e o homogeneizado. A reação foi iniciada com 5,4mM de acetoacetil-CoA e as absorbâncias lidas a 340 nm em placa UV de 96 poços (LYNEN; WIELAND, 1955).

A atividade máxima da CPTI (EC 2.3.1.21), foi determinada em tampão de ensaio (pH 8,1) constituído de 60mM de Tris-HCI, 1,5mM EDTA, 0,25mM de DTNB, TritonX100 0,05% (v/v), 0,035mM palmitoil-CoA e o homogeneizado. A reação foi iniciada com a adição de 1,25mM L-carnitina e as absorbâncias lidas a 412 nm (BIEBER; ABRAHAM; HELMRATH, 1972).

Por fim, a atividade da LDH (EC 1.1.1.27), isoforma que catalisa a conversão de piruvato em lactato, foi determinada utilizando kit comercial específico (LDH liquiform, Labtest, Belo Horizonte, MG, BR, código 86).

Os resultados das atividades enzimáticas, exceto LDH, foram expressos como µmol/min por grama de tecido. O resultado da atividade da LDH foi expresso em unidade (U) por grama de tecido.
4.6 Extração de RNA total, síntese de cDNA e RT-PCR

Amostras da AAE, AAD, SIV, PVD e PVE foram homogeneizadas com pistilo estéril em 1 mL de reagente TRIzol (*Invitrogen*, SP, BR), seguido da extração de RNA total de acordo com o protocolo padrão do fabricante. A concentração de RNA foi estimada por densidade óptica utilizando Espectrofotômetro DS-11 (*DeNovix Inc.*, Wilmington, DE, EUA). A pureza e possíveis contaminações do RNA, com proteínas ou fenol, também foram analisadas por espectrofotometria nos comprimentos de onda 260/280 e 260/230 nm, respectivamente. Somente amostras com pureza e concentrações de RNA adequadas foram submetidas à síntese de cDNA. Foi utilizando 2 microgramas (µg) de RNA para transcrição reversa e síntese do cDNA utilizando kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems,* Foster City, CA, EUA) de acordo com especificações do fabricante. A reação de transcrição reversa foi realizada na seguinte ordem: 25°C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos.

Para amplificação das sequências de interesse do cDNA, foram usados 1,5 microlitro (μ L) de cDNA, 7,5 μ L de *SYBR Green* (*Applied biosystems*, Woolston, WA, UK), 0,3 μ L de mistura de primer *sense* e *antisense* do gene-alvo (Tabela 1) e 13,5 μ L de água ultrapura autoclavada. A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-PCR - *quantitative real-time polymerase chain reaction*) foi realizada utilizando as seguintes etapas: 40 ciclos de duas fases - a primeira a 95°C por 15 segundos e a segunda a 60°C por 1 minuto - 1 ciclo com três fases - a primeira a 95°C por 1 minuto, a segunda a 55°C por 30 segundos e a terceira a 95°C por 30 segundos. A análise da fluorescência proporcionada pelo *SYBR Green*, conforme amplificação específica da sequência de interesse, foi realizada no detector *Stratagene MX3005P* (*Agilent Technologies*, Waldbronn, GER). O *cycle threshold* (CT) foi avaliado em unicata e duplicata. A expressão relativa dos genes de interesse foi calculada utilizando a fórmula 2^{-ΔΔCT} (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

A expressão do gene que codifica a isoenzima do tipo muscular da fosfofrutoquinase (*pfkm*), da lactado desidrogenase que catalisa a conversão de lactato em piruvato (*ldha*), da citrato sintase (*cs*), da carnitina palmitoil transferase I (*cpt1a*), da isoforma mais presente no coração da enzima carnitina palmitoil transferase I (*cpt1b*), piruvato desidrogenase quinase (*pdk1*), da subunidade catalítica da proteína quinase A (*prkaca*), do coativador de receptor ativado por proliferador

peroxissoma 1 (*ppargc1a*), sirtuína 1 (*sirt1*), glicogênio sintase (*gys2*), glicogênio sintase quinase 3 β (*gsk3b*), da subunidade reguladora de fosfatase 1 de proteína 1C (*ppp1r3c*), glicogênio fosforilase (*pygm*), fosfoelnolpiruvato carbocinase 1 (*pkc1*) e cadeira leve de miosina ventricular (*myl2*) foram normalizadas pela expressão gênica de histona desacetilase (*hdac1*) e subunidade F da RNA polimerase 2 (*polr2f*).

Para análise da expressão do gene *ppp1r3c*, método alternativo foi utilizado, tendo em vista que o *cycle threshold* (CT) do grupo controle não foi detectável. Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1%.

Gene	Sense	Antisense
pfkm	5`-GGGCTTTGAGGCTTACACAGGG -3`	5`-GCTTGATTCGGTCACAGGTCG -3`
ldha	5`-CAGACAAGGAGCAGTGGAAGG-3`	5`-TAATCATGGTGGAAATGGGATG-3`
CS	5`-AGGTGCTTGTCTGGCTGACG-3`	5`-TCGCTGACAGGAATATGG-3`
cpt1a	5`-ATTCCAGGAGAGTGCCAGGAGG-3`	5`-CCCATGTCCTTGTAATGTGCGAG-3`
cpt1b	5`-TTCACCTGGGCTACACGGAGAC-3`	5`-TCTGGCACTGCTCGGGAATG-3`
pdk1	5`-CCGAAAGACATGACGACGTT-3`	5`-GACTTCACACTCCATACCGC-3`
prkaca	5`-GGATTGGGAGGTTCAGTGAGCC-3`	5`-GCAGAAGGTTCCGAAGCAGGTC-3`
ppargc1a	5`-AGAGGATTTTTGTTGTTGTTTGTTTGTT-3`	5`-ASCAACCTCCCTTCTCCTATACAACT-3`
sirt1	5`-GACGATGACAGAGCATCACACGC-3`	5`-TGTTCGAGGATCGGTGCCAATC-3`
gys2	5`-AGCATGTGGCTGACCCTACC-3`	5`-TGCCCAGGTATCTCCAGTCC-3`
gsk3b	5`-ATCCTTATCCCTCCTCACGCTC-3`	5`-GACCAGTGTTGCTGAGTGGCAC-3`
ppp1r3c	5`-CATTTCCTACCATGCTAACGGG-3`	5`-AAGCCTCGGACTGCCAAAG-3`
pygm	5`-CCAAGAGAGTGGACACGGATG-3`	5`-CTGACGAGAAGGTTCAACACCC-3`
myl2	5`-TGTTCCTCACCATGTTTGGG-3`	5`-AGAACCTCTCTGCTTGCGTG-3`
pck1	5`-TGGTCTGGACTTCTCTGCCAAG-3`	5`-AATGATGACCGTCTTGCTTTCG-3`
hdac1	5`-GCCAGTCATGTCCAAAGTAATGG-3`	5`-CATTAGGGATCTCTGTGTCCAGG-3`
polr2f	5`-GGGCTCTCCAGATTGCGATG-3`	5`-TGGCAGGTAACGGCGAATG-3`

Tabela 1 - Primers utilizados para avaliação da expressão gênica por RT-PCR

4.7 Expressão proteica pela técnica Western Blot

Para extração de proteínas, fragmentos da PVE foram homogeneizadas, utilizando pistilo estéril, em tampão Tris-EDTA (100mM Tris, 2mM EDTA, pH 7,4) com inibidores de protease (10mM pirofosfato de sódio, 100mM fluoreto de sódio, 10mM ortovanadato de sódio, 2mM fenilmetilsulfonilfluoreto, 0,01mg/mL aprotinina). O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm, 4 °C, por 20 minutos e a concentração de proteínas do sobrenadante de cada amostra foi mensurada com kit *BCA Protein Assay* (*Thermo Scientific*, Wilmington, DE, EUA). Após quantificação da concentração proteica, o sobrenadante foi diluído em tampão *Laemmli* (240mM Tris-HCI, 0,8% dodecil sulfato de sódio, 40% glicerol, 0,02% azul de bromofenol e 200mM β -mercaptoetanol).

Quantidades iguais de proteínas das amostras (30 microgramas) foram separadas por eletroforese em gel *SDS*-poliacrilamida (*SDS-PAGE - sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) de acordo com Shapiro, Viñuela e Maizel (1967). Em seguida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose por transferência eletroforética (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Para confirmar a transferência das proteínas, as membranas de nitrocelulose foram coradas com *Ponceau* (0,1% *Ponceau* S, 10% ácido acético glacial), e um padrão de peso, *Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad,* Carlsbad, CA, EUA), foi utilizado para estimar o peso molecular das proteínas ligadas as membranas. Após registro de imagem, todo o *Ponceau* foi removido com tampão TBST (10mM Tris, 150 mM cloreto de sódio, 0,1% de Tween 20, pH 7,6).

Para visualizar somente a proteína de interesse, as membranas foram bloqueadas, por uma hora, com solução de *BSA* a 5% (albumina sérica bovina 5%), evitando ligações inespecíficas. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários de interesse por 18 horas, a 4 °C, sob constante agitação e posteriormente incubadas por uma hora, a temperatura ambiente, com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (*Anti-Rabbit* IgG-HRP).

Após tratamento com o reagente de detecção ECL (*SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific,* Waltham, MA, EUA), as imagens foram captadas pelo sistema de detecção *Amersham Imager* 600 (*GE Healthcare,* Waukesha, WI, EUA) e quantificadas com auxílio do *software ImageJ* (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram normalizados pela carga total de proteína utilizada

por amostra, mensurada na coloração com *Ponceau* (ROMERO-CALVO et al., 2010; GILDA; GOMES, 2013).

Anticorpos primários utilizados:

(*p-AMPKα*) Phospho-AMPKα em Thr172, rabbit (#4188 - Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA) (*p-GSK3β*) Phospho-GSK-3β em Ser9, rabbit (#9336 - Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA)

Anticorpo secundário utilizado:

Anti-Rabbit IgG-HRP (#7074S - Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA)

4.8 Registros hemodinâmicos e ventriculares e hematócrito

4.8.1 Registros hemodinâmicos e ventriculares

Para realizar os registros hemodinâmicos e ventriculares, animais dos dois grupos (controle e jejum 48h) foram anestesiados e submetidos a procedimento cirúrgico (conforme descrito anteriormente) para implantação de cateteres na carótida direita em direção a aorta.

O registro direto da pressão arterial pulsátil se deu através da conexão da cânula arterial ao transdutor de pressão (*ADInstruments*, Bella Vista, NSW, AU) acoplado ao pré-amplificador *PowerLab* (*ADInstruments*). Após estabilização do sinal, registros hemodinâmicos e variáveis ventriculares foram gravadas em um microcomputador equipado com *software LabChart Pro* (*ADInstruments*).

Os registros de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) foram gravados durante dez minutos. Posteriormente, o cateter foi avançado suavemente em direção ao coração até que ponta do mesmo ficasse posicionada no VE. A confirmação do correto posicionamento do cateter na câmara cardíaca foi possível através da observação da mudança simultaneamente no padrão do registro pulsátil (Figura 3).



Figura 3 – Representação de um canal de registro do software LabChart Pro (ADInstruments) ilustrando as diferenças entre o padrão de registro da pressão arterial e da pressão ventricular. Registro obtido de um rato do grupo controle

A pressão sistólica (PSVE) e pressões diastólicas inicial (pD₁VE) e final (pD₂VE) do ventrículo esquerdo, assim como suas primeiras derivadas temporais positiva (dP/dt+) e negativa (dP/dt-) foram gravadas durante 10 minutos. As derivadas temporais foram determinadas através de uma função diferencial realizada pelo *software LabChart Pro* que capta o registro contínuo da pressão do ventrículo esquerdo e o diferencia em dP/dt+, equivalente a rampa de subida de desenvolvimento de pressão e, dP/dt-, equivalente a rampa de decremento da pressão ventricular (Figura 4).



Figura 4 – Janela de visualização do software LabChart Pro (ADInstruments). No canal inferior está representado o gráfico gerado pelo software da derivada de pressão pelo tempo (dP/dt). Registro obtido de um rato do grupo controle

As análises dos registros foram realizadas com o próprio software LabChart Pro que permite seleção e cálculos. Os registros realizados permitiram a mensuração dos valores da pressão arterial média (PAM), FC, dP/dt+, dP/dt-, PSVE, pD₁VE, pD₂VE, e do tempo de enchimento diastólico do VE.

Os valores da PAM, FC, dP/dt+, dP/dt- e PSVE são médias de 1 minuto de gravação calculadas automaticamente pelo *software*. Os valores da pD₁VE, pD₂VE, e do tempo de enchimento diastólico do VE foram calculadas em planilha *Microsoft Office Excel* (2016) a partir de dados coletados manualmente no *software* no intervalo de 10 segundos de gravação.

4.8.2 Hematócrito

Hematócrito dos animais foi realizado através do método descrito por Dacie e Lewis (2008). Para isso, sangue da cauda foi coletado em tubo capilar de 1,5 x 75 mm heparinizado (INTERLAB, Vila Campestre, SP, BR) e após coleta uma das extremidades do capilar foi ocluída com massa de modelagem. Os capilares foram centrifugados em centrífuga para microhematócrito a 12.000 rpm durante 5 minutos.

