

LISLEY SANTOS RAMALHO

**SAM β A: UMA NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA (ICFEp)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biologia de Sistemas.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

Versão original

São Paulo
2022

LISLEY SANTOS RAMALHO

**SAMBA: UMA NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA INSUFICIÊNCIA
CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA (ICFep)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Biologia de Sistemas.

Área de concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientador: Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

Versão original

São Paulo

2022

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)

Santos Ramalho, Lisley
SAMBa: UMA NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO
PRESERVADA (ICFep) / Lisley Santos Ramalho;
orientador Julio Cesar Batista Ferreira. -- São
Paulo, 2022.
84 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Insuficiência cardíaca com fração de ejeção
preservada. 2. Função mitocondrial. 3. Dinâmica
mitocondrial. 4. Estresse metabólico. 5.
Bioenergética. I. Cesar Batista Ferreira, Julio,
orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Lislely Santos Ramalho

Título da Tese: SAMβA: uma nova estratégia terapêutica para Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada (ICFEp)

Orientador(a): Prof. Dr. Julio Cesar Batista Ferreira

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "SAMbA: UMA NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA", protocolada sob o CEUA nº 9236210120, sob a responsabilidade de **Julio Cesar Batista Ferreira e equipe; Lislely Santos Ramalho; Luiz Roberto Grassmann Bechara** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 27/02/2020.

We certify that the proposal "SAMbA: A NOVEL THERAPEUTIC STRATEGY FOR HEART FAILURE WITH PRESERVED EJECTION FRACTION", utilizing 240 Heterogenics rats (240 males), protocol number CEUA 9236210120, under the responsibility of **Julio Cesar Batista Ferreira and team; Lislely Santos Ramalho; Luiz Roberto Grassmann Bechara** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 02/27/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Anatomia**

Origem: **Biotério de Produção de Ratos da Rede de Biotérios da USP - Profa. Dra. Zuleica Bruno Fortes**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **8 a 12 semanas**

Linhagem: **Wistar**

N amostral: 240

São Paulo, 27 de fevereiro de 2020



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dedico esse projeto a Deus que sempre guiou e iluminou os meus caminhos e também a minha mãe Maria (Lia), que sempre me apoiou e incentivou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à Deus por ter preparado na mim esta oportunidade de ingressar dentro da Universidade de São Paulo, e por me conceder saúde, força, paciência e sabedoria ao longo desses dois anos para concluir mais essa etapa na minha vida.

Em segundo lugar agradeço ao meu pai Lúcio Ramalho e em especial a minha mãe Maria Santos (Lia), por ser meu exemplo de vida, por todo apoio, carinho, conselhos e orações, que foram fundamentais para que eu pudesse trilhar o meu caminho. Sou imensamente grata a Deus por tê-la como minha mãe, e por sempre acreditar e apoiar os meus sonhos. Que Deus possa retribuir em bênçãos todo esse amor e zelo que teve e tem por mim.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Julio Ferreira, por ter me dado a oportunidade de fazer parte do laboratório de integração de sistemas biológicos (Lisb), e por todos esses anos de orientação. Ao Dr. Luiz Bechara que com toda paciência e dedicação me auxiliou em toda a minha trajetória acadêmica. A Dr^a Juliane Campos e ao Dr. Luiz Bozi por toda paciência, ensinamentos e companheirismo. Aos demais componentes da família Lisb: Msc. Rudá Prestes, Dr^a Débora Scheffer, Dr^a Bárbara Krum, Ricardo Bandeira, Dr. Thiago Menezes, Dr. Márcio Ribeiro e Dr. Itamar Guedes que assim como os demais contribuíram de forma ímpar para a execução desse projeto de pesquisa, e para geração de memórias tão agradáveis.

Sou imensamente grata aos meus familiares, irmãos e irmãs da Congregação Cristã no Brasil, que oraram por mim. Em especial ao meu amigo Vanderlei Lange, por todo apoio, incentivo, conselhos, orações e por toda paciência que teve comigo, que Deus abençoe imensamente por tudo.

Aos meus amigos da pós-graduação para vida Marcos Caetano e Denival Júnior, que estiveram comigo ao longo desses anos me apoiando, incetivando, aconselhando, e tornando os dias de trabalho/estudo mais divertidos e agradáveis.

Agradeço também a todos os professores do ensino médio e superior que assim como as pessoas já listadas aqui, serviram como alicerce para a construção dessa jovem profissional.

Por fim agradeço a FAPESP (processo 2020/04006-7) e Capes (código de financiamento 001), pelo apoio financeiro.

"Bem-aventurado o homem que acha a sabedoria, e o homem que adquire o conhecimento" - Provérbios 3-13

RESUMO

Ramalho LS. SAM β A: uma nova estratégia terapêutica para insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada. Dissertação (Mestrado em Biologia de Sistemas). São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2022.

A insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEp) é uma síndrome multifatorial associada à elevada morbi-mortalidade, e que carece de terapias eficazes. Recentemente foi demonstrado que pacientes portadores de ICFEp apresentam acúmulo de mitocôndrias fragmentadas e disfuncionais no coração. Esses achados levantam a questão se a fragmentação mitocondrial cardíaca contribui para a fisiopatologia da ICFEp, e se terapias seletivas capazes de inibir essa fragmentação mitocondrial excessiva têm impacto positivo na bioenergética cardíaca e no prognóstico da ICFEp. Recentemente, demonstramos que a molécula SAM β A, um peptídeo capaz de bloquear o acúmulo de mitocôndrias fragmentadas, melhora a função mitocondrial e o desempenho cardíaco em modelo experimental de insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida. Desse modo, o objetivo dessa dissertação de mestrado foi desenvolver um modelo pré-clínico capaz de recapitular as principais características clínicas desta síndrome (estresse metabólico e hipertensão) a fim de caracterizar a morfologia e o metabolismo das mitocôndrias cardíacas na ICFEp. Caso confirmado o fenótipo de fragmentação mitocondrial no modelo proposto, testaríamos o efeito terapêutico da molécula SAM β A. Nossos resultados demonstram que a indução concomitante da síndrome metabólica e da hipertensão crônica foi eficaz de recapitular diversas características observadas em pacientes portadores de ICFEp, incluindo ganho de peso corporal, hipertensão arterial, dislipidemia, hipertrofia cardíaca, aumento da massa ventricular esquerda, aumento dos transcritos do peptídeo natriurético N-terminal do tipo B (NT-proBNP), ligeira disfunção diastólica, intolerância ao exercício físico e prejuízo morfológico e contrátil muscular esquelética. O conjunto dessas alterações foi acompanhado por leve disfunção bioenergética mitocondrial cardíaca, porém sem alterações no tamanho e número de mitocôndrias na ICFEp. Também constatamos que na ICFEp, as mitocôndrias cardíacas apresentam deficiência na captação e retenção de cálcio, acompanhados pela alteração no perfil de expressão de proteínas mitocôndrias envolvidas nesse processo. Em conclusão, o modelo experimental de ICFEp descrito nessa dissertação não recapitulou o fenótipo de acúmulo de mitocôndrias fragmentadas observado no coração de pacientes portadores de ICFEp, inviabilizando o teste da molécula SAM β A. Mas descrevemos pela primeira vez que nesse modelo experimental de ICFEp, a captação e a retenção de cálcio pela mitocôndria cardíaca estão prejudicadas. Esses resultados abrem novas perspectivas para a melhor compreensão do papel da mitocôndria no controle do transiente de cálcio cardíaco na ICFEp.

Palavras-chave: Insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada, função mitocondrial, dinâmica mitocondrial, estresse metabólico e bioenergética.

ABSTRACT

Ramalho LS. SAM β A: a novel therapeutic strategy for heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF). Dissertation (Mestrado em Biologia de Sistemas). São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, 2022.

Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF) is a multifactorial syndrome associated with high morbidity and mortality. Unfortunately, there are no effective therapies capable of improving HFpEF outcome. HFpEF patients display cardiac accumulation of fragmented and dysfunctional mitochondria. These findings raise the question whether cardiac mitochondrial fragmentation contributes to the pathophysiology of HFpEF, and whether selective therapies capable of inhibiting this excessive mitochondrial fragmentation have a positive impact on cardiac bioenergetics and the prognosis of HFpEF. We recently developed a peptide, termed SAM β A, capable of blocking the accumulation of fragmented mitochondria and improving mitochondrial function and cardiac performance in an experimental model of heart failure with reduced ejection fraction. Thus, the objective of this dissertation is to develop a HFpEF preclinical model (combination of metabolic stress and hypertension) recapitulating the main clinical features of HFpEF, including impaired cardiac mitochondria connectiveness and metabolism. If confirmed the mitochondrial phenotype in HFpEF, we intend to test the long-term therapeutic effects of SAM β A. Our results demonstrate that a combination of high-fat diet and sustained L-NAME administration was effective in recapitulating many characteristics of HFpEF in rats, including elevated body weight, hypertension, dyslipidemia, cardiac hypertrophy, increased left ventricular mass, elevated B-type N-terminal natriuretic peptide (NT-proBNP) levels, mild diastolic dysfunction, exercise intolerance, and impaired skeletal muscle morphological and contractile properties. Cardiac mitochondria isolated from HFpEF rats displayed mild bioenergetics dysfunction without major changes in the size and number of mitochondria when compared with sham animals. Interestingly, we observed a significant impairment of cardiac mitochondrial calcium uptake and retention HFpEF rats. In conclusion, the experimental model of HFpEF described here did not recapitulate the phenotype of accumulation of fragmented mitochondria observed in HFpEF patients. We also described for the first time that cardiac mitochondrial calcium handling is impaired in this experimental model of HFpEF. These results open new perspectives for a better understanding of the role of mitochondria in controlling the cardiac calcium handling in HFpEF.

Key words: Heart failure with preserved ejection fraction, mitochondrial function, mitochondrial dynamics, metabolic stress and bioenergetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo dos processos de fissão e fusão e proteínas envolvidas.....	27
Figura 2: Desenho experimental proposto para o presente projeto de pesquisa.....	30
Figura 3: Esquema ilustrativo do consumo de oxigênio.....	34
Figura 4: Peso corporal e níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol total.....	42
Figura 5: Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGi).....	44
Figura 6: Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTI).....	46
Figura 7: Dados hemodinâmicos da pressão arterial.....	48
Figura 8: Massa cardíaca.....	50
Figura 9: Parâmetros Ecocardiográficos do Doppler.....	54
Figura 10: Expressão gênica de NT-proBNP.....	55
Figura 11: Teste de tolerância ao esforço físico.....	56
Figura 12: Análise funcional do músculo extensor longo dos dedos (EDL).....	57
Figura 13: Respiração mitocondrial.....	59
Figura 14: Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) durante a respiração mitocondrial.....	60
Figura 15: Formação de adutos de 4-HNE.....	61
Figura 16: Expressão proteica e atividade da enzima ALDH2.....	62
Figura 17: Capacidade de retenção e captação de cálcio mitocondrial.....	64
Figura 18: Expressão de proteínas envolvidas no transiente de cálcio	

mitochondrial.....65

Figura 19: Expressão de proteínas da dinâmica mitocondrial.....66

Figura 20: Expressão da proteína quinase C β II no lisado total e na mitocôndria.....68

Figura 21: Morfologia mitocondrial.....69

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ADH	Álcool desidrogenase
ADP	Adenosina Difosfato
AGNES	Ácidos Graxos não-esterificados
ALDH2	Enzima Aldeído Desidrogenase 2
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CTRL	Controle
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DDFVE	Diâmetro Diastólico Final do Ventrículo Direto
DSFVE	Diâmetro Sistólico Final do Ventrículo Direto
Drp1	Proteína 1 relacionada a dinâmica
EDL	Músculo Extensor Londo dos Dedos
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Frequência Cardíaca
FCCP	Fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona
FE	Fração de Encurtamento
FEVE	Fração de Ejeção do Ventrículo Esquerdo
Fis1	Proteína de Fissão 1
Fmax	Fluorescência máxima
Fmin	Fluorescência mínima
GTP	Guanosina Trifosfato
GTPase	Enzimas Responsáveis pela hidrólise de GTP
H ₂ O	Molécula de água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HPRT	Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase
IC	Insuficiência Cardíaca

ICFEi	Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção intermediária
ICFEp	Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção preservada
ICFEr	Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção reduzida
KCl	Cloreto de Potássio
L-NAME	N(ω)-nitro-L-arginina metil éster
MCU	<i>Mitochondrial calcium uniporter</i>
MICU-1	<i>Mitochondrial calcium uptake-1</i>
MiD49	Proteína da dinâmica mitocondrial 49
MiD51	Proteína da dinâmica mitocondrial 51
Mff	Fator de fissão mitocondrial
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
Modo M	Modo Monodimensional
mtDNA	Ácido Desoxiribonucleico mitocondrial
mRNA	Ácido Ribonucleico mitocondrial
NCLX	<i>sodium/calcium/litium exchanger</i>
NT-proBNP	Peptídeo natriurético do tipo N-terminal pró-B
O ₂	Molécula de Oxigênio
Opa1	Proteína de atrofia óptica 1
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PDFVE	Pressão Diastólica Final do Ventrículo Esquerdo
PKC β I	Proteína Quinase C isoforma β I
PKC β II	Proteína Quinase C isoforma β II
PPVEd	Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo na diástole
PPVEs	Parede Posterior do Ventrículo Esquerdo na sístole
qPCR	Reação da Polimerase em Cadeia em tempo real
RNA	Ácido Ribonucleico
SAM β A	<i>Selective Antagonist of Mitofusin 1 and Beta 2 PKC Association</i>
SHR	<i>Spontaneously Hypertensive Rat</i>
SIVd	Septo Interventricular na diástole
SIVs	Septo Interventricular na sístole
SNS	Sistema Nervoso Simpático

SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
TTGi	Teste de Tolerância a Glicose intraperitoneal
TTI	Teste de Tolerância a Insulina
TOM20	<i>Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20</i>
TRIV	Tempo de Relaxamento Isovolumétrico
VDAC	<i>Voltage-dependent anion channel</i>
VE	Ventrículo Esquerdo
ZSF1	Rato geneticamente modificado obeso e hipertensivo
4HNE	4-Hidroxinonenal

Unidades

Bpm	Batimento por minuto
Hz	Hertz
kDa	Quilodalton
mmHg	Milímetros de mercúrio
M	Metro
Mm	Milímetro
Mm	Micrômetro
Nm	Nanômetro
Kg	Quilograma
G	Gramma
Mg	Miligrama
µg	Micrograma
M	Molar
mM	Milimolar
µM	Micromolar
L	Litro
ml	Mililitro
µl	Microlitro
min	Minuto
seg	Segundo
ms	Milisegundo

pH	Potencial hidrogênio
%	Porcentagem
U	Unidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comparação da Classificação Funcional <i>New York Heart Association</i> (NYHA) e dos estágios da IC.....	19
Tabela 2: Composição nutricional e calórica das diferentes dietas experimentais.....	32
Tabela 3: Lista dos anticorpos primários utilizados para análise de expressão proteica por <i>Immunoblotting</i>	37
Tabela 4: Lista dos primers utilizados para análise de expressão gênica por qPCR.....	38
Tabela 5: Medidas Ecocardiográficas do Modo M.....	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 Insuficiência Cardíaca (IC).....	20
2.2 Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada (ICFep)	22
2.3 Mitocôndria e ICFep	25
2.4 Dinâmica mitocondrial	26
2.5 Dinâmica mitocondrial como alvo terapêutico na ICFep	29
3. HIPÓTESE.....	31
4. OBJETIVOS	31
5. MATERIAIS E MÉTODOS	31
5.1 Animais e desenho experimental	31
5.2 Análises hemodinâmica e ecocardiográfica.....	33
5.3 Avaliação do perfil lipídico sérico e teste de tolerância à glicose (iGTT)	34
5.4 Teste de tolerância à insulina (TTI)	34
5.5 Teste de tolerância ao exercício.....	34
5.6 Isolamento de mitocôndrias	35
5.7 Consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada	35
5.8 Liberação de H ₂ O ₂ pela mitocôndria cardíaca isolada.....	36
5.9 Ensaio de captação de cálcio mitocondrial.....	36
5.10 Immunoblotting	37
5.11 Análise da expressão de gênica do peptídeo natriurético do tipo N-terminal pró-B (NT-proBNP)	38
5.12 Determinação da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão	39
5.13 Função muscular esquelética <i>ex vivo</i> – banho de órgãos	40
5.14 Análise estatística	40
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1 Caracterização fenotípica do modelo animal de ICFep	41
6.2 Caracterização bioenergética mitocondrial em corações de ratos com ICFep) ..	59
6.3 Caracterização do perfil de expressão das proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial no coração de ratos ICFep).....	67
7. CONCLUSÃO.....	72
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Os pacientes portadores IC são classificados em dois subgrupos, os que apresentam IC com fração de ejeção reduzida (ICFEr) e os que apresentam IC com fração de ejeção preservada (ICFEp). Durante décadas, praticamente toda a atenção clínica e acadêmica foi voltada ao entendimento da ICFEr devido à facilidade no diagnóstico e elevado grau de morbi-mortalidade entre os pacientes, existindo assim, pouco avanço no entendimento da fisiopatologia da ICFEp.

Recentemente, estudos epidemiológicos demonstram que as taxas de mortalidade e hospitalização, bem como a qualidade de vida dos pacientes portadores de ICFEp são semelhantes aos indivíduos com ICFEr. De fato, a ICFEp é responsável por 50% dos casos de IC, sendo mais prevalente em mulheres e idosos. Em geral, o aparecimento da ICFEp está associado a presença de algumas comorbidades como hipertensão arterial, diabetes, doença renal crônica e obesidade, o que parece favorecer mudanças estruturais e funcionais características da síndrome como remodelamento ventricular, disfunção diastólica cardíaca, intolerância aos esforços, retenção de fluido e redução da longevidade. Entretanto, pouco se compreende sobre os mecanismos moleculares envolvidos no estabelecimento e progressão da ICFEp, dificultando o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes e específicas no combate dessa síndrome.

Recentemente, o conhecimento sobre a fisiopatologia da ICFEp estabeleceu que além dos distúrbios hemodinâmicos e morfológicos cardíacos associados à doença, alterações na morfologia e bioenergética mitocondrial estão presentes no coração de pacientes portadores de ICFEp. Esses dados associativos, mas clinicamente relevantes, sugerem que o prejuízo na dinâmica e bioenergética mitocondrial podem estar envolvidos na fisiopatologia da ICFEp em humanos. Entretanto, faltam provas de conceito apontando causalidade entre esses fenômenos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Insuficiência Cardíaca (IC)

A insuficiência cardíaca (IC) é uma síndrome degenerativa multifatorial que consiste no comprometimento funcional e/ou estrutural do ventrículo esquerdo, o que resulta na capacidade reduzida do coração de encher e/ou bombear a quantidade de sangue necessária para atender as demandas metabólicas do organismo. A IC é um importante problema de saúde pública mundial, afetando cerca de 64,3 milhões de pessoas, sendo a causa mais proeminente de admissão hospitalar e morte dentre pacientes acima de 65 anos de idade ^{1; 2; 3; 4; 5; 6}. As manifestações clínicas dessa síndrome são: fadiga e dispneia que pode levar a intolerância ao exercício, e retenção de líquidos que pode resultar em edema pulmonar e/ou esplâncnico e/ou periférico ^{2; 3}.

Estima-se que o caso mais antigo de IC foi encontrado no Egito em uma tumba saqueada do Vale das Rainhas em restos mortais que datam mais de 3500 anos de idade. Acredita-se que os resquícios mortais são de um egípcio chamado Nebiri que viveu na 18ª dinastia do Faraó Thutmés III. Os egípcios conheciam vários componentes da IC como a hipertrofia cardíaca e o edema pulmonar, bem como outros povos como os gregos, romanos e chineses. No entanto, naquela época não havia conhecimento sobre como o fluido se acumulava, pois apesar de reconhecerem que o coração é capaz de contrair, acreditava-se que era uma fonte de calor e que o sangue era impulsionado pelas veias ^{7; 8}. Somente em 1628, Willian Harvey descreveu pela primeira vez a circulação, e com isso forneceu a base para novos estudos visando a compreensão das anormalidades hemodinâmicas na insuficiência cardíaca ⁹.

A fisiopatologia da IC é caracterizada pela diminuição do débito cardíaco e consequente redução da pressão arterial média. Na tentativa de manter a perfusão tecidual, observa-se uma hiperativação do sistema nervoso simpático (SNS) e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Agudamente, essa ativação neuro-humoral é benéfica, uma vez que promove a retenção líquida, o aumento da resistência vascular periférica, da frequência e da contratilidade cardíaca, resultando na melhora do débito cardíaco. Entretanto, cronicamente, o estímulo neuro-humoral resulta no remodelamento cardíaco patológico, disfunção ventricular, aumento do consumo de oxigênio pelo músculo cardíaco, aumento da frequência, prejuízo na função ventricular e agravamento das arritmias cardíacas ^{6; 10; 11; 12}. Desse modo, a

hiperativação neuro-humoral sustentada é um mecanismo deletério para o coração e contribui significativamente tanto para os sintomas quanto para elevada taxa de mortalidade na IC ¹¹.

A IC é classificada pela *American College of Cardiology/American Heart Association (ACC/AHA)* em diferentes estágios de acordo com a sua presença e severidade (tabela 1): o estágio A possui um alto risco de desenvolvimento dessa síndrome, mas sem a presença de doença cardíaca estrutural e sintomas; o B contém doença cardíaca estrutural, mas sem sintomatologia; o C possui cardiopatia estrutural com sintomas de IC e o D que é a IC refratária e requer intervenções especiais. Além disso, ela pode ser também classificada funcionalmente pela *New York Heart Association (NYHA)* de acordo com o estado sintomático da doença e a capacidade de exercício. Apesar de serem classificações distintas, elas são amplamente utilizadas por fornecer informações úteis e complementares sobre a presença e a gravidade da insuficiência cardíaca (tabela 1) ³.

Tabela 1 - Comparação da Classificação funcional *New York Heart Association (NYHA)* e dos estágios da IC.

Estágios da Insuficiência Cardíaca		Classificação Funcional	
A	Risco de IC, sem cardiomiopatia estrutural		
B	Cardiomiopatia estrutural, sem sinais ou sintomas de IC	I	Ausência de sintomas (dispneia), durante as atividades cotidianas.
C	Cardiomiopatia estrutural com sintomas prévios ou atuais de IC	I	Ausência de sintomas (dispneia), durante as atividades cotidianas.
		II	Sintomas leves durante as atividades físicas cotidianas.
		III	Sintomas desencadeados em atividades menos intensas que as cotidianas ou aos pequenos esforços.
		IV	Sintomas aos mínimos esforços ou em repouso
D	IC refratária, sendo necessárias intervenções	IV	Sintomas aos mínimos esforços ou em repouso

Em 2013 as diretrizes da Fundação Americana de Cardiologia (ACCF)/Associação Americana do Coração (AHA), baseadas na fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE), que é facilmente mensurada com o ecocardiograma, classificou a insuficiência cardíaca em três categorias: IC com fração de ejeção reduzida ou sistólica (ICFEr); IC com fração de ejeção intermediária (ICFEi), e IC com fração de ejeção preservada ou diastólica (ICFEp) ^{2; 3; 5; 13}. Essa diferenciação é importante devido às distintas etiologias, comorbidades, demografias, fisiopatologias, diagnóstico, prognóstico e respostas a terapias subjacentes ^{5; 13}.

A ICFEr é caracterizada pelo comprometimento da função sistólica do ventrículo esquerdo (FEVE $\leq 40\%$) associado à reduzida contratilidade miocárdica e a presença de hipertrofia ventricular esquerda excêntrica após sobrecarga de pressão ^{10; 14; 15; 16}. Na ICFEi, os pacientes podem apresentar tanto uma leve disfunção sistólica, quanto diastólica e FEVE entre 40-49% ¹⁷. Já na ICFEp, observa-se perda da elasticidade do músculo cardíaco, resultando na diminuição da complacência ventricular (maior rigidez) e automaticamente prejuízo no enchimento do ventrículo esquerdo. Vale ressaltar que indivíduos portadores de ICFEp apresentam FEVE normal. Esse tipo de IC normalmente é sistêmica e está associada à comorbidades como hipertensão, diabetes e obesidade ^{10; 13; 14; 15}.

