



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Adriana Fernandes de Deus

**Expressão das proteínas envolvidas no trânsito de cálcio
miocárdico de ratos obesos por dieta hiperlipídica saturada**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestra em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientador: Emérito Dr. Antonio Carlos Cicogna

**Botucatu
2015**

Adriana Fernandes de Deus

Expressão das proteínas envolvidas no trânsito
de cálcio miocárdico de ratos obesos por dieta
hiperlipídica saturada

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Mestra em Fisiopatologia
em Clínica Médica.

Orientador: Emérito Dr. Antonio Carlos Cicogna

Botucatu
2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Deus, Adriana Fernandes de.

Expressão das proteínas envolvidas no trânsito de cálcio miocárdico de ratos obesos por dieta hiperlipídica saturada / Adriana Fernandes de Deus. - Botucatu, 2015

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Antonio Carlos Cicogna
Capes: 40101002

1. Miocárdio. 2. Coração - Doenças. 3. Obesidade - Fisiopatologia. 4. Cálcio. 5. Ratos Wistar.

Palavras-chave: Coração; Dieta hiperlipídica; Proteínas do trânsito de cálcio; Ratos.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho as pessoas mais importantes da minha vida,

*Aos meus pais, **Antonía** e **Alfredo** que me deram a vida
e compartilharam*

muitos momentos comigo.

*Ensinarão-me valores de caráter e dignidade
que levarei por toda a minha existência.*

Amo vocês.

*As minhas irmãs **Ilza** e **Maria Angélica**,*

*Irmãs lutadoras, admiráveis
e essenciais na minha vida.*

Amor eterno.

A toda minha família.

*Compreenderam todos os momentos em que estive
ausente. Torceram muito pelo meu sucesso.*

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus que me conforta em muitos momentos, me dá força e ilumina a minha vida.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, responsável pelo meu amadurecimento científico e pessoal. Obrigada pela oportunidade, lições, dedicação e paciência. Por acreditar no meu potencial até mesmo quando eu não acreditava. Ficam o meu carinho, respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pela disponibilidade, ensinamentos e contribuição estatística.

A Profa. Dra. Ana Paula Leopoldo, Prof. Dr. André Leopoldo, Prof. Dr. Dijon Campos e Ma. Dani T., vocês foram fundamentais para o meu primeiro contato com a pesquisa, mesmo longe continuaram ajudando. Meu respeito e muito obrigada.

A todos os companheiros e amigos do “laboratório Cíc”, do grupo Fofóletes e da pós graduação: Loreta, Scarlet, Elenize, Caroline A., Caroline M., Damiana, Belle M., Paula F., Carlos A., Mariana, Luana, Fernanda Fontes, Maria Tereza, Miriane, André Nascimento, Regiane, Juliana Marino e Camila. Obrigada pela força e incentivo.

Em especial Dijon, Paula G. e Dani V. Muito obrigada, vocês foram fundamentais para a finalização desse trabalho.

As Profas. Maeli Dal Pai Silva e Bertha Furlan Polegato, pelas críticas e sugestões durante o exame de qualificação, que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

As minhas grandes amigas de Araraquara: Day, Carol, Caríne, Priscila, Juliana, Natalia e Rielí. Amigas desde o cursinho, aspirávamos aos mesmos sonhos... Obrigada pela compreensão e anos de amizade! Vocês também são minha família!

As minhas grandes amigas de graduação: Aline, Tarsila e Vitória. Sempre farão parte dessa conquista. A minha caminhada foi mais feliz ao lado de vocês.

Aos atenciosos amigos e prestativos funcionários: José Carlos Georgette, Elízete, Mário, Sueli, Camila, Corina, Elenize, Renata, Ângelo, Rogério, De Lalla, Diego, Eduardo, Danilo, Regina, Marcia, Igor, Vick e Camila, pela agradável convivência, colaboração e amizade conquistada.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação, Ana Maria Mengue, Regina Célia Spadín, Diego C. Bovolim de Oliveira, Lillian C. Nadal Bianchi, Janete Ap. Sieva, pela paciência e eficiência nas soluções de problemas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Mestrado.

A todos que colaboraram para a realização deste trabalho, mesmo que de forma indireta e que me fazem querer ser uma pessoa melhor a cada dia. Muito obrigada!

Não existe um caminho para a felicidade.

A felicidade é o caminho.

Mahatma Gandhi

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

A obesidade é um problema atual que ocorre em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, em diferentes faixas etárias e classes sociais. Considerada uma doença metabólica crônica, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura em relação à massa magra tecidual, está associada com o aumento de risco de mortalidade, redução na expectativa de vida e numerosas comorbidades como, diabetes mellitus tipo II, resistência à insulina, dislipidemia e doenças cardiovasculares. Diversas modificações, moleculares, estruturais, hemodinâmicas e funcionais, do coração, em humanos e animais, têm sido frequentemente associadas com a obesidade. Embora a elevação do tecido adiposo possa provocar mudanças no desempenho cardíaco, os mecanismos responsáveis por estas alterações não estão esclarecidos. Diferentes fatores têm sido sugeridos como responsáveis pelas possíveis anormalidades funcionais cardíacas em modelos de obesidade, entre eles, as proteínas reguladoras do trânsito de cálcio miocárdico. É bem difundida na literatura a associação de ácidos graxos saturados e aumento do risco de doenças cardiovasculares como, doença arterial coronariana. Alguns autores observaram alterações como, apoptose e hipertrofia cardíaca. Pesquisadores verificaram em ratos *Wistar* obesos por dieta hiperlipídica, 70% de ácidos graxos insaturados e 30% de saturados, que o aumento na área e volume nuclear do miócito se correlacionou significativamente com os ácidos graxos saturados, embora os seus níveis fossem menores que os insaturados. Na literatura consta que a obesidade por dieta hiperlipídica insaturada não promove alteração na expressão das proteínas relacionadas ao trânsito de cálcio miocárdico; entretanto, não há estudos que avaliaram esta relação na obesidade induzida por dieta hiperlipídica saturada. O objetivo desse estudo foi testar a hipótese que a obesidade por dieta hiperlipídica saturada acarreta alterações na expressão e/ou fosforilação nas proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico. Ratos *Wistar* foram distribuídos em dois grupos: controle (C, n=18; dieta normolipídica saturada) e obeso (OB, n=19; dieta hiperlipídica saturada) por 30 semanas. A obesidade foi determinada pelo índice de adiposidade e foram avaliadas as comorbidades. O perfil morfológico cardíaco foi estimado por análise macroscópica *post mortem*. As expressões das proteínas: bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), receptor de rianodina (RyR), calsequestrina (CSQ), fosfolambam total (PLB), fosfolambam

