

## Influências de Dietas Ricas em Ácidos Graxos Saturados e Insaturados sobre o Miocárdio de Ratos

*Influences of Rich in Saturated and Unsaturated Fatty Acids Diets in Rat Myocardium*

Matheus Fécchio Pinotti, Maeli Dal-Pai Silva, Mário Mateus Sugizaki, Yeda Santana Diniz Novelli, Lea Sílvia Sant'ana, Flávio Ferrari Aragon, Carlos Roberto Padovani, Ethel Lourenzi Barbosa Novelli, Antonio Carlos Cicogna

Faculdade Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP – Botucatu, SP

### Resumo

**Objetivos:** O estudo avaliou a influência de dietas ricas em ácidos graxos saturados (AGS) e ácidos graxos insaturados (AGI) sobre a função mecânica, a morfologia e o estresse oxidativo do miocárdio de ratos.

**Métodos:** Ratos Wistar com 60 dias de idade foram alimentados com dieta padrão (n = 8) ou dietas ricas em AGS (n = 8) ou AGI (n = 8) durante 60 dias. A função mecânica foi avaliada em músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo (VE) por meio de contrações isométrica e isotônica, em condição basal (1,25 mM de cálcio), após elevação da concentração extracelular de cálcio para 5,2 mM e estimulação β-adrenérgica com isoproterenol 1,0 μM. Fragmentos do VE foram usados para estudo de estresse oxidativo e microscopias óptica e eletrônica.

**Resultados:** As dietas suplementadas com AGS e AGI não alteraram a função mecânica do músculo cardíaco. Entretanto, ambas provocaram estresse oxidativo, com aumento do hidróperóxido de lipídio e redução da concentração de superóxido dismutase. A dieta AGI diminuiu a expressão da catalase e a AGS reduziu a quantidade de glutatona peroxidase miocárdica. Ambas as dietas promoveram discretas alterações morfológicas visualizadas ultra-estruturalmente, como depósitos lipídicos e lesões das membranas celulares.

**Conclusão:** Os resultados sugerem que dietas enriquecidas com AGS e AGI não acarretam alteração da função mecânica do músculo cardíaco isolado, mas causam discretas lesões estruturais e estresse oxidativo no miocárdio.

**Palavras-chave:** Dieta, ácidos graxos, miocárdio, ratos, estresse oxidativo.

### Summary

**Objectives:** To study the influence of saturated (SFA) and unsaturated fatty acid (UFA) rich diets on mechanical function, morphology and oxidative stress in rat myocardium.

**Methods:** Male, 60-day-old Wistar rats were fed a control (n=8), a SFA (n=8), or a UFA-rich diet (n=8) for sixty days. Mechanical function was studied in isolated left ventricle papillary muscle under isometric and isotonic contractions, in basal conditions (1.25mM calcium chloride) and after 5.2mM calcium chloride and beta-adrenergic stimuli with 1.0μM isoproterenol. Left ventricle fragments were used to study oxidative stress and morphology under light and electron microscopy.

**Results:** SFA and UFA-rich diets did not change myocardium mechanical function. Both diets caused oxidative stress, with high lipid hydroperoxide and low superoxide-dismutase concentrations. UFA rich diet decreased catalase expression and SFA rich diet decreased the amount of myocardial glutathione-peroxidase. Both diets promoted light ultrastructural injuries such as lipid deposits and cell membrane injuries.

**Conclusion:** Results suggest that SFA and UFA rich diets do not alter isolated muscle mechanical function, but promote light myocardial morphological injuries and oxidative stress.

**Key words:** Diet; fatty acids; myocardium; rats; oxidative stress.

### Introdução

Estudos recentes relatam as influências benéficas da mudança do estilo de vida e das alterações dietéticas, como menor consumo de ácidos graxos saturados (AGS) e ácidos

graxos trans e aumento da ingestão de óleo de peixe, rico em ácidos graxos insaturados (AGI), sobre a morbidade e a mortalidade de portadores de doença arterial coronariana<sup>1,2</sup>. Enquanto alimentos ricos em AGS são aterogênicos e diminuem a reserva coronariana<sup>1,3,4</sup>, os AGI apresentam efeito antiaterogênico<sup>1,5</sup> e protegem o coração contra os efeitos adversos da fase aguda do infarto do miocárdio<sup>5,6</sup>.

Embora os estudos relacionados aos AGI tenham demonstrado resultados benéficos no aparelho cardiovascular<sup>1,5,6</sup>, trabalhos experimentais evidenciaram que dietas ricas em AGI e AGS promovem danos estruturais

**Correspondência:** Matheus Fécchio Pinotti •

Rua Dr. José Adriano Marrey Jr., 796 – ap. 101

18603-610 – Botucatu, SP

E-mail: mpinotti@uol.com.br

Artigo recebido em 09/05/06; revisado recebido em 09/05/06;

aceito em 22/06/06.

## Artigo Original

e metabólicos no miocárdio<sup>6-10</sup>. Enquanto ambas as dietas acarretaram desorganizações do sarcolema, depósitos de lipídios<sup>9,10</sup> e estresse oxidativo miocárdico<sup>6,10</sup>, a dieta rica em AGI também promove necrose<sup>7</sup> e estriação muscular anormal<sup>8</sup>.