2.2 Insuficiência Cardíaca com Fração de Ejeção Preservada (ICFEp)

A ICFEp é responsável por 50% dos casos de IC (cerca de 13 milhões de pessoas em todo o mundo) e está associada a elevadas taxas de morbimortalidade e gastos com saúde pública, sendo mais frequente em idosos, obesos e mulheres ^{17; 18; 19}. Dados epidemiológicos indicam que a prevalência de ICFEp aumenta anualmente de acordo com o crescimento populacional e com o elevado número de indivíduos com comorbidades ²⁰. Ela é caracterizada pelo remodelamento cardíaco seguido de diminuição da reserva diastólica e sistólica, hemodinâmica anormal e disfunção de órgãos secundários ¹⁷. Essa síndrome pode ser ocasionada pela disfunção diastólica, que é caracterizada pelo aumento da rigidez ventricular esquerda que prolonga o relaxamento isovolumétrico, resultando no aumento da pressão atrial esquerda, para obter o enchimento do ventrículo esquerdo ^{2; 21}. Essa anormalidade é comumente causada por fibrose e/ou hipertrofia miocárdica, o que influencia negativamente a fase de enchimento ventricular ¹⁸.

O relaxamento do ventrículo esquerdo é um processo ativo que ocorre devido

à dissociação das pontes cruzadas entre a actina-miosina e a liberação do cálcio da troponina C, que ativa a sua extrusão pelo trocador de sódio e cálcio do citoplasma e à captação desse íon intracelular que estava em altas concentrações durante a sístole pelo retículo sarcoplasmático^{2; 18}. Esse mecanismo é prejudicado por distúrbios do metabolismo energético, ou por anormalidades no transiente de cálcio¹⁸. Quando o mecanismo diastólico é prejudicado, o débito cardíaco é atenuado, devido ao preenchimento ventricular incompleto. Como resultado, a pressão do átrio e do ventrículo esquerdo aumentam, podendo levar à insuficiência pulmonar por conta do acúmulo de fluido, ao aumento do trabalho do ventrículo esquerdo e à hipertrofia do miocárdio²¹.

É importante salientar que a disfunção diastólica tem um papel fundamental na fisiopatologia da ICFEp, porém ela isolada pode não ser um fator determinante para o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, pois existe um elevado número de pacientes portadores de disfunção diastólica, assintomáticos e com ausência de sinais e sintomas de IC²¹. Outros fatores que contribuem para a fisiopatologia dessa síndrome são: disfunção endotelial, recuperação da frequência cardíaca prejudicada, acoplamento vascular comprometido, hipertensão pulmonar pós-capilar e autônoma, recuperação anormal ventrículo-vascular, reserva vasodilatadora prejudicada, disfunção do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), incompetência cronotrópica e regulação dos sistemas simpáticos²².

Os fatores de risco para desenvolvimento de ICFEp incluem: cardiopatia isquêmica, diabetes mellitus, obesidade (cerca de 80% dos portadores estão com sobrepeso ou são obesos), idade avançada, síndrome metabólica, insuficiência renal, hipertrofia ventricular esquerda, intolerância ao exercício (que contribui para redução da qualidade de vida), tabagismo, doenças autoimunes, acidente vascular cerebral, anemia, doenças hepáticas, câncer, fibrilação arterial e hipertensão, que está presente na maioria dos casos de ICFEp^{2; 16; 19; 23}. Esses fatores metabólicos e inflamatórios extra cardíacos contribuem para alterações microvasculares prejudiciais, para o remodelamento e disfunção miocárdica^{16; 24}.

O diagnóstico dessa síndrome costuma ser difícil, pois os pacientes podem ser assintomáticos ou levemente sintomáticos em repouso e apresentar sintomas durante a prática de exercício físico, desse modo, a *American College of Cardiology Foundation/American Heart Association (ACCF/AHA)* e a *European Society of Cardiology (ESC)* publicaram diretrizes para auxiliar no diagnóstico de ICFEp^{3; 13; 25}.

As recomendações da ACCF/AHA dependem de três fatores: sintomatologia, fração de ejeção $\geq 50\%$ e evidência de disfunção diastólica detectada por ecocardiografia transtorácica, no entanto, essa abordagem só é eficiente em indivíduos com sintomatologia clara ³. No caso de pacientes assintomáticos outros parâmetros mais específicos são considerados como: índices ecocardiográficos baseados em medições bidimensionais que fornecerem os parâmetros de tamanho do ventrículo, do átrio e a espessura das paredes cardíacas e septo interventricular; e parâmetros que evidenciam a presença de disfunção diastólica a partir da velocidade de fluxo sanguíneo (onda E/A – indicativo de fluxo sanguíneo do átrio para o ventrículo) e a velocidade do anel mitral lateral ou medial (razão E/e' – indicativo de pressão elevada do átrio esquerdo) ¹³. Essas medidas ecocardiográficas podem ser associadas a concentração de peptídeo natriurético cerebral (BNP), também denominado de pró-hormônio N-terminal BNP (NT-proBNP), que está diretamente relacionado com o estresse na parede diastólica final do ventrículo esquerdo, e é maior em portadores de ICFEp devido ao relaxamento prejudicado ²⁶.

Outro teste amplamente utilizado em pacientes assintomáticos com suspeita de ICFEp é o teste de esforço cardiopulmonar em que é avaliado os sintomas como fadiga e dispneia, o consumo de oxigênio e a pressão arterial sistêmica e pulmonar. Geralmente, portadores dessa síndrome apresentam dispneia durante o esforço físico associada ao aumento da frequência respiratória e pressão arterial sistêmica e pulmonar média ou elevada ^{25; 27}.

Além da ICFEp afetar cerca de 50% dos pacientes portadores de IC, a sua incidência deve aumentar consideravelmente nas próximas décadas, devido ao aumento do número de idosos e distúrbios cardiovasculares acompanhados de diabetes mellitus, hipertensão, e a falta de medicamentos ou classe de medicamentos que melhorem o prognóstico dessa síndrome ^{2; 18; 21}. O tratamento da ICFEp consiste na administração de inibidores da enzima conversora de angiotensina, betabloqueadores, bloqueadores dos receptores de angiotensina e estatinas; no entanto, nenhum deles melhora a sobrevida ou reduz a taxa de mortalidade dos pacientes ²¹.

Apesar de existirem diversos estudos sobre a ICFEp, a fisiopatologia e os mecanismos moleculares que levam ao estabelecimento e progressão dessa síndrome ainda são pouco entendidos, limitando assim o desenvolvimento de terapias eficazes e específicas. Por isso, a ICFEp está entre as síndromes mais desafiadoras

tanto para clínica quanto para os pesquisadores. Um estudo publicado em 2019 demonstrou que pacientes com ICFEp exibem acúmulo cardíaco de mitocôndrias fragmentadas (disfuncionais) em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo assim o remodelamento mitocondrial patológico como um alvo terapêutico potencial na ICFEp ¹⁷.

2.3 Mitocôndria e ICFEp

A mitocôndria é uma organela fundamental para a sobrevivência celular, pois ela controla o metabolismo energético, sintetiza bases precursoras de DNA, aminoácidos não essenciais, moléculas envolvidas na sinalização intracelular e produz o ATP a partir de lipídeos, carboidratos e aminoácidos ²⁸. Além disso, possui papéis regulatórios e biológicos importantes como: biossíntese, crescimento, morte celular, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), controle de qualidade de proteínas, homeostase de íons, inflamação e balanço redox ²⁹.

Ela está presente apenas em células eucariontes, sendo que o seu tamanho, distribuição, forma e quantidade varia de acordo com o tipo de célula. Nos cardiomiócitos, por exemplo, ela compõe mais de 30% (cerca de um terço) do volume celular e sintetiza diariamente através da fosforilação oxidativa cerca de 6kg de ATP, devido ao elevado consumo energético do tecido cardíaco ^{28; 30; 31}.

Além de fornecer energia para o coração, as mitocôndrias estão diretamente ligadas ao envelhecimento, atuam como reservatório de cálcio, participam das vias de apoptose, necrose e beta oxidação de ácidos graxos, desempenhando um papel fundamental para manutenção da função celular. Desse modo, manter a homeostase mitocondrial é de extrema relevância para manter a viabilidade celular e o bom funcionamento cardíaco, tendo em vista que a sua disfunção resulta na diminuição da produção de ATP e na formação de espécies reativas de oxigênio ³¹.

A homeostase das mitocôndrias é conservada por meio da organização de processos que constituem a dinâmica mitocondrial, que é caracterizada pelo movimento dessa organela pela extensão celular, pelo controle da estrutura, distribuição e conectividade. Esse processo é mediado pela fissão e fusão mitocondrial, que são responsáveis por regular o número e o tamanho dessa organela ^{32; 33}.

Nosso grupo demonstrou em estudo pré-clínico publicado em 2019 que a

disfunção mitocondrial associada à fragmentação mitocondrial contribui diretamente para a progressão da ICfEr. De fato, o restabelecimento do número, tamanho e funcionamento mitocondrial é suficiente para melhorar o quadro de ICfEr em roedores³². Entretanto, o envolvimento da disfunção mitocondrial na ICfEp era desconhecido. Um estudo também publicado em 2019 mostrou pela primeira vez que pacientes portadores de ICfEp apresentam aumento no número de mitocôndrias fragmentadas (disfuncionais) no coração em comparação com os indivíduos saudáveis¹⁷.

Esse achado sugere uma possível associação entre o remodelamento estrutural e metabólico mitocondrial e a ICfEp. Entretanto, estudos de prova de conceito são necessários para validar essa hipótese. Vale ressaltar que a identificação da mitocôndria como alvo central na progressão da ICfEp abre portas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra a ICfEp. Esses dois estudos colocaram em evidência os processos que controlam o tamanho, número e forma das mitocôndrias (conhecido como dinâmica mitocondrial) como possíveis alvos contra o estabelecimento e progressão da ICfEp.

2.4 Dinâmica mitocondrial

A dinâmica mitocondrial é responsável pela manutenção da quantidade e da qualidade dessa organela, através dos processos de fissão e fusão. O equilíbrio entre esses processos permite o controle de qualidade da rede mitocondrial, incluindo renovação, remoção, distribuição do DNA mitocondrial e estado metabólico^{34; 35}.

Fissão mitocondrial. A fissão mitocondrial é caracterizada pela cisão de uma mitocôndria em duas ou mais organelas novas. Esse processo facilita o transporte da organela dentro da célula (fenômeno claramente observado em neurônios), permitindo um rápido tráfego mitocondrial para regiões distais ou com maior demanda energética, além de ser fundamental para remoção de partes disfuncionais dessa organela, que são direcionadas para o processo de mitofagia (degradação)^{36; 37; 38}. Entretanto, a fissão mitocondrial excessiva é capaz de induzir apoptose através da liberação de citocromo c e ativação da caspase 8³⁹.

As proteínas que participam da fissão mitocondrial identificadas até o momento são: proteína 1 relacionada a dinâmica (Drp1), fator de fissão mitocondrial (Mff), proteínas da dinâmica mitocondrial de 49 e 51 kDa (MiD49 e MiD51) e proteína mitocondrial de fissão 1 (Fis1). A Drp1 é uma GTPase localizada principalmente no

citósol. Durante o processo de fissão, a Drp1 é fosforilada e transloca-se para a membrana externa da mitocôndria, interagindo com receptores Mff, MiD49 e MiD51 presentes na membrana externa mitocondrial. Uma vez recrutada, a Drp1 oligomeriza para envolver a membrana externa e, após a hidrólise de GTP, muda de conformação para se dissociar de MiD49 e MiD51, retrair o anel oligomérico e realizar a cisão mitocondrial (figura 1) ⁴⁰. É importante destacar que a cisão mitocondrial é um evento extremamente dinâmico e regulado por uma miríade de componentes e processos celulares incluindo retículo endoplasmático, lisossomos, vesículas derivadas de Golgi, modificações pós-traducionais, contatos com filamentos de actina e reguladores de actina podem também modular a atividade de Drp1 ³⁵.

Antigamente acreditava-se que Drp1 se translocava para a membrana externa da mitocôndria e se ligava à proteína Fis1, uma proteína de 17 kDa ancorada na membrana externa da organela. No entanto, o papel de Fis1 na divisão mitocondrial mediada por Drp1 tem sido desafiado. Evidências recentes apontam que Fis1 não interage com Drp1, mas sim com componentes da medeiam a fusão, para inibir a sua atividade ^{34; 41; 42}. Diferentemente do que ocorre em mamíferos, em leveduras Fis1 atua recrutando Drp1, atuando como um adaptador de membrana para proteínas de divisão mitocondrial adicionais que não possuem homólogos em mamíferos ⁴⁰.

Em relação à fissão da membrana interna, estudos mostram que a replicação do mtDNA pela polimerase mitocondrial POLG2, parece estar ligada a sítios de fissão. Entretanto, os mecanismos que atuam na fissão da membrana interna ainda não foram totalmente elucidados ⁴³. A fissão mitocondrial está envolvida em processos celulares como: apoptose, função neuronal, diferenciação cardíaca e muscular, e ciclo celular. De fato, a perda genética de Drp1 ocasiona um alongamento drástico das mitocôndrias e peroxissomos tanto em linhagens celulares quanto em modelos animais, estando associada a fenótipos deletérios ^{44; 45; 46}.

Além dos resultados encontrados com Drp1, foi observado que a superexpressão de Mff resulta em uma rede mitocondrial fragmentada, enquanto a deleção do gene que codifica essa proteína promove o alongamento mitocondrial e peroxissomo, além de diminuir o recrutamento de Drp1 ⁴⁷. A superexpressão das MiDs leva ao alongamento das mitocôndrias devido o sequestro de Drp1, enquanto a deficiência dessas proteínas induz a fragmentação mitocondrial excessiva ^{48; 49}.

Além dos trabalhos utilizando camundongos transgênicos e nocautes no entendimento do papel da Drp1 no processo de fissão mitocondrial, recentemente,

nosso grupo demonstrou que o bloqueio farmacológico da interação entre Drp1 e Fis1 é suficiente para prevenir a fragmentação mitocondrial e proteger o coração e o cérebro contra doenças degenerativas como infarto do miocárdio e doença de Huntington ^{50; 51; 52}.

Fusão mitocondrial: O termo fusão mitocondrial foi adotado para descrever a união de duas ou mais mitocôndrias. Esse processo é importante para resgatar e restaurar a integridade de organelas comprometidas, além de permitir a manutenção do mtDNA, troca genética, e manutenção da vida celular em situações de estresse servindo como um meio temporário de aumento da produção de ATP ³⁵.

A fusão mitocondrial é regulada pela ação de duas classes de GTPases: mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2) e proteína de atrofia óptica 1 (Opa1). Essas enzimas são ativadas pela hidrólise de guanosina trifosfato (GTP), uma purina cuja função se assemelha à do ATP. O processo de fusão mitocondrial é dividido em duas fases, onde as membranas, externa e interna, se unem em eventos separados. As mitofusinas estão ancoradas na membrana externa da mitocôndria e são responsáveis pela fusão das mesmas, enquanto a Opa1, que está presente na membrana interna, atua fundindo as membranas internas das duas organelas (figura 1) ^{33; 53}. No entanto, o mecanismo explicando a fusão coordenada das membranas mitocondriais bem como a elucidação dos fatores que sinalizam uma região específica da organela para iniciar todo esse processo permanecem indeterminados ⁵⁴.

Atualmente sabe-se que a fusão mitocondrial está envolvida nos processos de desenvolvimento embrionário ^{36; 55} e morte celular ⁵⁵. De fato, a ablação das mitofusinas em roedores resulta em letalidade embrionária ⁵⁴. Em células mutantes e camundongos nocautes para ambas proteínas, observa-se excessiva fragmentação mitocondrial ⁵⁵, enquanto o *knockdown* de ambas Mfns resulta em ausência de fusão ⁵⁶. Além das mitofusinas, a OPA1 exerce importante papel na função mitocondrial. O *knockdown* dessa proteína resulta em fragmentação da rede mitocondrial, devido a deficiência no processo de fusão ⁵⁶. Enquanto a superexpressão dessa enzima induz o alongamento das mitocôndrias ⁵⁷.

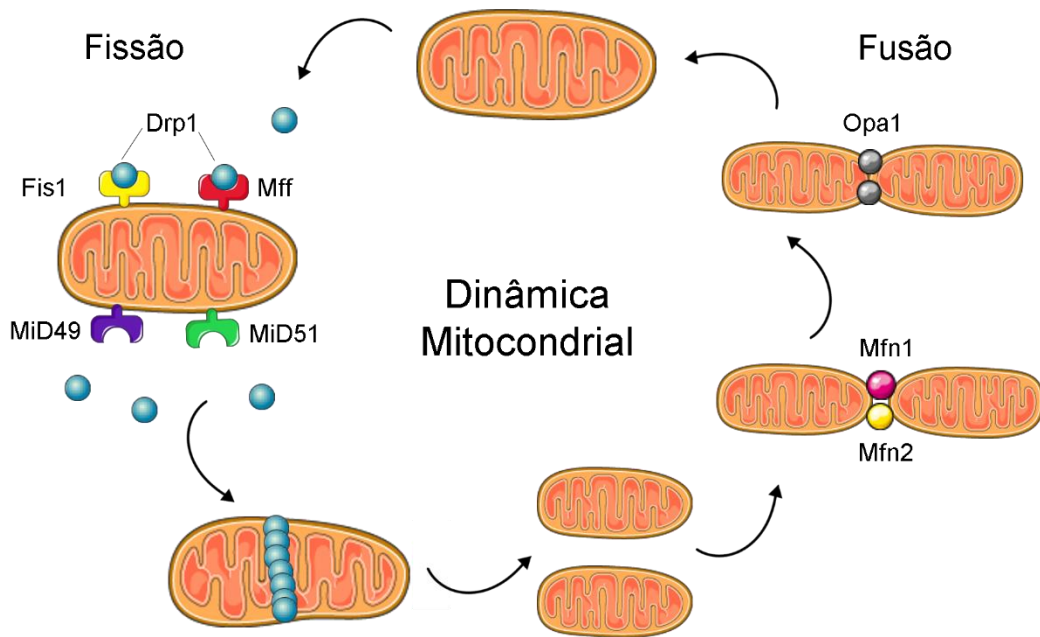


Figura 1: **Esquema ilustrativo dos processos de fissão e fusão e proteínas envolvidas.** Drp1 – proteína 1 relacionada a dinâmica; Fis1 – proteína mitocondrial de fissão 1; Mff – fator de fissão mitocondrial; MiD49 e MiD51 – proteínas da dinâmica de 49 e 51 kDa; Mfn1 – mitofusina 1; Mfn2 – mitofusina 2 e OPA1 – proteína de atrofia óptica 1.

Baseado nos trabalhos descritos acima, conclui-se que um contínuo balanço entre os processos de fusão e fissão da mitocôndria é importante para a manutenção da função, distribuição e conectividade mitocondrial. De fato, em patologias como diabetes, miopatia, câncer, doenças do fígado e neurodegenerativas, assim como no envelhecimento, são observadas alterações na morfologia mitocondrial e na expressão das proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão da organela, bem como uma disfunção mitocondrial ^{58; 59; 60; 61}.

2.5 Dinâmica mitocondrial como alvo terapêutico na ICFeP

Conforme descrito acima, nosso grupo identificou recentemente uma interação intermolecular que regula negativamente a dinâmica mitocondrial na ICFeP, favorecendo o acúmulo de mitocôndrias fragmentadas e, conseqüentemente, disfuncionais. Esse fenótipo na ICFeP é resultado da interação entre a proteína quinase C beta 2 (PKC β II) e a Mfn1, resultando em excessiva fosforilação e conseqüente inibição da atividade catalítica da Mfn1 ³². Como resultado, observa-se uma inibição da fusão mitocondrial, favorecendo então a fissão mitocondrial e acúmulo

de mitocôndrias fragmentadas e disfuncionais. Ainda, com base nessa interação intermolecular, nosso grupo desenvolveu um peptídeo capaz de competir com o sítio de interação entre as duas proteínas e inibir seletivamente a ação deletéria da PKC β II na Mfn1, resultando no restabelecimento da dinâmica mitocondrial, metabolismo celular e funcionamento cardíaco na ICfEp. O peptídeo chama-se SAM β A do inglês *Selective Antagonist of Mitofusin 1 and Beta 2 PKC Association*.

A ICfEp, caracterizada pelo remodelamento cardíaco, perda da reserva diastólica e sistólica, hemodinâmica anormal e disfunção dos órgãos, é considerada um importante problema de saúde pública, afetando 50% dos pacientes com IC. A progressão da disfunção ventricular na ICfEp é caracterizada por uma série de anormalidades celulares que resulta na falência cardíaca ²³. Entretanto, as terapias disponíveis para tratar ICfEp são pouco eficientes, uma vez que foram desenvolvidas para tratar ICfEr, uma doença com fisiopatologia completamente distinta da ICfEp ²³.

Dentre os diferentes fatores associados à disfunção ventricular na ICfEp, a fragmentação mitocondrial e, conseqüente prejuízo no metabolismo energético cardíaco, foram recentemente descritos em pacientes portadores de ICfEp. Entretanto, esses achados ainda não foram validados em modelo experimental de ICfEp, importante para futuros estudos de prova de conceito. Dessa forma, a caracterização da dinâmica mitocondrial e do metabolismo energético cardíaco em modelo pré-clínico de ICfEp são críticos para a melhor compreensão da fisiopatologia envolvida na ICfEp e futuro desenvolvimento de terapias eficazes.

No presente projeto de pesquisa utilizamos um modelo de ICfEp induzida através da combinação de uma dieta rica em gordura (60%) e inibição constitutiva da óxido nítrico sintase por N(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (150mg/L em água potável) durante 16 semanas em ratos wistar machos, mimetizando as 2 principais comorbidades envolvidas na ICfEp (hipertensão e síndrome metabólica) ^{62; 63}. Considerando o fato de que a mitocôndria apresenta importantes alterações morfológicas e funcionais na ICfEp em humanos ¹⁷, a caracterização dos processos de fusão e fissão (incluindo sua regulação pela PKC β II), bem como sua interação com a disfunção mitocondrial se faz necessária e interessante, pois poderá contribuir para futuras estratégias de prevenção e terapias.

3. HIPÓTESE

Considerando que a fragmentação mitocondrial é uma alteração característica da ICFEp em humanos ¹⁷, levantamos a hipótese que:

a. O modelo experimental proposto no presente estudo apresentará o mesmo fenótipo cardíaco de acúmulo de mitocôndrias fragmentadas (disfuncionais) observado em humanos;

b. Os níveis totais e a interação entre as enzimas Mfn1 e PKC β II estarão elevados nesse modelo experimental de ICFEp;

c. O tratamento com a molécula SAM β A reestabelecerá a dinâmica e a função mitocondrial, resultando na melhora do prognóstico do modelo experimental de ICFEp.

Em suma, a presente proposta de pesquisa pretende melhor compreender o papel da dinâmica mitocondrial na fisiopatologia da ICFEp, e testar a molécula SAM β A como uma possível terapia no tratamento da ICFEp, através do restabelecimento da dinâmica mitocondrial cardíaca.

4. OBJETIVOS

- Estabelecer o modelo experimental de ICFEp em ratos Wistar.
- Caracterizar a dinâmica e a bioenergética mitocondrial cardíaca em modelo experimental de ICFEp.
- Testar o efeito do tratamento sustentado com a molécula SAM β A no prognóstico da ICFEp, se confirmado o fenótipo de fragmentação mitocondrial nos animais.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais e desenho experimental

O protocolo com animais foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (nº 9236210120) e o estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos na pesquisa animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (www.cobea.org.br).

Para execução desse projeto utilizamos ratos Wistar machos com 3 meses de

idade randomizados nos seguintes grupos: controle que recebeu uma dieta balanceada (10% de lipídeos, 20% de proteínas e 70% de carboidratos -tabela 2) em conjunto com água potável *ad libitum*; e o DH+L-NAME que recebeu uma combinação de dieta hiperlipídica (DH- 60% lipídeos, 20% de proteínas e 20% de carboidratos – tabela 2) e água potável com inibidor constitutivo da enzima óxido nítrico sintase por N(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME (150mg/L)) durante 16 semanas, mimetizando as duas principais comorbidades envolvidas na ICFEp, hipertensão e obesidade ^{62; 63}.

Durante a execução do protocolo experimental o peso corporal foi acompanhado quinzenalmente. Medidas de função cardíaca, tolerância ao exercício, pressão arterial, frequência cardíaca, tolerância à glicose e insulina foram realizadas nas semanas pré-intervenção, 4, 8, 12 e 16 do protocolo experimental (figura 2).