Após centrifugação, eritrócitos ficaram compactados na parte inferior do tubo permitindo mensurar o volume por eles ocupado em relação ao sangue total. A mensuração foi realizada com auxílio de uma escala de leitura, limitando as marcas de 0 (extremidade inferior da coluna de hemácias) a 100 (menisco do plasma) e procurando na escala o limite de separação da massa dos eritrócitos/plasma. O resultado foi expresso em porcentagem (%) de eritrócitos em relação ao sangue total.

4.9 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (DP) e analisados pelo teste *t-Student* para comparar dois grupos: controle e jejum (48 h). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para p<0,05. Todos os resultados foram analisados utilizando o *software* de estatística *GraphPad Prism 6.0* (*GraphPad Software*, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Peso corporal e peso da gordura periepididimal, fígado e músculo cardíaco

O jejum de 48 h provocou alterações significativas no peso corporal e no peso de alguns órgãos e tecidos. Após 48 h de jejum houve redução significativa no peso corporal, cerca de 15% (Figura 5). Também foi observado redução de 24% do peso da gordura periepididimal e expressiva redução do peso do fígado em cerca de 56%, quando comparados ao grupo controle (Figura 6). Não houve diferença significativa no peso do músculo cardíaco entre os animais jejuados e não jejuados.



PESO CORPORAL

Figura 5 – Peso corporal. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n = 9-8). Foi aplicado o teste *t-Student* (***p<0,001) para a comparação entre os tempos nos dois grupos



Figura 6 – Peso da gordura periepididimal, fígado e músculo cardíaco. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n = 9-8). Foi aplicado o teste *t-Student* (***p<0,001, ****p<0,0001) para a comparação entre os grupos

5.2 Parâmetros bioquímicos no plasma e soro

Na Figura 7 estão apresentadas as concentrações plasmáticas de glicose, triacilglicerol, colesterol total, HDL, LDL, lactato, β -hidroxibutirato e glicerol dos grupos controle e jejum (48 h). Com o jejum de 48 h houve diminuição da concentração de glicose, cerca de 35%, e de triacilglicerol, cerca de 70%, em relação ao controle. Também houve aumento expressivo de β -hidroxibutirato após esse período de jejum, cerca de 96%, quase o dobro em relação ao controle. As concentrações de colesterol total, HDL, LDL, lactato e glicerol não apresentaram diferença significativa.



Figura 7 – Concentrações de parâmetros bioquímicos no plasma e soro. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n = 10-8). Foi aplicado o teste *t-Student* (****p<0,0001) para a comparação entre os grupos

5.3 Concentrações de ATP, lactato e glicogênio

Houve aumento da concentração de ATP em todas as regiões do coração de ratos jejuados, quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 8). Na AAD houve aumento de 72% da concentração de ATP, na AAE o aumento foi de quase duas vezes (183%), no SIV o aumento foi de 25%, na PVD houve aumento de quase 3 vezes (267%) e na PVE o aumento foi de 29% em relação ao grupo controle.

Não houve diferença significativa da concentração de lactato na AAD, AAE, SIV e na PVD quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 9). Entretanto, na PVE, houve diminuição de 20% da concentração de lactato no grupo jejum quando comparado com o controle.

O jejum de 48 h aumentou significativamente a concentração de glicogênio no SIV e na PVE (Figura 10). No SIV o aumento foi de 46% e na PVE de 33%, ambos em relação ao grupo controle. Não houve diferença significativa da concentração de glicogênio na AAD, na AAE e na PVD.



Figura 8 – Concentração de ATP na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=8-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001) para a comparação entre os grupos. (unidade relativa AAD= 0,36 µmol/g de tecido, unidade relativa AAE= 0,39 µmol/g de tecido, unidade relativa SIV= 0,77 µmol/g de tecido, unidade relativa PVD= 0,27 µmol/g de tecido, unidade relativa PVE= 0,85 µmol/g de tecido)



Figura 9 – Concentração de lactato na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=6-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 10 – Concentração de glicogênio na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=7). Foi aplicado o teste *t-Student* (**p<0,01) para a comparação entre os grupos

5.4 Concentrações de piruvato, ADP e glicerol na PVE

Não houve diferença significativa nas concentrações de piruvato, ADP e glicerol na PVE entre os grupos controle e jejum 48 h (Figura 11).



Figura 11 – Concentração de piruvato, ADP e glicerol na PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=7-8). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos (unidade relativa PVE= 14,02 µmol/g de tecido)

5.5 Atividade máxima das enzimas

A atividade máxima das enzimas HK, PFK1 e PK diminuíram na AAD e no SIV dos animais jejuados por 48 h (Figuras 12, 13 e 14). O contrário ocorreu na PVE, onde a atividade máxima dessas três enzimas aumentou significativamente nos animais jejuados. Não foi observado diferença significativa na atividade da HK, PFK1 e da PK na AAE e na PVD.

A atividade máxima da CS aumentou no SIV após jejum de 48 h (Figura 15). Não houve diferença da atividade da CS na AAD, AAE, PVD e PVE.

Aumento significativo na atividade da HOADH foi observado na PVD do grupo jejum (Figura 16). Na AAD, AAE, SIV e PVE não houve diferença significativa na atividade máxima desta enzima.

A atividade máxima de CPT I aumentou significativamente na PVE dos animais jejum, quando comparado ao controle (Figura 17).

Não houve diferença significativa na atividade máxima da enzima LDH (piruvato=>lactato) na PVE (Figura 18) entre os grupos.



Figura 12 – Atividade da hexoquinase (HK) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n= 8-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05, **p<0,01) para a comparação entre os grupos



Figura 13 – Atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK1) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=8-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05, ****p<0,0001) para a comparação entre os grupos



Figura 14 – Atividade da piruvato quinase (PK) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n= 7-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 15 – Atividade da citrato sintase (CS) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n= 7-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (**p<0,01) para a comparação entre os grupos



Figura 16 – Atividade da β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=7-8). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 17 – Atividade da carnitina palmitoil transferase I (CPT I) na PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=8-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 18 – Atividade da lactato desidrogenase (LDH) na PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos

5.6 Expressão gênica pela técnica RT- PCR

A expressão do gene *pfkm* diminuiu no SIV nos animais do grupo jejum (48h), quando comparados aos do grupo controle (Figura 19). Não houve diferença da expressão gênica de *pfkm* na AAD, AAE, PVD e PVE.

Houve aumento significativo na expressão gênica de *Idha* na PVE dos animais jejuados, quando comparados ao grupo controle (Figura 20). Na AAD, AAE, SIV e PVD não houve diferença significativa.

A expressão do gene *cs* aumentou, em resposta ao jejum, na PVD, no SIV e na PVE (Figura 21). Não houve diferença significativa na expressão gênica de *cs* na AAD e na AAE.

Todas as regiões analisadas do coração (AAE, AAD, SIV, PVD e PVE) apresentaram aumento significativo na expressão do gene *cpt1a* por efeito do jejum (Figura 22). A expressão do gene *cpt1b* também aumentou na PVE (Figura 22).

Na PVE o jejum de 48h aumentou significativamente a expressão dos genes *pdk1* (Figura 23), *gys2* (Figura 25) e de *prkaca*, *ppargc1a* e *sirt1* (Figura 24). Nessa região também houve aumento significativo na expressão gênica de *pck1* após 48 h de jejum (Figura 26).

Para analisar a expressão do gene *ppp1r3c*, os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel agarose 1%. O jejum aumentou significativamente a expressão do gene *ppp1r3c* na PVE (Figura 28).

Não houve diferença significativa na expressão dos genes *gsk3b* e *pygm* (Figura 25) entre os grupos controle e jejum. O jejum de 48h também não alterou a expressão do gene *myl*2 na PVE (Figura 27).



Figura 19 – Expressão gênica de *pfkm* **na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE.** Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=7-13). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 20 – Expressão gênica de *Idha* **na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE.** Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=7-11). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 21 – Expressão gênica de *cs* **na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE.** Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=6-7). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 22 – Expressão gênica de *cpt1a* **na AAD, AAE, SIV, PVD e PVE e expressão de** *cpt1b* **na PVE.** Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=7-11). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001) para a comparação entre os grupos



Figura 23 – Expressão gênica de *pdk1* **na PVE.** Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=8). Foi aplicado o teste *t-Student* (**p<0,01) para a comparação entre os grupos



Figura 24 – Expressão gênica de *prkaca, ppargc1a* **e** *sirt1* **na PVE.** Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=6-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05, ****p<0,0001) para a comparação entre os grupos



Figura 25 – Expressão gênica de gys2, gsk3b e pygm na PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=6-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 26 – Expressão gênica de *pck1* **na PVE.** Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=6). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 27 – Expressão gênica de *myl2* **na PVE.** Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=10-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos



Figura 28 – Eletroforese em gel de agarose 1%. Produtos da amplificação por PCR do gene de interesse *ppp1r3c* e do gene de referência *hdac* da PVE. (n=6) (ctl=grupo controle; jejum= grupo jejum 48h)

5.7 Expressão proteica por Western Blot

O jejum de 48 h aumentou significativamente a expressão de p-AMPKα (Figura 29) na PVE. Não houve diferença significativa de p-GSK3β na PVE entre os grupos.



Figura 29 – Expressão proteica de p-AMPKα e p-GSK3β na PVE. Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=6-9). Foi aplicado o teste *t-Student* (**p<0,01) para a comparação entre os grupos

5.8 Variáveis hemodinâmicas e função ventricular esquerda

O jejum de 48h alterou variáveis hemodinâmicas e ventriculares. Os ratos jejuados por 48 h apresentaram frequência cardíaca reduzida, diminuição na força de contração (dP/dt+) e na força de relaxamento (dP/dt-), assim como diminuição da pD1VE e aumento do tempo de enchimento diastólico do VE (Figura 30). Não houve alteração significativa na pressão arterial média entre os grupos.



Figura 30 –Variáveis hemodinâmicas e ventriculares. Os valores estão expressos como média \pm desvio padrão (n=4-5). Foi aplicado o teste *t-Student* (*p<0,05) para a comparação entre os grupos

Houve aumento significativo no hematócrito dos animais que ficaram em jejum por 48h quando comparados aos animais controle (Figura 31). O aumento foi de cerca de 9%.



HEMATÓCRITO

Figura 31 – Hematócrito de animais do grupo controle e jejum (48h). Os valores estão expressos como média ± desvio padrão (n=6). Foi aplicado o teste *t-Student* (**p<0,01) para a comparação entre os grupos

6 SINTESE DOS RESULTADOS

Alterações corporais e plasmáticas provocadas pelo jejum de 48 h:

- diminuição do peso corpóreo;
- diminuição do peso do fígado e do tecido adiposo periepididimal;
- diminuição da concentração plasmática de glicose e triacilglicerol;
- aumento da concentração plasmática de β-hidroxibutirato;

Principais alterações gênicas e metabólicas provocadas pelo jejum de 48 h nas diferentes estruturas cardíacas analisadas (AAD, AAE, SIV, PVD e PVE):

- aumento da expressão do gene que codifica CPT1 (cpt1a), e da concentração de ATP em todas as regiões analisadas;
- diminuição da atividade máxima das enzimas HK, PFK1 e PK na AAD e no SIV;
- aumento da atividade máxima das enzimas HK, PFK1 e PK na PVE;
- aumento da concentração de glicogênio no SIV e na PVE;
- aumento da expressão do gene que codifica glicogênio sintase (gys2) e da subunidade reguladora de fosfatase 1 de proteína 1C (ppp1r3c) na PVE;
- aumento da AMPKα fosforilada (p-AMPKα);
- aumento da expressão do gene que codifica AMPKα (*prkaca*), do PGC1α (*ppargc1a*) e da SIRT1 (*sirt1*) na PVE;
- diminuição da concentração de lactato sem alteração da concentração de piruvato na PVE;
- aumento da expressão do gene que codifica a lactato desidrogenase que catalisa a conversão de lactato em piruvato (*Idha*) e da piruvato desidrogenase quinase 1 (*pdk1*) na PVE;
- aumento da expressão do gene que codifica a enzima fosfoelnolpiruvato carbocinase 1 (*pkc1*);

Alterações hemodinâmicas e funcionais provocadas pelo jejum de 48 h:

- diminuição do inotropismo;
- diminuição do lusitropismo;
- diminuição da FC;
- aumento do tempo de enchimento diastólico;

Alterações no hematócrito provocado pelo jejum de 48 h:

• aumento do hematócrito;

7 DISCUSSÃO

Foram investigados os efeitos do jejum de 48 h no metabolismo de diferentes regiões do coração, assim como na função cardíaca. Esse período de jejum promoveu várias alterações.

Após 48 h de jejum, observamos diminuição significativa no peso corpóreo dos ratos (15%), assim como diminuição no peso do fígado (56%) e da gordura periepididimal (24%), quando comparado com animais alimentados.