Apesar de a literatura demonstrar que a dieta rica em AGI acarretou alterações morfometabólicas<sup>6-10</sup>, há informações contraditórias referentes a seus efeitos sobre a função mecânica do miocárdio<sup>7,9,11-15</sup>. Enquanto estudos prévios demonstraram que a dieta acarretou depressão da função cardíaca em músculo papilar isolado de coelhos<sup>12</sup> e ratos<sup>13</sup>, dados recentes de nosso laboratório<sup>15</sup> demonstraram, em concordância com outros autores<sup>7,9,11,14</sup>, que a dieta AGI não altera o desempenho funcional do músculo cardíaco. Por outro lado, há escassos registros sobre a relação entre dieta rica em AGS e função cardíaca. Pepe e McLennan<sup>4</sup> demonstraram que os AGS de origem animal causaram disfunção ventricular em coração isolado de ratos, que só foi evidenciada após importante aumento da pré-carga e do processo de isquemia-reperusão miocárdica. Os autores demonstraram que essa alteração funcional é consequência da incapacidade de o coração aumentar o fluxo coronariano e utilizar adequadamente o oxigênio necessário para a produção de energia<sup>4</sup>.

Este trabalho teve como objetivo avaliar as influências de dietas suplementadas com AGS e AGI sobre a função mecânica do músculo papilar isolado, e foi complementado pelas análises do estresse tanto oxidativo como morfológico do miocárdio de ratos.

## Métodos

*Grupos animais e protocolo experimental* - Foram utilizados ratos Wistar, machos, com 60 dias de idade, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP) e alimentados com ração comercial (C, n = 8) e dietas ricas em AGI (LI, n = 8) e AGS (LS, n = 8) e água *ad libitum*. A ração comercial Labina® (Purina – Paulínia, Brasil) continha 2,30% de gordura (58,52% de AGI e 41,38% de AGS). A dieta rica em AGI continha 19,39% de gordura (73,57% de AGI e 26,43% de AGS). Por outro lado, a dieta rica em AGS apresentava 20,02% de gordura (37,45% de AGI e 62,55% de AGS). A preparação das dietas está descrita a seguir.

Os animais, submetidos ao protocolo durante 60 dias e sacrificados posteriormente, foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada (24°C ± 2°C), ciclo claro-escuro (12:12 horas), e pesados semanalmente. O peso corpóreo tanto inicial (PCI) como final (PCF), o peso do ventrículo esquerdo (VE) e do ventrículo direito (VD), e as relações VE/PCF e VD/PCF foram medidos nos ratos submetidos a estudo funcional. A ingestão alimentar foi medida pelo consumo de cada semana. Todos os procedimentos estão de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo *US National Institute of Health* e aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da FMB-UNESP.

*Preparo das dietas* - As dietas ricas em AGI e AGS foram preparadas a partir do farelo da ração comercial e proporcionaram quantidades suficientes de vitaminas,

minerais, aminoácidos essenciais e lipídios. A fonte de AGI foi o óleo de milho e a fonte de AGS foi o óleo de coco. Para a dieta rica em AGI foi utilizada uma proporção de 220 ml de óleo de milho com 30 ml de óleo de coco para 1.000 g de ração comercial. A dieta rica em AGS foi preparada utilizando-se uma mistura de 110 ml de óleo de milho e 140 ml de óleo de coco para 1.000 g de ração comercial. Depois de processadas, as misturas passaram por máquina específica para formação de *pellets*, os quais foram secos em estufa com ar circulante durante 24 horas, em temperatura inferior a 70°C. Depois da secagem, foram mantidos em ar ambiente para resfriamento e armazenados em câmara fria a 6°C. A validade da ração preparada é de três meses.

A composição nutricional das rações foi estabelecida no Laboratório de Tecnologia dos Produtos Agropecuários da Faculdade de Ciências Agrônomicas (FCA-UNESP). Para análise do teor de gordura foi utilizada a extração em éter em aparelho de Soxhlet<sup>16</sup>. A análise dos ácidos graxos foi realizada por extração segundo o método de Folch e cols.<sup>17</sup>: a esterificação foi realizada com ácido sulfúrico metanol em frasco de transesterificação e a separação dos ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo CG 17 A, utilizando uma coluna DB-Wax com aproximadamente 35 m de comprimento e programação de temperatura.