serina 16 (PLB ser 16), fosfolambam treonina 17(PLB thr 17), trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e canal de cálcio tipo L (Canal L) foram feitas pela técnica de Western Blot. Neste trabalho os animais apresentaram aumento significativo do índice de adiposidade ($p<0,001$) e de diversas comorbidades como, intolerância a glicose ($p<0,001$), resistência à insulina ($p=0,02$), hiperleptinemia ($p<0,001$), hiperinsulinemia ($p=0,03$), hipertrigliceridemia ($p=0,001$), aumento do LDL ($p=0,03$), do NEFA ($p=0,02$) e da pressão arterial ($p=0,009$). Os resultados macroscópicos não apresentaram remodelação cardíaca significativa ($p>0,05$). A análise das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio não mostrou alterações significantes: na PLB ($p=0,71$), na CSQ ($p=0,62$), na SERCA2a ($p=0,61$), na PLB thr 17 ($p=0,58$), no NCX ($p=0,47$), na PLB ser 16 ($p=0,42$), na RYR ($p=0,19$) e no Canal L ($p=0,10$). Em conclusão os resultados desse trabalho mostram que a obesidade por dieta hiperlipídica saturada não promove alteração significativa nos níveis das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico.

Palavras-chave: coração, dieta hiperlipídica saturada, proteínas do trânsito de cálcio, ratos.

ABSTRACT

Obesity is a current problem that occurs in developed and developing countries, in different age groups and social classes. It is considered a chronic metabolic disease characterized by excessive fat accumulation in relation to lean tissue, is associated with increased mortality risk, reduced life expectancy and numerous comorbidities as type II diabetes mellitus, insulin resistance, dyslipidemia and cardiovascular diseases. Several molecular, structural, hemodynamic and functional modifications of the heart in humans and animals have been frequently associated with obesity. Although the increase in adipose tissue may cause changes in cardiac performance, the mechanisms responsible for these changes are unclear. Different factors have been suggested as responsible for possible cardiac functional abnormalities in obesity models, including the regulatory proteins of myocardial calcium handling. It is well established in the literature the association of saturated fatty acids and increased risk of cardiovascular diseases such as coronary artery disease. Some authors observed changes as apoptosis and cardiac hypertrophy. Researchers found in obese Wistar rats by high fat diet, 70% unsaturated fatty acids and 30% saturated, that the increase in the nuclear area and volume myocyte were correlated significantly with saturated fatty acids, although the levels were lower than unsaturated. The literature states that obesity by fat unsaturated diet does not promote changes in the expression of proteins related to myocardial calcium handling; however, there are no studies that evaluated this relationship in obesity models induced by saturated high-fat diet. The aim of this study was to test the hypothesis that obesity by saturated high-fat diet leads to changes in the expression and / or phosphorylation of proteins related to myocardial calcium handling. Wistar rats were divided into two groups: control (C, n=18; saturated normolipidic diet) and

obese (OB, n=19; saturated high-fat diet) for 30 weeks. Obesity was determined by adiposity index and comorbidities were evaluated. Cardiac morphological profile was estimated by post-death macroscopic analysis. The protein expressions of calcium pump of the sarcoplasmic reticulum (SERCA2a), ryanodine receptor (RYR), calsequestrin (CSQ), phospholamban total (PLB), phospholamban serine 16 (PLB ser 16), phospholamban threonine 17 (PLB thr 17), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) and L-type calcium channel (L channel) were performed by the method of Western Blot. In this study, the animals showed significant increase in adiposity index ($p<0.001$) and several comorbidities such as glucose intolerance ($p<0.001$), insulin resistance ($p=0.02$), hyperleptinemia ($p<0.001$), hyperinsulinemia ($p=0.03$), hypertriglyceridemia ($p=0.001$), increased LDL ($p=0.03$) and NEFA ($p=0.02$) and hypertension ($p=0.009$). Macroscopic results showed no significant cardiac remodeling ($p>0.05$). The analysis of proteins related to the calcium handling showed no significant change: PLB ($p=0.71$), CSQ ($p=0.62$), SERCA2a ($p=0.61$), PLB 17 Thr ($p=0.58$), NCX ($p=0.47$), PLB ser 16 ($p=0.42$), RYR ($p=0.19$) and channel L ($p=0.10$). In conclusion, the results of this study show that obesity by saturated high-fat diet does not promote significant changes in the levels of proteins related to myocardial calcium handling.