Após 16 semanas, os animais foram eutanasiados e em seguida o coração e os músculos (extensor longo dos dedos (EDL)) foram excisados e pesados. Com um microscópio estereoscópio binocular (x3,5 de amplitude), os átrios e ventrículos direito e esquerdo foram dissecados e

pesados independentemente. A massa cardíaca e do ventrículo esquerdo foi normalizada pelo comprimento da tíbia dos animais. Após pesagem, o ventrículo esquerdo foi utilizado para as análises funcionais (consumo de oxigênio (O₂), liberação de peróxido de hidrogênio mitocondrial (H₂O₂) e captação de cálcio mitocondrial), morfológicas e bioquímicas descritas na figura 2. O ventrículo direito foi armazenado para análises futuras.

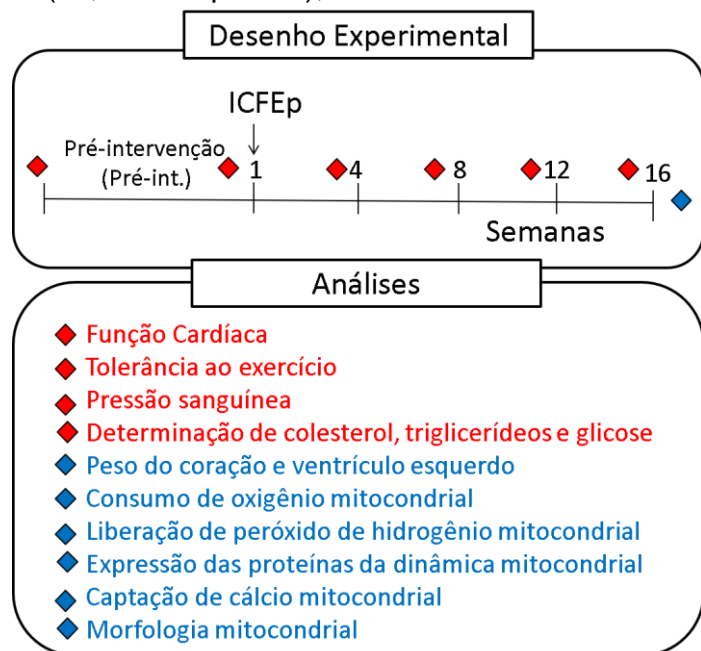


Figura 2: **Desenho experimental proposto para o presente projeto de pesquisa.** Em vermelho estão listadas as análises fisiológicas realizadas nos animais ao longo de dezesseis semanas e em azul estão listadas as análises pós eutanásia.

Tabela 2: **Composição nutricional e calórica das diferentes dietas experimentais**

Componentes	Kcal/g ração	
	Dieta Controle	Dieta Hiperlipídica 60%
Amido de Milho	1,19	0
Caseína	0,75	1,03
Amido Dextrinizado	0,20	0,65
Sacarose	1,30	0,36
Óleo de Soja	0,21	0,29
Celulose Microcristalina	0	0
Mix Mineral PSB 10026	0	0
Mix Vitamin AIN 93	0,04	0,05
L-Cistina	0,01	0,01
Bitartarato de Colina	0	0
BHT	0	0
Fosfato de Cálcio Bifásico	0	0
Carbonato de cálcio	0	0
Citrato de potássio	0	0
Banha	0,17	2,85
Total	3,87	5,24

5.2 Análises hemodinâmica e ecocardiográfica

A pressão arterial sistólica foi determinada de forma não invasiva, usando um sistema computadorizado de manguito de cauda (BP-2000, Visitech System). Também por método não invasivo foi avaliado a função cardíaca pelo ecocardiograma em modo M (monodimensional) e Doppler tecidual em ratos anestesiados (isoflurano a 3%). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal com as patas dianteiras abertas e foi aplicado um gel para facilitar a transmissão por ultrassom. O ecocardiograma transtorácico foi realizado utilizando equipamento Acuson Sequoia modelo 512 (SIEMENS) equipado com um transdutor linear de 10-14 MHz, no Instituto do coração do hospital das clínicas da FMUSP (Incor), em colaboração com o médico cardiologista Dr. Paulo Magno. A função sistólica do ventrículo esquerdo foi

estimada pela fração de ejeção (FE) e encurtamento fracionário (EF), como segue: $FE (\%) = [(DDFVE - DSFVE) / DDFVE - 1] \times 100$ e $EF (\%) = [(DDFVE - DSFVE) / DSFVE - 1] \times 100$, onde o DDFVE é o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo e o DSFVE é o diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo. As funções diastólicas incluindo velocidade das ondas E e A, tempo de desaceleração e tempo de relaxamento isovolumétrico foram adquiridas utilizando Doppler tecidual ⁶⁴. Além disso, calculamos outros índices associados à função cardíaca diastólica como razão ondas E/A e índice de performance do miocárdio.

5.3 Avaliação do perfil lipídico sérico e teste de tolerância à glicose (iGTT)

A concentração sérica de colesterol total, HDL, triglicerídeos foi determinada por ensaios colorimétricos utilizando kits comerciais (Bioclin-Quibase, Brasil). O teste de tolerância à glicose foi realizado por injeção de glicose (2g/kg em solução salina) após jejum de 12 horas. Os níveis de glicose no sangue da cauda [mg/dL] foram medidos com um glicosímetro antes (0 min) e aos 15, 30, 60, 90 e 120 min após a administração de glicose. Esses testes foram realizados nas semanas pré-intervenção, 4, 8, 12 e 16 do protocolo experimental (figura 2).

5.4 Teste de tolerância à insulina (TTI)

Os animais foram submetidos a 6 horas de jejum, e então medimos a glicemia basal (min 0). Imediatamente após esse procedimento os animais receberam uma injeção via intraperitoneal de insulina humana recombinante (Novolin[®] R) equivalente a 0,75U/kg de peso corporal. Amostras de sangue foram coletadas para determinação da glicemia nos tempos 15, 30, 60, 90 e 120 min. Esses testes foram realizados nas semanas pré-intervenção, 4, 8, 12 e 16.

5.5 Teste de tolerância ao exercício

Algumas anormalidades cardíacas associadas à ICFEp podem ser aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão. Dessa forma, a capacidade máxima de realização do exercício físico dos animais foi estimada nas semanas pré-intervenção, 4, 12 e 16 por meio de um teste progressivo até a exaustão em esteira rolante ⁶⁵. Foi realizado um exercício progressivo escalonado até a exaustão em esteira rolante, onde a velocidade inicial da esteira foi de 6m/min sem

haver inclinação da mesma. A cada três minutos, a velocidade da esteira sofreu um acréscimo de 3m/min até a exaustão do animal. As variáveis medidas são o tempo total e a distância em metros percorrida por cada animal durante o teste máximo. Essas análises foram realizadas em nosso laboratório.

5.6 Isolamento de mitocôndrias

Logo após o sacrifício dos animais, os corações foram retirados e as câmaras cardíacas separadas. Em seguida, o ventrículo esquerdo foi homogeneizado em tampão de lise (Manitol 210 mM, sacarose 70mM, MOPS 5mM, EDTA 1mM, coquetel de inibidores de proteases e fosfatases, pH 7.4) e as mitocôndrias foram isoladas por centrifugação em gradiente de sacarose. Em suma, o homogenato foi centrifugado a 700g por 5 min (4°C). O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 10.000g por 10 min (4°C). O sobrenadante resultante foi considerado como a fração citosólica. O pelete resultante foi considerado a fração mitocondrial, que foi lavada e ressuspensa no tampão de lise. Esses procedimentos foram realizados em nosso laboratório.

5.7 Consumo de oxigênio na mitocôndria cardíaca isolada

Para caracterizar o metabolismo mitocondrial, avaliamos o consumo de oxigênio na fração mitocondrial isolada do ventrículo esquerdo dos animais, conforme previamente demonstrado pelo nosso grupo ⁶⁶. Para esses ensaios, utilizamos a concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. Essa variável foi avaliada utilizando um eletrodo específico de oxigênio (do tipo Clark) acoplado a um registrador (*OROBOROS, Oxygraph-2k*), como previamente descrito. O eletrodo é composto por um cátodo de platina e um ânodo de prata, imersos em solução eletrolítica de KCl. A reação se processa pela corrente gerada entre os eletrodos e é relacionada à concentração de oxigênio na superfície do cátodo. Cada amostra de mitocôndria cardíaca foi diluída em tampão de KCl (Sacarose 125 mM, KCL 65 mM, Hepes 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,01% BSA, pH 7.2). Os registros de consumo de oxigênio foram feitos na presença de succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM) e ADP (1 mM). Um inibidor do complexo V (Oligomicina 1 µg/ml) foi adicionado para inibir sua atividade durante esse ensaio. Além disso, utilizamos um desacoplador da membrana interna da mitocôndria (FCCP - fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona, 1 µM)

para estimular o consumo máximo de oxigênio (figura 3). Os valores foram expressos em nanomoles por minuto por miligrama de proteína.

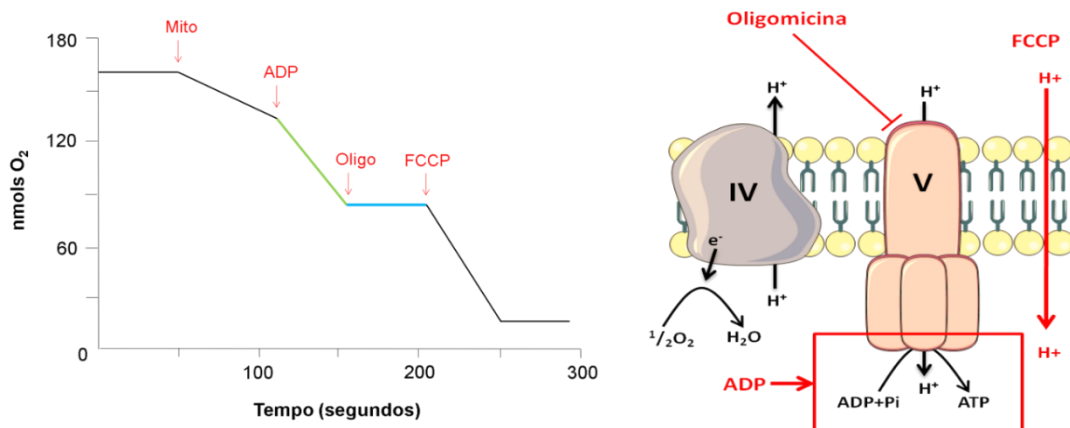


Figura 3: **Esquema ilustrativo do consumo de oxigênio.** Após a adição dos substratos malato, succinato, piruvato e glutamato e da mitocôndria isolada, foi realizada a medida do consumo de oxigênio basal. Após isso foi adicionado ADP para avaliar o consumo máximo de oxigênio e por fim avaliamos o consumo de oxigênio na presença de FCCP (desacoplador mitocondrial).

5.8 Liberação de H₂O₂ pela mitocôndria cardíaca isolada

Foi avaliada por espectrofluorimetria (Tahara, Navarete, Kowaltowski, 2009). Cada amostra de mitocôndria cardíaca proveniente do ventrículo esquerdo isolado foi diluída em um tampão de KCl (Sacarose 125 mM, KCL 65 mM, Hepes 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, 0,01% BSA, pH 7.2) numa concentração final de proteína de 0,125 mg/ml. A produção de H₂O₂ foi determinada pela geração de resorufina, fruto da oxidação do *Amplex Red* (25 μM) na presença de *horseradish peroxidase* (0,5 U/ml), identificada pelos comprimentos de onda de 563 nm para excitação e 587 nm para emissão. O ensaio foi realizado na presença de succinato (2 mM), malato-glutamato (2 mM), ADP (1 mM), Oligomicina (1 μg/ml) e também utilizamos desacoplador da membrana interna da mitocôndria (FCCP - fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona, 1 μM). A quantificação dos valores foi feita após uma calibração com quantidades conhecidas de H₂O₂, expressos em nanomoles por minuto por miligrama de proteína.

5.9 Ensaio de captação de cálcio mitocondrial

Para avaliar a captação e retenção de Ca²⁺ mitocondrial, 500 μg da fração enriquecida com mitocôndria derivada do coração foi incubada em 2 mL de tampão

experimental (125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES, 2 mM de fosfato, 2 mM de MgCl₂ e 0,2% de albumina de soro bovino, ajustado para pH 7,2 com KOH), em conjunto com o *calcium green* 5N 0,1 μM e succinato 1 mM, na presença de rotenona 2 μM. A fluorescência 5N *calcium green* foi medida com um fluorímetro F4500 Hitachi nos comprimentos de onda de excitação e emissão de 506 nm e 532 nm, respectivamente, a 37 ° C, sob agitação constante. Adições sequenciais de Ca²⁺ 10 μM, com intervalos de 3 minutos, foram feitas até a indução do mPT (*mitochondrial permeability transition*)^{67; 68}. Foi realizado um traçado para cada animal (n=5). A relação entre a fluorescência do *calcium green* 5N (F) e as concentrações de [Ca²⁺] foi estabelecida usando a equação $[Ca^{2+}] = Kd \cdot (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$. O Kd foi determinado empiricamente como o valor no qual a alteração na fluorescência (ΔF) após cada adição de cálcio é equivalente a uma alteração de 10 μM na concentração de cálcio (Δ [Ca²⁺]). A fluorescência máxima (F_{max}) e mínima (F_{min}) foram determinadas no final de cada traço usando 100 μL de soluções 100 mM de Ca²⁺ e 100 mM de EGTA, respectivamente. A capacidade de retenção de cálcio foi determinada como a quantidade total de cálcio Ca²⁺ incorporado pelas mitocôndrias até a indução de mPT (nmol Ca²⁺ · Mg proteína⁻¹). As taxas de captação de cálcio foram determinadas como a inclinação da porção linear (nmol Ca²⁺ · mg proteína⁻¹ · S⁻¹) no início da primeira adição de cálcio.

5.10 Immunoblotting

O lisado total e a fração mitocondrial do ventrículo esquerdo foram utilizados para a análise da expressão de proteínas. Para isso, 25 μg de proteínas foram separadas por eletroforese utilizando géis de poliacrilamida SDS-PAGE (6-15%), dependendo peso molecular da proteína que foi avaliada. Após a eletroforese, as proteínas foram eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose. A eficiência da transferência foi monitorada usando a coloração de Ponceau S a 0,5%. Após a eletrotransferência, a membrana foi bloqueada com albumina bovina 5%, em uma solução contendo 10 mM de Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl e Tween 20 a 0,1% por 2h em temperatura ambiente e posteriormente incubada durante uma noite a 4°C com anticorpos específicos contra as proteínas que regulam a dinâmica mitocondrial (figura 1). A ligação do anticorpo primário foi detectada com o uso de anticorpos secundários marcados com peroxidase (diluição de 1:10000), e posteriormente visualizada e

quantificada pelo Software Image J (Image J Corporation baseado na imagem NIH). A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método de Bradford ⁶⁸. A quantificação das proteínas mencionadas acima foi normalizada pelas proteínas Enolase (citosólica), VDAC (mitocondrial), Tom20 (mitocondrial) e pelo ponceau. As proteínas quantificadas foram: aldeído desidrogenase 2 (ALDH2), proteína 1 relacionada a dinâmica (Drp1), proteína de fissão mitocondrial (Fis1), mitofusina 1 (Mfn1), mitofusina 2 (Mfn2), proteína de atrofia óptica (OPA1), proteína quinase C isoforma beta 2 (PKC β II), fator de fissão mitocondrial (Mff) e *mitochondrial calcium uniporter* (MCU), *sodium/calcium/litium exchanger* (NCLX), *mitochondrial calcium uptake-1* (MICU-1).

Tabela 3 - Lista dos anticorpos primários utilizados para análise de expressão proteica por *Immunoblotting*

Proteínas Analisadas	Origem	Peso Molecular	Titulação
ALDH2	Santa Cruz (sc-48837)	56kDa	1:1000
Drp1	Cell signaling (D6C7)	80kDa	1:1000
Fis1	A.BioReagents (PA1-41082)	16kDa	1:1000
Mfn1	Santa Cruz (sc-50330)	80kDa	1:500
Mfn2	Santa Cruz (sc-50331)	80kDa	1:500
Opa1	Abcam (ab42364)	100kDa	1:1000
4-HNE	Calbiochem (CALB-393204)	-	1:1000
PKC β II	Santa Cruz (sc-13149)	80kDa	1:1000
Mff	Santa Cruz (sc-398617)	38kDa	1:1000
Tom20	Santa Cruz (sc-11415)	20kDa	1:500
VDAC-1	Santa Cruz (sc-32063)	35kDa	1:1000
MCU	Cell signaling (14997)	35kDa	1:1000
MICU-1	Sigma (HPA037480)	48kDa	1:1000
NCLX	Biorbyt (ORB317904)	64kDa	1:1000
Enolase	Santa Cruz (sc-15343)	48kDa	1:1000

5.11 Análise da expressão de gênica do peptídeo natriurético do tipo N-terminal pró-B (NT-proBNP)

A expressão gênica foi realizada em qPCR. Uma porção de ~40 mg do

ventrículo esquerdo foi homogeneizada em 1 mL do reagente de Trizol (Life Technologies) com o auxílio de um politron. O RNA total da amostra foi extraído conforme as instruções fornecidas no *datasheet* do produto. O RNA total extraído de cada amostra foi usado como molde para a síntese do cDNA com uma transcriptase reversa comercialmente disponível (M-MuLV reverse Transcriptase- Thermo scientific) usando oligo dTs como primers. O cDNA resultante foi usado como molde na reação de PCR em tempo real montada segundo as informações do kit da enzima utilizada (MAXIMA Sybr Green/ ROX qPCR máster mix- Thermo scientific) usando iniciadores específicos desenhados a partir de sequências referências depositadas nos bancos de dados do NCBI (refseq), que estão disponíveis para consulta na tabela 4. Os resultados obtidos foram quantificados pelo método $\Delta\Delta C_T$ e então expressos em nível de mRNA relativo ao controle (% de ctrl). Avaliamos os níveis de transcritos do peptídeo natriurético do tipo N-terminal pró-B (NT-proBNP) e utilizamos a Hipoxantina-guanina fosforribosil transferase (HPRT) como normalizador.

Tabela 4 - **Lista dos primers utilizados para análise de expressão gênica por qPCR**

Genes Analisados	NCBI RNAm (Cod. Seq.)	Sequência sense	Sequência antisense	Tamanho
NT-proBNP	NM_031545.1	TCCCCTGGGAAGTC CTAGCC	GGCCTTGGTCCTTT GAGAGC	628
HPRT	NM_013556.2	AGTCCCAGCGTCGT GATTAG	TTTCCAAATCCTCG CATAATGA	88

5.12 Determinação da morfologia mitocondrial por microscopia eletrônica de transmissão

As amostras cardíacas do ventrículo esquerdo (5 blocos por animal) foram fixadas em glutaraldeído 2% e paraformaldeído 4% em tampão de cacodilato de sódio, pH 7.3 durante 1h em temperatura ambiente e os blocos foram cortados em fatias de aproximadamente 1mm³, conforme previamente padronizado em nosso laboratório ⁸. Após lavagem, as amostras foram pós-fixadas com 2% de tetróxido de ósmio e 1% de acetato de uranila por 2h, lavados com água, desidratadas por exposição a concentrações crescentes de etanol, seguido de acetona 100% e depois infiltradas e incorporadas em Eponato. Os cortes finais foram utilizados para avaliar a mitocôndria

intermiofibrilar, número e tamanho. As imagens foram adquiridas usando um microscópio eletrônico de transmissão CCD JEOL1230 Gatan 967 a 80 kV e uma câmera digital Gatan Orius 4k x 4k (Gatan). As análises quantitativas foram realizadas em pelo menos 10 campos por animal e pelo menos 15 cardiomiócitos por grupo usando o Software Image J. Esses procedimentos foram realizados utilizando o microscópio eletrônico de transmissão da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP).

5.13 Função muscular esquelética *ex vivo* – banho de órgãos

Imediatamente após o sacrifício, os músculos: extensor longo dos dedos (EDL) e sóleo foram removidos e posicionados verticalmente em uma cuba do sistema *ex vivo* (banho de órgãos) por meio da fixação do tendão distal à extremidade imóvel e da fixação do tendão proximal ao transdutor de força isométrica com fio de polipropileno não absorvível (3.0, ETHICON, Brasil). Com a finalidade de manter a viabilidade do tecido ao longo do experimento, os músculos permaneceram imersos em uma solução-tampão Krebs-Ringer (137mM NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂.2H₂O, 1mM KH₂PO₄, 1mM MgSO₄, 24mM NaHCO₃, 11mM C₆H₁₂O₆, pH 7.4, 22°C), submetida a aeração com mistura carbogênica (95% oxigênio, 5% dióxido de carbono)⁶⁹. Inicialmente foi determinado o comprimento ótimo dos músculos, identificado pela máxima força de contração isométrica. Na sequência, a força tetânica máxima dos músculos EDL e sóleo foram induzidas por meio do oferecimento de trens de pulsos elétricos crescentes (1, 10, 20, 30, 50, 80, 100 e 150 hertz).

5.14 Análise estatística

Inicialmente a distribuição dos dados obtidos nesse estudo foi testada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Os dados obtidos neste estudo foram apresentados na forma de média \pm erro padrão e comparados pela análise por teste t de *Student* ou análise multivariada (ANOVA) com post-hoc de Duncan. Para todas as análises, foi adotado como nível de significância $p \leq 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para melhor entendimento dos resultados, essa sessão será apresentada em

três subseções:

6.1 Caracterização fenotípica do modelo animal de ICfEp;

6.2 Caracterização bioquímica do modelo animal de ICfEp;

6.3 Caracterização da dinâmica mitocondrial e da captação de cálcio mitocondrial no coração de ratos com ICfEp;

6.1 Caracterização fenotípica do modelo animal de ICfEp

Os pacientes portadores de ICfEp apresentam diversas comorbidades associadas que contribuem para a fisiopatologia dessa síndrome, tais como: idade avançada, diabetes mellitus tipo 2 (DMII), fibrilação atrial, hipertensão pulmonar, disfunção renal, obesidade/síndrome metabólica e hipertensão arterial, sendo essas duas últimas mencionadas as mais prevalentes em portadores dessa síndrome^{2; 5; 18; 70}. Devido esse amplo espectro de comorbidades que contribuem para o desenvolvimento e /ou progressão dessa doença, a maioria dos modelos pré-clínicos se concentra em utilizar uma única comorbidade para mimetizar o fenótipo de ICfEp humana. No entanto, esses modelos não conseguem reproduzir a miríade de sintomas observados em humanos⁷¹.

Em 2019, um trabalho publicado Schiattarella e colaboradores⁶³, conseguiu recapitular inúmeras características cardiovasculares e sistêmicas dos portadores de ICfEp, utilizando um modelo murino denominado pelos autores de *Two-Hits model*, em que é utilizada a combinação de dieta hiperlipídica (DH - 60% lipídeos) e tratamento com inibidor da enzima óxido nítrico sintase por N(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME); induzindo síndrome metabólica e hipertensão, respectivamente.

Desse modo, sabendo que o modelo descrito acima foi eficaz em mimetizar as características da ICfEp em camundongos C57BL6, iniciamos o presente projeto caracterizando esse modelo em ratos Wistar machos randomizados em dois grupos: o grupo controle (n=7) recebeu uma dieta controle balanceada (70% carboidratos, 20% proteínas e 10% de lipídeos) e água potável *ad libitum*; enquanto o grupo DH+L-NAME (n=9) recebeu uma dieta hiperlipídica (60% lipídeos, 20% proteínas e 20% carboidratos), associado com o L-NAME (150 mg/L em água potável), por 16 semanas. Durante essas 16 semanas foram realizadas análises de função cardíaca, perfil lipídico e glicêmico, tolerância ao exercício e pressão arterial antes de iniciar o protocolo (pré-intervenção (Pré-int.)) e nas semanas 4, 8, 12 e 16 do protocolo

experimental conforme ilustrado na figura 2.

A literatura aponta que obesidade pode contribuir para a fisiopatologia da ICFEp devido alterações hemodinâmicas, inflamatórias, mecânicas e neuro-humorais⁷². Desse modo, para confirmar o ganho de peso, os animais foram pesados quinzenalmente ao longo de dezesseis semanas na presença da dieta hiperlipídica e tratamento com L-NAME. Como esperado, o grupo DH+L-NAME apresentou aumento do peso corporal em comparação com o grupo controle a partir da oitava semana após início do protocolo experimental (figura 4A e 4B), bem como um acréscimo no peso do tecido adiposo branco epididimal (figura 4C).