*Estudo funcional* - O desempenho mecânico dos músculos papilares isolados foi avaliado de acordo com a técnica utilizada no laboratório em que foi realizado este estudo. Ao término do período experimental, os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, na razão de 1 ml da droga por 1.000 g de peso do animal, e, posteriormente, decapitados. Depois de aberto o tórax, o coração foi removido rapidamente e colocado em solução de Krebs-Henseleit previamente oxigenada (10 minutos) com 95% de oxigênio (O<sub>2</sub>) e 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Após remover o coração da solução, o ventrículo direito foi dissecado com a finalidade de se expor o septo interventricular. Este foi dividido ao meio, permitindo a exposição adequada dos dois músculos papilares do ventrículo esquerdo, anterior e posterior. O ventrículo esquerdo foi separado em duas partes, cada uma contendo seu músculo papilar. A seguir, um dos músculos foi cuidadosamente dissecado numa câmara contendo solução de Krebs-Henseleit, adequadamente oxigenada e aquecida a 28°C. Durante a dissecação, foram mantidos segmentos da parede livre e do septo interventricular nas extremidades dos músculos, em que foram presos anéis de aço inoxidável, evitando lesões das extremidades do músculo papilar. Depois disso, o músculo foi rapidamente transferido para uma câmara de acrílico contendo 100 ml de solução de Krebs-Henseleit, constantemente oxigenada e mantida à temperatura de 28°C com uso de banho circulante. O músculo papilar foi suspenso verticalmente na câmara, e a extremidade tendinosa superior foi conectada, por meio de anel e fio de aço inoxidável de 0,038 cm de diâmetro, à extremidade do braço de um motor DC de baixa inércia (G100-PD, General Scanning, Watertown, MA, Estados Unidos). A extremidade inferior do músculo foi fixada a um gancho preso ao fundo da câmara por meio de anel de aço.

Para controlar a força e/ou o comprimento da preparação muscular foi utilizado um sistema servoeletrônico. O motor DC contendo transdutores de força e comprimento foi

conectado a um microcomputador com interface digital-analógica, o que permitiu controlar a tensão e o comprimento da preparação. As variações de tensão e comprimento foram registradas à velocidade de 1 kHz e armazenadas em disquete para análise posterior.

Os músculos foram estimulados por um estimulador Grass (DS9J, W. Warwick, RI, Estados Unidos) 12 vezes por minuto por meio de eletrodos de platina, com pulsos elétricos regulares de 5 ms de duração. A voltagem utilizada foi 10% maior que o valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. A seguir está apresentada a composição da solução de Krebs-Henseleit, expressa em milimol por litro: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 1,25 CaCl<sub>2</sub>; 1,16 MgSO<sub>4</sub>; 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,5 glicose; e 25,88 NaHCO<sub>3</sub>.

Após período de 30 minutos, os músculos foram isotonicamente contraídos contra leve carga (0,4 g) e, a seguir, colocados em contração isométrica e medidos. Nessa situação, foram estirados gradualmente até a tensão desenvolvida atingir seu valor máximo. O comprimento diastólico da fibra muscular associado à tensão máxima desenvolvida denomina-se L<sub>máx</sub>. Após atingir L<sub>máx</sub>, o músculo foi colocado em contração isotônica fisiológica contra pós-carga (pré-carga igual a 50% da pré-carga em L<sub>máx</sub> e pós-carga equivalente a 25% da tensão máxima desenvolvida) durante 15 minutos. A seguir, três novas determinações de L<sub>máx</sub> foram realizadas. Após verificação da estabilização de L<sub>máx</sub>, os músculos permaneceram em contração isométrica, sendo analisados os seguintes parâmetros: tensão máxima desenvolvida (TD, g/mm<sup>2</sup>), tensão de repouso (TR, g/mm<sup>2</sup>), tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT, ms), velocidade máxima de variação temporal da TD (+dT/dt, g/mm<sup>2</sup>/s), velocidade máxima de variação do decréscimo da TD (-dT/dt, g/mm<sup>2</sup>/s), e tempo para TD decrescer 50% de seu valor máximo (TR<sub>50</sub>, ms).

Após o término do registro isométrico, o músculo foi colocado em contração isotônica, contraindo contra uma pequena carga capaz de manter o músculo com comprimento de repouso igual a L<sub>máx</sub>. Os seguintes parâmetros isotônicos foram medidos: velocidade máxima de encurtamento (-dl/dt, MI/s) e velocidade máxima de relaxamento (+dl/dt, MI/s). A constante de rigidez do músculo foi calculada pela relação  $\log(S_m) = B + K_m E_m$ , em que S<sub>m</sub> é o estresse calculado a partir da TR observada nos diferentes comprimentos do músculo normalizada para as respectivas áreas de secção transversa, e E<sub>m</sub> é a deformação (strain) natural do músculo ( $E_m = 1 n[L_m/L_{0,1}]$ , em que L<sub>m</sub> é o comprimento instantâneo do músculo e L<sub>0,1</sub> é o comprimento no estresse igual a 0,1 g/mm<sup>2</sup>). Essas análises foram realizadas em situação basal ([Ca<sup>2+</sup>] = 1,25 mM), com aumento da concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup> para 5,2 mM e estímulo beta-adrenérgico (1 μM de isoproterenol).

Os parâmetros usados para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm) e área seccional (AS, mm<sup>2</sup>). O comprimento *in vitro*, em L<sub>máx</sub>, foi obtido com catetômetro Gartner (Chicago, IL, Estados Unidos). A porção do músculo entre os anéis de aço foi cortada, submetida a secagem em papel filtro e pesada. A AS foi calculada dividindo-se o peso do músculo pelo seu comprimento, considerando-se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme, e peso específico aproximadamente unitário.

A fim de poder comparar o desempenho de músculos de tamanhos diferentes, os parâmetros isométricos e isotônicos foram normalizados, respectivamente, pela AS e pelo L<sub>máx</sub>.