Key words: heart, saturated high-fat diet, calcium handling proteins, rats.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Macro, micronutrientes e ácidos graxos das dietas (%).....	23
---	-----------

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil nutricional dos animais.....	35
Tabela 2. Perfil macroscópico cardíaco <i>post mortem</i>	38
Tabela 3. Valores de p para as proteínas cardíacas.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tecido adiposo e as adipocinas.....	16
Figura 2. Mobilização do Ca^{2+} miocárdico.....	19
Figura 3. Evolução semanal do peso.....	33
Figura 4. Pressão arterial sistólica final.....	36
Figura 5. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose.....	36
Figura 6. Índice HOMA-IR.....	37
Figura 7. Nível de insulina.....	37
Figura 8. Nível de leptina.....	38
Figura 9. Expressão proteica da SERCA2a.....	39
Figura 10. Expressão proteica da RYR	39
Figura 11. Expressão proteica da CSQ	40
Figura 12. Expressão proteica da PLB.....	40
Figura 13. Expressão proteica da PLB ser 16	41
Figura 14. Expressão proteica da PLB thr 17.....	41
Figura 15. Expressão proteica do Canal L.....	42
Figura 16. Expressão proteica do NCX	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....15

2. MATERIAL E MÉTODOS.....21

3. RESULTADOS.....33

4. DISCUSSÃO.....44

5. CONCLUSÃO.....51

6. REFERENCIAS.....52

7. ANEXO.....60

1- INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença metabólica crônica, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura em relação à massa magra tecidual ⁽¹⁾. Nas últimas décadas a incidência e a prevalência dessa patologia no mundo, têm aumentado nos países subdesenvolvidos e desenvolvidos, tornando-se uma epidemia global e consequente problema de saúde pública ⁽²⁻⁵⁾. Atualmente, mais de um bilhão de pessoas apresentam sobrepeso, sendo que, mais de 30% desta população é clinicamente obesa. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), para o ano de 2015, 2,3 bilhões de pessoas estarão com excesso de peso (Índice de Massa Corporal (IMC > 25 kg/m²) e, destes, 700 milhões serão obesos (IMC > 30 kg/m²) ⁽⁶⁾.

No Brasil, as mudanças demográficas ao longo do tempo permitiram que ocorresse a chamada transição nutricional, com diminuição progressiva da desnutrição e aumento da obesidade ^(7,8). A Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF 2008-2009) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) evidenciou sobrepeso em 49 % e obesidade em 14,8% da população estudada acima de 20 anos. Além disso, pesquisas realizadas pelo IBGE no período de 1974 a 2009 mostrou aumento contínuo de tecido adiposo na mesma população ao longo de 35 anos ⁽⁹⁾.

A obesidade está associada com o aumento do risco de mortalidade, redução na expectativa de vida e numerosas comorbidades como diabetes mellitus tipo II, resistência a insulina, dislipidemia e doenças respiratórias, digestivas, osteoarticulares, renais crônicas, psicológicas, ginecológicas, câncer, estados pró-trombóticos, inflamatórios e doenças cardiovasculares ⁽¹⁰⁻¹³⁾. Essas comorbidades são resultado de uma produção excessiva pelo adipócito de inúmeros peptídeos como, leptina, adiponectina, renina, angiotensinogênio, angiotensina I e II e

receptores, enzima de conversão da angiotensina (ECA), resistina, fator de necrose tumoral α (TNF- α), inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1), interleucina 6 (IL-6) e ácidos graxos (Figura1). Desse modo, o tecido gorduroso não é um simples depósito de energia, mas um órgão com capacidade autócrina, parácrina e endócrina, capaz de produzir e liberar mediadores que participam de processos fisiológicos e patológicos em todo o organismo, incluindo o coração ⁽¹⁴⁻¹⁶⁾. Além disso, recebe influência de diversas substâncias, como insulina, cortisol, catecolaminas, glucagon, hormônios tireoidianos e, ao promover o aumento da leptina eleva os níveis de catecolamina circulante, importante modulador do sistema cardiovascular ^(14,15).

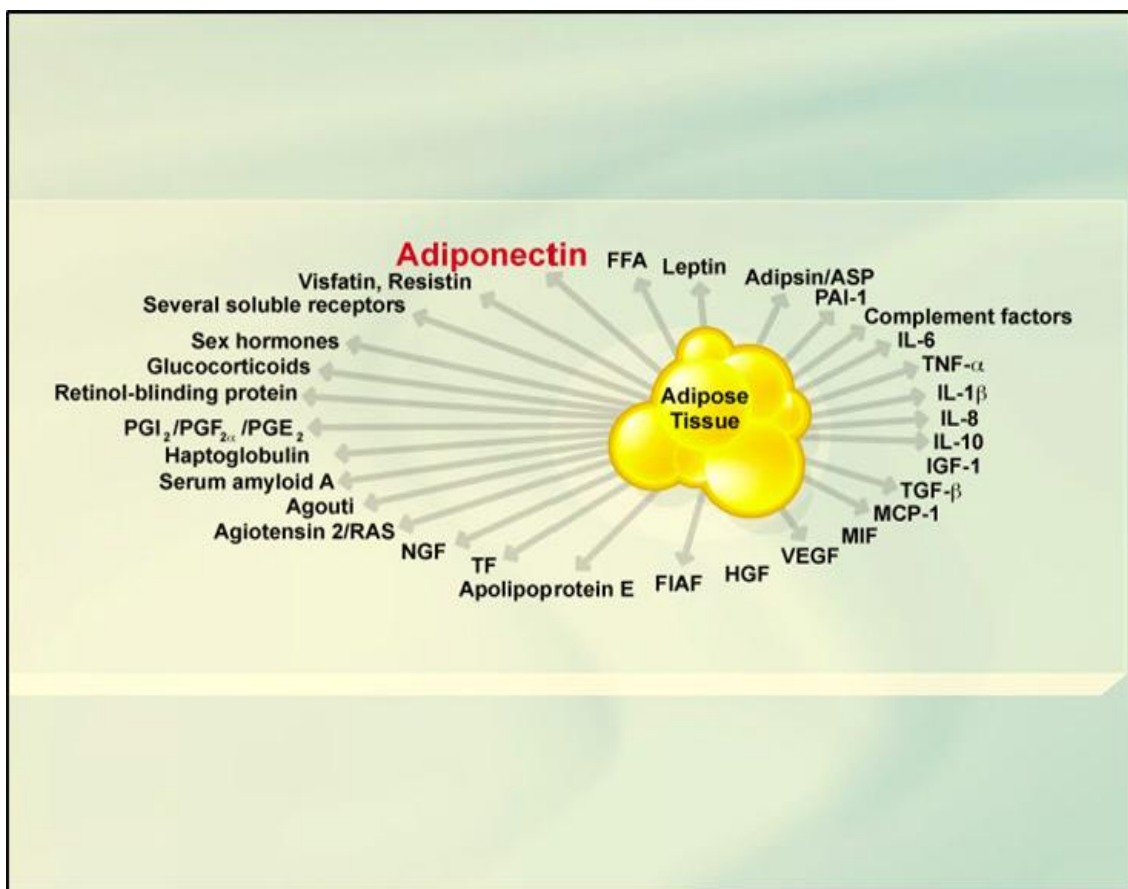


Figura 1. Tecido adiposo e as adipocinas. Retirada de Tchernof A ⁽¹⁴⁾.