Semelhante ao observado em nosso trabalho, Schiattarella e colaboradores⁶³, utilizando das mesmas intervenções para mimetizar a ICFEp em camundongos C57BL6 durante quinze semanas, observaram um aumento significativo no ganho de peso dos animais na quinta semana do protocolo experimental. Outro estudo utilizando um modelo semelhante ao proposto por Schiattarella e colaboradores, em que os autores utilizaram camundongos C57BL6 com 3 meses de idade e administraram dieta hiperlipídica para os animais por 13 meses, em conjunto com indutor de hipertensão, também notaram ganho de peso significativo nos animais que receberam a dieta hiperlipídica a partir da quarta semana do protocolo experimental proposto⁷³. Provavelmente essas diferenças entre o nosso modelo e os encontrados na literatura ocorrem devido o metabolismo das espécies de roedores ser distinto, além disso, a composição da dieta administrada foi ligeiramente diferente.

O nosso estudo é o primeiro a utilizar um modelo de *two-hits* para mimetizar a ICFEp em ratos Wistar machos. A maioria dos trabalhos encontrados na literatura faz o uso de comorbidades isoladas para desencadear essa síndrome. Os trabalhos que usam a obesidade para induzir ICFEp, optam por modelos geneticamente modificados como rato Zucker que contém uma mutação no gene de leptina, resultando em hiperfagia e obesidade¹⁵. Grande parte dos modelos utiliza camundongos para induzir a obesidade por conta deste ser o modelo animal de preferência para produzir animais geneticamente modificados, e também devido esse modelo ser mais barato¹⁵. No entanto, apesar das facilidades e vantagens de utilizar camundongos, optamos por usar ratos Wistar machos para poder comparar com o trabalho publicado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa com ICFEr³².

Conforme mencionado, a obesidade é um fator de risco presente em cerca de 80% dos pacientes com ICFEp. O aumento da adiposidade induz mudanças

estruturais significativas no ventrículo esquerdo, e promove inflamação, dislipidemia (elevados níveis de lipídeos séricos), resistência à insulina, intolerância à glicose, e prejuízo da função endotelial e muscular esquelética ^{15; 74; 75; 76}. Assim, para avaliar o perfil lipídico desses animais, coletamos o sangue venoso proveniente da veia caudal em tubo com heparina, posteriormente isolamos o plasma e realizamos a dosagem do colesterol total e triglicerídeos nas semanas pré-intervenção (Pré-int.), 4, 8, 12 e 16 do protocolo experimental proposto.

A figura 4D mostra que não houveram diferenças significativas dos níveis de triglicerídeos entre os grupos em todos os pontos analisados. No entanto, apesar de diferenças estatísticas não terem sido notadas entre os grupos nas semanas pré-intervenção (Pré-int.), 4 e 8 do protocolo experimental, na figura 4E foi observado um aumento dos níveis de colesterol total sérico na décima segunda e décima sexta semana nos animais do grupo DH+L-NAME em comparação com o grupo controle, demonstrando que a dieta hiperlipídica contribuiu para o aparecimento da dislipidemia nesses animais. A gordura saturada presente na ração administrada ao grupo DH+L-NAME provavelmente foi responsável pelo aumento do colesterol total. Em conjunto esses dados demonstram que o nosso protocolo experimental proposto foi eficaz em induzir tanto o aumento de peso corporal quanto o aumento de colesterol sérico.

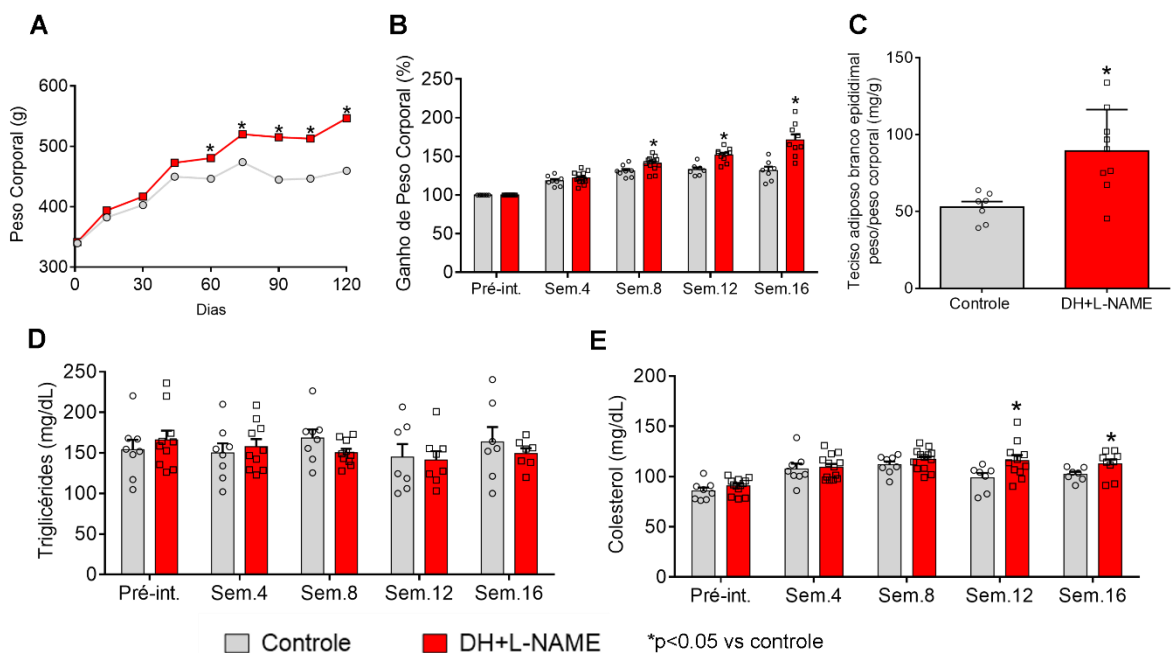


Figura 4: **Peso Corporal e níveis plasmáticos de triglicérides e colesterol total.** (A) Peso corporal dos animais, avaliado quinzenalmente ao longo do protocolo experimental; (B) porcentagem do ganho

de peso corporal, (C) peso do tecido adiposo branco epididimal, coletado após a eutanásia (D) triglicérides e (E) colesterol total dos diferentes grupos nas semanas pré- intervenção (Pré-int.), 4, 8, 12 e 16. Os asteriscos sobre as barras e linhas indicam diferenças estatísticas, quando comparadas ao grupo controle ($p \leq 0,05$).

A obesidade representa um fator de risco importante capaz de induzir a resistência à insulina e a hiperglicemia, que podem desencadear desequilíbrio neuro-humoral, hiperativação nervosa simpática e consequente sobrecarga cardíaca. Isso, por sua vez, pode induzir processos de remodelamento cardíaco, hipertrofia, fibrose e disfunção diastólica e sistólica^{15; 74; 76}. A exposição prolongada a dietas ricas em lipídeos pode contribuir para o aumento da concentração sérica de ácidos graxos não esterificados (AGNES), que são produtos da metabolização de triglicerídeos, e contribuem negativamente para a biossíntese de insulina, resultando na perda contínua da função das células beta pancreáticas, e no aumento dos níveis de glicose no sangue, podendo levar ao diabetes mellitus tipo II⁷⁷.

De acordo com estudos publicados anteriormente, ratos Wistar machos alimentados com dieta hiperlipídica apresentam concentrações séricas de glicose aumentadas, e também intolerância a glicose, que são características de diabetes mellitus tipo II (DMII)^{78; 79}. A literatura aponta que cerca de 45% dos portadores de ICFEp possuem diabetes mellitus (DM)^{80; 81}. Apesar da alta prevalência de DM nos indivíduos com ICFEp, as características clínicas e moleculares dessa população ainda são pouco compreendidas. No entanto, alguns dados clínicos disponíveis têm demonstrado um efeito negativo no prognóstico dos pacientes⁸⁰.

Grande parte dos trabalhos que utilizam a combinação de dieta hiperlipídica e algum indutor de hipertensão em camundongos C57BL6 para induzir a ICFEp tem encontrado os níveis de glicose sérico aumentados após a realização de testes de tolerância a glicose, sugerindo a presença de disfunção metabólica nos animais^{63; 73}.

Testes metabólicos *in vivo* são importantes para avaliar se a intervenção proposta promove alterações no metabolismo de carboidratos, como a intolerância a glicose e a resistência a insulina⁸². Dessa forma, para determinar o efeito do nosso protocolo experimental no fenótipo metabólico da glicose, submetemos os ratos ao teste de tolerância a glicose intraperitoneal (TTGi) após 12 horas de jejum, e ao teste de tolerância a insulina intraperitoneal (TTI).

O teste de tolerância a glicose intraperitoneal (TTGi) mede a depuração de uma

carga de glicose pelo corpo ⁸². Para realização do TTGi, os animais foram submetidos à análise de glicemia em jejum (tempo 0) e, posteriormente, receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (2g/kg de animal), sendo a glicemia medida após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados apresentados na figura 5A, 5B e 5F demonstram que entre as semanas pré-intervenção e 4 não houveram diferenças significativas entre os grupos nos tempos analisados e nos cálculos de área sob a curva. No entanto, na oitava e décima segunda semana notamos um atraso significativo na depuração da glicose do grupo DH+L-NAME em comparação com o grupo controle após 60-90 min (figura 5C) e 60- 120 min (figura 5D) da administração intraperitoneal de glicose refletindo aumento da área sob a curva nesses períodos (figura 5F). Essa diferença foi perdida na semana 16 em decorrência do atraso na depuração da glicose do grupo controle quando comparado ao período pré-intervenção (figura 5E e 5F). É importante destacar que a dieta controle administrada aos animais contém 70% de carboidratos, sendo a sacarose (dissacarídeo formado por quantidades iguais de frutose e glicose), o principal carboidrato presente. Acredita-se que semelhante ao que acontece com os alimentos processados, a sacarose promove menos saciedade do que outros açúcares, aumentando assim a ingestão calórica ⁸³. Dessa forma, com o passar do tempo, o alto consumo de calorias associado com o sedentarismo dos animais provavelmente ocasionou a alteração no metabolismo da glicose no grupo controle, fazendo com que a diferença estatística observada anteriormente fosse perdida.

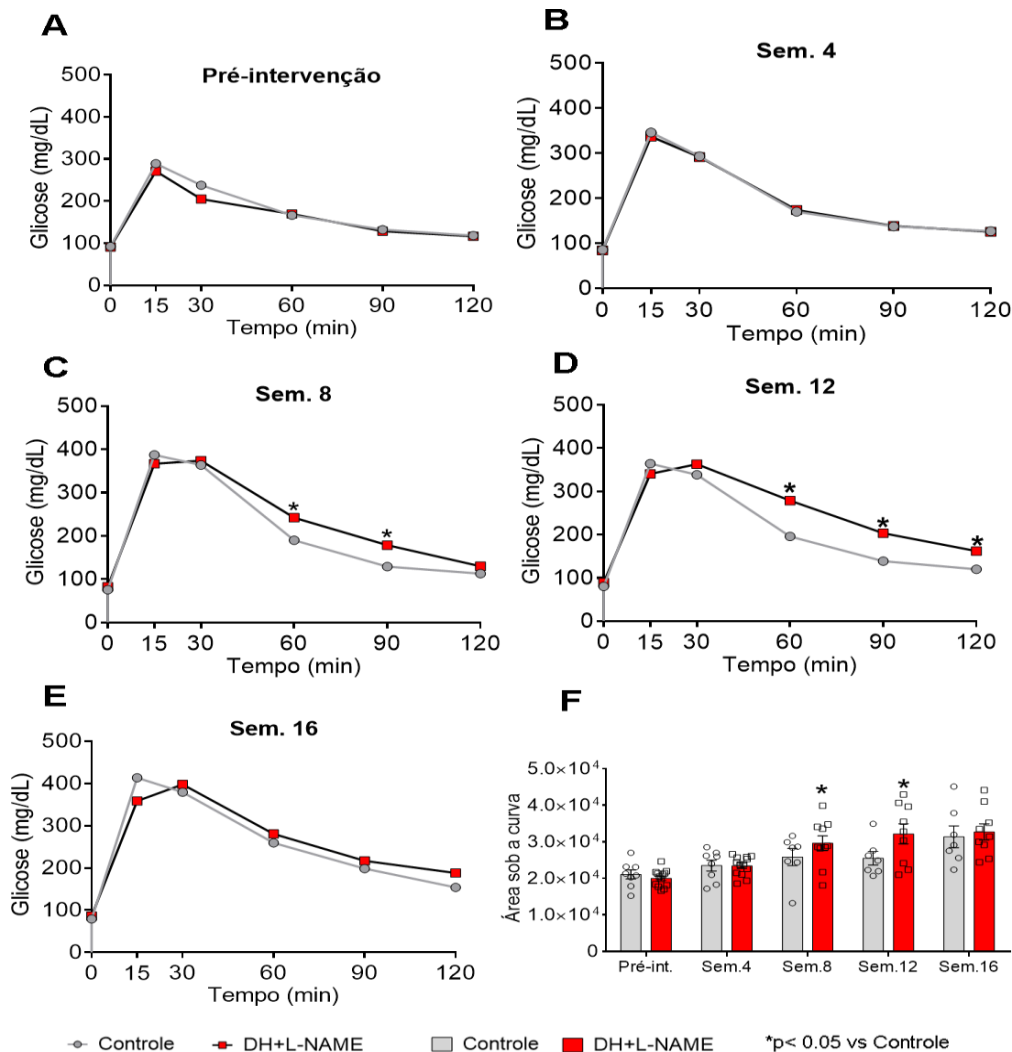


Figura 5: **Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (TTGi).** (A) Pré-intervenção; (B) Semana 4, (C) Semana 8, (D) Semana 12, (E) Semana 16 e (F) cálculo da área sob a curva em ratos submetidos a dieta controle e dieta hiperlipídica + L-NAME. * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

O teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTI) é utilizado para avaliar a tolerância à insulina através da medição da glicose endógena remanescente na circulação ao longo do tempo em resposta a uma injeção de insulina humana. A taxa de depuração da glicose indica a ação da insulina nos tecidos periféricos, mostrando a sua sensibilidade ao hormônio⁸⁴. Um estudo publicado por Scherbakov⁸⁴ e colaboradores demonstrou que, ao analisar o perfil glicêmico de pacientes com ICFEp após a injeção de insulina, o declive da eliminação de glicose foi mais íngreme quando comparado com pacientes saudáveis, reportando uma diminuição da sensibilidade tecidual à insulina.

Para realização desse teste evitando episódios de hipoglicemia, medimos a

glicemia dos animais após 6 horas de jejum (tempo 0) e, posteriormente, administramos insulina via intraperitoneal (0,75U/kg de peso corporal), sendo a glicemia medida após 15, 30, 60, 90 e 120 min. Semelhante ao que foi observado no teste de tolerância a glicose intraperitoneal (figura 5), na figura 6A e 6B, notamos que não existe diferença significativa entre os grupos ao longo do tempo e no cálculo de área sob a curva na semana pré-intervenção e 4 (figura 6F). No entanto, na oitava e décima segunda semana do protocolo experimental, observamos um retardo significativo no tempo de depuração de glicose endógena no tempo 15-30 min (figura 6C) e 30-90 min (figura 6D), e um aumento significativo no cálculo de área sob a curva (figura 6F) do grupo DH+L-NAME quando comparado com o grupo controle. Contudo, devido a um atraso na depuração da glicose em dois animais do grupo controle, essa diferença não foi observada nos grupos na semana 16 ao longo do tempo e no cálculo de área sob a curva (figura 6E e 6F), semelhante ao que foi observado no TTGi (figura 5E e 5F). Como esses achados se assemelham ao que foi observado no TTGi, acreditamos que o uso prolongado da dieta rica em carboidratos para o grupo controle, promoveu tanto alterações no metabolismo da glicose (figura 5), quanto na sensibilidade tecidual a insulina nos animais.

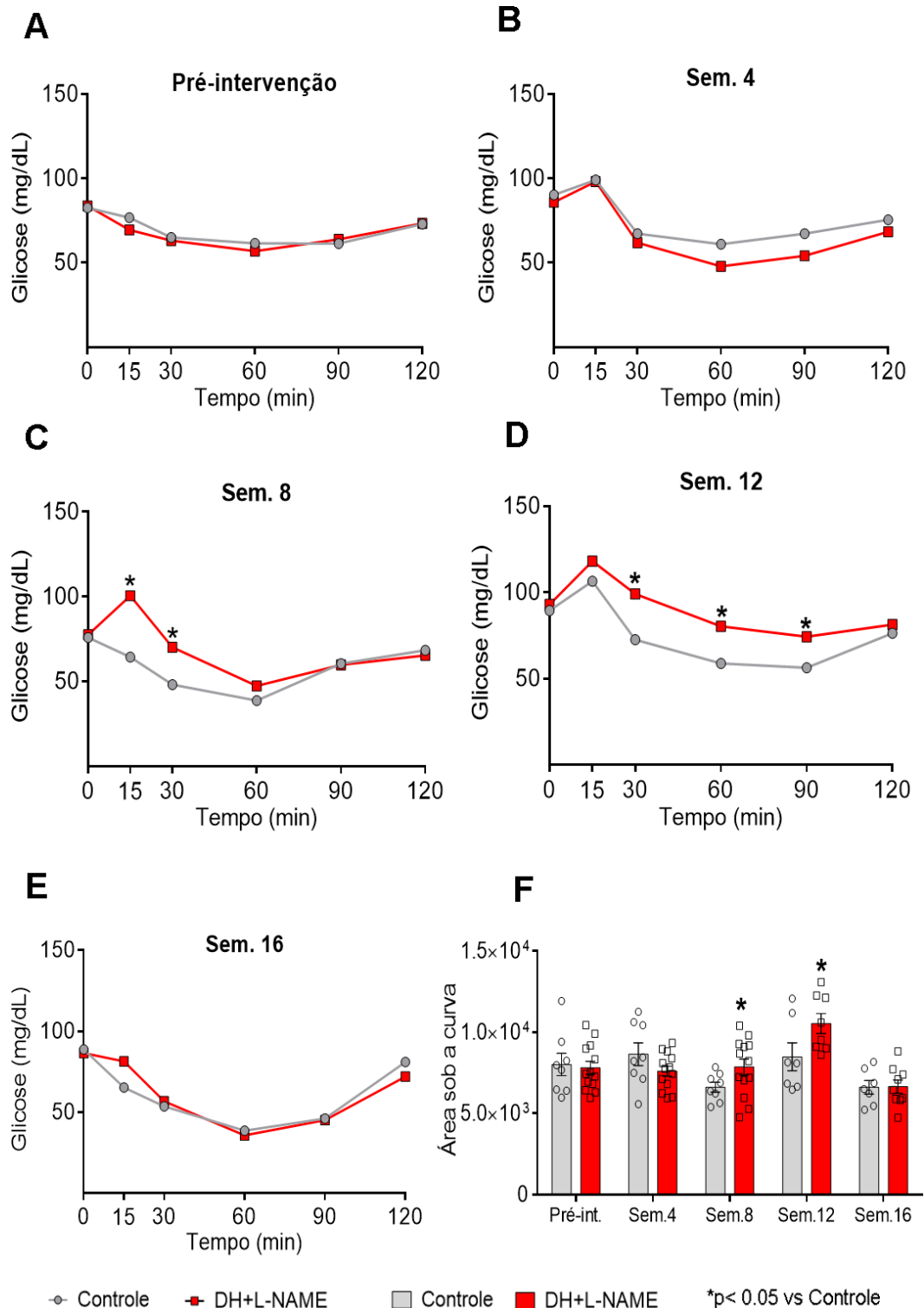


Figura 6: **Teste de tolerância à insulina intraperitoneal (TTI)**. (A) Pré-intervenção; (B) Semana 4, (C) Semana 8, (D) Semana 12, (E) Semana 16 e (F) cálculo da área sob a curva em ratos submetidos a dieta controle e dieta hiperlipídica + L-NAME. * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

Segundo estudos epidemiológicos, a hipertensão arterial sistêmica é uma comorbidade altamente prevalente nos pacientes com ICFEp³. A pressão arterial

elevada é um dos principais determinantes das alterações do ventrículo esquerdo, pois induz alterações estruturais dos cardiomiócitos e fibroblastos, acelerando o remodelamento cardíaco. Ela também promove rigidez arterial que resulta em uma carga desproporcional ao coração levando a perda da complacência e a incompatibilidade pós-carga^{1; 85}.

Devido essa ser a comorbidade mais prevalente da ICFEp, a maioria dos trabalhos da literatura utiliza indutores de hipertensão como o L-NAME⁶³, aldosterona⁸⁶ e angiotensina II⁸⁷, ou então ratos geneticamente modificados que são sensíveis ao sal como sal Dahl⁸⁸, ratos ou camundongos hipertensos DOCA-sal⁸⁹, ratos espontaneamente hipertensos (SHR)⁹⁰, e ratos zucker espontaneamente hipertenso (ZSF1)⁹¹. Há uma grande variedade de modelos, no entanto, nenhum modelo único recapitula a miríade de características encontradas na clínica em portadores de ICFEp. Além disso, esses modelos não reproduzem o início lento de alterações observado em pacientes hipertensos que levam ao desenvolvimento de ICFEp.

Como descrito anteriormente, um dos objetivos desse projeto foi desenvolver um modelo de ratos Wistar machos com ICFEp que recapitulasse as principais características encontradas na clínica (obesidade e hipertensão). Assim, para induzir a hipertensão arterial nos animais, administramos a molécula N(ω)-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), que é um inibidor constitutivo da enzima óxido nítrico sintase (que produz óxido nítrico para promover a vasodilatação) na água de beber dos animais, na concentração de 150 mg/L por dezesseis semanas. Como esperado, o tratamento com L-NAME aumentou a pressão arterial sistólica e diastólica significativamente do grupo DH+L-NAME a partir da oitava semana até a décima sexta semana do protocolo experimental quando comparado com o grupo controle (figura 7A e 7B). Em conjunto esses dados demonstram que o tratamento com L-NAME foi eficaz na indução da hipertensão nos animais.

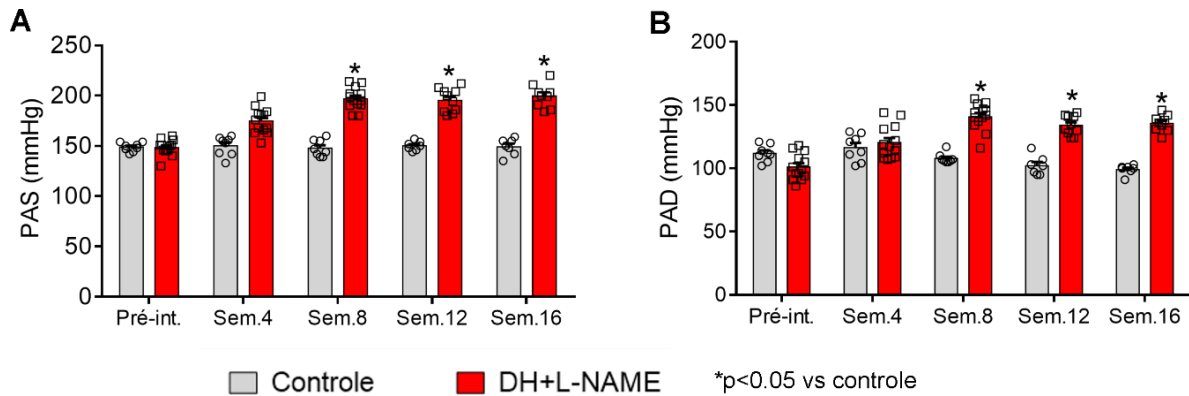


Figura 7: **Dados hemodinâmicos da pressão arterial.** (A) PAS – Pressão arterial sistólica; (B) PAD – Pressão arterial diastólica. * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

A exposição ao estresse hemodinâmico e metabólico é um fator chave para induzir o remodelamento do músculo cardíaco, a hipertrofia e a disfunção diastólica, que são sinais característicos de portadores de ICfEp^{1; 15; 18}. A sobrecarga de longa duração promove respostas adaptativas mecânicas e neuro-humorais, que nos estágios iniciais é benéfica para manutenção do débito cardíaco, no entanto, com o tempo se torna prejudicial levando a alterações adaptativas no miocárdio na forma de hipertrofia ventricular^{10; 92}. No nível celular, cardiomiócitos aumentam a expressão de proteínas estruturais e fibroblastos presentes no coração se proliferam, produzem colágeno e outras proteínas de matriz, ocasionando rigidez miocárdica e relaxamento prejudicado, que é característico de disfunção diastólica⁹².

Além disso é importante destacar que a adiposidade, também induz alterações estruturais e funcionais no coração decorrente dos seus efeitos hemodinâmicos, inflamatórios, mecânicos e neuro-humorais, através da expansão do volume plasmático, liberação de adipocinas e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Todos esses fatores citados contribuem para o remodelamento cardíaco e hipertrofia ventricular⁷².