*Estudo bioquímico* - Cinco animais de cada grupo foram utilizados para o estudo do estresse oxidativo. Os corações foram removidos e o tecido adiposo cardíaco foi desprezado. Fragmentos de VE pesando 200 mg foram homogeneizados em 5 ml de fosfato de sódio tampão a 0,1 M, pH de 7,4, contendo 1 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). O tecido homogeneizado foi preparado em um homogeneizador Teflon Glass Potter Elvehjem (Piracicaba, SP, Brasil) por 1 minuto a 100 rpm, imerso em água gelada. O produto foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi usado para determinar: proteína total (PS), hidroperóxido de lipídio (HL), antioxidantes totais (TAS), glutatona-peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT).

O HL foi medido pela oxidação do hidroperóxido pelo Fe<sup>2+</sup> em meio ácido. Amostras foram adicionadas a misturas contendo 100 μM de alaranjado de xilenol, 250 μM de FeSO<sub>4</sub>, 25 μM de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 4 mM de butilato de hidroxitolueno em metanol 90%. As misturas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente para leitura a 560 nm.

GSH-Px foi quantificada usando 0,15 M de tampão de fosfato de sódio, pH de 7,0 contendo 5 mM de EDTA, 0,1 ml de NADPH a 0,0084 M e 0,005 ml de GSSG-redutase (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos), 0,01 ml de Na<sub>3</sub> a 1,125 M e 0,1 ml de GSH a 0,15 M. A atividade da SOD foi determinada pela habilidade da enzima de inibir a redução do nitroazul de tetrazólio (Sigma). A taxa de redução do nitroazul de βtetrazólio na ausência de tecido foi usada como referência. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de proteína necessária para diminuir a taxa de referência para 50%. Todos os dados foram expressos como unidades de SOD por mg de proteína. A atividade da CAT foi determinada a 240 nm, com tampão de fosfato de sódio (pH 7,0).

As atividades enzimáticas foram determinadas com a utilização de leitor de microplacas (Bio-Tech Instruments Inc., Winooski, VT, Estados Unidos), e as determinações espectrofotométricas foram feitas com espectrofotômetro Pharmacia Biotech (974213, Cambridge, Inglaterra).

*Estudo morfológico* - Após a retirada do coração, um fragmento do músculo papilar de cinco animais de cada grupo foi submetido a tratamento criobiológico. Esses fragmentos foram imersos em N-Hexana a -70°C, previamente resfriada em nitrogênio líquido a -196°C. Decorridos dois minutos, o material congelado foi transferido para a câmara de um micrótomo criostato (Leica CM 1800 - Leica Inst., Nussloch, Alemanha), a -20°C. Estabelecido o equilíbrio térmico, cada fragmento congelado foi fixado aos suportes metálicos do criostato, com adesivo especial *Yung Tissue Freezing Medium*. Cortes histológicos, com 8-10 μm de espessura obtidos em criostato a -20°C, foram submetidos a coloração HE, para a avaliação da morfologia geral do músculo.

Para o estudo ultra-estrutural, pequenos fragmentos do músculo papilar de VE foram fixados em solução de Karnovsky (0,12 M de fosfato, pH de 7,2), por uma a duas horas, e pós-

fixados em tetróxido de ósmio a 1% em tampão de fosfato (0,1 M) por duas horas. Após desidratação em etanol, amostras foram embebidas em resina para realização dos cortes. Secções ultrafinas foram realizadas com uma faca de diamante e coradas com acetato de urânio e citrato de chumbo, as quais foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (Philips EM 301).

**Análise estatística** - Dados referentes aos parâmetros morfológicos, aos parâmetros funcionais em situação basal e aos lipídios séricos foram estudados pela análise de variância, complementada com o teste de Tukey. Dados funcionais com aumento das concentrações de cálcio e isoproterenol foram submetidos a análise de variância para o modelo de medidas repetidas em três grupos independentes. O nível de significância foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

## Resultados

As características gerais dos animais desse experimento são apresentadas na tabela 1. Os animais submetidos a dieta AGS apresentaram VD maior que os animais controle e os com dieta AGI. A média de ingestão alimentar foi diferente entre os três grupos, sendo maior nos ratos controle e menor nos do grupo LI.

A tabela 2 apresenta os dados referentes ao estudo funcional do músculo papilar isolado em situação basal na concentração extracelular de cálcio de 1,25 mM. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os três grupos. Os resultados mecânicos com aumento da concentração extracelular de cálcio estão apresentados na tabela 3. A variação da TR foi menor nos animais com dietas hiperlipídicas que no grupo controle. Os