O comportamento adquirido pela moderna sociedade industrializada, envolvendo o sedentarismo, os hábitos alimentares inadequados ou a combinação de ambos têm levado ao aumento da prevalência da obesidade ^(12,15,16). O aumento do consumo de energia, a diminuição do gasto energético ou a combinação de ambos têm levado a um balanço calórico positivo com consequente aumento do peso corporal ⁽¹⁷⁾.

Pesquisadores mostram que dietas com alto teor de gordura e/ou altamente energéticas, ao induzir a obesidade em humanos ou animais de experimentação ⁽¹⁸⁾, podem acarretar alterações moleculares, estruturais, hemodinâmicas e funcionais no coração, por exemplo: diminuição da proteína fosfolambam, aumento do núcleo celular, hipertrofia atrial e ventricular, hipertensão arterial sistêmica e disfunção diastólica e sistólica cardíaca, podendo desenvolver o quadro de insuficiência cardíaca ^(19–21).

Embora a elevação do tecido adiposo possa promover alteração na função cardíaca, os mecanismos responsáveis por esta modificação não estão claros. Diferentes fatores têm sido sugeridos como responsáveis por essa anormalidade em modelos de obesidade como, as proteínas reguladoras do trânsito de cálcio (Ca^{2+}) miocárdico ^(22,23).

O íon Ca^{2+} é um importante integrante do processo de excitação-contracção-relaxamento (Figura 2). A contracção cardíaca inicia-se com a despolarização das células pelo potencial de ação, abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo lento (Canal L) e influxo do Ca^{2+} através destes canais sarcolemais ^(18,24–26). O influxo de Ca^{2+} desencadeia liberação de grande quantidade deste íon do retículo sarcoplasmático (RS) pelos receptores de rianodina (RyR) ⁽²⁷⁾. O aumento da concentração do Ca^{2+} citosólico possibilita a ligação desse íon com a troponina C (TnC) e, a consequente

interação actina-miosina desencadeando o processo de contração ⁽²⁸⁾. A intensidade da contração depende da quantidade e da resposta dos miofilamentos ao Ca^{2+} . O relaxamento inicia-se quando a concentração intracelular de Ca^{2+} é reduzida, principalmente, pela recaptção deste íon pela ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA2a). A função da SERCA2a é regulada pela fosfolambam (PLB), proteína que em estado fosforilado na serina 16 (PLB ser 16) via adenosina monofosfato cíclico (AMPc) ou na treonina 17 (PLB thr 17) via quinase dependente de cálcio-calmodulina, o que permite a recaptura do Ca^{2+} pela SERCA2a para o interior do RS ^(24,28–30). A calsequestrina (CSQ) proteína do lúmen do RS tem a função de estoque do Ca^{2+} ; assim, este íon, recapturado pela SERCA2a para dentro do RS é armazenado pela CSQ, devido à sua capacidade de ligação aos íons Ca^{2+} , tornando-o disponível para a próxima liberação pelos receptores de RYR. Outra importante proteína na regulação do efluxo de Ca^{2+} celular é o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal (NCX), que utiliza o gradiente de Na^+ transmembrana para catalisar a extrusão do Ca^{2+} do interior celular. Desta forma, a quantidade e/ou atividade de diferentes proteínas, localizadas no sarcolema e no RS, regulam o trânsito de Ca^{2+} celular, modulando a contração e o relaxamento miocárdico ^(28,31).