A avaliação ecocardiográfica faz parte da avaliação de rotina de pacientes com suspeita de insuficiência cardíaca, devido ser um método não invasivo que permite avaliar a estrutura, função e hemodinâmica cardíaca^{93; 94}. Baseado nesses fatos, realizamos uma caracterização da função e morfologia cardíaca nas semanas pré-intervenção, 4, 8, 12 e 16 do protocolo experimental pelo exame ecocardiográfico de modo M e doppler em colaboração com o cardiologista Dr. Paulo Magno do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de

São Paulo.

Como demonstrado na tabela 5, os animais de ambos os grupos (controle e DH-L-NAME) não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros ecocardiográficos referentes a frequência cardíaca (FC), fração de encurtamento (FE) diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE), comprimento do septo interventricular na sístole (SIVs) e espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEd) em todas as semanas analisadas nesse modelo experimental. No entanto, observamos um aumento na espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPVEs) do grupo DH+L-NAME a partir da décima segunda semana de protocolo experimental, até a décima sexta semana. Ainda, notamos que na semana 16 ocorreu uma redução do diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE), ou seja, do lúmen ventricular esquerdo do grupo DH+L-NAME em comparação com o controle, bem como o aumento da espessura do septo interventricular na diástole (SIVd) e da parede posterior ventricular esquerda na sístole (PPVEs) desse grupo quando comparado com o grupo controle (tabela 5).

Os primeiros estudos que descreveram os componentes fisiopatológicos da insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada reportaram que o remodelamento cardíaco desencadeado por alterações hemodinâmicas e inflamação sistêmica decorrente da síndrome metabólica, contribui para a hipertrofia cardíaca concêntrica e conseqüente diminuição do lúmen da câmara ventricular, características comuns entre os portadores de ICFEp, e que esses fatores contribuem para a disfunção diastólica ^{1; 18; 66; 70; 95}. Desse modo, o conjunto desses dados sugere que desenvolvemos um modelo pré-clínico que induz remodelamento cardíaco concêntrico acompanhado pela reduzida complacência ventricular esquerda.

Atualmente sabe-se que o remodelamento cardíaco em doenças cardiovasculares é caracterizado pelo aumento da massa cardíaca e disfunção metabólica mitocondrial, decorrente, em parte, pelo elevado estresse hemodinâmico e neuro-humoral, o que contribui para a fisiopatologia da ICFEp ⁹⁵. Baseado nisso, estudos utilizando um modelo murino de ICFEp semelhante ao nosso, em que é utilizado a dieta hiperlipídica e alguma intervenção que induz a hipertensão, observaram um aumento da massa cardíaca e/ou aumento da massa ventricular esquerda após a eutanásia dos animais, refletindo a presença de hipertrofia ^{63; 73}.

Após a eutanásia dos animais realizamos análises morfológicas cardíacas com o intuito de avaliar a massa cardíaca no nosso modelo animal. Foram avaliadas: a

massa cardíaca e a massa ventricular esquerda corrigida pelo comprimento da tibia. Na figura 8A notamos que não existe diferença significativa entre os grupos na massa cardíaca. No entanto, na figura 8B observamos que o grupo DH+L-NAME apresentou um aumento na razão massa ventricular esquerda pelo comprimento da tibia, quando comparado ao grupo controle. Esse resultado encontrado corrobora com os dados de hipertrofia ventricular esquerda que foi observada no ecocardiograma modo M na décima sexta semana do protocolo experimental.

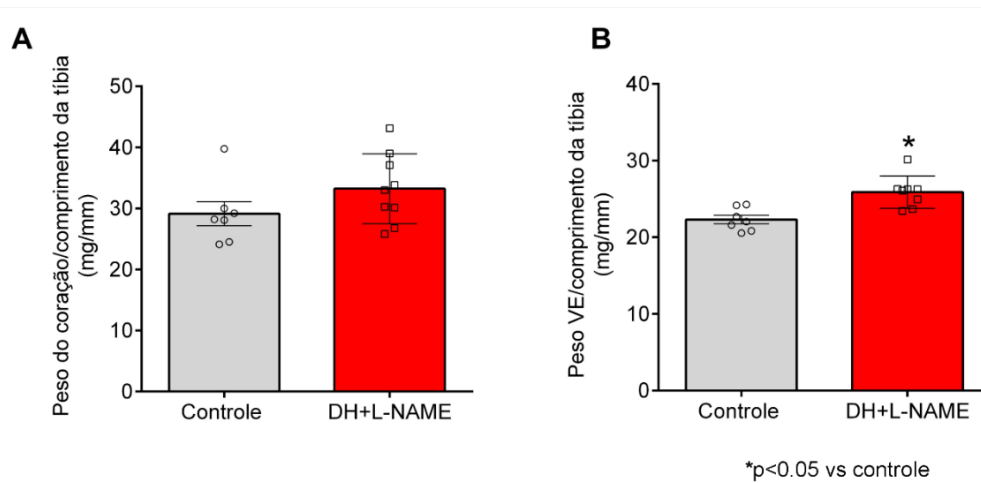


Figura 8: **Massa cardíaca.** (A) Peso do coração corrigido pelo comprimento da tibia e; (B) Peso do ventrículo esquerdo (VE) dividido pelo comprimento da tibia. * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

Tabela 5 – Medidas Ecocardiográficas do Modo M

Parâmetros	Pré-intervenção		Semana 4		Semana 8		Semana 12		Semana 16	
	C	DH	C	DH	C	DH	C	DH	C	DH
FC (bpm)	304±23	283±44	315±56	309±36	284±22	287±38	300±32	291±39	276±43	276±45
FE (%)	42±12	42±6	49±7	48±8	42±3	41±6	44±6	46±9	48±6	49±8
DSFVE (mm)	3,75±0,74	4,03±0,64	3,39±0,55	3,46±0,57	4,25±0,40	4,38±0,65	4,49±0,78	4,39±0,92	3,85±0,40	3,57±0,58
DDFVE (mm)	6,51±0,58	6,95±0,72	6,67±0,41	6,71±0,59	7,29±0,58	7,41±0,71	7,97±0,63	8,04±0,52	7,43±0,62	6,96±0,30*
SIVs (mm)	1,02±0,13	1,18±0,26	1,66±0,22	1,70±0,31	1,79±0,24	1,71±0,19	2,05±0,28	1,85±0,21	2,03±0,30	1,99±0,17
SIVd (mm)	0,96±0,12	0,97±0,20	1,06±0,17	1,05±0,18	1,09±0,06	1,11±0,18	1,12±0,20	1,19±0,20	1,16±0,19	1,33±0,17*
PPVEs (mm)	1,87±0,27	2,08±0,36	2,21±0,33	2,14±0,38	2,00±0,34	2,16±0,33	2,08±0,20	2,40±0,30*	2,30±0,32	2,57±0,27*
PPVEd (mm)	1,02±0,13	1,18±0,26	1,20±0,18	1,20±0,22	1,15±0,13	1,20±0,18	1,25±0,19	1,26±0,22	1,23±0,12	1,33±0,16

Dados Ecocardiográficos no modo M referentes as semanas pré-intervenção, 4, 8, 12 e 16 do protocolo experimental. Grupo control (C), grupo DH+ L- NAME (DH), Frequência Cardíaca (FC), Fração de Encurtamento (FE), Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE), Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE), Septo intraventricular na sístole (SIVs), Septo intraventricular na diástole (SIVd), Parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole (PPVEs), Parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole (PPVEd). Dados apresentados como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados por Test T. *p<0,05 vs. controle.

A disfunção diastólica é definida como a incapacidade do ventrículo esquerdo de ajustar-se ao volume de pré-carga devido a rigidez miocárdica^{95; 96}. A maioria dos estudos demonstram que a pressão ventricular, principalmente a do ventrículo esquerdo, está aumentada prejudicando o relaxamento isovolumétrico em portadores de ICFEp^{97; 98; 99}. Além disso, a rigidez miocárdica influenciada pelos cardiomiócitos e pela matriz extracelular estimula síntese e deposição de colágeno do tipo I, ocasionando um desbalanço entre produção e degradação de colágeno cardíaco em pacientes portadores de ICFEp⁹².

Como já mencionado, a insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada recebeu essa denominação devido a fração de ejeção ventricular esquerda (FEVE), ou seja, volume de sangue bombeado a cada batimento cardíaco estar no limiar considerado normal, acima de 50% do volume de sangue a cada ejeção³. Desse modo, com o intuito de verificar a fração de ejeção ventricular realizamos análises ecocardiográficas que revelaram que os animais de ambos os grupos em todos os pontos analisados possuem FEVE preservada, maior que 50% (figura 9A).

Para determinar a presença da disfunção diastólica nesses animais analisamos os principais parâmetros recomendados pela *American College of Cardiology Foundation/American Heart Association (ACCF/AHA)* e a *European Society of Cardiology (ESC)* que são: razão entre a velocidade diastólica do fluxo mitral e a velocidade diastólica do fluxo anular (E/E'), razão entre a velocidade diastólica do fluxo mitral e o enchimento ativo ventricular (E/A) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV)^{3; 13}.

A razão E/E' é um parâmetro utilizado para estimar a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (PDFVE) através da divisão da velocidade diastólica do fluxo mitral (E) pela velocidade diastólica do fluxo anular (E')¹⁰⁰. A disfunção diastólica leva a um relaxamento ventricular prejudicado e conseqüente aumento da PDFVE. As análises ecocardiográficas realizadas em ambos os grupos revelaram que entre a semana de pré-intervenção e a décima segunda semana não houve diferença significativa desses parâmetros diastólicos entre os grupos. No entanto, essa diferença surgiu na décima sexta semana no grupo DH-L-NAME em relação ao controle (figura 9B).

A razão E/A reflete as fases individuais de enchimento, ou seja, a onda E reflete o enchimento passivo do átrio esquerdo para o ventrículo esquerdo que é impulsionado pela diferença de pressão entre essas duas câmaras, e a onda A o

enchimento ativo ventricular gerado pela contração atrial ativa. A disfunção diastólica altera essa relação e o tempo de relaxamento do ventrículo (relaxamento isovolumétrico) ¹⁰¹. No nosso modelo notamos que as diferenças nas semanas pré-intervenção, 4 e 8 do protocolo experimental não são estatisticamente significativas. No entanto, na décima segunda semana de caracterização houve uma diferença estatística do grupo DH+L-NAME em comparação com o controle (figura 9C). Ao avaliar o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) entre os grupos controle e DH+L-NAME, não observamos diferenças significativas nas semanas analisadas (figura 9D).

É importante salientar que apesar do parâmetro E/A ser amplamente utilizado para a detecção de disfunção diastólica, existem várias limitações para o uso dessa medida que podem interferir no resultado, como a idade, pois o enchimento ventricular diminui com o envelhecimento, além disso mudanças sutis são dificilmente detectáveis no estado basal e até mesmo após desafiar o trabalho cardíaco com exercício físico. Ainda, se a velocidade do fluxo mitral for maior que 20 cm/s, a relação E/A será reduzida por conta da sobreposição das ondas. Por isso trabalhos da literatura tem sugerido a razão E/E' como um índice alternativo útil, sensível e mais estável para avaliar a disfunção diastólica ^{102; 103}.

Diferentemente do que é relatado em trabalhos que utilizam camundongos com síndrome metabólica e hipertensão ^{63; 73}, e ratos geneticamente modificados que apresentam hipertensão como intervenção para desencadear a ICFEp ^{88; 89}, o nosso trabalho não demonstrou uma alteração clara na função diastólica dos animais, e acreditamos que isso possa ter sido ocasionado pelo tempo de intervenção que talvez tenha sido curto para que os sintomas claros fossem observados. Além disso, o ecocardiograma em doppler é uma tecnologia adaptada de humanos que é utilizada em roedores, desse modo a sensibilidade é baixa para alterações sutis, por isso, existem relatos na literatura ⁷³ que destacam que o cateterismo é um método mais sensível de detecção de pequenas alterações na pressão ventricular em roedores. Apesar disso, é importante destacar que a literatura relata que apesar da disfunção diastólica exercer um papel central na fisiopatologia da ICFEp, ela por si só pode não desencadear um quadro de insuficiência cardíaca, afinal existe um grande número de pacientes que apresentam a disfunção diastólica mas não têm sinais de insuficiência cardíaca ²¹.

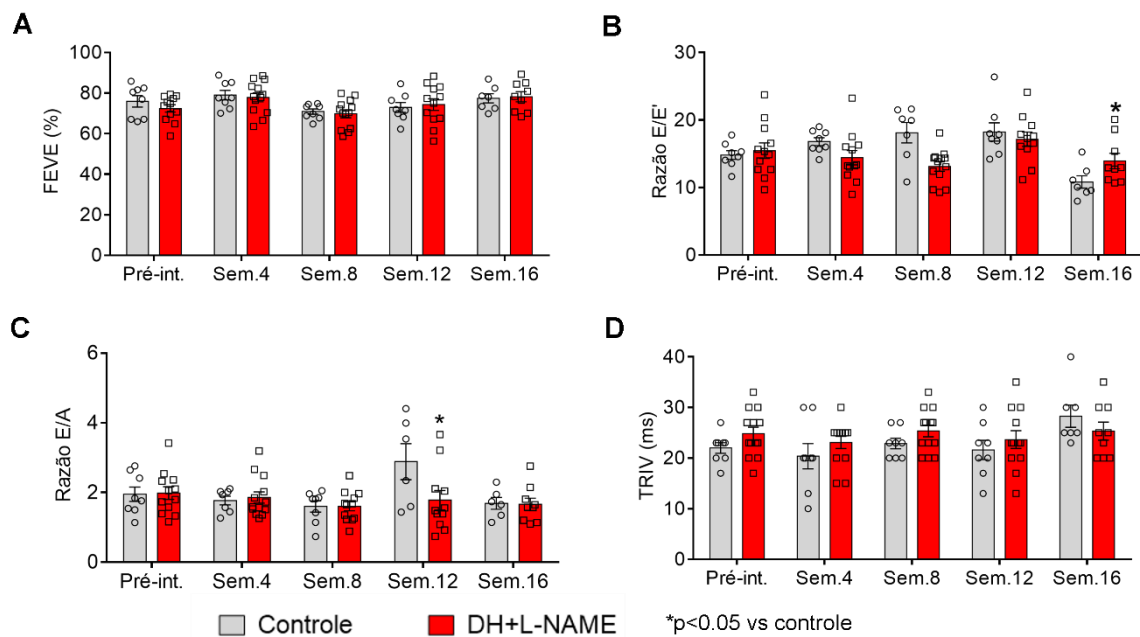


Figura 9: **Parâmetros Ecocardiográficos do Doppler.** (A) Fração de Ejeção Ventricular Esquerda (FEVE); (B) Razão entre a velocidade diastólica do fluxo mitral (E) e a velocidade diastólica do anel mitral (E'); (C) Razão entre a velocidade diastólica do fluxo mitral (E) e o fluxo de enchimento ativo diastólico (A); (D) Tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV). * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

Além dos parâmetros ecocardiográficos citados acima, os peptídeos natriuréticos representam o padrão ouro para biomarcadores na insuficiência cardíaca. O peptídeo natriurético do tipo N-terminal pró-B (NT-proBNP) é um biomarcador bem estabelecido na clínica e frequentemente utilizado para auxiliar no diagnóstico inicial de IC FEp. O peptídeo natriurético do tipo B (BNP), é secretado em resposta ao estiramento miocárdico decorrente da sobrecarga de pressão ou volume, que normalmente é observada na insuficiência cardíaca. Ele é sintetizado como um pró-hormônio, denominado proBNP. Na secreção esse peptídeo é dividido em sua fração biologicamente ativa (BNP) e biologicamente inerte, mas bioquimicamente mais estável, NT-proBNP. Dessa forma, ambos podem ser encontrados na circulação; no entanto, devido a sua estabilidade, o NT-proBNP tem sido utilizado como preditor de diagnóstico da IC FEp¹⁰⁴. Nesse sentido, após as 16 semanas do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados e o ventrículo esquerdo isolado para avaliação da expressão gênica do NT-proBNP. Ao analisarmos os níveis de mRNA cardíacos, observamos um aumento expressivo dos níveis de NT-proBNP nos animais

DH+LAME quando comparado com o grupo controle (figura 10), sugerindo que o nosso protocolo foi eficaz em promover alterações na pressão do ventrículo esquerdo.

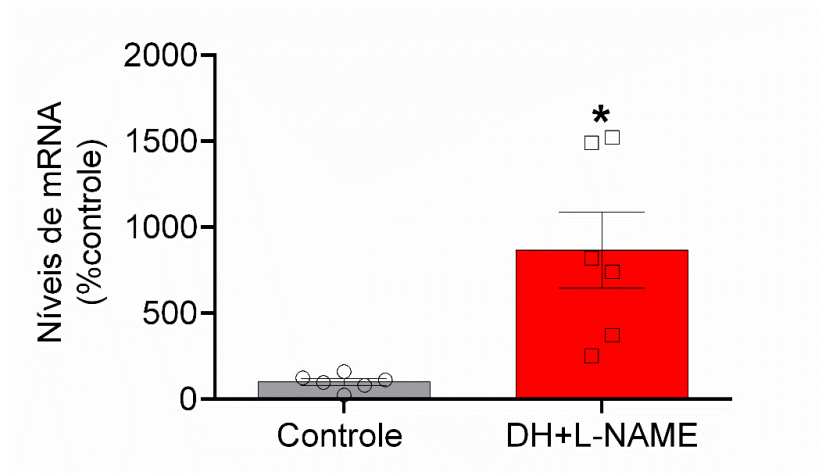


Figura 10: **Expressão gênica de NT-proBNP.*** diferença significativa versus grupo controle controle (p≤0,05).

Outro sinal clínico da insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada é a intolerância ao esforço físico, que é definida como a redução da capacidade de realização de exercício físico, acompanhada de sintomas como dispneia e/ou fadiga significativa. Algumas anormalidades cardíacas podem ser aparentes somente após a realização de um exercício máximo até a exaustão ⁷⁶. Nesse sentido, avaliamos a capacidade máxima de realização do exercício físico nos diferentes grupos da semana pré-intervenção até a décima sexta semana do protocolo experimental (figura 3). Como podemos observar na figura 11, o desempenho aos esforços físicos dos animais do grupo DH+L-NAME, representado pela distância total percorrida, foi prejudicado a partir da quarta semana de caracterização até a décima sexta semana em comparação com o grupo controle.

Apesar da intolerância ao esforço físico ser uma característica presente em portadores de ICfEp, fatores cardíacos e extracardíacos contribuem para essa disfunção. Entre os fatores cardíacos, os principais contribuintes são incompetência cronotrópica, redução na capacidade de reserva e pressões de enchimento do ventrículo esquerdo elevadas. A incompetência cronotrópica, definida como incapacidade do coração de aumentar a frequência cardíaca de acordo com a demanda metabólica é a causa mais comum encontrada na clínica, além disso a hipertrofia miocárdica, proveniente do remodelamento cardíaco atrapalha o aumento

do volume diastólico durante a prática de exercício físico, prejudicando assim a qualidade de vida do paciente ¹⁰⁵.

Com relação aos fatores extracardíacos a literatura destaca que a obesidade, síndrome metabólica e distúrbios pró-inflamatórios sistêmicos desencadeados por essas comorbidades podem levar a alterações no diafragma e músculo esquelético, que levam a intolerância ao exercício físico. No que se refere as alterações no diafragma os mecanismos intracelulares subjacentes responsáveis por essa disfunção ainda são pouco compreendidos. No entanto, de acordo com estudos da literatura ratos obesos podem apresentar mudanças na proporção de fibras tipo I (lenta), levando a um prejuízo na função respiratória que impacta dramaticamente a capacidade de exercício ^{106; 107}.

No que diz respeito a alterações no músculo esquelético, a mudança na distribuição das fibras musculares, como redução nas fibras tipo I (lenta) e uma relação capilar/fibra atenuada, além de comprometimento na sinalização anabólica, podem contribuir para fisiopatologia da intolerância ao exercício físico ¹⁰⁵. Apesar de existirem estudos que tentam esclarecer a relação entre a intolerância ao exercício físico e a síndrome metabólica encontrada em pacientes com ICFEp, a fisiopatologia envolvida nessa disfunção ainda é pouco compreendida devido a complexidade dessa doença ¹⁰⁵. Dessa forma, como o nosso protocolo induz o ganho de peso dos animais, acreditamos que a adiposidade contribuiu para redução da capacidade de exercício físico dos animais. No entanto, para compreensão mais detalhada dos mecanismos envolvidos nessa disfunção são necessários experimentos adicionais.

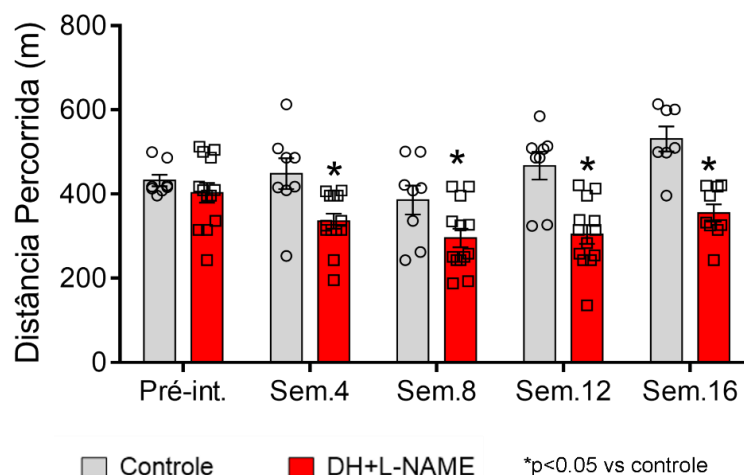


Figura 11: **Teste de tolerância ao esforço físico.** * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

Como já mencionado anteriormente a intolerância ao esforço físico é uma característica comum em pacientes com ICFEp, e essa intolerância é devido não apenas à redução de reserva cardíaca, mas também a disfunção muscular esquelética¹⁰⁸. Portanto, além de avaliar os parâmetros fisiológicos e bioquímicos do ventrículo esquerdo dos ratos, e com base nos achados encontrados com o teste de tolerância ao exercício físico (figura 11) analisamos nesse lote de animais com ICFEp a função muscular esquelética (*ex vivo*) do músculo EDL (extensor longo dos dedos). Para isso, o músculo foi isolado dos animais e acoplado ao sistema de avaliação da contratilidade *ex vivo* em um banho de órgãos, onde foi submetido à estimulação elétrica crescente (em Hertz).

Como podemos observar na figura 12A o nosso protocolo experimental reduziu significativamente a força específica do músculo EDL do grupo DH+L-NAME a partir da frequência de 80 Hz até 150 Hz, bem como diminuiu a força tetânica máxima (figura 12B) desse grupo quando comparado com o controle. Dessa forma, o conjunto desses dados sugere que o protocolo experimental proposto também induziu disfunção muscular esquelética *ex vivo*, a qual pode estar associada a intolerância ao exercício observada no grupo DH+L-NAME na figura 11.

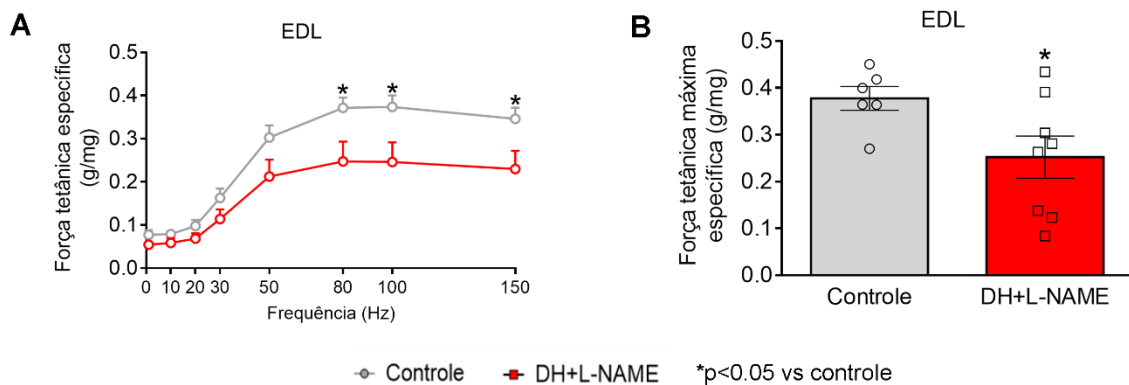


Figura 12: **Análise funcional do músculo extensor longo dos dedos (EDL)**. (A) Curva da força específica desenvolvida após estímulos crescentes em Hertz do músculo EDL; (B) Força tetânica máxima do músculo EDL. Os resultados estão apresentados em média±EPM. * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

6.2 Caracterização bioenergética mitocondrial em corações de ratos com ICFEp

Após as 16 semanas de protocolo experimental os animais foram eutanasiados, o coração coletado e o ventrículo esquerdo isolado para realizar as seguintes análises:

metabolismo bioenergético mitocondrial, captação de cálcio mitocondrial e expressão das proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial. Atualmente sabe-se que o remodelamento cardíaco em doenças cardiovasculares é caracterizado pelo aumento da massa cardíaca e disfunção metabólica mitocondrial, decorrente, em parte, pelo elevado estresse hemodinâmico e neuro-humoral, o que contribui para a fisiopatologia da ICFEp⁹⁵.