Tabela 1 - Características gerais dos grupos experimentais

	C (n = 8)	LI (n = 8)	LS (n = 8)
PI (g)	256 + 46	223 + 20	238 + 27
PF (g)	434 + 32	418 + 48	419 + 36
VE (g)	0,85 + 0,07	0,84 + 0,11	0,94 + 0,08
VD (g)	0,25 + 0,03 <sup>a</sup>	0,25 + 0,02 <sup>a</sup>	0,28 + 0,02 <sup>b</sup>
VE/PF (mg/g)	1,96 + 0,07 <sup>a</sup>	2,02 + 0,23 <sup>ab</sup>	2,25 + 0,25 <sup>b</sup>
VD/PF (mg/g)	0,57 + 0,05 <sup>a</sup>	0,60 + 0,05 <sup>a</sup>	0,68 + 0,08 <sup>b</sup>
AS (mm <sup>2</sup> )	1,06 + 0,31	1,04 + 0,19	1,09 + 0,26
L <sub>máx</sub> (mm)	6,85 + 0,87	6,58 + 1,10	7,59 + 0,99
MIA (g/semana)	162 + 12 <sup>c</sup>	130 + 12 <sup>a</sup>	149 + 3 <sup>b</sup>

Média ± desvio padrão; n - número de animais; C - grupo controle; LI - grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos insaturados; LS - grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos saturados; PI - peso corpóreo inicial; PF - peso corpóreo final; VE - peso do ventrículo esquerdo; VD - peso do ventrículo direito; AS - área seccional do músculo papilar; L<sub>máx</sub> - comprimento muscular associado à tensão máxima desenvolvida; MIA - média de ingestão alimentar. Variáveis com diferenças estatisticamente significantes são assinaladas por letras minúsculas diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2 - Parâmetros funcionais em situação basal

	C (n = 8)	LI (n = 8)	LS (n = 8)
TD (g/mm <sup>2</sup> )	5,39 + 1,27	4,58 + 0,86	4,12 + 1,02
TR (g/mm <sup>2</sup> )	1,52 + 0,59	1,58 + 0,25	1,28 + 0,32
TPT (ms)	159 + 14	162 + 12	147 + 12
+dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	59 + 16	50 + 11	49 + 13
-dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	18 + 6	16 + 3	14 + 3
TR <sub>50</sub> (ms)	218 + 33	213 + 23	198 + 21
k <sub>m</sub>	19 + 3	19 + 2	19 + 3
-dL/dT (ML/s)	1,24 + 0,21	1,06 + 0,20	1,22 + 0,25
+dL/dT (ML/s)	2,02 + 0,38	1,78 + 0,58	2,22 + 0,66

Média ± desvio padrão; situação basal = concentração de cálcio na solução nutriente 1,25 mM; n - número de animais; C grupo controle; LI - grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos insaturados; LS - grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos saturados; TD - tensão desenvolvida; TR - tensão de repouso; TPT - tempo para atingir o pico da TD; +dT/dt - velocidade de variação da TD; -dT/dt - velocidade de variação do decréscimo da TD; TR<sub>50</sub> - tempo para TD decrescer 50% de seu valor máximo; k<sub>m</sub> - constante de rigidez do músculo; -dL/dT - velocidade máxima de encurtamento; +dL/dT - velocidade máxima de relaxamento; ML/s - comprimento muscular por segundo. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3 - Efeitos do aumento de cálcio extracelular sobre parâmetros funcionais

	C (n = 8)	LI (n = 8)	LS (n = 8)
TD	21,75 + 19,17	32,88 + 11,56	31,73 + 44,87
TR	-3,21 + 3,37 <sup>b</sup>	-6,40 + 4,62 <sup>a</sup>	-8,16 + 3,93 <sup>a</sup>
TPT	-12,57 + 5,71	-14,33 + 6,04	-10,76 + 4,40
+dT/dt	44,99 + 41,92	58,79 + 17,16	51,56 + 67,66
-dT/dt	55,26 + 24,91	63,80 + 24,35	64,97 + 30,82
TR <sub>50</sub>	-17,13 + 8,99	-15,98 + 13,21	-16,93 + 7,01
k <sub>m</sub>	-7,33 + 10,31	-5,26 + 9,96	-4,22 + 7,34
-dL/dT	45,29 + 28,38	57,69 + 15,21	42,32 + 57,22
+dL/dT	35,51 + 29,26	63,42 + 64,42	48,11 + 66,01

Mediana ± semi-amplitude dos valores expressos em porcentagem; n - número de animais; C - grupo controle; LI - grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos insaturados; LS - grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos saturados; TD - tensão desenvolvida; TR - tensão de repouso; TPT - tempo para atingir o pico da TD; +dT/dt - velocidade de variação da TD; -dT/dt - velocidade de variação do decréscimo da TD; TR50 - tempo para TD decrescer 50% de seu valor máximo; km - constante de rigidez do músculo; -dL/dT - velocidade máxima de encurtamento; +dL/dT - velocidade máxima de relaxamento. Variáveis com diferenças estatisticamente significativas são assinaladas por letras minúsculas diferentes (p < 0,05).

demais parâmetros não foram estatisticamente diferentes entre os grupos. Quando submetidos ao estímulo com isoproterenol, a constante de rigidez do miocárdio do grupo LS apresentou resposta menor que nos demais grupos. Não houve diferença estatística nas outras variáveis analisadas (tab. 4).