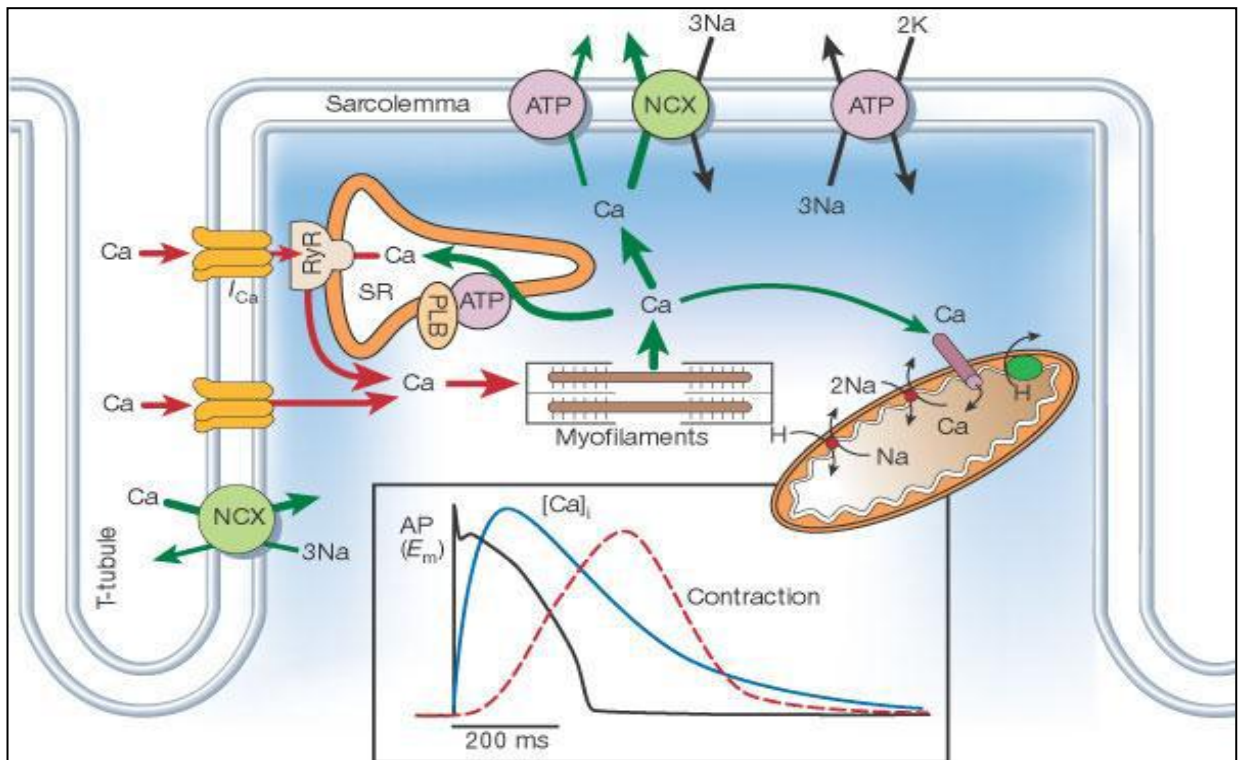


Figura 2. Representação esquemática da mobilização do Ca^{2+} durante a excitação contração-relaxamento miocárdico. Retirada de Bers DM ⁽²⁸⁾.

Embora as proteínas relacionadas com o trânsito de Ca^{2+} no miocárdio tenham sido estudadas em modelos experimentais de insuficiência cardíaca ⁽³²⁻³⁴⁾, a literatura revela escassez de estudos que avaliaram a relação entre a obesidade por dieta hiperlipídica e as proteínas envolvidas na homeostase do Ca^{2+} miocárdico. Relling et al ⁽¹⁸⁾ utilizando ratos submetidos à dieta hiperlipídica, por 12 semanas, mostraram que a obesidade, não acompanhada de comorbidades, promoveu aumento da expressão proteica da SERCA2a e da PLB e diminuição dos níveis de PLB fosforilada; entretanto, Relling et al não informaram a composição dos ingredientes desta dieta. Em pesquisa recente, em nosso laboratório ⁽²¹⁾, foi observado que a obesidade induzida por um ciclo de dietas hiperlipídicas insaturadas, em ratos *Wistar*, promoveu diminuição da fosforilação do PLB ser 16; esses autores não observaram alterações nas demais proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio, como SERCA2a, PLB, CSQ, Canal L e PLB thr 17. Freire et al ⁽³⁵⁾

utilizando a mesma metodologia de Lima-Leopoldo et al, não encontraram alteração na PLB ser 16.

É bem difundida na literatura a associação de ácidos graxos saturados e aumento do risco de doenças cardiovasculares como, doença arterial coronariana^(36–38). Alguns autores observaram alteração como, apoptose^(39–41) e hipertrofia cardíaca^(42,43). Oliveira-Junior et al⁽¹⁹⁾ verificaram em ratos *Wistar* obesos por dieta hiperlipídica, 70% de ácidos graxos insaturados e 30% de saturados, que a variação na área e volume nuclear do miócito se correlacionou significativamente com os ácidos graxos saturados, embora os seus níveis fossem menores que os insaturados. Em razão dos dados da literatura que mostraram a relação entre ácidos graxos saturados e alterações cardíacas, e da ausência de trabalhos que avaliaram a associação entre a obesidade por dieta saturada e a expressão das proteínas envolvidas na homeostase do Ca^{2+} miocárdico, a proposta deste estudo foi testar a hipótese que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica saturada acarreta modificações na expressão e/ou fosforilação das proteínas relacionadas com o trânsito de Ca^{2+} cardíaco. Com esse objetivo foram estudadas os seguintes polipeptídeos RYR, CSQ, SERCA2a, PLB, PLB ser 16, PLB thr 17, Canal L e NCX no miocárdico de ratos submetidos a dieta hiperlipídica saturada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Para este trabalho foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 60 dias de idade, provenientes da Anilab Animais de Laboratório Criação e Comércio Ltda – Paulínia, São Paulo, Brasil. Os animais permaneceram no Biotério de roedores do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, com as seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de Pinus esterilizada, temperatura ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($55 \pm 5\%$) e ciclos de iluminação de 12 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” publicado pelo “U.S. National Institutes of Health” ⁽⁴⁴⁾.

2.2 Protocolo experimental

Os ratos foram randomizados em dois grupos e tratados com dietas normolipídica (DN; n= 25) ou hiperlipídica (DH; n= 25), ricas em ácidos graxos saturados e a oferta de água foi *ad libitum*. O período de obesidade foi de 30 semanas. Os ratos DN e DH receberam 250g de ração e a quantidade não ingerida foi mensurada semanalmente. As rações foram idealizadas no Laboratório Experimental de Músculo Papilar Isolado da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPLEX), Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, e adaptadas a partir de modelo dietético utilizado anteriormente pelo grupo ⁽⁴⁵⁾ e, manipuladas com a parceria da empresa Biotron Zootécnica®, Rio Claro, São Paulo, Brasil. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP (protocolo 994/2012).

2.2.1 Composição das dietas normolipídica e hiperlipídica

Pesquisas utilizam dietas, manipuladas, de acordo com o tratamento de interesse. O desenvolvimento de dietas é resultante da alteração na quantidade ou qualidade dos ingredientes e/ou por adição de fármacos. Investigadores modificam suas dietas por simples adição de um novo composto; entretanto, a adição de um componente, em grande quantidade, é acompanhada de diluição dos demais compostos da dieta. Neste trabalho foram desenvolvidas dietas normolipídica e hiperlipídica com predomínio de ácidos graxos saturados, com equilíbrio nas taxas de hidratos de carbono.