Estudos da literatura têm apontado a disfunção mitocondrial como um processo crítico envolvido na fisiopatologia e progressão da insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida (ICFEr)^{32; 109; 110}. Um estudo realizado por Phan e colaboradores¹¹¹ usou a espectroscopia de ressonância magnética para avaliar a reserva de energia do miocárdio em 37 indivíduos com ICFEp e 20 indivíduos saudáveis. Como resultado eles descobriram que indivíduos portadores de ICFEp apresentam reservas de energia significativamente reduzidas quando comparados com os indivíduos saudáveis¹¹¹. Além disso, experimentos em ratos submetidos a uma dieta hipercalórica para induzir a síndrome metabólica, hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica demonstraram que os roedores com disfunção diastólica apresentam redução na síntese de ATP em comparação com o grupo controle, demonstrando que disfunções mitocondriais parecem estar associadas a fisiopatologia da ICFEp¹¹².

A partir da caracterização fenotípica do nosso modelo animal, o nosso próximo passo foi avaliar a função mitocondrial cardíaca. Para melhor quantificar os parâmetros funcionais dessa organela, optamos por fazer as análises em mitocôndrias cardíacas isoladas do ventrículo esquerdo. Vale destacar que todos os ensaios foram realizados na presença de piruvato, malato, succinato e glutamato, substratos que participam das funções respiratórias fisiológicas no tecido cardíaco.

Inicialmente, avaliamos o consumo de oxigênio (O₂) mitocondrial nas seguintes condições: basal (Estado 2), estimulação da respiração com ADP (Estado 3), inibição da respiração com oligomicina (Estado 4, que age diretamente na ATP sintase bloqueando o movimento de prótons através desse complexo), e estimulação da respiração máxima com fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona (FCCP, Estado desacoplado). Por fim, inferimos a eficiência da respiração mitocondrial através do cálculo do controle respiratório, que compreende a razão do Estado 3 pelo Estado 4.

Como podemos observar na figura 13A, nenhuma diferença foi observada entre os grupos controle e DH+L-NAME quando avaliamos respiração mitocondrial basal, respiração máxima no Estado 4 (figura 13C), Estado desacoplado (figura 13D) e

controle respiratório mitocondrial (figura 13E). No entanto, a figura 13B mostra que o consumo máximo de oxigênio mitocondrial no Estado 3 (presença de ADP) estava atenuado no grupo DH+L-NAME quando comparado com o grupo controle. Esse dado demonstra uma redução da eficiência mitocondrial dos animais DH+L-NAME na produção de ATP perante demanda energética aumentada. Esse achado no nosso trabalho corrobora com os achados na literatura descrito em vários modelos animais de ICFEp, que relatam que a alteração metabólica primária do coração de portadores dessa síndrome é uma diminuição do metabolismo oxidativo ¹¹³. Até o momento não está bem estabelecido na literatura os mecanismos envolvidos nessa disfunção. Sabe-se que existe um comprometimento de genes envolvidos no metabolismo mitocondrial no coração de roedores com ICFEp ¹¹⁴.

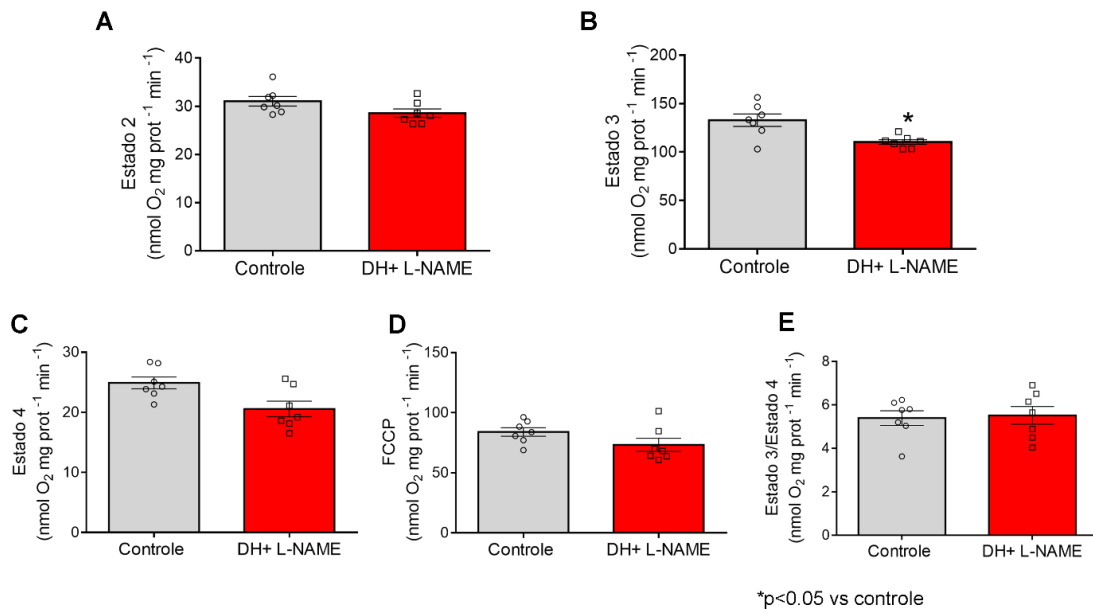


Figura 13: **Respiração mitocondrial.** (A) Estado 2 – Respiração Basal; (B) Respiração máxima no Estado 3 na presença de ADP; (C) Respiração máxima no Estado 4 na presença de oligomicina; (D) Estado desacoplado na presença de FCCP e; (E) Controle respiratório mitocondrial (Estado 3/Estado 4). * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

Outro elemento crítico associado ao desenvolvimento da ICFEp é o aumento do estresse oxidativo mitocondrial. As espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas de forma predominante nas mitocôndrias e são consideradas marcadores de estresse mitocondrial ¹¹⁵. O aumento da produção de EROs tem sido descrito em amostras de miocárdio humano ^{116; 117} e modelos animais ^{118; 119}, por isso tem sido sugerido como um fator envolvido na patogênese dessa síndrome.

Para complementar as análises de função das mitocôndrias cardíacas isoladas, avaliamos a quantidade de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) liberada pela mitocôndria isolada perante diferentes condições bioenergéticas. Para isso, utilizamos ensaio fluorimétrico para quantificar a liberação de H_2O_2 nos Estados 2, 3, 4 e desacoplado em mitocôndrias cardíacas. Nossos resultados demonstraram não haver diferença significativa na liberação absoluta de H_2O_2 entre os grupos estudados nos estados respiratórios mitocondriais 2 (figura 14A), 3 (figura 14B), 4 (figura 14C) e com FCCP (figura 14D).

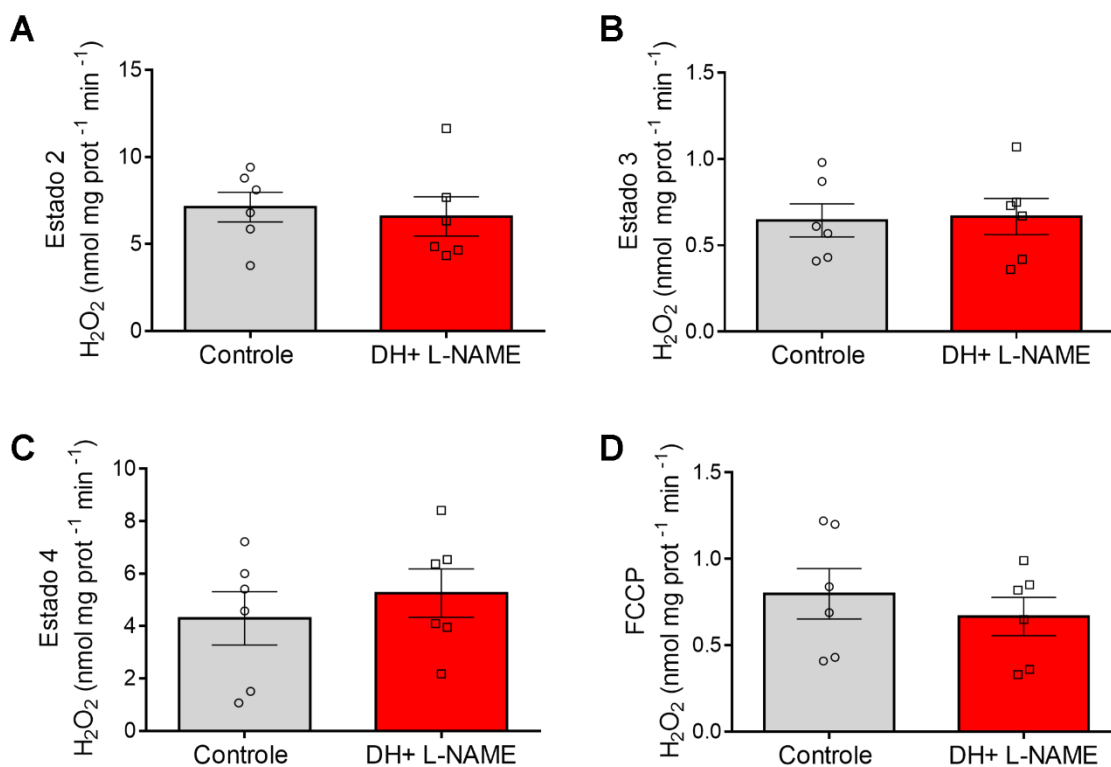


Figura 14: **Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante a respiração mitocondrial.** (A) Produção de H_2O_2 no Estado 2 (basal); (B) no Estado 3 na presença de ADP; (C) no Estado 4 na presença de oligomicina e; (D) no Estado desacoplado na presença de FCCP.

A literatura reporta que a formação e o acúmulo de aldeídos decorrentes de estresse oxidativo são extremamente cardiotoxícos e contribuem para a progressão de doenças cardiovasculares. Dentre os aldeídos acumulados no coração, o 4-Hidroxinonenal (4-HNE), originado através da oxidação de fosfolípidos presentes na membrana interna da mitocôndria, apresenta um grande poder nocivo devido a sua capacidade de reagir aminoácidos nucleofílicos e/ou outras macromoléculas e formar

adutos que resultam na disfunção celular ¹²⁰. Desse modo, para complementar as análises de estresse oxidativo, decidimos avaliar a formação dos adutos de 4-HNE na fração mitocondrial do ventrículo esquerdo. Como resultado notamos na figura 15B que não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

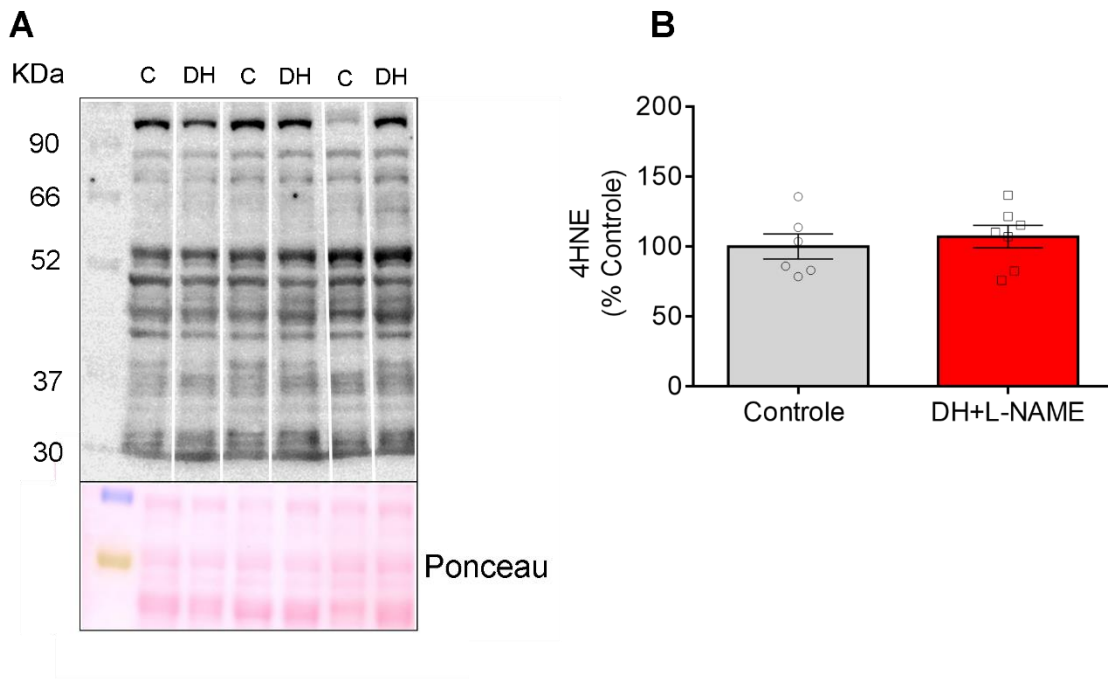


Figura 15: **Formação de adutos de 4-HNE.** (A) Figura representativa alternando as amostras do grupo controle (C) e DH+L-NAME (DH); (B) Expressão de adutos de 4-HNE na fração mitocondrial do ventrículo esquerdo. Normalização pelo ponceau.

Com o intuito de avaliar possíveis alterações metabólicas associadas ao equilíbrio redox cardíaco, quantificamos a expressão proteica e atividade da enzima responsável por remover aldeídos reativos, a aldeído desidrogenase 2 (ALDH2). A ALDH2 é responsável tanto pelo metabolismo do acetaldeído um intermediário tóxico, proveniente da metabolização do etanol pela álcool desidrogenase (ADH), quanto pelo metabolismo de aldeídos alifáticos de cadeia curta e longa, sendo responsável pela conversão do 4-HNE a aldeídos menos tóxicos (4-hidroxi-2-nonenoico e 4HNA). Essa enzima é expressa principalmente no fígado, coração e cérebro. Alterações na expressão proteica e atividade dessa enzima resultam em uma ampla gama de implicações funcionais em doenças cardiovasculares ^{29; 121; 122}. Como pode-se observar na figura 16A e 16B, nosso protocolo experimental não promoveu alterações na expressão proteica dessa enzima, bem como não levou à alterações na atividade basal (figura 16C), em ambos os grupos analisados.

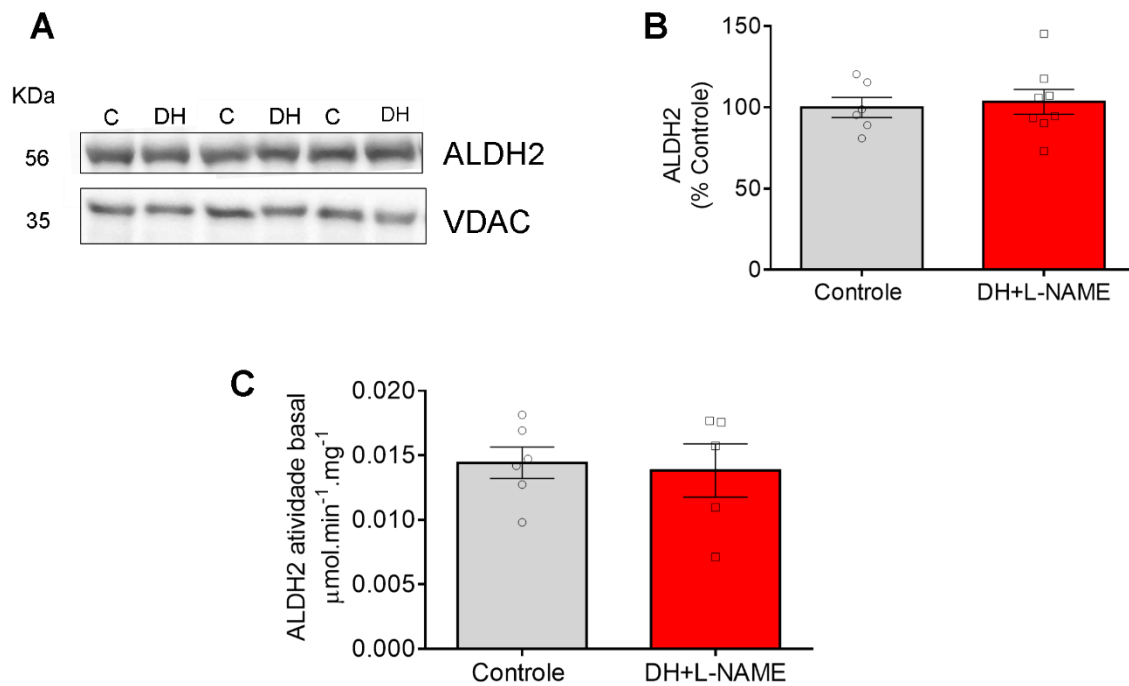


Figura 16: **Expressão proteica e atividade da enzima ALDH2.** (A) Figura representativa alternando as amostras do grupo controle (C) e DH+L-NAME (DH) da expressão proteica da enzima ALDH2; (B) Expressão de ALDH2 na fração mitocondrial do ventrículo esquerdo, dado normalizado por VDAC e resultado representado pela porcentagem do controle; (C) e Atividade basal da ALDH2.

As mitocôndrias são organelas que desempenham um papel fundamental suprindo as necessidades metabólicas dos diversos órgãos e tecidos, principalmente do coração, tendo em vista que cerca de 30% do volume do cardiomiócitos é composto por essas organelas. Além de fornecer energia, as mitocôndrias regulam a homeostase cardíaca controlando a captação e liberação do íon cálcio (Ca^{2+}), essencial na produção de ATP e acoplamento excitação/contração. Quando o controle do transiente de cálcio está desequilibrado, a contratilidade dos cardiomiócitos é prejudicada, levando a disfunção cardíaca^{28; 123; 124}. Desse modo, preservar a homeostase dessa organela é essencial para o bom funcionamento cardíaco.

Para avaliar as propriedades de transporte de cálcio mitocondrial do ventrículo esquerdo dos animais controle e do grupo DH+L-NAME, isolamos a fração mitocondrial dessa câmara e as mitocôndrias foram incubadas com adições seriadas de cálcio na presença de *Calcium green*, que apresenta fluorescência quando ligada ao cálcio, mas é impermeável a membrana, permitindo detectar mudanças nas concentrações de cálcio extra mitocondrial. Com isso, conseguimos calcular a cinética

de captação de cálcio mitocondrial. A figura 13A mostra um traçado representativo de captação de cálcio pelas mitocôndrias cardíacas de ratos controle (traçado preto) e ratos DH+L-NAME (traçado vermelho). Esse ensaio é baseado em adições subsequentes (setas na figura 13A) de concentrações exponenciais de cálcio (iniciando pela concentração de $10\mu\text{M}$), em que se observa uma diminuição gradativa da concentração de cálcio extra mitocondrial, indicando a captação do íon pelas mitocôndrias (figura 17A).

Com o intuito de avaliar o tamponamento de cálcio pelas mitocôndrias cardíacas em duas condições distintas, utilizamos tampões com diferentes substratos que atuam no complexo I (piruvato e malato - PM) e complexo II (succinato + rotenona que inibe o complexo I - Srot). A figura 17B demonstra que houve uma diminuição da capacidade de retenção de cálcio do grupo DH+L-NAME quando os substratos piruvato e malato estão presentes, em comparação com o controle. No entanto, essa diferença não foi observada entre os grupos na presença de succinato e rotenona (figura 17C). Ao analisar a taxa de captação de cálcio não detectamos diferenças significativas entre os grupos quando expostos aos substratos piruvato e malato (figura 17D). Entretanto, observamos uma redução significativa da captação desse íon sob adição de succinato e rotenona (figura 17E). Em conjunto, esses dados sugerem que os efeitos desse protocolo na retenção e captação de cálcio mitocondrial parecem ser distintos de acordo com o complexo da cadeia transportadora de elétrons modulado. Especula-se que a redução na captação e retenção de cálcio mitocondrial possa ter efeito protetor cardíaco em condições estressoras, uma vez que reduz diretamente a formação de poros de permeabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, inibe a indução de apoptose desencadeada pela liberação mitocondrial de citocromo c.

Estudos utilizando modelo de ICFEp metabolicamente induzido ^{125; 126}, tem demonstrado que o ventrículo de ratos apresenta concentração de cálcio citosólica aumentada quando comparado com o grupo controle. Sugerindo que a sobrecarga desse íon possa exercer um papel na patogênese dessa síndrome.

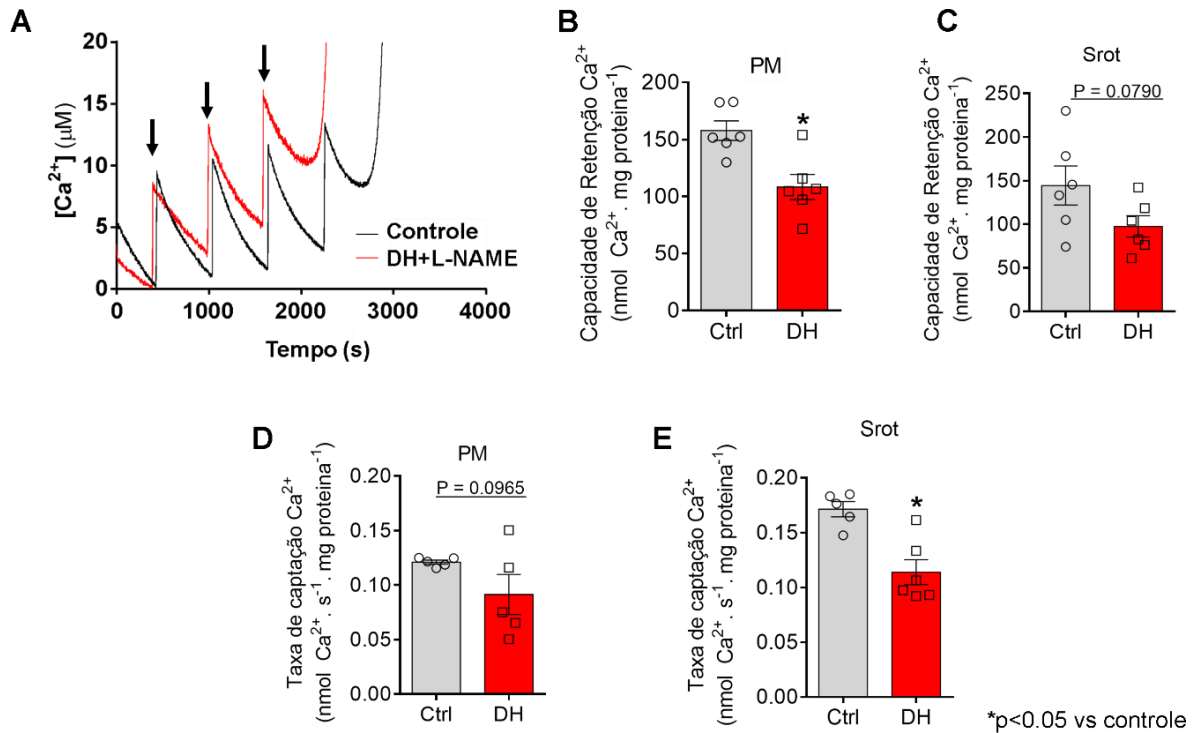


Figura 17: **Capacidade de retenção e captação de cálcio mitocondrial.** (A) Traçado representativo da captação de cálcio; (B) Quantificação da capacidade de retenção de cálcio na presença de piruvato e malato (PM); (C) Quantificação da capacidade de retenção de cálcio na presença de succinato e rotenona (Srot); (D) Quantificação das taxas de captação de cálcio na presença de piruvato e malato (PM) e; (E) succinato e rotenona (Srot); Ctrl – grupo controle e DH – grupo DH+L-NAME. * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,01$).