Alterações semelhantes foram descritas na literatura. Em 1971, Furner e Feller relataram que ratos submetidos a vários períodos de jejum exibiam perda de peso corpóreo significativa, principalmente após 24 e 48 horas de jejum. Nowland, Hugunin e Rogers (2011), utilizando ratos *Sprague Dawley* machos, também observaram diminuição do peso corporal após 24 h de jejum. Gursoy et al. (2001), por sua vez, observaram diminuição do peso de vários órgãos, como fígado e timo, em ratos submetidos a jejum, quando comparado com ratos alimentados. Redução do peso corpóreo e do fígado também foi observado em camundongos submetidos a 48 h de jejum (WARWICK et al., 1985). Em camundongos também foi observado que longos períodos de jejum reduziam significativamente estoques de gorduras (BRONSON, 1987). Perda de massa gorda, provocada pelo jejum, também foi descrito por Ayala et al. (2006).

Devido a esses efeitos, períodos longos de jejum têm sido utilizado como estratégia para controle e perda de peso, sendo indicado por muitas clínicas como tratamento auxiliar na obesidade. Segundo Longo e Mattson (2014) muitas clínicas ainda monitoram pacientes durante períodos de jejum prolongado, com duração de 1 semana ou mais, para controle de peso e também como método de prevenção e tratamento de doenças.

Além de alterações corpóreas, também observamos alterações de metabólitos plasmáticos, provocadas pelo jejum de 48 h. Os valores plasmáticos de glicose e triacilglicerol diminuíram significativamente com o jejum (35% e 70% respectivamente), quando comparado ao controle. O contrário ocorreu com a concentração de β -hidroxibutirato plasmático (corpos cetônicos) cujo aumento foi eminente (96%). Esse efeito cetogênico do jejum é consenso entre vários autores e já foi descrito em várias espécies.

È sabido que em humanos, após jejum de 12 a 24 horas, tem-se diminuição sérica expressiva de glicose (devido à falta de ingesta de alimentos), depleção do glicogênio hepático, intensa oxidação de AGs livres e por consequência produção de corpos cetônicos, principalmente β-hidroxibutirato (OPIE, 1968; LONGO; MATTSON, 2014; CURI, 2017). Em estudo realizado por Hashimoto et al. (2000), com camundongos, também foi observado, após 48 h de jejum, diminuição da concentração de glicose plasmática, redução dos níveis plasmáticos de triacilglicerol e aumento de AG livres acompanhado de elevação de β-hidroxibutirato plasmático.

Segundo Opie (1968) e Botas (1989), longos períodos de jejum desencadeiam intensa lipólise do tecido adiposo assim como hidrólise de triacilglicerol fornecendo grandes quantidades de AGs passíveis de metabolização. Ao analisarmos a expressão do gene que codifica CPT1 (cpt1a), enzima chave para a oxidação de ácidos graxos, observamos que todas as estruturas cardíacas analisadas (AAD, AAE, PVD, PVE e SIV) apresentaram aumento significativo na expressão dessa enzima (Figura 32). A CPT I é uma enzima que converte o complexo acil-CoA graxo em acilcarnitina, molécula prontamente transferida para a matriz mitocondrial pela carnitina translocase. Dentro da mitocôndria, o grupo acil se separa da carnitina e se liga a uma nova molécula de Coenzima A por ação da CPT II, reconstituindo o acil-CoA graxo que pode então seguir para a β -oxidação (IDELL-WENGER; GROTYOHANN; NELLY, 1978; WILLIAMSON, 1979; VARY; REIBEL; NEELY, 1981; LOPASCHUK et al., 2010). O aumento da oxidação de AG promove aumento de citrato, ATP e acetil-CoA, cujo acúmulo pode dar origem a corpos cetônicos (RANDLE et al., 1963; KERNDT et al., 1982; LONGO; MATTSON, 2014; CURI, 2017). Corpos cetônicos, como β-hidroxibutirato e acetoacetato, são muito utilizados por órgãos vitais como coração e cérebro, servindo como um importante substrato energético (LONGO; MATTSON, 2014; CURI, 2017).

Assim como aumento da expressão do gene que codifica CPT1 *(cpt1a),* aumento de ATP, provocado pelo jejum, também foi observado em todas as estruturas cardíacas analisadas (Figura 32). Mesmo tratando-se de um período de completa privação alimentar, passando o organismo a depender somente de substratos endógenos, o jejum de 48 h não inibiu os processos geradores de ATP no músculo cardíaco; ao contrário, curiosamente promoveu elevação. Dados similares foram observados por Van der Lee et al. (2001) e de Souza Junior et al. (2015).

Em estudo realizado com ratos machos *Sprague Dawley* jejuados por 46 h, Van der Lee et al. (2001) relataram que o aumento de AG circulantes implica em uma fonte melhorada deste substrato para o miocárdio, cujo catabolismo gera grandes quantidades de ATP. No mesmo trabalho foi relatado que proteínas envolvidas no transporte de AG para dentro dos cardiomiócitos aumentam significativamente com o jejum. Souza Junior et al. (2015), por sua vez, utilizando ratos *Wista*r machos, identificou aumento da concentração de AG circulante (2 vezes maior), intensa mobilização de triglicérides e aumento da concentração de ATP (33%) no VE do coração de ratos submetidos a 48 h de jejum, em comparação com ratos alimentados, sugerindo que essas alterações são adaptações metabólicas ao jejum, podendo ter efeitos cardioprotetores em situações patológicas. Apesar do aumento da expressão gênica de CPT1 e do aumento de ATP terem sido comuns em todas as estruturas cardíacas analisadas, o perfil das vias metabólicas, após jejum, se mostraram diferentes.

Ao analisarmos enzimas chave da via glicolítica, observamos perfis diferentes, principalmente na AAD, SIV e PVE (Figura 33). Na AAD e no SIV a atividade máxima das enzimas HK, PFK e PK apresentaram diminuição significativa no grupo jejum, quando comparado ao controle (Figura 33a / 33d). O contrário foi observado na PVE, onde a atividade máxima dessas enzimas aumentou (Figura 33e).

Os resultados citados levam-nos a propor que o ciclo ácido graxo-glicose, proposto por Randle et al. (1963), parece ser efetivo na AAD e no SIV. Porém, não nos ajuda a entender a origem das alterações citadas na PVE.

Segundo Randle et al. (1963), o aumento da oxidação de AG interfere na oxidação de glicose por efeito inibitório em várias etapas e enzimas da via glicolítica, como inibição da enzima PFK, e inibição alostérica de HK (via G6P) e PK. Essas interações elucidam a gênese da redução do potencial glicolítico observado na AAD e no SIV, e também é sugestivo para compreensão do acúmulo de glicogênio observada no SIV, tendo em vista que a redução do potencial glicolítico nesta região pode não somente estar poupando glicose como permitindo seu redirecionamento para síntese de glicogênio.

Como dito anteriormente, apesar de aplicável na AAD e no SIV, as interações propostas por Randle et al. (1963) no ciclo ácido graxo-glicose não nos ajuda a esclarecer as alterações observadas na PVE. Diferente das outras estruturas, observamos que na PVE tanto o potencial oxidativo de AG quanto o glicolítico parecem estar aumentados; o acúmulo de glicogênio também foi observado nesta região (Figura 34e). Outros mecanismos, portanto, devem estar regulando o metabolismo cardíaco durante o jejum prolongado.

Segundo Hardie (2007), a AMPK é o principal sensor de energia das células, sendo intensamente ativada por inúmeras situações que de alguma forma altere o metabolismo, a disponibilidade de substrato e a demanda de energia.

Em estudo realizado com camundongos, foi observado aumento da atividade de AMPK hipotalâmico durante jejum (MINOKOSHI et al., 2004). Resultados semelhantes foram obtidos em estudo feito com ratos *Sprague Dawley*, cujo aumento da atividade de AMPK no hipotálamo também foi evidenciada após 48 h de jejum (MURPHY et al., 2009). Recentemente, o aumento de AMPK, promovido pelo jejum, foi evidenciado em vários outros tecidos. Lee et al. (2017), em trabalho realizado com elefante marinho do norte, verificaram aumento de AMPK muscular após longos períodos de jejum. Todos esses autores consideraram, em seus estudos, que o aumento de AMPK é importante para regular adaptações metabólicas e fisiológica ao jejum prolongado.

Uma ação frequentemente mencionada da AMPK é seu papel na ativação do catabolismo, tanto de AG guanto de glicose. Vários são os mecanismos pelos guais AMPK ativa o catabolismo lipídico, sendo o aumento de captação de AG e o aumento da atividade de CPT1 os mais prevalentes (HARDIE; HAWLEY, 2001; HARDIE et al., 2003; HABETS et al., 2009). Evidências também indicam a ação de AMPK sobre biogênese mitocondrial por ativar PGC-1α (LIN; HANDSCHIN; SPIEGELMAN, 2005; O'NEILL et al., 2011), que pode ser mediada por SIRT1 (RODGERS; PUIGSERVER, 2007; ATTIA et al., 2010). Ainda, há evidencias da existencia de feedback positivo entre AMPK e SIRT1, e da estimulação pela SIRT1 de genes mitocondriais envolvidos na oxidação de AG e na gliconeogênese (GERHART-HINES et al., 2007; RODGERS; PUIGSERVER, 2007; LAN et al., 2008). Como mencionado, AMPK também ativa a oxidação de glicose, principalmente por aumentar a expressão de genes que codificam enzimas da via glicolítica, como a enzima HK (ZHENG et al., 1985; STOPPANI et al., 2002). Estudo realizado em cardiomiócitos demonstraram que AMPK pode ainda atuar sobre a via glicolítica, estimulando fosforilação e controle alostérico. No mesmo estudo, foi identificado maior atividade da enzima PFK 1 (MARSIN et al., 2000; MARSIN et al., 2002).

Esses dados corrobaram os resultados conflitantes que encontramos no PVE, e ao analisarmos a expressão do gene que codifica AMPKα (*prkaca*) e o conteúdo da proteína fosforilada, vimos aumento nessa região. A sequência de ações realizadas pela AMPK no aumento de oxidação de AG e glicose parece condizer com nossos achados na PVE. Outro achado conflitante nessa região foi o aumento de glicogênio, e duas ações da AMPK sobre o glicogênio já foram descritas. Apesar de muitos autores afirmarem a ação inibitória de AMPK na síntese de glicogênio, tem sido descrito que a ativação crônica e prolongada da AMPK resulta em efeito contrário nos músculos esqueléticos e cardíacos (ARAD; SEIDMAN; SEIDMAN, 2007; HUNTER et al., 2011). Nos parece claro o envolvimento de AMPK com as alterações metabólicas provocadas pelo jejum na PVE. Porém, essa associação não nos concede entendimento claro sobre a origem do esqueleto de carbono utilizado para a síntese do glicogênio acumulado durante o jejum.

Na literatura, algumas possibilidades já foram descritas. Vários autores afirmam que cardiomiócitos expressam aquoporina 7 (AQP7) (BUTLER et al., 2006; EGAN et al., 2006). Além de ser permeável a água, a AQP7 também atua como um facilitador de glicerol para o tecido cardíaco, que pode utilizar esse substrato para produção de energia (GAMBERT; HELIES-TOUSSAINT; GRYNBERG, 2005; HIBUSE et al., 2009). Curiosamente, durante o jejum, devido intensa lipólise e hidrólise de triacilgricerol plasmático, grande quantidade de glicerol é gerado, e portanto, passível de metabolização (JENSEN et al., 2013; LONGO; MATTSON, 2014).

Em 2013, Jin, Sherry e Malloy, descreverem uma via alternativa no coração, pelo qual o glicerol, além de ser metabolizado a piruvato, poderia também ser encaminhado a glicogênio. Após perfundir coração de ratos com glicerol marcado, os autores perceberam que carbonos do glicerol apareceram em várias unidade glicosil do glicogênio cardíaco. Sabe-se que o glicerol é fosforilado pela glicerol quinase para formar o glicerol 3-fosfato, e este intermediário é então convertido pela glicerol 3 fosfato desidrogenase em dihidroxiacetona fosfato (GAMBERT; **HELIES-**TOUSSAINT; GRYNBERG, 2005; NELSON; COX, 2014). A partir desta etapa, Jin, Sherry e Malloy (2013) sugerem que por ação da aldolase b, dihidroxiacetona fosfato é convertido em frutose 1,6-bifosfato. Posteriormente, a enzima frutose 1,6 bifosfatase catalisa a conversão em frutose 6-fostato que, por sua vez, sofre ação da fosfoglimutase isomerase formando glicose 6-fosfato, seguindo para síntese de glicogênio.

Diante dos achados citados, nos parece promissor considerar o glicerol como importante fonte de carbono para síntese de glicogênio, durante o jejum, na PVE. Porém, acreditamos que essa pode não ser a única via produtora de glicogênio.

Apesar de Jin, Sherry e Malloy (2013), não afirmarem a capacidade do coração em fazer gliconeogenese, boa parte da via sugerida pelos autores tem em comum etapas gliconeogenicas.

Na PVE de ratos submetidos a jejum observamos diminuição da concentração de lactato, inalteração da concentração de piruvato, aumento de expressão do gene que codifica a enzima piruvato desidrogenase quinase (*pdk1*), assim como aumento da expressão do gene que codifica fosfoelnolpiruvato carbocinase 1 (*pkc1*), uma das enzimas chave da gliconeogenese.