Nas dietas foram utilizados os seguintes componentes: farelo e casca de soja, milho, dextrina, óleo de soja e palmístico e premix vitamínico e mineral. As quantidades foram adicionadas a fim de produzir duas dietas diferentes no teor dos lipídeos: normolipídica saturada (DN) e hiperlipídica saturada (DH), com a mesma quantidade nas taxas de hidratos de carbono. Os níveis de garantia foram obtidos por dosagem bromatológica dos componentes da dieta (Laboratório de Bromatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu-SP). A composição dos macro e micronutrientes e a porcentagem dos ácidos graxos das dietas estão apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1. Macro, micronutrientes e ácidos graxos das dietas (%)

Componentes	Dietas	
	Normolipídica	Hiperlipídica
Proteína	24	18
Carboidrato	40	40
Gordura	6	17
Fibras	12	9
Outros*	18	16
Calorias (Kcal/g)	3,10	3,85
Ácidos Graxos Insaturados	38,5	35,2
Ácidos Graxos Saturados	61,5	64,8

* Outros: umidade, vitaminas e minerais.

2.3 Perfil nutricional dos animais

O perfil nutricional foi determinado pela análise de ingestão calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal, índice de adiposidade, glicose sanguínea e lipídios séricos. A ingestão calórica foi calculada pela fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada dieta (g x kcal). A capacidade do animal de converter energia em peso corporal, foi calculada pela eficiência alimentar (EA), isto é dividindo-se o ganho total de peso corporal dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal). O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, São Paulo, Brasil). A quantidade de gordura corporal total foi a somatória de três depósitos de gordura: epididimal, retroperitoneal e visceral. O índice de adiposidade foi calculado, dividindo-se a gordura corporal total pelo peso corporal final, multiplicado por 100⁽⁴⁶⁾. A análise do perfil lipídico sérico foi analisado nos ratos em jejum, por 12 a 15 horas, anestesiados com cloridrato de ketamina, 50mg/kg/ip; cloridrato de xilazina,

10 mg/kg/ip e eutanasiados por decapitação. As amostras de sangue foram coletadas em tubos Falcon, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e armazenadas em freezer à -80°C (Thermo Fisher Scientific LLC, Asheville, NC, USA). As concentrações séricas de triacilglicerol, colesterol total e lipoproteínas de alta (HDL) e baixa (LDL) densidade foram estabelecidas utilizando-se kits específicos (BIOCLIN®, Belo Horizonte, MG, Brasil) e analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, Shenzhen, China). Os níveis de ácidos graxos livres não esterificados (NEFA) foram avaliados por kit colorimétrico (WAKO Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japão); a leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Para análise do perfil glicêmico os animais foram expostos a jejum e anestesia, como descritos acima, e a coleta de sangue foi realizada na artéria caudal; os níveis glicêmicos foram avaliados com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda., São Paulo, Brasil).

2.4 Caracterização da obesidade

Para caracterizar a obesidade foi utilizado o índice de adiposidade. Na literatura constam vários trabalhos que fazem uso desse método para avaliar a quantidade de gordura corporal em roedores ^(18,27,46).

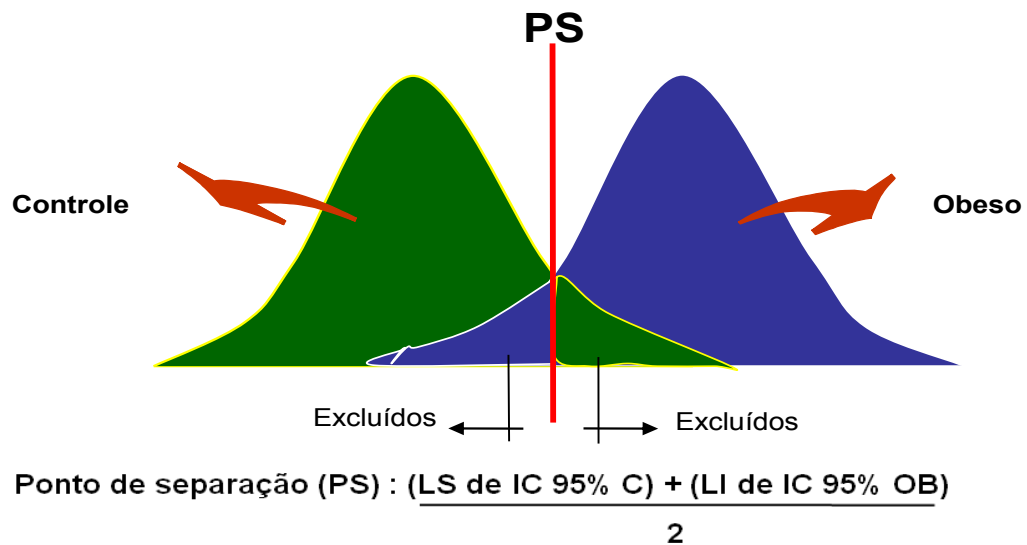
2.5 Determinação do momento inicial da obesidade

O momento do início da obesidade foi determinado a partir da aferição semanal do peso corporal dos animais. Na semana de tratamento em que se visualize aumento significativo no peso corporal do grupo DH em relação ao DN, este

momento foi considerado como início da obesidade; esta decisão se baseia em estudo prévio, no qual se verificou que a diferença do peso corporal entre os grupos era resultante do maior índice de adiposidade nos ratos do grupo DH ⁽³⁴⁾.