Sob condições fisiológicas, as mesmas quantidades de cálcio que entram na matriz mitocondrial, devem ser retiradas¹²⁷. Mediante as alterações encontradas no transiente de cálcio mitocondrial, decidimos avaliar o perfil de expressão das proteínas envolvidas no processo de captação (MCU – *mitochondrial calcium uniporter* e MICU-1 – *mitochondrial calcium uptake-1*) e extrusão (NCLX – *sodium/calcium/litium exchanger*) de cálcio. Como podemos observar nas figuras 18C, 18D e 18E, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos. No entanto na figura 18B, notamos que o grupo DH+L-NAME apresentou uma leve, porém significativa, diminuição na expressão proteica de MCU quando comparado com o grupo controle. Esses dados sugerem que a diminuição na capacidade de captação de cálcio mitocondrial esta associada à redução dos níveis proteicos de MCU, responsável pela captação desse íon pela mitocôndria. Entretanto, provas causais são necessárias para o estabelecimento de conclusões mais sólidas. Camundongos nocautes para MCU

não apresentam fenótipo cardíaco em condições basais ou perante estresse patológico ¹²⁸. Entretanto, a hiperexpressão de MCU protege o coração contra situações estressoras patológicas ¹²⁹.

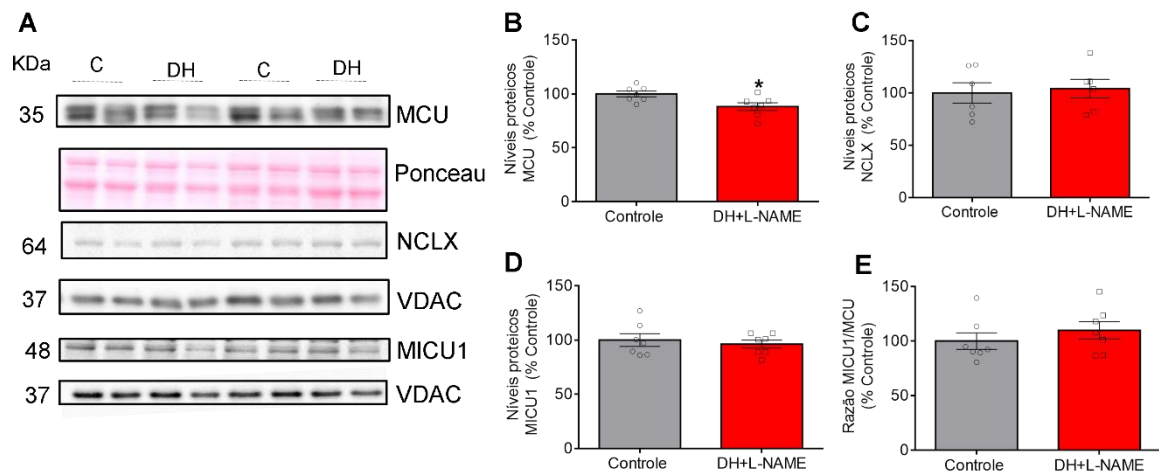


Figura 18: **Expressão de proteínas envolvidas no transiente de cálcio mitocondrial.** (A) Figura representativa; (B) Expressão proteica da *mitochondrial calcium uniporter* (MCU); (C) *sodium/calcium/litium exchanger* (NCLX); (D) *mitochondrial calcium uptake-1* (MICU-1) e; (E) Razão entre as proteínas MICU-1 e MCU. Normalização por ponceu para proteína MCU e VDAC para as proteínas NCLX e MICU-1. Os resultados estão apresentados em porcentagem do controle.

6.3 Caracterização do perfil de expressão das proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial no coração de ratos ICFEp)

O acúmulo de mitocôndrias fragmentadas (menores) no coração é uma característica comum em pacientes com ICFEp ou ICFEr ^{17; 32; 110}. Recentemente o nosso grupo de pesquisa demonstrou que um desbalanço na dinâmica mitocondrial induzido por uma interação intermolecular entre uma proteína que participa da dinâmica mitocondrial (mitofusina 1 – Mfn1) e uma quinase envolvida na transdução de sinais (PKC β II), favorece o acúmulo de mitocôndrias fragmentadas (menores) que estão disfuncionais em um modelo ICFEr induzido por infarto agudo do miocárdio em ratos ³². Um estudo recente publicado por Chaanine e colaboradores utilizando biópsias de ventrículo esquerdo demonstrou que pacientes com ICFEp apresentam um acúmulo de mitocôndrias fragmentadas em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo assim o remodelamento mitocondrial patológico como um potencial mecanismo envolvido na fisiopatologia da ICFEp ¹⁷.

Uma vez que um dos objetivos do projeto inclui a caracterização da dinâmica mitocondrial no nosso modelo experimental, decidimos avaliar o perfil de expressão das proteínas envolvidas nos processos de fusão e fissão mitocondrial na tentativa de melhor compreender os mecanismos celulares envolvidos na fisiopatologia da ICFEp. A figura 14 apresenta os dados da expressão proteica referentes às proteínas envolvidas na fusão mitocondrial (Mfn1, Mfn2 e Opa1) e de uma proteína envolvida na fissão mitocondrial (Fis1) provenientes da fração mitocondrial do ventrículo esquerdo. Vale destacar que não foi possível realizar a quantificação da expressão das proteínas MiD49 e MiD51 devido a um atraso na importação dos anticorpos. Como podemos observar na figura 14, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos na expressão das proteínas Mfn1 (figura 19B), Mfn2 (figura 19C), Opa1 (figura 19D), Drp1 (figura 19E), Mff (figura 19F) e Fis1 (figura 19G). Em conjunto esses dados sugerem que o nosso protocolo experimental não promoveu alterações na expressão de proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial.

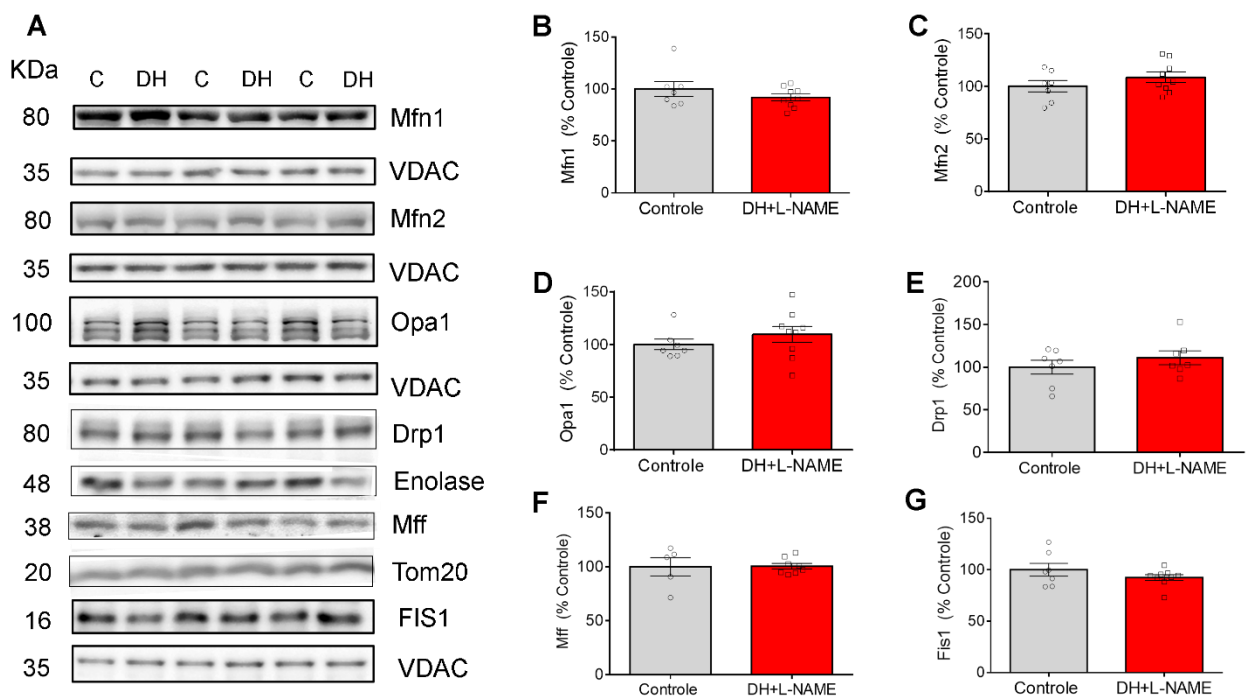


Figura 19: **Expressão de proteínas da dinâmica mitocondrial.** (A) Figura representativa; (B) Expressão proteica de proteínas da fusão mitocondrial: Mitofusina 1 (Mfn1); (C) Mitofusina 2 (Mfn2); (D) Proteína de atrofia óptica (OPA1) e de proteínas da fissão mitocondrial: (E) Proteína 1 relacionada a dinâmica (Drp1); (F) Fator de fissão mitocondrial (Mff) e (G) Proteína de fissão mitocondrial (Fis1). Normalização por VDAC das proteínas Mfn1, Mfn2, Opa1 e Fis 1; por enolase para Drp1 e por Tom20 para Mff. Resultados apresentados em porcentagem do controle.

A insuficiência cardíaca em humanos está associada a um aumento significativo nos níveis e atividade da proteína quinase C β II (PKC β II). Cerca de 2% do genoma humano codifica proteínas quinases, de modo geral, elas são enzimas que alteram outras proteínas quimicamente adicionando um grupo γ -fosfato terminal de trifosfato de adenosina (ATP) aos resíduos de serina, treonina ou tirosina. Esse processo também chamado de fosforilação e resulta em uma alteração funcional do substrato (proteína alvo) que regula as vias de sinalização através da amplificação de sinais, localização celular, ou por interações com proteínas reguladoras, mediadas por hormônios, neurotransmissores e estresse mecânico ^{110; 130}.

Um trabalho publicado por Bowling *et al* utilizando corações transplantados de pacientes evidenciou que a insuficiência cardíaca em humanos está associada a um aumento significativo dos níveis e atividade de PKC β I e PKC β II ¹³¹. Inagaki e colaboradores ¹³² observaram uma elevada expressão dessas isoenzimas (159 e 155%, respectivamente) no coração ratos hipertensos. No entanto, nosso grupo demonstrou que apenas ativação da isoenzima PKC β II contribui para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida ^{11; 32}.

Recentemente, relatamos o benefício de um inibidor de fosforilação de substrato de PKC β II, denominado SAM β A. Em suma, na ICFEr, a PKC β II transloca-se para a mitocôndria, fosforila e, assim, inibi Mfn1, uma GTPase que medeia a fusão mitocondrial, levando a um acúmulo de mitocôndrias fragmentadas favorecendo a degeneração cardíaca ³². Como já mencionado, Chaanine ¹⁷ e colaboradores observaram acúmulo de mitocôndrias fragmentadas em biópsias de ventrículo esquerdo de pacientes com ICFEp quando comparados com o grupo controle. Desse modo, um dos objetivos desse projeto foi avaliar os níveis dessa quinase no lisado total e na fração mitocondrial do ventrículo esquerdo dos animais dos grupos estudados, bem como correlacionar esses níveis com a translocação dessa proteína do lisado total para a mitocôndria. Como se pode observar na figura 20B e 20C, a expressão da proteína PKC β II não apresentou diferença entre os grupos. Além disso, ao analisar a translocação da PKC β II, definida pela razão entre PKC β II mitocondrial e PKC β II do lisado total (figura 20D), observamos que os grupos não são estatisticamente diferentes. Desse modo, o conjunto desses dados sugere que não há alteração nos níveis mitocondriais de PKC β II e Mfn1 no modelo experimental estudado.

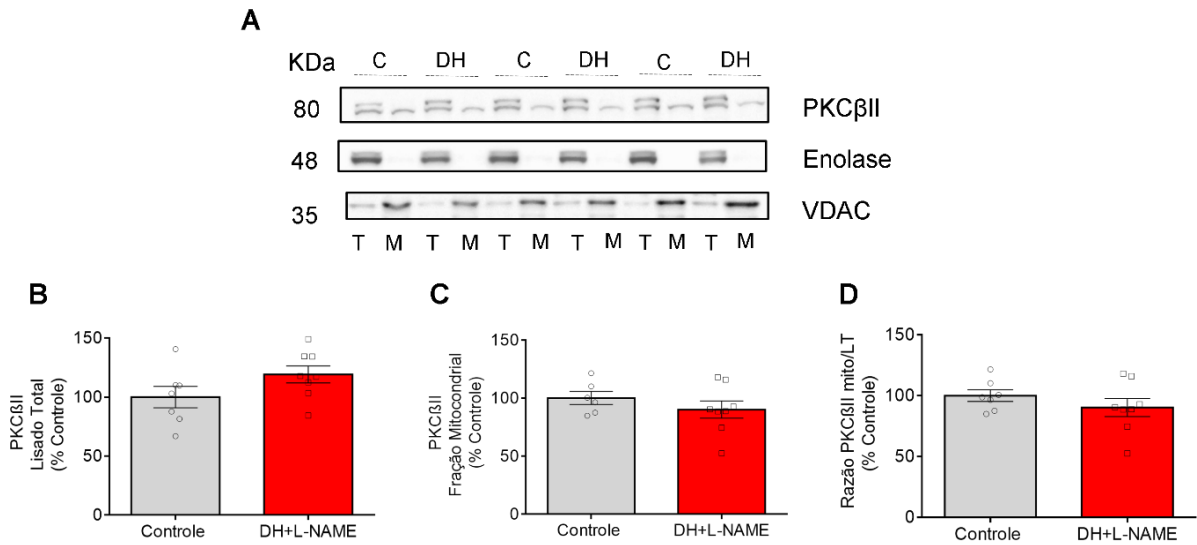


Figura 20: **Expressão da proteína quinase C βII no lisado total e na mitocôndria.** (A) Figura representativa alternando as amostras do lisado total e mitocôndria; (B) Expressão da PKCβII no lisado total; (C) Expressão da PKCβII na fração mitocondrial; (D) Translocação da PKCβII definida pela razão entre PKCβII mitocondrial e do lisado total (LT); T – Lisado total e M – mitocôndria; C – grupo controle e DH – grupo DH+L-NAME. Normalização do lisado total por enolase e da fração mitocondrial por VDAC. Os resultados estão apresentados em porcentagem do controle. * diferença significativa versus grupo controle ($p \leq 0,05$).

Apesar de não constarmos alterações nas principais proteínas que regulam os processos de fusão e fissão mitocondrial, resolvemos investigar a morfologia das mitocôndrias do ventrículo esquerdo através da microscopia eletrônica de transmissão. Essa análise teve o objetivo de averiguar a presença de fragmentação mitocondrial e possíveis mudanças na estrutura dessa organela. Como podemos observar na figura 21, não houve diferenças estatísticas tanto no número de mitocôndrias (figura 21B), quanto na área mitocondrial (figura 21C). Nossos resultados demonstram que diferentemente do que acontece no modelo de ICFe padronizado pelo o nosso grupo³², e do fenótipo encontrado em biópsias de ventrículo esquerdo de portadores de ICFe¹⁷, o nosso modelo não apresentou alterações na dinâmica mitocondrial e na morfologia dessa organela, ficando evidente que os resultados obtidos não suportam a hipótese de que o prejuízo na dinâmica mitocondrial cardíaca contribui para o estabelecimento e progressão da ICFe no modelo estudado por nós. Como a molécula SAMβA foi desenvolvida para reverter a fragmentação mitocondrial excessiva, através da inibição competitiva da interação entre Mfn1 e PKCβII, e no nosso modelo não observamos esse fenótipo, dispensamos

assim o uso dessa molécula como intervenção terapêutica.

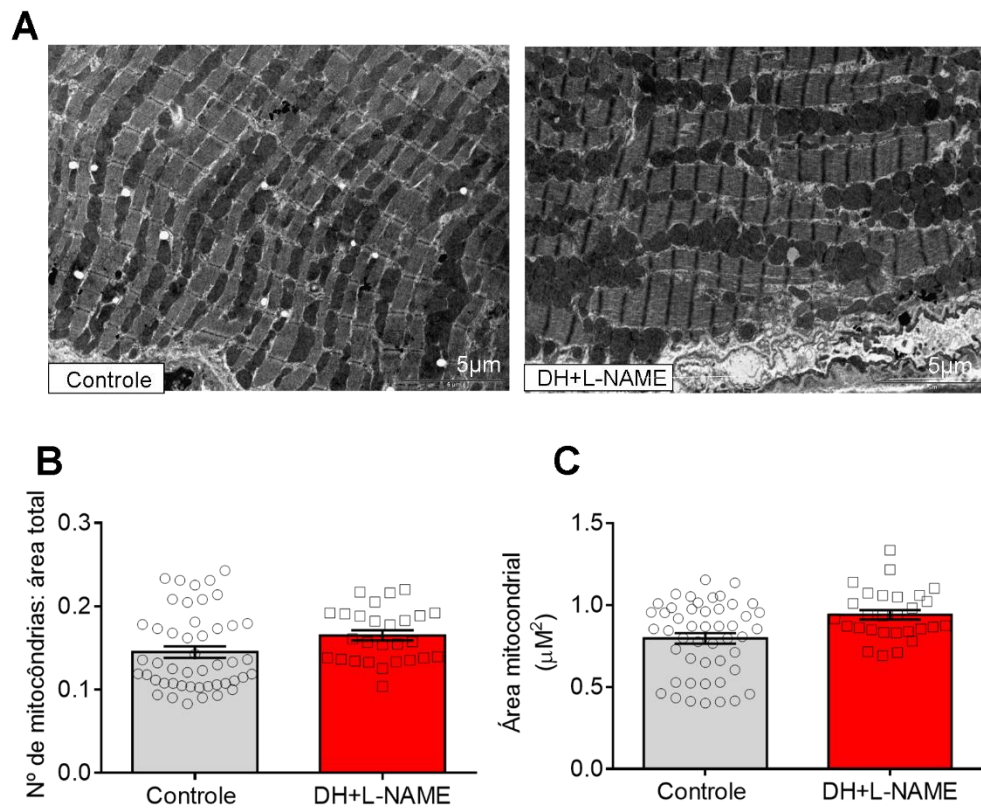


Figura 21: **Morfologia mitocondrial.** (A) Imagens representativas (aumento 5µm); (B) número de mitocôndrias e (C) área mitocondrial (µM²). M – mitocôndria e S – sarcômero.

7. CONCLUSÃO

Devido a crescente incidência de casos de ICFEp no mundo, a busca pela compreensão detalhada da fisiopatologia e dos mecanismos moleculares envolvidos tanto no desenvolvimento, quanto na progressão dessa síndrome tem se tornado crescente ao longo os anos. Certamente essas pesquisas contribuirão para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes no tratamento da ICFEp, e contribuir para a redução das elevadas taxas de mortalidade e gastos com saúde pública.

Inicialmente partimos da hipótese de que o modelo proposto de ICFEp, iria recapitular as principais características fenotípicas e celulares de portadores dessa síndrome. Com base nos experimentos realizados observamos que o protocolo de indução proposto foi eficiente em induzir a obesidade, alterações cardiovasculares e metabólicas nos animais, que são características presentes na clínica em pacientes. No entanto, ao analisarmos o perfil celular, notamos que as características de disfunção da dinâmica mitocondrial associadas ao desbalanço nos processos de fissão e fusão encontrados em um trabalho da literatura não estavam presentes em nosso modelo.

Independente disso, os resultados obtidos nesse dissertação de mestrado abrem novas perspectivas acerca da melhor compreensão do papel da mitocôndria no controle do transiente de cálcio na ICFEp, bem como os mecanismos envolvidos na disfunção muscular esquelética observada no modelo experimental estudado.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 TANAI, E.; FRANTZ, S. Pathophysiology of Heart Failure. **Compr Physiol**, v. 6, n. 1, p. 187-214, Dec 2015. ISSN 2040-4603. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26756631> >.
- 2 SINGH, A.; MEHTA, Y. Heart failure with preserved ejection fraction (HFpEF): Implications for the anesthesiologists. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol**, v. 34, n. 2, p. 161-165, 2018 Apr-Jun 2018. ISSN 0970-9185. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30104821> >.
- 3 YANCY, C. W. et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on practice guidelines. **Circulation**, v. 128, n. 16, p. 1810-52, Oct 2013. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23741057> >.
- 4 ALZAHRI, M. S.; ROHRA, A.; PEACOCK, W. F. Nitrates as a Treatment of Acute Heart Failure. **Card Fail Rev**, v. 2, n. 1, p. 51-55, May 2016. ISSN 2057-7540. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28785453> >.
- 5 RIGOLLI, M.; WHALLEY, G. A. Heart failure with preserved ejection fraction. **J Geriatr Cardiol**, v. 10, n. 4, p. 369-76, Dec 2013. ISSN 1671-5411. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24454331> >.
- 6 MURPHY, S.; FRISHMAN, W. H. Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target. **Cardiol Rev**, v. 13, n. 1, p. 3-12, 2005 Jan-Feb 2005. ISSN 1061-5377. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596021> >.
- 7 BIANUCCI, R. et al. Forensic Analysis Reveals Acute Decompensation of Chronic Heart Failure in a 3500-Year-Old Egyptian Dignitary. **J Forensic Sci**, v. 61, n. 5, p. 1378-81, 09 2016. ISSN 1556-4029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27362779> >.
- 8 FERRARI, R.; BALLA, C.; FUCILI, A. **Heart failure: an historical perspective.** *European Heart Journal Supplements*. Cotignola, Italy: European Heart Journal Supplements. Volum 18 G3-G10 p. 2016.
- 9 DAVIS, R. C.; HOBBS, F. D.; LIP, G. Y. ABC of heart failure. History and epidemiology. **BMJ**, v. 320, n. 7226, p. 39-42, Jan 2000. ISSN 0959-8138. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617530> >.
- 10 ROGERS, C.; BUSH, N. Heart Failure: Pathophysiology, Diagnosis, Medical Treatment Guidelines, and Nursing Management. **Nurs Clin North Am**, v. 50, n. 4, p. 787-99, Dec 2015. ISSN 1558-1357. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596665> >.
- 11 FERREIRA, J. C.; BRUM, P. C.; MOCHLY-ROSEN, D. β IIIPKC and ϵ PKC isozymes as potential pharmacological targets in cardiac hypertrophy and heart failure. **J Mol Cell Cardiol**, v. 51, n. 4, p. 479-84, Oct 2011. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21035454> >.
- 12 VLAHOS, C. J.; MCDOWELL, S. A.; CLERK, A. Kinases as therapeutic targets for heart failure. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p. 99-113, Feb 2003. ISSN 1474-1776.

- Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12563301> >.
- 13 PONIKOWSKI, P. et al. 2016 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure: The Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure of the European Society of Cardiology (ESC) Developed with the special contribution of the Heart Failure Association (HFA) of the ESC. **Eur Heart J**, v. 37, n. 27, p. 2129-2200, 07 2016. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27206819> >.
- 14 MOSTERD, A.; HOES, A. W. Clinical epidemiology of heart failure. **Heart**, v. 93, n. 9, p. 1137-46, Sep 2007. ISSN 1468-201X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699180> >.
- 15 VALERO-MUÑOZ, M.; BACKMAN, W.; SAM, F. Murine Models of Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: a "Fishing Expedition". **JACC Basic Transl Sci**, v. 2, n. 6, p. 770-789, Dec 2017. ISSN 2452-302X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29333506> >.
- 16 SIMMONDS, S. J. et al. Cellular and Molecular Differences between HFpEF and HFrEF: A Step Ahead in an Improved Pathological Understanding. **Cells**, v. 9, n. 1, 01 2020. ISSN 2073-4409. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31963679> >.
- 17 CHAANINE, A. H. et al. Mitochondrial Morphology, Dynamics, and Function in Human Pressure Overload or Ischemic Heart Disease With Preserved or Reduced Ejection Fraction. **Circ Heart Fail**, v. 12, n. 2, p. e005131, 02 2019. ISSN 1941-3297. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30744415> >.
- 18 KOMAMURA, K. Similarities and Differences between the Pathogenesis and Pathophysiology of Diastolic and Systolic Heart Failure. **Cardiol Res Pract**, v. 2013, p. 824135, 2013. ISSN 2090-8016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24459600> >.
- 19 KITZMAN, D. W. et al. Effect of Caloric Restriction or Aerobic Exercise Training on Peak Oxygen Consumption and Quality of Life in Obese Older Patients With Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, v. 315, n. 1, p. 36-46, Jan 2016. ISSN 1538-3598. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26746456> >.
- 20 KUMAR, A. A.; KELLY, D. P.; CHIRINOS, J. A. Mitochondrial Dysfunction in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **Circulation**, v. 139, n. 11, p. 1435-1450, 03 2019. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30856000> >.
- 21 MILJKOVIK, L. V.; SPIROSKA, V. Heart Failure with Preserved Ejection Fraction - Concept, Pathophysiology, Diagnosis and Challenges for Treatment. **Open Access Maced J Med Sci**, v. 3, n. 3, p. 521-7, Sep 2015. ISSN 1857-9655. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27275281> >.
- 22 SHEAR, F. E. Novel paradigms in the therapeutic management of heart failure with preserved ejection fraction: clinical perspectives. **Am J Cardiovasc Dis**, v. 9, n. 5, p. 91-108, 2019. ISSN 2160-200X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31763061> >.
- 23 PFEFFER, M. A.; SHAH, A. M.; BORLAUG, B. A. Heart Failure With Preserved Ejection

- Fraction In Perspective. **Circ Res**, v. 124, n. 11, p. 1598-1617, 05 2019. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31120821> >.
- 24 PAULUS, W. J.; TSCHÖPE, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 4, p. 263-71, Jul 2013. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23684677> >.
- 25 PAGEL, P. S. et al. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Comprehensive Review and Update of Diagnosis, Pathophysiology, Treatment, and Perioperative Implications. **J Cardiothorac Vasc Anesth**, v. 35, n. 6, p. 1839-1859, Jun 2021. ISSN 1532-8422. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32747202> >.
- 26 TANASE, D. M. et al. Natriuretic Peptides in Heart Failure with Preserved Left Ventricular Ejection Fraction: From Molecular Evidences to Clinical Implications. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 11, May 2019. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31142058> >.
- 27 REDDY, Y. N. V. et al. A Simple, Evidence-Based Approach to Help Guide Diagnosis of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **Circulation**, v. 138, n. 9, p. 861-870, 08 2018. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29792299> >.
- 28 BOYMAN, L.; KARBOWSKI, M.; LEDERER, W. J. Regulation of Mitochondrial ATP Production: Ca. **Trends Mol Med**, v. 26, n. 1, p. 21-39, Jan 2020. ISSN 1471-499X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31767352> >.
- 29 TIAN, R. et al. Unlocking the Secrets of Mitochondria in the Cardiovascular System: Path to a Cure in Heart Failure—A Report from the 2018 National Heart, Lung, and Blood Institute Workshop. **Circulation**, v. 140, n. 14, p. 1205-1216, Oct 2019. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31769940> >.
- 30 CHERRY, A. D. Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Surgery. **Anesthesiol Clin**, v. 37, n. 4, p. 769-785, Dec 2019. ISSN 1932-2275. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31677690> >.
- 31 MORALES, P. E. et al. Emerging role of mitophagy in cardiovascular physiology and pathology. **Mol Aspects Med**, v. 71, p. 100822, Feb 2020. ISSN 1872-9452. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31587811> >.
- 32 FERREIRA, J. C. B. et al. A selective inhibitor of mitofusin 1- β IIPKC association improves heart failure outcome in rats. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 329, 01 2019. ISSN 2041-1723. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30659190> >.
- 33 LIESA, M.; PALACÍN, M.; ZORZANO, A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. **Physiol Rev**, v. 89, n. 3, p. 799-845, Jul 2009. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19584314> >.
- 34 WHITLEY, B. N.; ENGELHART, E. A.; HOPPINS, S. Mitochondrial dynamics and their potential as a therapeutic target. **Mitochondrion**, v. 49, p. 269-283, 11 2019. ISSN 1872-8278. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31228566> >.
- 35 YAPA, N. M. B. et al. Mitochondrial dynamics in health and disease. **FEBS Lett**, v. 595, n. 8, p. 1184-1204, 04 2021. ISSN 1873-3468. Disponível em: <

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33742459> >.
- 36 SKULACHEV, V. P. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. **Trends Biochem Sci**, v. 26, n. 1, p. 23-9, Jan 2001. ISSN 0968-0004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11165513> >.
- 37 PALANIYANDI, S. S. et al. Regulation of mitochondrial processes: a target for heart failure. **Drug Discov Today Dis Mech**, v. 7, n. 2, p. e95-e102, 2010. ISSN 1740-6765. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21278905> >.
- 38 SKULACHEV, V. P. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. **Biochim Biophys Acta**, v. 1363, n. 2, p. 100-24, Feb 1998. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9507078> >.
- 39 BRECKENRIDGE, D. G. et al. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. **J Cell Biol**, v. 160, n. 7, p. 1115-27, Mar 2003. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12668660> >.
- 40 GIACOMELLO, M. et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 21, n. 4, p. 204-224, 04 2020. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32071438> >.
- 41 JAMES, D. I. et al. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. **J Biol Chem**, v. 278, n. 38, p. 36373-9, Sep 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12783892> >.
- 42 YUE, W. et al. A small natural molecule promotes mitochondrial fusion through inhibition of the deubiquitinase USP30. **Cell Res**, v. 24, n. 4, p. 482-96, Apr 2014. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513856> >.
- 43 KRAUS, F. et al. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. **Nature**, v. 590, n. 7844, p. 57-66, 02 2021. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33536648> >.
- 44 KOCH, A. et al. Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. **J Biol Chem**, v. 278, n. 10, p. 8597-605, Mar 07 2003. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12499366> >.
- 45 ISHIHARA, N. et al. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. **Nat Cell Biol**, v. 11, n. 8, p. 958-66, Aug 2009. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578372> >.
- 46 WAKABAYASHI, J. et al. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. **J Cell Biol**, v. 186, n. 6, p. 805-16, Sep 21 2009. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19752021> >.
- 47 OTERA, H. et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. **J Cell Biol**, v. 191, n. 6, p. 1141-58, Dec 13 2010. ISSN 1540-8140. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149567> >.
- 48 ELGASS, K. D. et al. Analysis of ER-mitochondria contacts using correlative fluorescence microscopy and soft X-ray tomography of mammalian cells. **J Cell Sci**, v.

- 128, n. 15, p. 2795-804, Aug 01 2015. ISSN 1477-9137. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26101352> >.
- 49 ZHAO, J. et al. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. **EMBO J**, v. 30, n. 14, p. 2762-78, Jun 24 2011. ISSN 1460-2075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21701560> >.
- 50 JOSHI, A. U. et al. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. **Nat Neurosci**, v. 22, n. 10, p. 1635-1648, 10 2019. ISSN 1546-1726. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31551592> >.
- 51 DISATNIK, M. H. et al. Acute inhibition of excessive mitochondrial fission after myocardial infarction prevents long-term cardiac dysfunction. **J Am Heart Assoc**, v. 2, n. 5, p. e000461, Oct 2013. ISSN 2047-9980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24103571> >.
- 52 _____. Potential biomarkers to follow the progression and treatment response of Huntington's disease. **J Exp Med**, v. 213, n. 12, p. 2655-2669, 11 2016. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27821553> >.
- 53 MALKA, F. et al. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. **EMBO Rep**, v. 6, n. 9, p. 853-9, Sep 2005. ISSN 1469-221X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113651> >.
- 54 GAO, S.; HU, J. Mitochondrial Fusion: The Machineries In and Out. **Trends Cell Biol**, v. 31, n. 1, p. 62-74, 01 2021. ISSN 1879-3088. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33092941> >.
- 55 CHEN, H. et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **J Cell Biol**, v. 160, n. 2, p. 189-200, Jan 2003. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12527753> >.
- 56 CHEN, H.; CHOMYN, A.; CHAN, D. C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. **J Biol Chem**, v. 280, n. 28, p. 26185-92, Jul 15 2005. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899901> >.
- 57 GRIPARIC, L. et al. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. **J Biol Chem**, v. 279, n. 18, p. 18792-8, Apr 30 2004. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14970223> >.
- 58 WALLACE, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1482-8, Mar 1999. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10066162> >.
- 59 ZÜCHNER, S. et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. **Nat Genet**, v. 36, n. 5, p. 449-51, May 2004. ISSN 1061-4036. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15064763> >.
- 60 KUJOTH, G. C. et al. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 481-4, Jul 2005. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020738> >.

- 61 WANG, X. et al. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. **Am J Pathol**, v. 173, n. 2, p. 470-82, Aug 2008. ISSN 1525-2191. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18599615> >.
- 62 AYDOĞDU, N. et al. The Effects of Irisin on Nω-Nitro-L-arginine Methyl Ester Hydrochloride-Induced Hypertension in Rats. **Balkan Med J**, v. 36, n. 6, p. 337-346, 10 2019. ISSN 2146-3131. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31486326> >.
- 63 SCHIATTARELLA, G. G. et al. Nitrosative stress drives heart failure with preserved ejection fraction. **Nature**, v. 568, n. 7752, p. 351-356, 04 2019. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30971818> >.
- 64 HO, D. et al. Heart Rate and Electrocardiography Monitoring in Mice. **Curr Protoc Mouse Biol**, v. 1, p. 123-139, Mar 2011. ISSN 2161-2617. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21743842> >.
- 65 FERREIRA, J. C. et al. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 760-5, Aug 2007. ISSN 0305-1870. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17600553> >.
- 66 TOPOL, E. J.; TRAILL, T. A.; FORTUIN, N. J. Hypertensive hypertrophic cardiomyopathy of the elderly. **N Engl J Med**, v. 312, n. 5, p. 277-83, Jan 1985. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2857050> >.
- 67 MENEZES-FILHO, S. L. et al. Caloric restriction protects livers from ischemia/reperfusion damage by preventing Ca. **Free Radic Biol Med**, v. 110, p. 219-227, 09 2017. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28642067> >.
- 68 KRUGER, N. J. The Bradford method for protein quantitation. **Methods Mol Biol**, v. 32, p. 9-15, 1994. ISSN 1064-3745. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7951753> >.
- 69 INGALLS, C. P. et al. Dihydropyridine and ryanodine receptor binding after eccentric contractions in mouse skeletal muscle. **J Appl Physiol (1985)**, v. 96, n. 5, p. 1619-25, May 2004. ISSN 8750-7587. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14672973> >.
- 70 SHAH, S. J. et al. Phenotype-Specific Treatment of Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: A Multiorgan Roadmap. **Circulation**, v. 134, n. 1, p. 73-90, Jul 2016. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27358439> >.
- 71 MISHRA, S.; KASS, D. A. Publisher Correction: Cellular and molecular pathobiology of heart failure with preserved ejection fraction. **Nat Rev Cardiol**, v. 18, n. 10, p. 735, Oct 2021. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33479518> >.
- 72 HARADA, T.; OBOKATA, M. Obesity-Related Heart Failure with Preserved Ejection Fraction: Pathophysiology, Diagnosis, and Potential Therapies. **Heart Fail Clin**, v. 16, n. 3, p. 357-368, Jul 2020. ISSN 1551-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32503758> >.

- 73 DENG, Y. et al. Targeting Mitochondria-Inflammation Circuit by β -Hydroxybutyrate Mitigates HFpEF. **Circ Res**, v. 128, n. 2, p. 232-245, 01 22 2021. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33176578> >.
- 74 TURKBEY, E. B. et al. The impact of obesity on the left ventricle: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). **JACC Cardiovasc Imaging**, v. 3, n. 3, p. 266-74, Mar 2010. ISSN 1876-7591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223423> >.
- 75 HAASS, M. et al. Body mass index and adverse cardiovascular outcomes in heart failure patients with preserved ejection fraction: results from the Irbesartan in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction (I-PRESERVE) trial. **Circ Heart Fail**, v. 4, n. 3, p. 324-31, May 2011. ISSN 1941-3297. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21350053> >.
- 76 HAYKOWSKY, M. J. et al. Skeletal muscle composition and its relation to exercise intolerance in older patients with heart failure and preserved ejection fraction. **Am J Cardiol**, v. 113, n. 7, p. 1211-6, Apr 01 2014. ISSN 1879-1913. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507172> >.
- 77 AL-GOBLAN, A. S.; AL-ALFI, M. A.; KHAN, M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 7, p. 587-91, 2014. ISSN 1178-7007. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25506234> >.
- 78 AKIYAMA, T. et al. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 31, n. 1-3, p. 27-35, Mar 1996. ISSN 0168-8227. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8792099> >.
- 79 CANI, P. D. et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1470-81, Jun 2008. ISSN 1939-327X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18305141> >.
- 80 MCHUGH, K. et al. Heart Failure With Preserved Ejection Fraction and Diabetes: JACC State-of-the-Art Review. **J Am Coll Cardiol**, v. 73, n. 5, p. 602-611, 02 12 2019. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30732715> >.
- 81 SON, T. K. et al. Prediabetes and insulin resistance in a population of patients with heart failure and reduced or preserved ejection fraction but without diabetes, overweight or hypertension. **Cardiovasc Diabetol**, v. 21, n. 1, p. 75, May 14 2022. ISSN 1475-2840. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35568879> >.
- 82 VINUÉ, Á.; GONZÁLEZ-NAVARRO, H. Glucose and Insulin Tolerance Tests in the Mouse. **Methods Mol Biol**, v. 1339, p. 247-54, 2015. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26445794> >.
- 83 MORENO-FERNÁNDEZ, S. et al. High Fat/High Glucose Diet Induces Metabolic Syndrome in an Experimental Rat Model. **Nutrients**, v. 10, n. 10, Oct 14 2018. ISSN 2072-6643. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30322196> >.
- 84 SCHERBAKOV, N. et al. Insulin resistance in heart failure: differences between patients with reduced and preserved left ventricular ejection fraction. **Eur J Heart Fail**, v. 17, n. 10, p. 1015-21, Oct 2015. ISSN 1879-0844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26198713> >.

- 85 SAMSON, R. et al. Clinical Phenotypes in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **J Am Heart Assoc**, v. 5, n. 1, Jan 25 2016. ISSN 2047-9980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26811159> >.
- 86 SAM, F. et al. Mice lacking osteopontin exhibit increased left ventricular dilation and reduced fibrosis after aldosterone infusion. **Am J Hypertens**, v. 17, n. 2, p. 188-93, Feb 2004. ISSN 0895-7061. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14751663> >.
- 87 ICHIHARA, S. et al. Angiotensin II type 2 receptor is essential for left ventricular hypertrophy and cardiac fibrosis in chronic angiotensin II-induced hypertension. **Circulation**, v. 104, n. 3, p. 346-51, Jul 17 2001. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11457756> >.
- 88 DOI, R. et al. Development of different phenotypes of hypertensive heart failure: systolic versus diastolic failure in Dahl salt-sensitive rats. **J Hypertens**, v. 18, n. 1, p. 111-20, Jan 2000. ISSN 0263-6352. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10678551> >.
- 89 ALLAN, A. et al. Reversal of cardiac dysfunction by selective ET-A receptor antagonism. **Br J Pharmacol**, v. 146, n. 6, p. 846-53, Nov 2005. ISSN 0007-1188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151437> >.
- 90 HEYEN, J. R. et al. Structural, functional, and molecular characterization of the SHHF model of heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 283, n. 5, p. H1775-84, Nov 2002. ISSN 0363-6135. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12384454> >.
- 91 LEITE, S. et al. Echocardiography and invasive hemodynamics during stress testing for diagnosis of heart failure with preserved ejection fraction: an experimental study. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 308, n. 12, p. H1556-63, Jun 15 2015. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25862827> >.
- 92 NAIR, N. Epidemiology and pathogenesis of heart failure with preserved ejection fraction. **Rev Cardiovasc Med**, v. 21, n. 4, p. 531-540, Dec 30 2020. ISSN 1530-6550. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33387998> >.
- 93 OBOKATA, M.; REDDY, Y. N. V.; BORLAUG, B. A. Diastolic Dysfunction and Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Understanding Mechanisms by Using Noninvasive Methods. **JACC Cardiovasc Imaging**, v. 13, n. 1 Pt 2, p. 245-257, 01 2020. ISSN 1876-7591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31202759> >.
- 94 NAGUEH, S. F. et al. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 29, n. 4, p. 277-314, Apr 2016. ISSN 1097-6795. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27037982> >.
- 95 BORLAUG, B. A. The pathophysiology of heart failure with preserved ejection fraction. **Nat Rev Cardiol**, v. 11, n. 9, p. 507-15, Sep 2014. ISSN 1759-5010. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958077> >.
- 96 BORLAUG, B. A.; KASS, D. A. Mechanisms of diastolic dysfunction in heart failure.

- Trends Cardiovasc Med**, v. 16, n. 8, p. 273-9, Nov 2006. ISSN 1050-1738. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17055383> >.
- 97 WACHTER, R. et al. Blunted frequency-dependent upregulation of cardiac output is related to impaired relaxation in diastolic heart failure. **Eur Heart J**, v. 30, n. 24, p. 3027-36, Dec 2009. ISSN 1522-9645. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19720638> >.
- 98 WESTERMANN, D. et al. Role of left ventricular stiffness in heart failure with normal ejection fraction. **Circulation**, v. 117, n. 16, p. 2051-60, Apr 2008. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18413502> >.
- 99 ZILE, M. R.; BAICU, C. F.; GAASCH, W. H. Diastolic heart failure--abnormalities in active relaxation and passive stiffness of the left ventricle. **N Engl J Med**, v. 350, n. 19, p. 1953-9, May 2004. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15128895> >.
- 100 PREVITALI, M. et al. Is mitral E/E' ratio a reliable predictor of left ventricular diastolic pressures in patients without heart failure? **Eur Heart J Cardiovasc Imaging**, v. 13, n. 7, p. 588-95, Jul 2012. ISSN 2047-2412. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22184787> >.
- 101 RAJYAGURU, C. et al. Increased E/A Ratio is a Risk Factor for the Formation of Pleural Effusion in Heart Failure. **Lung**, v. 198, n. 1, p. 229-233, 02 2020. ISSN 1432-1750. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31853638> >.
- 102 LEE, S. W. et al. E/E' ratio is more sensitive than E/A ratio for detection of left ventricular diastolic dysfunction in patients with systemic sclerosis. **Clin Exp Rheumatol**, v. 28, n. 2 Suppl 58, p. S12-7, 2010 Mar-Apr 2010. ISSN 0392-856X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20576210> >.
- 103 _____. E/E' ratio is more sensitive than E/A ratio for detection of left ventricular diastolic dysfunction in systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v. 17, n. 3, p. 195-201, Mar 2008. ISSN 0961-2033. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18372359> >.
- 104 GAGGIN, H. K.; JANUZZI, J. L. Biomarkers and diagnostics in heart failure. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 12, p. 2442-50, Dec 2013. ISSN 0006-3002. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23313577> >.
- 105 SALZANO, A. et al. Exercise Intolerance in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction. **Heart Fail Clin**, v. 17, n. 3, p. 397-413, Jul 2021. ISSN 1551-7136. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34051972> >.
- 106 BOWEN, T. S. et al. Exercise Training Reveals Inflexibility of the Diaphragm in an Animal Model of Patients With Obesity-Driven Heart Failure With a Preserved Ejection Fraction. **J Am Heart Assoc**, v. 6, n. 10, Oct 24 2017. ISSN 2047-9980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29066440> >.
- 107 _____. Heart failure with preserved ejection fraction induces molecular, mitochondrial, histological, and functional alterations in rat respiratory and limb skeletal muscle. **Eur J Heart Fail**, v. 17, n. 3, p. 263-72, Mar 2015. ISSN 1879-0844. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25655080> >.
- 108 SAW, E. L. et al. Skeletal muscle (dys)function in heart failure with preserved ejection

- fraction. **Curr Opin Cardiol**, v. 36, n. 2, p. 219-226, 03 01 2021. ISSN 1531-7080. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33394707> >.
- 109 KIYUNA, L. A. et al. Targeting mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart failure: Challenges and opportunities. **Free Radic Biol Med**, v. 129, p. 155-168, 12 2018. ISSN 1873-4596. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30227272> >.
- 110 MENESES, T. N. et al. **Targeting Mitochondrial Fission-Fusion Imbalance in Heart Failure**. [Springer Link](#). Immunometabolism: <i data-test="journal-title" style="font-size: inherit;">Current Tissue Microenvironment Reports 239–247 p. 2020.
- 111 PHAN, T. T. et al. Heart failure with preserved ejection fraction is characterized by dynamic impairment of active relaxation and contraction of the left ventricle on exercise and associated with myocardial energy deficiency. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 5, p. 402-9, Jul 28 2009. ISSN 1558-3597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19628114> >.
- 112 ZHANG, L. et al. Cardiac insulin-resistance and decreased mitochondrial energy production precede the development of systolic heart failure after pressure-overload hypertrophy. **Circ Heart Fail**, v. 6, n. 5, p. 1039-48, Sep 01 2013. ISSN 1941-3297. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23861485> >.
- 113 YAMAMOTO, H. et al. Amla Enhances Mitochondrial Spare Respiratory Capacity by Increasing Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Systems in a Murine Skeletal Muscle Cell Line. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2016, p. 1735841, 2016. ISSN 1942-0994. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340504> >.
- 114 SUMMER, G. et al. A directed network analysis of the cardiome identifies molecular pathways contributing to the development of HFpEF. **J Mol Cell Cardiol**, v. 144, p. 66-75, 07 2020. ISSN 1095-8584. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32422321> >.
- 115 TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 301, n. 6, p. H2181-90, Dec 2011. ISSN 1522-1539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21949114> >.
- 116 LOFFREDO, F. S. et al. Heart failure with preserved ejection fraction: molecular pathways of the aging myocardium. **Circ Res**, v. 115, n. 1, p. 97-107, Jun 20 2014. ISSN 1524-4571. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951760> >.
- 117 KOLIJN, D. et al. Empagliflozin improves endothelial and cardiomyocyte function in human heart failure with preserved ejection fraction via reduced pro-inflammatory-oxidative pathways and protein kinase α oxidation. **Cardiovasc Res**, v. 117, n. 2, p. 495-507, 01 21 2021. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32396609> >.
- 118 LI, J. M. et al. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. **Hypertension**, v. 40, n. 4, p. 477-84, Oct 2002. ISSN 1524-4563. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364350> >.
- 119 VAN DER POL, A. et al. OPLAH ablation leads to accumulation of 5-oxoproline, oxidative stress, fibrosis, and elevated fillings pressures: a murine model for heart failure with a preserved ejection fraction. **Cardiovasc Res**, v. 114, n. 14, p. 1871-1882, 12 01 2018. ISSN 1755-3245. Disponível em: <

- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30032247> >.
- 120 CHEN, H. et al. Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 280-9, Apr 16 2010. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20403324> >.
- 121 GOMES, K. M. et al. Aldehyde dehydrogenase 2 activation in heart failure restores mitochondrial function and improves ventricular function and remodelling. **Cardiovasc Res**, v. 103, n. 4, p. 498-508, Sep 01 2014. ISSN 1755-3245. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817685> >.
- 122 GUO, J. M. et al. ALDH2 protects against stroke by clearing 4-HNE. **Cell Res**, v. 23, n. 7, p. 915-30, Jul 2013. ISSN 1748-7838. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23689279> >.
- 123 GUSTAFSSON, A. B.; GOTTLIEB, R. A. Heart mitochondria: gates of life and death. **Cardiovasc Res**, v. 77, n. 2, p. 334-43, Jan 15 2008. ISSN 0008-6363. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18006487> >.
- 124 KIM, J. C.; SON, M. J.; WOO, S. H. Regulation of cardiac calcium by mechanotransduction: Role of mitochondria. **Arch Biochem Biophys**, v. 659, p. 33-41, 12 01 2018. ISSN 1096-0384. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30278156> >.
- 125 MIRANDA-SILVA, D. et al. Disturbed cardiac mitochondrial and cytosolic calcium handling in a metabolic risk-related rat model of heart failure with preserved ejection fraction. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 228, n. 3, p. e13378, 03 2020. ISSN 1748-1716. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31520455> >.
- 126 KILFOIL, P. J. et al. Distinct features of calcium handling and β -adrenergic sensitivity in heart failure with preserved versus reduced ejection fraction. **J Physiol**, v. 598, n. 22, p. 5091-5108, 11 2020. ISSN 1469-7793. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32829489> >.
- 127 DEL CAMPO, A. et al. Mitochondrial function, dynamics and quality control in the pathophysiology of HFpEF. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1867, n. 10, p. 166208, 10 01 2021. ISSN 1879-260X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34214606> >.
- 128 PAN, X. et al. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 12, p. 1464-72, Dec 2013. ISSN 1476-4679. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24212091> >.
- 129 WANG, P. et al. Elevated MCU Expression by CaMKII δ B Limits Pathological Cardiac Remodeling. **Circulation**, v. 145, n. 14, p. 1067-1083, Apr 05 2022. ISSN 1524-4539. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35167328> >.
- 130 KANNAIYAN, R.; MAHADEVAN, D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 18, n. 12, p. 1249-1270, 12 2018. ISSN 1744-8328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30259761> >.
- 131 BOWLING, N. et al. Increased protein kinase C activity and expression of Ca²⁺-sensitive isoforms in the failing human heart. **Circulation**, v. 99, n. 3, p. 384-91, Jan 26 1999. ISSN 0009-7322. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9918525> >.

132

INAGAKI, K. et al. Tissue angiotensin II during progression or ventricular hypertrophy to heart failure in hypertensive rats; differential effects on PKC epsilon and PKC beta. **J Mol Cell Cardiol**, v. 34, n. 10, p. 1377-85, Oct 2002. ISSN 0022-2828. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12392998> >.