A redução da concentração de lactato na PVE pode ser melhor compreendida observando a atividade e expressão das isoenzimas que atuam sobre esse substrato. Verificamos que a atividade máxima da enzima LDH, que converte piruvato em lactato, manteve-se inalterada após jejum de 48 h. Porém, foi observado que a expressão gênica de sua isoforma (*Idha*), que catalisa a conversão de lactato em piruvato, aumentou significativamente após jejum de 48 h. Apesar desse aparente direcionamento de lactato para piruvato, a concentração de piruvato na PVE permaneceu inalterada.

Sabe-se que o piruvato pode seguir vários caminhos. Além da possibilidade do piruvato ser convertido em lactato, já mencionada, esse substrato pode ainda ser oxidada pelo complexo da desidrogenase pirúvica, fornecendo acetil-CoA para o ciclo de Krebs, e pode sofrer ação da enzima piruvato carboxilase, formando oxaloacetato, que por ação da fosfoenolpiruvato carbocinase segue para a gliconeogenese (NELSON; COX, 2014).

Tendo em vista que jejum é um período de completa privação alimentar, nos pareceu, inicialmente relevante a oxidação do piruvato para disponibilizar Acetil-CoA ao ciclo de Krebs e por consequência gerar energia. Porém, na PVE, o jejum promoveu grande aumento na expressão do gene que codifica a enzima piruvato desidrogenase quinase (*pdk1*). Essa enzima inibe o complexo da desidrogenase pirúvica, não oxidando piruvato e deixando esse substrato disponível para seguir em

outras vias (HUE; TAEGTMEYER, 2009). Esse resultado é consistente com estudos anteriores (PRIESTMAN; ORFALI; SUGDEN, 1996; WU et al., 1998; WU et al., 1999) Devido ao aumento da expressão do gene que codifica fosfoelnolpiruvato carbocinase 1 (*pkc1*), outro caminho pode ser sugerido para o piruvato, a via gliconeogênica.

O principal motivo de muitos autores não considerarem esse caminho para o piruvato está associado a escassos estudos sobre a atividade da piruvato carboxilase, outra enzima chave da gliconeogenese, no coração. Essa enzima realiza caboxilação de piruvato a oxaloacetato, dependente de ATP (WALLACE; JITRAPAKDEE; CHAPMAN-STMITH, 1998; NELSON; COX, 2014). Quando descoberta, em 1963, essa enzima foi descrita no fígado de aves (UTTER; KEECH, 1963). Porém, muitos estudos tem mostrado não somente a existência dessa enzima no coração como também aumento de sua atividade em condições específicas (SUNDQVIST; HILTUNEN; HASSINEN, 1989; RUSSELL; TAEGTMEYER, 1991; LANCHA; RECCO; CURI, 1994; WU et al., 2018).

Apesar do coração ter maquinaria necessária para piruvato seguir pela via gliconeogênica, nossos resultados são apenas sugestivos (Figura 35). Investigações mais detalhadas são necessárias.

Com o objetivo de verificar se existe associação entre as alterações metabólicas observadas e a função cardiovascular, fizemos registros hemodinâmicos e ventriculares na condição de jejum de 48 horas.

Tanto a força de contração quanto a força de relaxamento diminuíram significativamente nos ratos jejuados, quando comparados com ratos alimentados. Essas alterações foram acompanhadas de diminuição da FC e aumento do tempo de enchimento diastólico (Figura 34).

Também observamos aumento do hematócrito nos ratos que ficaram em jejum. Resultados semelhantes foram obtidos com camundongos. Segundo Jensen et al. (2013), 16 h de jejum foi suficiente para aumentar significativamente o hematócrito de camundongos. Segundo os autores o jejum influência a ingestão de água, tendo em visto que ingestão de água está diretamente relacionada com a de alimentos. Redução de ingestão de água por camundongos em jejum de 24 e 48 horas também já havia sido observada por Morton (1978) e Williams et al. (2002), que relataram diminuição do volume sanguíneo e identificaram condição hipovolêmica. Em ratos, a condição hipovolêmica provocada pelo jejum também já havia sido relatada; à medida que a privação alimentar se estendia a hipovolemia se tornava mais grave (WRIGHT; O'KELLY, 1973). Para Traber, Meyer e Traber (1993), a hipovolemia persistida pode comprometer a função cardíaca e evoluir para insuficiência cardíaca.

Sabe-se que diante de diminuição de volume sanguíneo o sistema cardiovascular aciona várias alterações compensatórias. Nos resultados funcionais observamos diminuição da FC e aumento do tempo de enchimento diastólico (Figura 34). Nos parece que essas alterações são ajustes para tentar manter volume de ejeção adequado frente a uma provável pré-carga reduzida. As alterações da força de contração e da força de relaxamento observadas também podem estar associadas com essas alterações.

Segundo Opie, 2005 alterações no enchimento da câmara cardíaca na diástole interferem nas dimensões das câmaras cardíacas. Como descrito por Frank-Starling (mecanismo de Frank-Starling), a diminuição da pré-carga e o volume diastólico menor distendem pouco os sarcômeros, ou seja, diminui o lusitropismo cardíaco; por consequência, tem-se menor desenvolvimento de tensão exercendo menor força de contração na sístole cardíaca, ou seja, menor inotropismo.

Apesar de observamos potencial oxidativo aumentado no músculo cardíaco e incrível disponibilidade de ATP após o jejum de 48 h, acreditamos que esse período de jejum causou uma expressiva alteração volêmica, e as alterações na força de contração e relaxamento podem estar relacionadas a isso. A redução da frequência cardíaca e aumento do tempo de ejeção, por sua vez, são sugeridas como alterações compensatórias para tentar manter a função cardíaca. Durante procedimento anestésico e cateterismo dos animais para realizar os registros hemodinâmicos e funcionais, percebemos grande taxa de óbito (44%) dos animais que haviam sido submetidos a jejum de 48 h. Nenhum animal controle faleceu durante anestesia e cateterismo.



Figura 32 – Representação esquemática dos efeitos do jejum de 48 h sobre o metabolismo de glicose e ácidos graxos nas regiões do coração de ratos estudadas. AAD (aurícula do átrio direito); AAE (aurícula do átrio esquerdo); PVD (parede do ventrículo direito); SIV (septo interventricular); PVE (parede do ventrículo esquerdo); HK (hexoquinase); PFK1 (fosfofrutoquinase1); CS (citrato sintase); CPT I (carnitina palmitoil transferase I); HOADH (β-hidroxiacil-CoA desidrogenase) (Figura cedida por Fabio Takeo Sato)



Figura 33 – Representação esquemática do perfil metabólico da AAD, AAE, PVD, PVE e SIV após jejum de 48 h. AAD (aurícula do átrio direito); AAE (aurícula do átrio esquerdo); PVD (parede do ventrículo direito); SIV (septo interventricular); PVE (parede do ventrículo esquerdo); HK (hexoquinase); PFK (fosfofrutoquinase); CS (citrato sintase); CPT I (carnitina palmitoil transferase I); LDH (lactato desidrogenase); PDH (piruvato desidrogenase); GS (glicogênio sintase)



Figura 34 – Representação esquemática dos efeitos do jejum de 48 h sobre as medidas hemodinâmicas e ventricular. VE (ventrículo esquerdo); dP/dt+ (força de contração); dP/dt- (força de relaxamento); pD1VE (pressão diastólica inicial) (Figura cedida por Fabio Takeo Sato)



Figura 35 – Proposta do perfil metabólico da PVE durante jejum prolongado de 48 h e sugestões de vias envolvidas na síntese de glicogênio

8 CONCLUSÃO

O jejum de 48 h promove alterações metabólicas no músculo cardíaco e aumenta a concentração de ATP. Porém, esse período de jejum diminui a força de contração (dP/dt+) e a força de relaxamento (dP/dt-) cardíaco e adaptações fisiológicas, como aumento do tempo de enchimento diastólico e diminuição da FC, são requeridas para tentar manter a função cardíaca.
REFERÊNCIAS

ABEL, E. D. Glucose transport in the heart. Front. Biosci., v. 1, n. 9, p. 201-215, 2004.

ABRAHAMSEN, G. C.; BERMAN, Y.; CARR, K. Curve-shift analysis of self-stimulation in food-restricted rats: relationship between daily meal, plasma corticosterone, and reward sensitization. **Brain Res.**, v. 695, p. 186-194, 1995.

ADAM, H. Adenosine-5'-diphosphate and adenosine-5'-monophosphate. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analyses**. 2 ed. New York: Academic Press, 1965. p. 573-577.

AERNI-FLESSNER, L.; ABI-JAOUDE, M.; KOENIG, A.; PAYNE, M.; HRUZ, P. W. Glut4, glut1, and glut8 are the dominant glut transcripts expressed in the murine left ventricle. **Cardiovasc. Diabetol.**, v. 11, n. 63, 2012.

AGUILAR-NASCIMENTO, J. E.; PERRONE, F.; PRADO, L. I. A. Jejum pré-operatório de 8 horas ou de 2 horas: o que revela a evidência. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 36, n. 4, p. 350-352, 2009.

AHMET, I.; WAN, R.; MATTSON, M. P.; LAKATTA, E. G.; TALAN, M. Cardioprotection by intermitente fasting in rats. **Circulation.**, v. 112, n. 20, p. 3115-3121, 2005.

ALLEN, D. G.; ORCHAND, C. H. Myocardial contractite function during ischemia and hypoxia. **Circul. Res.**, v. 60, n. 2, p. 153-168,1987.

ALP, P. R.; NEWSHOLME, E. A.; ZAMMIT, V. A. Activities of citrate synthase and NAD+-linked and NADP+-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. **Biochem. J.**, v. 154, n. 3, p. 689-700, 1976.

ARAD, M.; SEIDMAN, C. E.; SEIDMAN, J. G. AMP-activated protein kinase in the heart: role during health and disease. **Circ. Res.**, v. 100, p. 474-488, 2007.

ATTIA, R. R.; CONNNAUGHTON, S.; BOONE, L. R.; WANG, F.; ELAM, M. B.; NESS, G. C.; COOK, G. A.; PARK, E. A. Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) by thyroid hormone: role of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator (PGC-1 alpha). **J. Biol. Chem.**, v. 285, p. 2375-2385, 2010.

AYALA, J. E.; BRACY, D. P.; MCGUINNESS, O. P.; WASSERMAN, D. H. Considerations in the design of hyperinsulinemic–euglycemic clamps in the conscious mouse. **Diabetes**, v. 55, p. 390-397, 2006.

AZEVEDO, F. R.; IKEOKA, D.; CARAMELLI, B. Efeitos do jejum intermitente no metabolismo em homens. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 59, n. 2, 2013.

BEER, M.; SEYFARTH, T.; SANDSTEDE, J.; LANDSCHUTZ, W.; LIPKE, C.; KOSTLER, H.; VON KIENLIN, M.; HARRE, K.; HAHN, D.; NEUBAUER, S. Absolute concentrations of high-energy phosphate metabolites in normal, hypertrophied, and

failing human myocardium measured noninvasively with p-sloop magnetic resonance spectroscopy. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 40, n. 7, p. 1267-1274, 2002.

BIEBER, L. L.; ABRAHAM, T.; HELMRATH, T. A rapid spectrophotometric assay for carnitine palmitoyltransferase. **Anal Biochem.**, v. 50, n. 2, p. 509-518, 1972.

BIRD, S. D.; DOEVENDANS, P. A.; van ROOIJEN, M. A.; BRUTEL de la RIVIERE, A.; HASSINK, R. J.; PASSIER, R.; MUMMERY, C. L. The human adult cardiomyocyte phenotype. **Cardiovasc. Res.**, v. 58, p. 423-434, 2003.

BOTAS, L. Metabolismo energético da célula muscular cardíaca. Actas. Bioq., v. 1, p. 207-219, 1989.

BRONSON, F. H. Susceptibility of the fat reserves of mice to natural challenges. J. Comp. Physiol. B., v. 157, p. 551-554, 1987.

BRUNEAU, B. G.; BAO, Z. Z.; TANAKA, M.; SCHOTT, J. J.; IZUMO, S.; CEPKO, C. L.; SEIDMAN, J. G.; SEIDMAN, C. E. Cardiac expression of the ventricle-specific homeobox gene Irx4 is modulated by Nkx2–5 and dHand. **Dev. Biol.**, v. 217, p. 266-277, 2000.

BUCHER, T.; CZOK, R.; LAMPRECHT, W.; LATZKO, E. Pyruvate. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analyses**. 2 ed. New York: Academic Press, 1965. p. 253-259.

BUTLER, T. L.; AU, C. G.; YANG, B.; EGAN, J. R.; TAN, Y. M.; HARDEMAN, E. C.; NORTH, K. N.; VERHMAN, A. S.; WINLAW, D. S. Cardiac aquaporin expression in humans, rats, and mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 291, p. H705–H713, 2006.

CAMPBELL, F. M.; KOZAK, R.; WAGNER, A.; ALTAREJOS, J. Y.; DYCK, J. R.; BELKE, D. D.; SEVERSON, D. L.; KELLY, D. P.; LOPASCHUK, G. D. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and in- creased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 4098-4103, 2002.

CARLSON, M. G.; SNEAD, W. L.; CAMPBELL, P. J. Fuel and energy metabolismo in fasting humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 60, n. 1, p. 29-36, 1994.