2.6 Constituição dos grupos controle e obeso

Após o início da obesidade, os grupos de animais que receberam dieta normolipídica e hiperlipídica foram denominados controle (C) e obeso (Ob), respectivamente. Na experimentação biológica, em especial, em estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada uma homogeneidade de resposta. Neste sentido, os ratos submetidos à dieta normolipídica e hiperlipídica podem apresentar, em maior ou menor escala, características comuns, como, por exemplo, o índice de adiposidade. Estudo publicado previamente ⁽⁴⁸⁾ mostrou que este fato pode conduzir a um erro de classificação, ou seja, animais submetidos à dieta normolipídica poderiam ser classificados como controle, quando na realidade, exibem características de animais obesos, ou vice versa. Por essa razão, tornou-se necessário estabelecer um critério que separasse os animais em dois grupos distintos de acordo com o índice de adiposidade. Com essa finalidade, foi construído um intervalo de 95% de confiança (IC) para a média do índice de adiposidade dos ratos controle e obeso. Foi adotado como ponto de separação (PS) entre os grupos, o ponto médio entre o limite superior do grupo C e o limite inferior do Ob; a partir deste ponto foram excluídos do grupo C os animais com índice de adiposidade acima do PS e do grupo Ob os animais com índice de adiposidade abaixo do PS.



Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso

2.7 Obesidade e comorbidades

Desde que o aumento do tecido adiposo pode ser acompanhado por comorbidades como, alterações cardiovasculares, metabólicas e hormonais, visualizadas por hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, hiperglicemia, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e remodelação cardíaca,^(18,27,49–53) as seguintes variáveis foram analisadas:

2.7.1 Pressão arterial sistêmica (PAS)

A PAS foi aferida indiretamente por plestimografia de cauda, utilizando-se electro-sphygmomanometer, Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Austin, TX, USA); este método não permite avaliar a pressão arterial diastólica. Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal, os ratos foram previamente aquecidos, à temperatura de 40°C por 5 minutos, em uma caixa de madeira (50 x 40 cm) forrada com maravalha de Pinus autoclavada. Após o aquecimento, foi acoplado o sensor e o manguito em torno da cauda do animal. O

manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge® MP100, Biopac Systems, Ins, Santa Barbara, CA, USA).

2.7.2 Intolerância à glicose

A partir do teste de tolerância à glicose (TTG) foi possível constatar se os ratos obesos desenvolveram intolerância à glicose, isto é, apresentaram níveis de glicemia maiores em relação ao grupo C, após a sobrecarga glicêmica. As coletas de sangue, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal, após um período de jejum de 6 horas, e após administração intraperitoneal de glicose 25% (Sigma-Aldrich,® St Louis, MO, USA), equivalente a 2 g/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, considerado condição basal, e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da infusão da glicose. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, São Paulo, Brasil). A intolerância à glicose foi avaliada pela área glicêmica.

2.7.3 Perfil lipídico e glicêmico

Foram avaliadas as concentrações séricas de triglicerídeos, colesterol total (CT), lipoproteínas de alta (HDL) e baixa densidade (LDL) e NEFA e, os níveis glicêmicos de acordo com a metodologia descrita no item 2.3.

2.7.4 Resistência sistêmica á insulina

Como os animais obesos podem apresentar resistência a insulina foi calculado o índice HOMA-IR (*Homeostatic Model Assessment-Insulin Resistance*),

que baseia-se nas concentrações de glicose e insulina de jejum. O cálculo foi realizado pela seguinte fórmula: concentração de insulina ($\mu\text{U/mL}$) multiplicada pelos níveis glicêmicos (mM/L) dividida por 22,5 ⁽⁵⁴⁾.

2.7.5 Perfil hormonal: insulina e leptina

As concentrações hormonais séricas de insulina e leptina foram determinadas pelo método de ELISA utilizando-se kits específicos (EMD Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.8 Remodelação cardíaca

O coração foi analisado por meio de estudos estruturais e moleculares ^(27,50,55–61). A hipertrofia foi avaliada *post mortem* por análise macroscópica dos seguintes parâmetros: peso total do coração, dos átrios e dos ventrículos esquerdo e direito, e das suas respectivas relações com o comprimento da tibia. A análise molecular foi realizada pelas expressões das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio: RYR, CSQ, SERCA2a, PLB, PLB ser 16, PLB thr 17, Canal L e NCX.

2.8.1 Análise da expressão das proteínas do trânsito de cálcio

As expressões das proteínas do trânsito de cálcio foram avaliadas por meio da técnica de Western Blot ^(49,62).

2.8.1.1 Técnica de Western Blot

As expressões das proteínas RYR, CSQ, SERCA2a, PLB, PLB ser 16, PLB thr 17, Canal L e NCX, foram realizadas pela técnica de Western Blot. Além disso,

também foi realizada a expressão da proteína de normalização, β -actina. Este método é frequentemente utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico, ⁽⁶³⁾ sendo constituído das seguintes etapas: extração de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação dos *blots* de polipetídeos ⁽³⁵⁾. A metodologia de Western Blot está descrita abaixo.

2.8.1.2 Extração das proteínas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C . A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão RIPA (Amresco LLC, Solon, OH, USA), inibidores de protease (Sigma, St. Louis, MO, USA) e fosfatase (Roche diagnostics, Indianapolis, IN, USA). O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C , e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer -80°C . A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford, ⁽⁶⁴⁾ utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

2.8.1.3 Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração proteica, as amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240 mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM). As amostras continham 50ug de proteínas totais e foram separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-

Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCL 240 mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240 mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 6 a 10%, dependente do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por aproximadamente 3-4 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

2.8.1.4 Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Armsham Biosciences) em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 2-6 horas, utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em 10 mL tampão TBS-T pH 7,4 (Tris-HCl 20 mM, NaCl 137mM e detergente Tween 20 0,1%) por no mínimo 2 horas à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. A

imuno-deteccão foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). Finalmente, as membranas de nitrocelulose foram analisadas em fotodocumentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

Anticorpos primários

- *Serca2 ATPase, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1: 2500.
- *Ryanodine Receptor, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Phospholamban, rabbit IgG* (Abcam, Cambridge, MA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000.
- *Phospho-Phospholamban (Ser16), rabbit* (Badrilla, Leeds, West Yorkshire, UK): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Phospho-Phospholamban (Thr17), rabbit* (Badrilla, Leeds-UK): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Calcium Channel, Voltage Gated Alpha 1C, rabbit* (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:100.
- *Calsequestrin, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:300.
- *Exchanger $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, mouse IgG2b* (Upstate, Lake Placid, NY, USA): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000.