A análise bioquímica do miocárdio demonstrou que animais dos grupos LI e LS apresentaram aumento do hidropéroxido de lipídio e diminuição dos antioxidantes totais e da superóxido-dismutase em relação ao controle. As substâncias antioxidantes totais foram menores no grupo LI em relação ao grupo LS. A dieta AGI promoveu diminuição da atividade da catalase e a AGS, diminuição de glutatona peroxidase em relação aos outros dois grupos. A proteína solúvel do miocárdio foi

semelhante nos três grupos (tab. 5).

As figuras 1 e 2 demonstram, respectivamente, a análise ultra-estrutural dos músculos papilares de animais submetidos a dietas ricas em AGI e AGS. Em ambos os grupos foram observadas discretas alterações, como pequenos depósitos de gordura entre os miócitos e lesões focais na membrana plasmática e nas cristas mitocondriais. À microscopia óptica não foram encontradas alterações morfológicas.

## Discussão

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de dietas ricas em AGI e AGS sobre a função mecânica do músculo

Tabela 4 - Efeitos do isoproterenol sobre parâmetros funcionais

	C (n = 8)	LI (n = 8)	LS (n = 8)
TD	12,67 + 10,38	15,82 + 7,54	15,46 + 18,14
TR	0,00 + 2,53	0,86 + 2,14	0,45 + 4,13
TPT	-25,02 + 7,58	-22,43 + 5,49	-22,28 + 7,59
+dT/dt	46,53 + 28,01	55,41 + 21,28	46,45 + 33,82
-dT/dt	69,68 + 26,70	62,21 + 26,09	67,79 + 41,59
TR <sub>50</sub>	-34,82 + 8,04	-33,11 + 7,15	-33,45 + 11,59
k <sub>m</sub>	9,08 + 7,34 <sup>b</sup>	8,44 + 4,76 <sup>b</sup>	3,53 + 2,20 <sup>a</sup>
-dL/dT	38,32 + 21,15	43,57 + 20,91	40,47 + 26,95
+dL/dT	67,89 + 16,89	62,93 + 12,26	65,89 + 50,20

Mediana ± semi-amplitude dos valores expressos em porcentagem; n - número de animais; C - grupo controle; LI - grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos insaturados; LS - grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos saturados; TD - tensão desenvolvida; TR - tensão de repouso; TPT - tempo para atingir o pico da TD; +dT/dt - velocidade de variação da TD; -dT/dt - velocidade de variação do decréscimo da TD; TR50 - tempo para TD decrescer 50% de seu valor máximo; km - constante de rigidez do músculo; -dL/dT - velocidade máxima de encurtamento; +dL/dT - velocidade máxima de relaxamento. Variáveis com diferenças estatisticamente significativas são assinaladas por letras minúsculas diferentes (p < 0,05).

Tabela 5 - Estresse oxidativo miocárdico

	C (n = 5)	LI (n = 5)	LS (n = 5)
PS (g%)	21 + 3	24 + 1	24 + 1
HL (nmol/g de tecido)	158 + 5 <sup>a</sup>	176 + 5 <sup>b</sup>	187 + 14 <sup>b</sup>
TAS (g%)	35 + 6 <sup>c</sup>	15 + 2 <sup>a</sup>	24 + 4 <sup>b</sup>
SOD (U/mg de proteína)	27 + 5 <sup>b</sup>	18 + 2 <sup>a</sup>	17 + 2 <sup>a</sup>
GSH-Px (U/mg de tecido)	22 + 2 <sup>b</sup>	22 + 1 <sup>b</sup>	16 + 2 <sup>a</sup>
CAT (kat.f)	9 + 1 <sup>b</sup>	7 + 1 <sup>a</sup>	9 + 1 <sup>b</sup>

Média ± desvio padrão; n = número de animais; C = grupo controle; LI = grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos insaturados; LS = grupo alimentado com dieta rica em ácidos graxos saturados; PS = proteína solúvel; HL = hidroperóxido de lipídio; TAS = substâncias antioxidantes totais; SOD = superóxido-dismutase; GSH-Px = glutatona peroxidase; CAT = catalase. Variáveis com diferenças estatisticamente significantes são assinaladas por letras minúsculas diferentes ( $p < 0,05$ ).

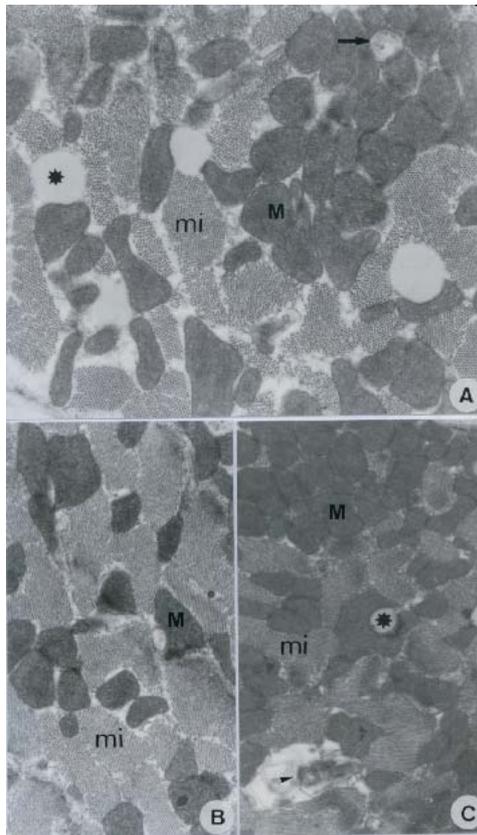


Fig. 1 – Músculo estriado cardíaco. Grupo com ácido graxo insaturado. A, B e C: Miofibrilas (mi). Mitocôndrias normais (M). Mitocôndria com perda de cristas em A (seta). Gotículas de gordura em A e C (\*). Figura de mielina em C (cabeça de seta). A: 4.600 X; B: 3.400 X; C: 2.650 X.