CARR, K. D. Augmentation of drug reward by chronic food resriction: behavioral evidence and underlying mechanisms. **Physiol. Behav.**, v. 76, p. 353-364, 2002.

COOK, G. A.; EDWARDS, T. L.; JANSEN, M.S.; BAHOUTH, S. W.; WILCOX, H. G.; PARK, E. A. Differential regulation of carnitine palmitoyltransferase-I gene isoforms (cpt-I alpha and cpt-I beta) in the rat heart. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 33, n. 2, p. 317-329, 2001.

COOTE, J. H. Myths and realities of the cardiac vagus. J. Physiol., v. 591, n. 17, p. 4073-4085, 2013.

CRABTREE, B.; NEWSHOLME, E. A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem. J.**, v. 126, n. 1, p. 49-58, 1972.

CURI, R. Integração do Metabolismo. In: CURI, R.; PROCOPIO, J. **Fisiologia Básica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap. 54, p. 754-769.

DACIE, J. V.; LEWIS, S. M. **Practical haematology**. 10 ed. New York: Churchill Livingstone, 2008.

de SOUZA JUNIOR, A. L.; MALFITANO. C.; FIGUEROA, D.; SOUZA, L. E.; IGNOTTI, E.; IRIGOYEN, M. C.; CURI, R. Effect of fasting and refeeding on the consequences of myocardial infarction in rats. **Integr. Mol. Med.**, v. 3, n. 1, p. 478-483, 2015.

DOENST, T.; NGUYEN, D.; ABEL, D.; PHIL, D. Cardiac metabolism in heart failure : implications beyond ATP production. **Circ. Res.**, v. 113, n. 6, p. 709-724, 2013.

DUFFY, P. H.; LEAKEY, J.; PIPKIN, J.; TURTURRO, A.; HART, R. The hysiologic, neurologic, and behavioral effects of caloric restriction related to aging, disease, and environmental factors. **Environ. Res.**, v. 73, p. 242-248, 1997.

EGAN, J. R.; BUTLER, T. L.; AU, C. G.; TAN, Y. M.; NORTH, K. N.; WINLAW, D. S. Myocardial water handling and the role of aquaporins. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1758, p. 1043-1052, 2006.

FEGURI, G. R.; LIMA, P. R. L.; LOPES, A. M.; ROLEDO, A.; MIRIAM, M.; TREVISAN, M.; AHMAD, H.; FREITAS, B. B; AGUILAR-NASCIMENTO, J. E. Resultados clínicos e metabólicos da abreviação do jejum com carboidratos na revascularização cirúrgica do miocárdio. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 27, n. 1, p. 7-17, 2012.

FENG, J.; WIBLE, B.; LI, G-R.; WANG, Z.; NATTEL, S. Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1.5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K1 current in cultured adult human atrial myocytes. **Circ. Res.**, v. 80, p. 572-579, 1997.

FINCK, B. N.; LEHMAN, J. J.; LEONE, T. C.; WELCH, M. J.; BENNETT, M. J.; KOVACS, A.; HAN, X.; GROSS, R. W.; KOZAK, R.; LOPASCHUK, G. D.; KELLY, D. P. The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v. 109, n. 1, p. 121-130, 2002.

FRAYN, K. N.; ARNER, P.; YKI-JARVINEN, H. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. **Essays Biochem.**, v. 42, p. 89-103, 2006.

FURNER, R. L.; FELLER, D. D. Influence of starvation upon hepatic drug metabolism in rats, mice, and guinea pigs. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 137: 816-819, 1971.

GABORIT, N.; LE BOUTER, S.; SZUTS, V.; VARRO, A.; ESCANDE, D.; NATTEL, S.; DEMOLOMBE, S. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the nondiseased human heart. **J. Physiol.**, v. 582, p. 675-693, 2007.

GAMBERT, S.; HELIES-TOUSSAINT, C.; GRYNBERG, A. Regulation of intermediar metabolism in rat cardiac myocyte by extracellular glycerol. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1736, p. 152-162, 2005.

GERHART-HINES, Z.; RODGERS, J. T.; BARE, O.; LERIN, C.; KIM, S. H.; MOSTOSLAVSKY, R.; ALT, F. W.; PUIGSERVER, P. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. **EMBO J.**, v. 26, p. 1913-1923, 2007.

GERTZ, E. W.; WISNESKI, J. A.; STANLEY, W. C.; NEESE, R. A. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. **J. Clin. Invest.**, v. 82, n. 6, p. 2017-2025, 1988.

GIBBS, C. L. Cardiac energetics. Physiol. Rev., v. 58, n. 1, p. 174-254, 1978.

GILDA, J. E.; GOMES, A. V. Stains-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. **Anal Biochem.**, v. 440, n. 2, p. 186-188, 2013.

GIMENO, R. E.; ORTEGON, A. M.; PATEL, S.; PUNREDDY, S.; GE, P.; SUN, Y.; LODISH, H. F.; STAHL, A. Chaeracterization of a Heart-specific Fatty Acid Transport Protein. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 18, p. 16039-16044, 2003.

GLATZ, J. F.; LUIKEN, J. J.; BONEN, A. Involvement of membrane-associated proteins in the acute regulation of cellular fatty acid uptake. **J. Mol. Neurosci.**, v. 16, n. 2-3, p. 123-132, 2001.

GOLDHAMER, A.C.; LISLE, D. J.; SULTANA, P.; ANDERSON, S. V.; PARPIA, B.; HUGHES, B.; CAMPBELL, T. C. Medically supervised water-only fasting in the treatment of borderline hypertension. **J. Altern. Complement. Med.**, v. 8, n. 5, p. 643-650, 2002.

GOURINE, A. V.; MACHHADA, A.; TRAPP, S.; SPYER, K. M. Cardiac vagal preganglionic neurones: An update. **Auton. Neurosci.**, v. 199, p. 24-28, 2016.

GURSOY, E.; CARDOUNEL, A.; HU, Y.; MUHAMMED, K. Biological effects of longterm caloric restriction: adaptation with simultaneous administration of caloric stress plus repeated immobilization stress in rats. **Exp. Biol. Med.**, v. 226, p. 97-102, 2001.

HABETS, D. D.; COUMANS, W. A.; EL HASNAOUI, M.; ZARRINPASHNEH, E.; BERTRAND, L.; VIOLLET, B.; KIENS, B.; JENSEN, T. E.; RICHTER, E. A.; BONEN, A.; GLATZ, J. F.; LUIKEN, J. J. Crucial role for LKB1 to AMPKalpha2 axis in the regulation of CD36-mediated long-chain fatty acid uptake into cardiomyocytes. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1791, n. 3, p. 212-219, 2009.

HARDIE, D. G. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, v. 8, p. 774-785, 2007.

HARDIE, D. G.; CARLING, D.; CARLSON, M. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 821-855, 1998.

HARDIE, D. G.; SCOTT, J. W.; PAN, D. A.; HUDSON, E. R. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. **FEBS Lett.**, v. 546, p. 113-120, 2003.

HARDIE, D.; HAWLEY, S. AMP-activated protein kinase: the energy charge hypothesis revisited. **Bioessays.**, v. 23, p. 1112-1119, 2001.

HASHIMOTO, T.; COOK, W. S.; QI, C.; YELDANDI, A. V.; REDDY, J. K.; RAO, M. S. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 28918-28928, 2000.

HEIDERSTADT, K. M.; MCLAUGHLIN, R.; WRIGHT, D.; WALKER, S.; GOMEZ-SANCHES, C. The effect of chronic food and water restriction on open-field ehaviour and serum corticosterone levels in rats. **Lab. Anim.**, v. 34, p. 20-28, 2000.

HEILBRONN, L. K.; SMITH, S. R.; MARTIN, C. K.; ANTON, S. D.; RAVUSSIN, E. Alternate-day fasting in nonobese subjects: effects on body weight, body composition, and energy metabolismo. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, n. 1, p. 69-73, 2005.

HENNING, S. L.; WAMBOLT, R. B.; SCHONEKESS, B. O.; LOPASCHUK, G. D.; ALLARD, M. F. Contribution of glycogen to aerobic myocardial glucose utilization. **Circulation.**, v. 93, p. 1549-1555, 1996.

HIBUSE, T.; MAEDA, N.; NAKATSUJI, H.; TOCHINO, Y.; FUJITA, K.; KIHARA, S.; FUNAHASHI, T.; SHIMOMURA, I. The heart requires glycerol as an energy substrate through aquaporin 7, a glycerol facilitator. **Cardiovasc. Res.**, v. 83, p. 34-41, 2009.

HUE, L.; RIDER, M. H. The AMP-activated protein kinase: more than an energy sensor. **Essays Biochem.**, v. 43, p. 121-137, 2007.

HUE, L.; TAEGTMEYER, H. The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 297, n. 3, p. 578-591, 2009.

HUNTER, R. W.; TREEBAK, J.T.; WOJTASZEWSKI, J. F. P.; SAKAMOTO, K. Molecular mechanism by which AMP-activated protein kinase activation promotes glycogen accumulation in muscle. **Diabetes**, v. 60, p. 766-774, 2011.

HUSS, J. M.; TORRA, I.P.; STAELS, B.; GIGUERE, V.; KELLY, D. P. Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. **Mol. Cell. Biol.**, v. 24, n. 20, p. 9079-9091, 2004.

IDELL-WENGER, J. A.; GROTYOHANN, L. W.; NELLY, J. R. Coenzime A and carnitine distributian in normal and ischaemic hearts. **J. Biol. Chem.**, v. 253, n. 12, p. 4310-4318, 1978.

JENSEN, T. L.; KIERSGAARD, M.K.; SORENSEN, D. B.; MIKKELSEN, L. F. Fasting of mice: a review. Lab. Anim., v. 47, n. 4, p. 225-240, 2013.

JIN, E. S.; SHERRY, A. D.; MALLOY, C. R. Evidence for Transaldolase Activity in the Isolated Heart Supplied with [U-13C3]Glycerol. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 5, p. 2914-2922, 2013.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 13 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. p. 200-216.

KANE, C.; TERRACCIANO, C. M. N. Concise Review: Criteria for Chamber-Specific Categorization of Human Cardiac Myocytes Derived from Pluripotent Stem Cells. **Steam Cells.**, v. 35, p. 1881-1897, 2017.

KEPLER D.; DECKER K. Glycogen Determination with Amyloglucosidase. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analyses**. 4 ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1974. p. 1127-1131.

KERNDT, P. R.; NAUGHTON, J. L.; DRISCOLL, C.E.; LOXTERKAMP, D. A. Fasting: the history, pathophysiology and complications. **West. J. Med.**, v. 137, n. 5, p. 379-399, 1982.

KOKUBUN E.; HIRABARA, S. M.; FIAMONCINI, J.; CURI, R.; HAEBISCH, H. et al. Changes of glycogen content in liver, skeletal muscle, and heart from fasted rats. **Cell Biochem. Funct.**, v. 27, p. 488-495, 2009.

LAMPRECHT W.; TRAUTSHOLD I. Determination with Hexokinase and Glucose-6phosphate Dehydrogenase. In: BERGMEYER, H. U. **Methods of Enzymatic Analyses**. 2 ed. Weinheim: Verlag Chemie, 1965. p. 543-551.

LAN, F.; CACICEDO, J. M.; RUDERMAN, N.; IDO, Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 27628-27635, 2008.

LANCHA JR, A. H.; RECCO, A. B.; CURI, R. Piruvate carboxylase activity in the heart and skeletal muscles of the rat. **Biochem. and Mol. Biol. International.**, v. 32, n. 3, p. 483-489, 1994.

LEE, D.; MARTINEZ, B.; CROCKER, D. E.; ORTIZ, R. M. Fasting increases the phosphorylation of AMPK and expression of sirtuin 1 in muscle of adult male northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). **Physiol. Rep.**, v. 5, n. 4, p. 1-13, 2017.

LEE, K.; ROSS, R. S.; ROCKMAN, H. A.; HARRIS, A. N.; O'BRIEN, T. X.; van BILSEN, M.; SHUBEITA, H. E.; KANDOLF, R.; BREM, G.; PRICE, J. Myosin light chain-2

luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal musclespecific expression of a single contractile protein gene. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 15875-15885, 1992.

LIEPINSH, E.; MAKRECKA, M.; KUKA, J.; MAKAROVA, E.; VILSKERSTS, R.; CIRULE, H.; SEVOSTJANOUS, E.; GRINBERGA, S.; PUGOVICS, O.; DAMBROVA, M. The heart is better protect against myocardial infarction in the fed state compared to the fasted state. **Metabolism**, v. 63, p. 127-136, 2014.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell. Metab.**, v. 1, p. 361–370, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LONGO, V. D.; MATTSON, M. P. Fasting: molecular mechanisms and clinical applications. **Cell. Metab.**, v. 19, n. 2, p. 181-192, 2014.

LOPASCHUK, G. D.; USSHER, J. R.; FOLMES, C. D.; JASWAL, J. S.; STANLEY, W. C. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiol. Rev.**, v. 90, p. 207-258, 2010.

LUKYANENKO, V.; CHIKANDO, A.; LEDERER, W. J. Mitochondria in cardiomyocyte Ca21 signaling. Int. J. Biochem. Cell. Biol., v. 41, p. 1957–1971, 2009.

LYNEN, L.; WIELAND, O. **Methods in Enzymology**. Academic Press, v. 1, p. 566-567, 1955.

MACHADO, M. N. Jejum pré-operatório: revendo conceitos e condutas. **Rev. Bras. Cir. Cardiovasc.**, v. 27, n. 1, p. 4-5, 2012.

MARSIN, A. S.; BERTRAND, L.; RIDER, M. H.; DEPREZ, J.; BEAULOYE, C.; VINCENT, M. F.; Van den BERGHE, G.; CARLING, D.; HUE, L. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. **Curr. Biol.**, v. 10, p. 1247–1255, 2000.

MARSIN, A. S.; BOUZIN, C.; BERTRAND, L.; HUE, L. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 30778–30783, 2002.

MAUGHAN, R. J.; FALLAH, J.; COYLE, E. F. The effects of fasting on metabolism and performance. **Br. J. Sports Med.**, v. 44, n. 7, p. 490-494, 2010.

MENDELSON, C. L. The aspiration of stomach contents into the lungs during obstetric anesthesia. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 52, p. 191- 205, 1946.

MICHELINI, L. C. Músculo Cardíaco/ Acoplamento Excitação-Contração e Contratilidade. In: CURI, R.; PROCOPIO, J. **Fisiologia Básica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap. 26, p. 350-359.

MINOKOSHI, Y.; ALQUIER, T.; FURUKAWA, N.; KIM, Y-B.; LEE, A.; XUE, B.; UM, J.; FOUFELLE, F.; FERRÉ, P.; BIRNBAUM, M. J.; STUCK, B. J.; KAHN, B. B. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutriente signals in the hypothalamus. **NATURE**, v. 428, p. 569-574, 2004.

MOORE, K. L.; DALLEY, F. A.; AGUR, A. M. R. **Anatomia orientada para a clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

MORTON, S. R. Torpor and nest-sharing in free-living Sminthopsis crassicaudata (Marsupialia) and Mus musculus (Rodentia). **J. Mammal.**, v. 59, p. 569-575, 1978.

MURPHY, B. A.; FIORAMONTI, X.; JOCHNOWITZ, N.; FAKIRA, K.; GAGEN, K.; CONTIE, S.; LORSIGNOL, A.; PENICAUD, L.; MARTIN, W. J.; ROUTH, V. H. Fasting enhances the response of arcuate neuropeptide Y-glucose-inhibited neurons to decreased extracellular glucose. **Am. J. Physiol. Cell. Physiol.**, v. 296, p. C746-C756, 2009.

MURRAY, M. P.; KORY, R. C.; CLARKSON, B. H. Walking patterns in healthy old men. **Journal of Gerontology**, v. 24, p. 169-178, 1969.

NAGOSHI, T.; YOSHIMURA, M.; ROSANO, G. M.; LOPASCHUK, G. D.; MOCHIZUKI, S. Optimization of cardiac metabolism in heart failure. **Curr. Pharm. Des.**, v. 17, p. 3846-3853, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 544-580.

NETTER, F. H. Atlas de Anatomia Humana. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NG, S. Y.; WONG, C. K.; TSANG, S. Y. Differential gene expressions in atrial and ventricular myocytes: insights into the road of applying embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for future therapies. **Am. J. Physiol.**, v. 199, p. C1234-1249, 2010.

NOWLAND, M. H.; HUGUNIN, K. M. S.; ROGERS, K. L. Effect of Short-Term Fasting in Male Sprague-Dawley Rats. **Comparative Med.**, v. 61, n. 2, p. 138-143, 2011.

NYGREN, J. The metabolic effects of fasting and surgery. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, v. 20, n. 3, p. 429-38, 2006.

NYGREN, J.; THORELL, A. M.; LJUNGQVIST, O. New developments facilitating nutritional intake after gastrointeestinal surgery. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 6, n. 5, p. 593-597, 2003.

O'MALLEY, J.; DAMBROSIA, J. M.; DAVIS, J. A. Effect of housing density on reproductive parameters and corticosterone levels in nursing mice. J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci., v. 47, p. 9-15, 2008.

O'NEILL, H. M.; MAARBJERG, S. J.; CRANE, J. D.; JEPPESEN, J.; JORGENSEN, S. B.; SCHERTZER, J. D.; SHYROKA, O.; KIENS, B.; van DENDEREN, B. J.;

TARNOPOLSKY, M. A.; KEMP, B. E.; RICHTER, E. A.; STEINBERG, G. R. AMPactivated protein kinase (AMPK) beta1beta2 muscle null mice reveal an essential role for AMPK in maintaining mitochondrial content and glucose uptake during exercise. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 108, p. 16092-16097, 2011.

OPIE, L. H. Mechanisms of Contraction and Relaxation. In: ZIPES, D. P. **Braunwald's** heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. 7 ed. Philadelphia: Saunders, 2005. cap. 19, p. 457-487.

OPIE, L. H. Metabolism of the heart in health and disease (parte I). **Am. Heart J.**, v. 76, n. 5, p. 685-698, 1968.

OPIE, L. H.; NEWSHOLME, E. A. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. **Biochem. J.**, v. 103, n. 2, p. 391-399, 1967.

PRIESTMAN, D. A.; ORFALI, K. A.; SUGDEN, M. C. Pyruvate inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase. Effects of progressive starvation and hyperthyroidism in vivo, and of dibutyryl cyclic AMP and fatty acids in cultured cardiac myocytes. **FEBS Lett.**, v. 393, p. 174-178, 1996.

RANDLE, P. J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. **Diabetes Metab. Rev.**, v. 14, n. 4, p. 263-283, 1998.

RANDLE, P. J.; GARLAND P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, p. 785-789, 1963.

RAVENS, U.; CERBAI, E. Role of potassium currents in cardiac arrhythmias. **Europace.**, v. 10, p. 1133-1137, 2008.

RAYMENT, I.; HOLDEN, H. M.; WHITTAKER, M. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. **Science**, v. 261, p. 58-65, 1993.

RINGER, S. Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. **J. Physiol.**, v. 3, p. 380-393, 1882.

RODGERS, J. T.; PUIGSERVER, P. Fasting-dependent glucose and lipid metabolic response through hepatic sirtuin 1. **Proc. Natl Acad. Sci. USA.**, v. 104, p. 12861-12866, 2007.

ROMERO-CALVO, I.; OCÓN, B.; MARTINEZ-MOYA, P.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F. S. Reversible ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Anal Biochem.**, v. 401, n. 2, p. 318-320, 2010.

ROWE, G. C.; JIANG, A.; ARANY, Z. Pgc-1 coactivators in cardiac development and disease. **Circ. Res.**, v. 107, n. 7, p. 825-838, 2010.

RUSSELL, R. R.; TAEGTMEYER, H. Pyruvate carboxylation prevents the decline in contractile function of rat hearts oxidizing acetoacetate. **American Journal of Physiology**, v. 261, p. H1756-H1762, 1991.

SANG, Q.; YAO, Z.; WANG, H.; FENG, R.; ZHAO, X.; XING, Q.; JIN, L.; HE, L.; WU, L.; WANG, L. Identification of microRNAs in human follicular fluid: characterization of microRNAs that govern steroidogenesis in vitro and are associated with polycystic ovary syndrome in vivo. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 7, p. 3068-3079, 2013.

SANTOS, R. A. S.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J.; FERREIRA, A. J.; SAMPAIO, W. O. Visão Integrada da Circulação. In: CURI, R.; PROCOPIO, J. **Fisiologia Básica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. cap. 23, p. 319-327.

SHAPIRO, A. L.; VIÑUELA, E.; MAIZEL, J. V. JR. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 28, n. 5, p. 815-820, 1967.

SHIMADA, T.; KAWAZATO, H.; YASUDA, A.; ONO, N.; SUEDA, K. Cytoarchitecture and intercalated disks of the working myocardium and the conduction system in the mammalian heart. **Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.**, v. 280, n. 2, p. 940-951, 2004.

SILVEIRA, L. R.; PINHEIRO, C. H. J.; ZOPPI, C. C.; HIRABARA, S. M.; VITZEL, K. F.; BASSIT, R.; LEANDRO, C. G.; BARBOSA, M. R.; SAMPAIO, I. H.; MELO, I. H. P.; FIAMONCINI, J.; CARNEIRO, E. M.; CURI, R. Regulação do metabolismo de glicose e ácido graxo no músculo esquelético durante exercício físico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 55, n. 5, p. 303-313, 2011.

SMITH, L. K.; METZ, G. A. Dietary restriction alters fine motor function in rats. **Physiol. Behav.**, v. 85, p. 581-592, 2005.

SNOREK, M.; HODYC, D.; SEDIVÝ, V.; DURISOVÁ, J.; SKOUMALOVÁ, A.; WILHELM, J.; NECKÁR, J.; KOLÁR, F.; HERGET, J. Short-term fasting reduces the extent of myocardial infarction and incidence of reperfusion arrhythmias in rats. **Physiol. Res.**, v. 61, n. 6, p. 567-574, 2012.

SOETERS, M. R.; LAMMERS, N. M.; DUBBELHUIS, P.F.; ACKERMANS, M.; JONKERS-SCHUITEMA, C. F. FILIERS, E.; SAUERWEIN, H. P.; AERTS, J.M.; SERLIE, M. J. Intermittent fasting does not affect whole-body glucose, lipid or protein metabolismo. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 90, n. 5, p. 1244-1251, 2009.

STOPPANI, J.; HILDEBRANDT, A. L.; SAKAMOTO, K.; CAMERON-SMITH, D.; GOODYEAR, L. J.; NEUFER, P. D. AMP-activated protein kinase activates transcription of the UCP3 and HKII genes in rat skeletal muscle. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 283, p. E1239-E1248, 2002.

SUGA, H. Ventricular energetics. Physiol. Rev., v. 70, n. 2, p. 47-277, 1990.

SUNDQVIST, K. E.; HILTUNEN, J. K.; HASSINEN, I. E. Pyruvate carboxylation in the rat heart. Role of biotin-dependent enzymes. **Biochemical Journa**l, v. 257, p. 913-916, 1989.

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON. J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 76, n. 9, p.145-149, 1979.

TRABER, D. L.; MEYER, J.; TRABER, L. D. Cardiac Function During Hypovolemia. In: SCHLAG, G.; REDL, H. **Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure**. Berlin: Heidelberg, 1993.

TSUKAMOTO, Y.; NAKADA, C.; NOGUCHI, T.; TANIGAWA, M.; NGUYEN, L.T.; UCHIDA, T.; HIJIYA, N.; MATSUURA, K.; FUJIOKA, T.; SETO, M.; MORIYAMA, M. MicroRNA-375 is downregulated in gastric carcinomas and regulates cell survival by targeting PDK1 and 14-3-3zeta. **Cancer. Res.**, v. 70, p. 2339-2349, 2010.

UTTER, M. F.; KEECH, D. B. Pyruvate Carboxylase. J. Biol. Chem., v. 238, n. 8, p. 2603-2608, 1963.

van der LEE, K. A. J. M.; WILLEMSEN, P. H. M.; SAMEC, S.; SEYDOUX, J.; ABDUL, G. D.; PELSERS, M. M. A. L.; GLATZ, J. F. C.; van der VUSSE, G. J.; BILSEN, M. V. Fasting-induced changes in the expression of genes controlling substrate metabolismo in the rat heart. **Jounal of Lipid Research**, v. 42, p. 1753-1758, 2001.

van der VUSSE, G J.; van BILSEN, M.; GLATZ, J. F. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, n. 2, p. 279-293, 2000.

VARY, T. C.; REIBEL, D. K.; NEELY, J. R. Control of energy metabolism of heart muscle. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 43, p. 419-430, 1981.

VASSALO, D. V.; OLIVEIRA, E. M.; STEFANON, I. Contratilidade miocárdica. In: AIRES, M. M. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 30, p. 435-464.

WALLACE, J.C.; JITRAPAKDEE, S.; CHAPMAN-SMITH, A. Pyruvate carboxylase. Int. J. Biochem. Cell. Biol., v. 30, n. 1, p. 1-5, 1998.

WAN, R.; AHMET, I.; BROWN, M.; CHENG, A.; KAMIMURA, N.; TALAN, M.; MATTSON, M. P. Cardioprotective effect of intermitente fasting is associated with na elevation of adiponectin levels in rats. **J. Nutr. Biochem.**, v. 21, n. 5, p. 413-417, 2010.

WARWICK, R. O.; SMITH, M. P.; GRAFFY, M. A.; LAGE, G. L. Altered distribution and toxicity of digitoxgenin in fasted mice. Life Sci., v. 37, p. 775-782, 1985.

WILLIAMS, T. D.; CHAMBERS, J. B.; HENDERSON, R. P.; RASHOTTE, M. E.; OVERTON, J. M. Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 282, p. R1459-R1467, 2002.

WILLIAMSON, J. R. Mitochondrial function in the heart. **Ann. Rev. Physiol.**, v. 41, p. 485-506, 1979.

WISNESKI, J. A.; GERTZ, E. W.; NEESE, R. A.; GRUENKE, L. D.; CRAIG, J. C. Dual carbon-labeled isotope experiments using d-[6-14c] glucose and l-[1,2,3-13c3] lactate: A new approach for investigating human myocardial metabolism during ischemia. J Am. Coll. Cardiol., v. 5, n. 5, p. 1138-1146, 1985.