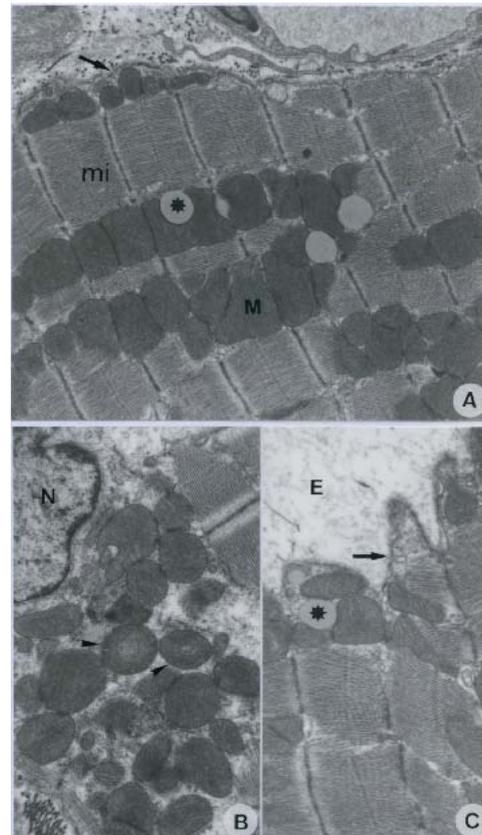


Fig. 2 – Músculo estriado cardíaco. Grupo com ácido graxo saturado. A, B e C: Miofibrilas (mi). Mitocôndrias normais (M). Núcleo do miócito em B (N). Mitocôndria com cristas irregulares em B (cabeça de seta). Gotículas de gordura em A e C (\*). Sarcolema irregular em C (seta). A: 13.250 X; B e C: 17.000 X.

papilar isolado do ventrículo esquerdo, o estresse oxidativo e a morfologia do miocárdio. Preparações com músculos isolados permitem medir a capacidade do miocárdio de desenvolver tensão e encurtamento, independentemente das alterações da pré-carga, da pós-carga e da frequência cardíaca, que podem

modificar o desempenho miocárdico *in vivo*. A estimulação inotrópica permite a identificação de alterações nas fases de contração e relaxamento, que podem não ser observadas em condições basais e auxiliam no entendimento de mecanismos envolvidos nas alterações da função cardíaca.

Este trabalho demonstrou que animais alimentados com dietas AGI ou AGS tiveram o mesmo peso corpóreo que os controles. A menor ingestão alimentar dos ratos com dietas hipercalóricas em relação aos controles igualou o aporte calórico entre os três grupos, o que resultou em peso corporal final semelhante. Esses dados estão de acordo com os resultados de experimentos anteriores que usaram dietas ricas em AGI ou AGS<sup>8-10,13-15</sup>. A análise das relações entre os pesos dos ventrículos e o peso corporal final dos ratos demonstrou que os animais submetidos a dieta AGS apresentaram hipertrofia biventricular em relação ao grupo controle e hipertrofia de ventrículo direito quando comparados aos animais do grupo que recebeu dieta AGI.

No presente estudo, as alterações morfológicas do miocárdio detectadas, como pequenos depósitos de gordura entre os miócitos e lesões focais na membrana plasmática e nas cristas mitocondriais, foram apenas ultra-estruturais. As modificações observadas com dieta AGI são menos relevantes que as relatadas em pesquisas anteriores, que demonstraram necrose<sup>7</sup> e desorganização do aparelho contrátil do miócito<sup>8</sup>. O mecanismo das lesões miocárdicas produzidas pelo aumento da ingestão de ácidos graxos é desconhecido<sup>7</sup>. Acredita-se que seja consequência do estresse oxidativo induzido por esse tipo de dieta<sup>10,18,19</sup>. Os lipídios ingeridos são incorporados em maior quantidade aos fosfolípidos de membrana, tornando-os mais suscetíveis à agressão dos radicais livres. Isso ocorre principalmente em relação aos AGI, que possuem em sua estrutura molecular ligações instáveis e, portanto, mais suscetíveis ao estresse oxidativo<sup>10,18,19</sup>. Essa hipótese encontra suporte neste experimento, no qual foram observados estresse oxidativo e discretas lesões ultra-estruturais provocados por dietas ricas em AGI e AGS.