WU, C-Y.; SATAPATI, S.; GUI, W.; WYNN, R. M.; SHARMA, G.; LOU, M.; QI, X.; BURGESS, S. C.; MALLOY, C.; KHEMTONG, C.; SHERRY, A. D.; CHUANG, D.; MERRITTS, M. E. A Novel Inhibitor of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Stimulates Myocardial Carbohydrate Oxidation in Diet-Induced Obesity. **J. Biol. Chem.**, v. 293, p. 9604-9624, 2018.

WU, P.; INSKEEP, K.; BOWKER-KINLEY, M. M.; POPOV, K. M. HARRIS, R. A. Mechanism responsible for inactivation of skeletal muscle pyruvate dehydrogenase complex in starvation and diabetes. **Diabetes.**, v. 48, p. 1593-1599, 1999.

WU, P.; SATO, J.; ZHAO, Y.; JASKIEWICZ, J.; POPOV, K. M.; HARRIS, R. A. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. **Biochem. J.**, v. 329, p. 197-201, 1998.

WRIGHT, J. W.; O'KELLY, L. I. Deviations in body fluids during fasting in rats: Failure of ADH treatment abd nonnutritive bulk in preventing the occurrence of plasma hypovolemia. **Physiology & Behavior**, v. 11, n. 6, p. 791-800, 1973.

ZAHA, V. G.; YOUNG, L. H. AMP-activated protein kinase regulation and bio- logical actions in the heart. **Circ. Res.**, v. 111, n. 6, p. 800-814, 2012.

ZAMMIT, V. A.; NEWSHOLME, E. A. Properties of pyruvate kinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in relation to the direction and regulation of phosphoenolpyruvate metabolism in muscles of the frog and marine invertebrates. **Biochem. J.**, v. 174, n. 3, p. 979-987, 1978.

ZHENG, D.; MACLEAN, P. S.; POHNERT, S. C.; KNIGHT, J. B.; OLSON, A. L.; WINDER, W. W.; DOHM, G. L. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. **J. Appl. Physiol.**, v. 91, p.1073-1083, 1985.

APÊNDICE A- Tabelas de valores individuais

Tabela A1- Valores individuais do peso corporal (g) antes (0h) e após jejum (48h), peso da gordura periepididimal (g/mm), peso do fígado (g/mm) e peso do músculo cardíaco (mg/mm) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	F	Peso c	orpora	l	Peso da	gordura	Pes	so do	Peso do	músculo
	С	tl	jj(4	8h)	periepi	didimal	fíg	jado	card	díaco
	0h	48h	0h	48h	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	303	299	353	286	0,030	0,024	0,37	0,17	22,92	20,72
	334	344	330	302	0,029	0,020	0,32	0,19	22,72	20,15
	302	310	344	298	0,030	0,019	0,30	0,20	30,22	23,16
	318	325	321	275	0,031	0,014	0,39	0,16	23,12	22,05
	340	348	328	283	0,027	0,019	0,35	0,19	22,54	25,86
	320	339	314	265	0,029	0,021	0,28	0,17	24,06	21,01
	305	312	278	229	0,030	0,026	0,35	0,22	22,7	17,75
	306	328	287	226	0,027	0,029	0,33	0,17	20,81	18,19
							0,35	0,21	22,14	19,21
média	316	326	319	269	0,029	0,022	0,34	0,19	23,47	20,9
n	8	8	8	8	8	8	9	9	9	9

Tabela A2- Valores individuais de glicose (GLI), triacilglicerol (TG), colesterol (COL), HDL, LDL, no soro (mg/dL), lactato (LAC) no plasma (mg/dL), β -hidroxibutirato (BHB) no soro (mM), e glicerol (GCR) no soro (mg/mL) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	G	BLI	1	G	C	OL	H	IDL	L	.DL	L	AC	E	знв	G	CR
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	127,0	96,9	158,6	35,2	59,4	30,1	33,7	26,2	15,7	8,6	21,3	18,7	2,8	6,0	0,10	0,11
	129,3	93,1	206,9	37,0	41,2	37,8	30,2	31,4	8,8	8,4	30,1	25,9	3,0	5,2	0,09	0,08
	100,4	88,2	75,8	39,2	43,6	49,8	35,5	33,8	15,2	12,1	32,2	17,6	2,3	6,2	0,06	0,07
	116,4	70,5	74,8	47,3	42,4	52,0	28,3	45,6	7,0	13,0	20,6	38,7	2,4	5,0	0,06	0,09
	115,6	87,5	141,8	68,8	52,0	63,9	39,0	44,2	13,0	14,9	31,6	27,1	3,0	5,4	0,11	0,07
	110,4	77,2	185,8	49,1	42,7	62,8	30,8	40,8	9,5	10,3	49,0	33,1	3,2	6,1	0,09	0,08
	123,2	64,1	177,6	30,2	49,9	60,1	29,9	46,1	9,7	9,3	41,9	30,6	3,4	5,8	0,11	0,06
	147,0	66,5	150,3	40,8	60,3	54,7	46,2	30,8	11,8	11,1	21,9	25,9	2,9	6,0	0,09	0,06
	141,2	81,1	122,3	45,8	90,7	51,6	30,3	37,9	9,8	6,7			2,6	5,8	0,07	0,10
													3,5			
média	123,4	80,5	143,8	43,7	53,6	51,4	33,8	37,4	11,2	10,5	31,1	27,2	2,9	5,7	0,09	0,08
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8	8	10	9	9	9

	A	AD	A	AE	9	SIV	F	PVD	F	VE
	ctl	jj(48h)								
	0,80	1,75	0,54	3,34	1,05	1,31	0,25	5,41	0,84	1,16
	1,61	2,00	2,08	1,61	0,93	0,79	1,77	0,47	0,96	1,03
	0,59	2,25	0,38	0,59	1,02	1,32	0,99	3,00	1,21	1,30
	0,44	1,66	0,34	0,41	0,85	1,18	0,35	1,91	0,83	1,38
	0,86	1,99	1,44	3,72	1,01	0,98	1,68	6,22	0,93	0,92
	1,14	0,60	1,32	5,18	1,14	1,07	1,15	5,60	1,24	1,27
	1,66	1,72	0,87	3,28	1,28	1,94	1,17	3,74	0,93	2,00
	0,90	2,84	1,73	3,79	0,86	1,36	1,25	3,48	1,07	1,40
		0,73	0,31	3,55	0,86	1,30	0,40	3,26		1,17
média	1,00	1,73	1,00	2,83	1,00	1,25	1,00	3,68	1,00	1,29
n	8	9	9	9	9	9	9	9	8	9

Tabela A3- Valores individuais de ATP (unidade relativa) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

Tabela A4- Valores individuais da concentração de lactato (mg/g de tecido) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	Α	AD	AAE		:	SIV	PVD		PVE	
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	79,8	71,2	81,3	71,7	65,7	71,3	88,2	90,7	93,8	83,2
	72,6	54,3	78,2	69,4	58,3	79,4	80,7	80,5	97,1	70,9
	80,4	62,8	69,6	63,5	98,5	75,3	90,9	81,6	103,5	85,2
	70,0	79,4	49,2	76,5	78,4	90,0	104,8	83,9	142,0	88,3
	60,2	42,2	58,1	59,4	99,1	81,1	101,3	90,1	104,0	85,1
	75,7	102,2	71,7	49,3	90,5	98,5	90,7	90,5	106,6	92,4
	112,4	60,8	96,5	92,0		111,9		81,9		99,5
	87,7	84,3	78,4	73,4						
	89,9	132,1	129,8	21,3						
média	81,0	76,6	79,2	64,1	81,8	86,8	92,8	85,6	107,8	86,4
n	9	9	9	9	6	7	6	7	6	7

Tabela A5- Valores individuais da concentração de glicogênio (mg/g de tecido) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

		AAD	AAE			SIV		PVD	PVE		
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	
	12,8	13,8	9,3	5,7	5,9	10,0	8,6	10,3	6,4	17,1	
	14,8	5,0	10,8	10,2	7,3	13,8	11,1	11,8	10,5	15,7	
	16,0	6,1	15,9	10,1	8,7	14,4	12,4	11,2	12,5	17,5	
	14,6	10,5	7,0	9,6	9,4	9,6	12,2	11,7	13,1	13,3	
	7,9	9,9	6,5	6,5	6,0	9,0	13,9	14,7	13,1	12,4	
	5,8	7,3	4,8	5,0	9,9	12,8	7,1	8,6	10,1	12,8	
	3,6	5,3	8,2	3,8	9,7	13,7	6,5	9,9	8,9	10,5	
média	10,8	8,3	9,0	7,3	8,1	11,9	10,3	11,2	10,7	14,2	
n	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	

Tabela A6- Valores individuais de piruvato (µmol/g de tecido), ADP (unidade relativa) e glicerol (mg/g de tecido) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

			F	PVE		
	Pir	uvato	ŀ	ADP	gli	cerol
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	3,72	4,89	0,81	1,22	0,48	0,69
	5,05	3,08	1,26	1,30	0,34	0,36
	2,48	2,75	1,01	0,65	0,69	0,35
	3,28	3,00	1,03	0,96	0,71	0,53
	4,60	2,80	1,22	0,78	0,70	0,46
	2,85	5,22	1,12	0,99	0,58	0,50
	4,88	4,30	0,54	1,00	0,52	0,51
				0,75		0,62
média	3,84	3,72	1,00	0,96	0,63	0,50
n	7	7	7	8	7	8

Tabela A7- Valores individuais da atividade máxima da enzima hexoquinase (HK) (µmol.min.g de tecido) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	AAD		AAE		:	SIV	F	PVD PV		VE
	ctl	jj(48h)								
	0,41	0,32	0,07	0,30	0,70	0,64	0,50	0,77	0,68	0,78
	0,55	0,36	0,44	0,05	0,97	0,58	1,03	0,42	0,74	0,92
	0,63	0,34	0,08	0,04	0,68	0,34	0,85	0,53	0,78	0,89
	0,54	0,33	0,06	0,33	0,57	0,76	0,25	0,65	0,59	0,69
	0,40	0,42	0,12	0,45	0,81	0,54	0,86	0,78	0,59	0,67
	0,41	0,32	0,23	0,39	0,83	0,45	0,84	0,70	0,77	0,83
	0,41	0,46	0,07	0,36	0,78	0,48	0,49	0,57	0,62	0,85
	0,31	0,23	0,01	0,37	0,71	0,48	0,70	0,72	0,64	0,67
	0,37	0,24	0,37	0,37	0,62	0,61	0,65	0,95	0,64	
média	0,45	0,33	0,16	0,30	0,74	0,54	0,68	0,68	0,67	0,79
n	9	9	9	9	9	9	9	9	9	8

Tabela A8- Valores individuais da atividade máxima da enzima fosfofrutoquinase (PFK) (μmol.min.g de tecido) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	Α	AD	AAE		;	SIV	P	PVD PVE		VE
	ctl	jj(48h)								
	1,33	1,07	0,84	1,12	1,46	0,72	1,09	0,70	0,81	1,27
	2,28	0,82	0,97	1,15	1,11	0,80	0,70	0,23	1,08	2,02
	2,41	1,12	1,54	0,87	1,49	0,16	1,67	0,59	1,10	2,18
	1,31	1,20	0,86	1,18	0,99	0,54	0,75	0,99	0,77	1,30
	1,80	1,02	0,45	0,32	1,40	0,82	1,35	1,14	0,83	0,78
	0,91	0,95	0,47	0,58	1,19	0,30	0,25	1,16	0,82	1,00
	1,18	0,65	1,11	0,91	0,74	0,21	0,80	1,17	0,63	1,44
	1,38	0,69	0,45	1,77	1,23	0,44	0,36	0,33	0,62	0,72
	0,83	1,28	1,07	0,78	1,17		0,49	0,92		
média	1,49	0,98	0,86	0,96	1,20	0,50	0,83	0,80	0,83	1,34
n	9	9	9	9	9	8	9	9	8	8

Tabela A9- Valores individuais da atividade máxima da enzima piruvato quinase (PK) (μmol.min.g de tecido) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	Α	AD	AAE		;	SIV	PVD		P	PVE	
	ctl	jj(48h)									
	17,5	13,7	20,9	14,2	31,7	35,9	18,9	35,9	22,0	38,1	
	23,4	18,3	10,1	8,5	33,3	32,4	34,2	18,6	33,1	36,9	
	27,4	16,6	10,1	18,2	36,4	13,5	32,0	20,4	36,2	26,7	
	22,6	17,2	6,1	18,5	28,1	32,8	5,9	25,3	21,5	33,6	
	18,6	20,4	20,8	21,1	33,0	29,9	28,4	35,0	20,6	36,8	
	19,7	14,9	15,1	17,2	35,0	19,0	34,0	22,5	30,9	36,9	
	15,0	16,7	13,3	14,4	33,9	19,9	20,9	19,4	26,4	32,9	
	15,7	16,3	20,3	20,6	32,8	14,1	30,4	29,7	20,9		
	17,3	13,1			28,6	31,7	29,3	35,9			
média	19,7	16,3	14,6	16,6	32,5	25,5	26,0	27,0	27,3	34,8	
n	9	9	8	8	9	9	9	9	8	7	

Tabela A10- Valores individuais da atividade máxima da enzima citrato sintase (CS) (μmol.min.g de tecido) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	AAD		AAE		:	SIV	F	PVD		PVE	
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	
	9,1	9,3	9,1	7,8	9,6	9,4	11,0	9,8	11,3	11,1	
	10,5	8,9	4,3	4,0	6,8	9,2	8,1	11,6	10,6	12,5	
	10,5	9,3	7,4	7,3	9,6	11,5	9,9	11,9	10,8	11,1	
	9,9	10,6	9,5	8,5	9,4	9,4	10,1	11,5	11,5	10,6	
	9,1	9,2	9,7	9,4	7,8	10,0	10,3	10,2	12,0	12,1	
	9,8	7,9	6,6	8,8	7,5	11,3	10,3	10,9	11,6	11,8	
	8,8	8,3	5,8	7,9	8,9	11,5	11,7	11,5	11,9	11,6	
			9,8	9,6	9,8	11,4	10,6	11,0	11,7	10,9	
					10,2	10,2	10,7	9,4	12,0	12,1	
média	9,7	9,1	7,8	7,7	8,8	10,4	10,3	10,9	11,4	11,5	
n	7	7	8	8	9	9	9	9	9	9	

Tabela A11- Valores individuais da atividade máxima da enzima β-hidroxiacil-CoA desidrogenase (HOADH) (μmol.min.g de tecido) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	A	AD	AAE			SIV	PVD		PVE	
	ctl	jj(48h)								
	1,0	0,7	0,1	0,6	1,3	1,2	1,1	1,3	1,4	1,6
	0,6	0,8	0,6	0,1	1,4	1,2	1,2	1,6	1,7	1,7
	0,9	0,8	0,1	0,8	1,4	1,3	1,4	1,7	1,8	1,9
	0,9	0,7	0,4	0,6	1,5	1,4	1,4	1,8	1,8	2,0
	1,1	0,8	0,4	0,8	1,6	1,6	1,4	2,2	1,9	2,0
	0,9	0,8	0,5	0,6	1,6	1,7	1,5	2,3	1,9	2,1
	0,6	0,5	0,2	1,1	1,3	1,1	1,6	2,4	1,9	2,1
			0,9	0,9					2,0	
média	0,8	0,8	0,3	0,6	1,4	1,4	1,4	1,9	1,8	1,9
n	7	7	8	8	7	7	7	7	8	7

Tabela A12- Valores individuais da atividade máxima da enzima carnitina palmitoil transferase I (CPT I) (μmol.min.g de tecido) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	P	VE
	ctl	jj(48h)
	3,60	4,42
	3,60	3,27
	2,95	3,27
	2,62	3,44
	2,78	3,76
	3,44	3,44
	2,95	3,76
	3,60	3,44
		3,60
média	3,19	3,60
n	8	9

	P	VE
	ctl	jj(48h)
	49,5	37,1
	52,2	36,7
	45,6	51,2
	38,7	35,1
	38,1	31,7
	42,5	34,4
	42,7	56,1
	33,6	42,3
	47,6	36,3
média	43,4	40,1
n	9	9

Tabela A13- Valores individuais da atividade máxima da enzima lactato desidrogenase (LDH) (U/g de tecido) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

Tabela A14- Valores individuais da expressão gênica de *pfkm* (expressão relativa) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	A	AD	AAE			SIV		PVD	PVE		
-	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	ctl jj(48h)		jj(48h)	ctl	jj(48h)	
	0,6	1,3	0,8	1,9	0,8	0,9	1,1	1,0	1,4	1,4	
	1,3	0,2	1,5	1,6	0,8	0,5	0,6	1,0	0,9	1,2	
	2,8	0,5	1,7	0,5	1,6	0,9	1,7	0,7	1,4	0,7	
	0,6	0,2	0,7	0,6	1,6	1,0	1,7	0,7	0,4	0,8	
	0,5	1,3	0,9	1,3	0,8	0,5	0,7	0,6	1,1	1,1	
	2,1	0,5	0,9	0,3	1,0	0,6	0,7	1,0	1,2	1,3	
	0,7	0,9	1,1	0,7	0,8	0,6	1,6	0,5	1,3	1,3	
	1,0	1,5	1,2			0,6	1,1	0,5	0,8	1,2	
	1,1	1,2	0,8				0,6		1,0	0,6	
		1,5								1,0	
										0,6	
										0,8	
										1,0	
média	1,2	0,9	1,0	1,0	1,1	0,7	1,1	0,7	1,1	1,0	
n	9	10	9	7	7	8	9	8	9	13	

Tabela A15- Valores individuais da expressão gênica de *Idha* (expressão relativa) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	Α	AD	Α	AE		SIV	F	PVD	PVE	
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	ctl jj(48h)		jj(48h)	ctl	jj(48h)
	0,7	0,7	1,1	1,1	1,4	1,6	1,0	1,3	1,4	1,4
	0,8	0,8	0,7	1,2	0,7	1,2	1,0	0,9	1,3	0,8
	0,9	0,9	0,6	0,6 1,3		1,1	1,1	0,5	1,7	1,1
	1,0	0,9	0,9	0,7	1,5	0,9	1,0	1,3	0,8	1,4
	1,0	1,7	0,7	0,4	0,5	1,4	0,9	1,2	0,9	1,8
	1,2	2,0	1,5	1,2	0,9	1,2	1,3	1,7	0,4	1,1
	1,2	2,0	1,3	1,7	1,2	1,2 0,6		1,0	1,1	1,6
	1,6		1,9	1,5	0,9	0,9		0,6 0,9		2,2
				0,7					0,8	1,4
									1,1	1,2
									1,0	1,5
média	1,0	1,3	1,1	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1	1,1	1,4
n	8	7	8	9	8	7	8	8	11	11

Tabela A16- Valores individuais da expressão gênica de *cs* (expressão relativa) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	A	AD	AAE			SIV	F	VD	PVE	
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl jj(48h)		ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	0,8	0,6	0,9	0,9	1,9	2,5	1,2	2,4	1,0	1,3
	0,9	0,8	0,6	0,9	0,7	2,1	0,9	2,0	0,7	1,1
	1,4	0,7	0,7	1,2	1,1	1,7	1,7	1,9	1,6	1,6
	1,1	0,7	1,5	0,6	2,0	2,4	1,3	1,4	0,8	2,0
	1,0	1,0	1,5	1,3	0,7	1,4	0,5	2,3	1,2	1,5
	0,9	1,2	1,0	1,2	0,5	2,0	0,8	1,9	0,7	1,5
	1,1	1,2	1,2	0,5	1,2				1,2	1,2
média	1,0	0,9	1,1	0,9	1,1	2,0	1,1	2,0	1,0	1,5
n	7	7	7	7	7	6	6	6	7	7

Tabela A17- Valores individuais da expressão gênica de *cpt1a* (expressão relativa) na AAD (aurícula do átrio direito), AAE (aurícula do átrio esquerdo), PVD (parede do ventrículo direito), SIV (septo interventricular) e na PVE (parede do ventrículo esquerdo) e de *cpt1b* (expressão relativa) na PVE de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	AAD AAE			SIV PVD		PVD	PVE		PVE			
			cpt1a								c	ot1b
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	1,1	2,5	1,3	2,6	0,9	3,9	1,1	5,7	1,0	3,0	0,3	0,6
	1,3	2,3	1,1	0,9	0,6	4,5	0,9	9,5	1,1	1,6	0,7	0,6
	1,2	1,4	1,3	1,7	1,8	6,0	1,4	2,3	0,7	1,8	0,8	1,8
	0,9	1,7	0,9	2,5	0,8	2,0	1,0	5,6	0,8	2,4	1,2	3,6
	0,7	3,3	1,0	1,5	1,0	3,1	0,8	2,1	1,4	3,1	1,2	4,1
	0,9	4,2	0,7	4,6	1,6	5,5	0,9	6,0	1,1	2,3	1,5	6,6
	0,9	1,8	0,6	4,8	0,9	2,1	1,3	4,6	0,9	2,2	2,3	6,9
	1,1		1,4	1,9			0,8	2,3	1,0	1,4		
	1,1		1,2					3,0	1,1	1,8		
									1,0	1,9		
										1,2		
média	1,0	2,5	1,0	2,5	1,1	3,9	1,0	4,6	1,0	2,1	1,16	3,46
n	9	7	9	8	7	7	8	9	10	11	7	7

Tabela A18- Valores individuais da expressão gênica de *pdk1* (expressão relativa) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	P	PVE
	р	dk1
	ctl	jj(48h)
	0,42	5,49
	0,51	2,61
	2,01	4,13
	1,10	3,88
	0,74	5,02
	1,57	1,64
	1,64	2,83
	1,11	1,68
média	1,14	3,41
n	8	8

			F	VE		
	pr	kaca	рра	rgc1a	s	irt1
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	0,93	6,19	0,75	1,63	0,74	1,89
	1,68	6,70	0,74	0,79	1,27	1,04
	0,58	4,07	1,38	2,26	2,05	2,23
	1,06	6,19	0,94	2,87	1,63	2,56
	1,57	7,08	1,66	1,98	0,76	1,40
	1,32	2,66	0,84	2,69	1,04	1,19
	1,03	2,79			0,66	1,87
	0,48				0,62	1,48
						1,39
média	1,08	5,10	1,05	2,04	1,09	1,67
n	8	7	6	6	8	9

Tabela A19- Valores individuais da expressão gênica de *prkaca, ppargc1a* e *sirt1* (expressão relativa) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

Tabela A20- Valores individuais da expressão gênica de *gys2, gsk3b, pygm* (expressão relativa) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

			P	VE		
	g	ys2	gs	sk3b	p	ygm
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	2,14	1,19	1,00	1,50	0,82	0,92
	0,50	2,69	2,32	1,63	0,83	1,06
	1,26	2,86	1,63	1,47	0,84	1,14
	0,41	6,24	0,64	1,09	0,86	1,20
	1,79	5,21	0,69	1,17	0,93	1,26
	2,36	2,06	0,60	1,15	1,05	1,29
	0,42	3,66			1,09	1,31
					1,31	1,51
					1,45	
média	1,27	3,42	1,15	1,34	1,02	1,21
n	7	7	6	6	9	8

	P	VE
	р	ck1
	ctl	jj(48h)
	1,38	1,98
	2,16	3,02
	0,55	3,13
	0,60	0,92
	0,42	3,34
	2,41	3,61
média	1,25	2,66
n	6	6

Tabela A21- Valores individuais da expressão gênica de *pck1* (expressão relativa) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

Tabela A22- Valores individuais da expressão gênica de PDK, AMPK, PGC1 alfa, SIRT1, GS, GSK3, GP e MLC (expressão relativa) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

	P	ΡVE
	n	ıyl2
	ctl	jj(48h)
	0,35	0,55
	1,03	0,65
	0,42	1,06
	0,13	0,56
	0,72	0,53
	0,12	0,74
	1,12	0,70
	1,32	0,73
	0,76	1,25
		0,27
média	0,66	0,70
n	9	10

		Р	VE	
	p-A	ΜΡΚα	p-G	SK3 β
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	0,17	0,44	0,52	0,35
	0,21	0,78	0,65	0,55
	0,23	0,96	0,81	0,57
	0,26	1,06	1,05	0,67
	0,31	1,10	1,13	0,74
	0,43	1,13	1,34	0,98
	0,54	1,44	1,43	1,00
	0,74			1,01
	0,83			1,27
média	0,41	0,99	0,99	0,79
n	9	7	7	9

Tabela A23- Valores individuais da expressão proteica de p-AMPK α e p-GSK3 β (unidades arbitrárias) na PVE (parede do ventrículo esquerdo) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

Tabela A24- Valores individuais da PA (mmHg), FC (bpm), dP/dt+ (mmHg/s), dP/dt- (mmHg/s), PSVE (mmHg), PDiVE (mmHg), PDfVE (mmHg) e TED (ms) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)

		PAM		FC	dP	/dt+	dP	/dt-	Р	SVE	P	DiVE	P	DfVE	T	ED
	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)	ctl	jj(48h)
	79	88	251	267	7047	4617	-6198	-3368	115	119	-4	-1	12	13	0,106	0,110
	86	85	289	248	7674	6610	-5185	-4961	114	109	-2	-2	9	11	0,099	0,127
	89	82	287	232	8374	6899	-6331	-4666	124	104	-3	-2	8	6	0,100	0,122
	79	69	280	251	7832	5886	-5619	-4051	124	130	-5	-1	10	9	0,110	0,116
		78		233		6693		-5422		105						0,152
média	83	80	276	246	7732	6141	-5833	-4494	119	113	-4	-2	9,75	9,75	0,104	0,125
n	4	5	4	5	4	5	4	5	4	5	4	4	4	4	4	5

	HEMATÓCRITO	
	ctl	jj(48h)
	59	61
	53	62
	59	65
	57	62
	57	59
	59	62
média	57	62
n	6	6

Tabela A25- Valores individuais do hematócrito (%) de ratos do grupo controle (ctl) e do grupo jejum (jj 48h)