Embora trabalhos anteriores tenham associado estresse oxidativo e disfunção cardíaca<sup>6,20-22</sup>, neste trabalho não foram observadas alterações da função mecânica em situação basal. Os resultados observados, como variações percentuais isoladas da TR com aumento da concentração extracelular de cálcio e a constante de rigidez do músculo com isoproterenol no grupo LS, permitem concluir que as dietas não provocaram alterações funcionais miocárdicas significantes. Os achados deste estudo estão de acordo com os resultados de estudos que demonstraram que dietas AGI não modificam a função mecânica do miocárdio<sup>7,9,11,14,15</sup>, embora discordem de outros autores que relataram depressão da função miocárdica com dietas AGI<sup>12,13</sup> e AGS<sup>4</sup>.

## Conclusões

Em conclusão, este experimento demonstra que dietas ricas em AGI ou AGS provocam estresse oxidativo e lesões ultra-estruturais miocárdicas discretas, e não acarretam comprometimento da função mecânica do miocárdio.

## Agradecimentos

Nossos sinceros agradecimentos a J. C. Georgette, M. Bruno e C. E. Knaggs, pela assistência técnica, e à FAPESP (02/02704-0), por acreditar em nosso trabalho.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflitos de interesses pertinentes.

## Referências

1. Hu FB, Willet WC. Optimal diets for prevention of coronary heart disease. *JAMA*. 2002; 288: 2569-78.
2. Iestra JA, Kromhout D, van der Schouw YT, Grobbee DE, Boshuizen HC, van Staveren WA. Effect size of lifestyle and dietary changes on all-cause mortality in coronary artery disease patients: a systematic review. *Circulation*. 2005; 112: 924-34.
3. Nielsen LB, Leth-Espensen P, Nordestgaard BG, Foged E, Kjeldsen S, Stender S. Replacement of dietary saturated fat with monounsaturated fat: effect on atherogenesis in cholesterolemia-fed rabbits clamped at the same plasma cholesterol level. *Br J Nutr*. 1995; 74: 509-21.
4. Pepe S, McLennan PL. Cardiac membrane fatty acid composition modulates myocardial oxygen consumption and postischemic recovery of contractile function. *Circulation*. 2002; 105: 2303-8.
5. Mori TA, Beilin LJ. Long-chain omega 3 fatty acids, blood lipids and cardiovascular risk reduction. *Curr Opin Lipidol*. 2001; 12: 11-7.
6. Nageswari K, Banerjee R, Menon VP. Effect of saturated,  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids on myocardial infarction. *J Nutr Biochem*. 1999; 10: 338-44.
7. Lamers JM, Hartog JM, Verdouw PD, Hulsmann WC. Dietary fatty acids and myocardial function. *Basic Res Cardiol*. 1987; 82: 209-21.
8. Sylvén C, Glavind J. Peroxide formation, vitamin E and myocardial damage in the rat. *Int J Vitam Nutr Res*. 1977; 47: 9-16.
9. Charnock JS, McLennan PL, Abeywardena MY, Dryden WF. Diet and cardiac arrhythmia: effects of lipids on age-related changes in myocardial function in the rat. *Ann Nutr Metab*. 1985; 29: 306-18.
10. Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli EL. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition*. 2004; 20: 230-4.
11. de Wildt DJ, Speijers GJ. Influence of dietary rapeseed oil and erucic acid upon myocardial performance and hemodynamics in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984; 74: 99-108.
12. Peterson DW, Griffith DW, Napolitano CA. Decreased myocardial contractility in papillary muscles from atherosclerotic rabbits. *Circ Res*. 1979; 45: 338-46.
13. Chemla D, Javouhey-Donzel A, Suard I, Maupoil V, Lecarpentier Y, Pourny JC, et al. Influence of dietary polyunsaturated fatty acids on contractility, lusitropy and compliance of isolated rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1995; 27: 1745-55.
14. Kako KJ, Vasdev SC. Effects of a high-fat erucic acid on the lipid metabolism and contractility of the rat heart. *Biochem Med*. 1979; 22: 76-87.
15. Pinotti MF, Silva MDP, Sugizaki MM, Diniz YS, Sant'ana LS, Aragon FF, et al. Effects of unsaturated fatty acids on myocardial performance, metabolism and morphology. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39: 305-12.
16. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 14th ed. Washington, DC: Association of Official Agricultural Chemists; 1984.
17. Folch J, Lee M, Sloane Stanley GH. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem*. 1957; 226: 497-509.
18. Moreira NX, Curi R, Padovese R, Mancini-Filho J. Incorporation of dietary trans-monounsaturated fatty acids into tissues of Walker 256 tumor-bearing

## Artigo Original

- 
- rats. *Braz J Med Biol Res.* 2001; 34: 501-8.
19. Weirik EV, Berg H, Weststrate JA, Hof KH, Graaf C. Consumption of reduced fat products: effects on parameters of antioxidant capacity. *Eur J Clin Nutr.* 1996; 50: 214-9.
20. Keith M, Geranmayegan A, Sole MJ, Kurian R, Robinson A, Omran AS, et al. Increased oxidative stress in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 31: 1352-5.
21. Collucci WS. Molecular and cellular mechanisms of myocardial failure. *Am J Cardiol.* 1999; 80: 15L-25L.
22. Pichardo J, Palace V, Farahmand F, Singal PK. Myocardial oxidative stress changes during compensated right heart failure in rats. *Mol Cell Biochem.* 1999; 196: 51-7.