Anticorpo de normalização

- *β -actin*, *Rabbit IgG1* (CELL SIGNALING, Danvers, MA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:1000.

Anticorpos secundários

Os anticorpos secundários, conjugados a peroxidase (anti-mouse IgG ou anti-rabbit IgG, Abcam, Cambridge, MA, USA) foram utilizados na titulação de 1:1000. Os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes titulações, assim como a solução bloqueadora e demais etapas metodológicas.

2.8.1.5 Quantificação das proteínas

As análises quantitativas das bandas proteicas (*blots*) foram realizadas pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA).

2.9 Análise estatística

As variáveis analisadas foram expressas por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade e submetidas ao teste “t” de Student para amostras independentes ⁽⁶⁵⁾. A evolução semanal do peso corporal dos animais para determinação do momento inicial da obesidade foi realizada pela análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni ^(65,66). O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização do momento inicial da obesidade

Após a 3ª semana de tratamento, foi possível observar que o peso corporal dos animais do grupo obeso estava significativamente maior que os do grupo controle, sendo considerado o início da obesidade (Figura 3).

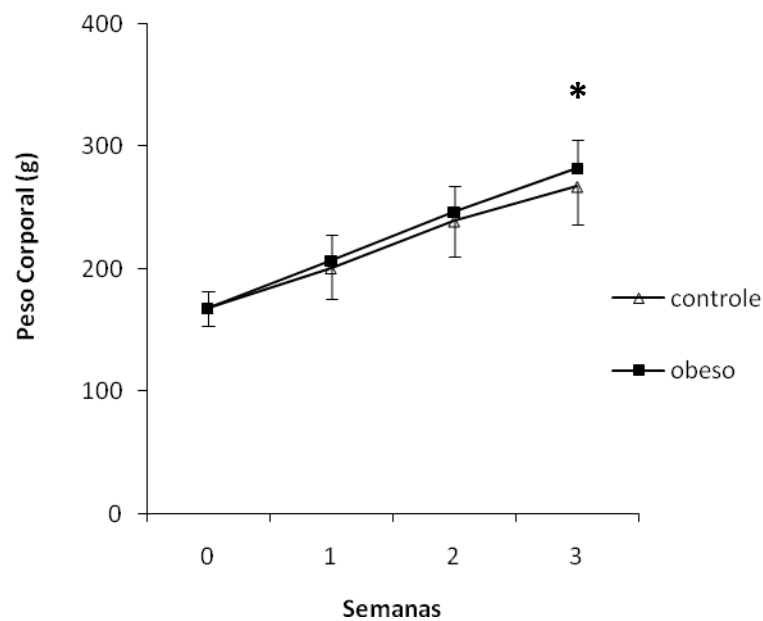


Figura 3. Evolução semanal do peso corporal dos animais controle (n=18) e obeso (n=19). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste post-hoc de Bonferroni. * $p=0,04$ vs C.

3.2 Composição dos grupos controle e obeso

Com a aplicação do critério estabelecido para a composição dos grupos na 30ª semana, após o início da obesidade, foram excluídos sete animais do grupo controle (C; n=18) e seis do grupo obeso (Ob; n=19).

3.3 Perfil nutricional dos animais

O peso corporal inicial e final, o ganho de peso, o comprimento naso-anal, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores nos obesos em relação aos controles. Os animais obesos ingeriram menor quantidade de ração que os controles, porém, a eficiência alimentar foi maior nos animais obesos do que nos controle. As concentrações séricas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, LDL e NEFA aumentaram nos obesos em relação ao controle. Não houve diferença estatística na ingestão calórica e na HDL entre os grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil nutricional dos animais.

Variáveis	Grupos		Valor de p
	C (n=18)	Ob (n=19)	
PCI (g)	260 ± 30	279 ± 25	= 0,04
PCF (g)	467 ± 52	541 ± 68	< 0,001
CNA (cm)	27,3 ± 0,9	27,8 ± 0,7	= 0,03
Epididimal (g)	7,42 ± 3,03	15,5 ± 4,0	< 0,001
Retroperitoneal (g)	7,66 ± 3,58	21,8 ± 6,8	< 0,001
Visceral (g)	5,52 ± 2,16	11,4 ± 3,7	< 0,001
GCT (g)	20,6 ± 8,2	48,7 ± 13,3	< 0,001
Índice de adiposidade (%)	4,52 ± 1,42	9,22 ± 1,54	< 0,001
Ingestão alimentar (g)	24,2 ± 2,1	19,8 ± 1,9	< 0,001
Ingestão calórica (kcal)	71,3 ± 6,2	72,1 ± 6,9	= 0,69
Eficiência alimentar (%)	1,38 ± 0,16	1,72 ± 0,19	< 0,001
Glicose (mg/dL)	104 ± 12	114 ± 12	= 0,01
Triglicerídeos (mg/dL)	46,7 ± 18,2	72,7 ± 25,4	= 0,001
Colesterol total (mg/dL)	68,0 ± 13,4	78,2 ± 14,5	= 0,04
HDL (mg/dL)	25,1 ± 3,9	27,1 ± 4,7	= 0,17
LDL (mg/dL)	24,0 ± 4,3	27,7 ± 5,4	= 0,03
NEFA (mmol/L)	0,42 ± 0,08	0,51 ± 0,11	= 0,02

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; CNA: comprimento naso-anal; GCT: gordura corporal total; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; NEFA: ácidos graxos livres não-esterificados; n=14 para os grupos C e Ob. Teste “t” de Student para amostras independentes.

3.4. Pressão arterial sistólica

A pressão arterial sistólica final foi significativamente maior no grupo obeso em relação ao controle (Figura 4).

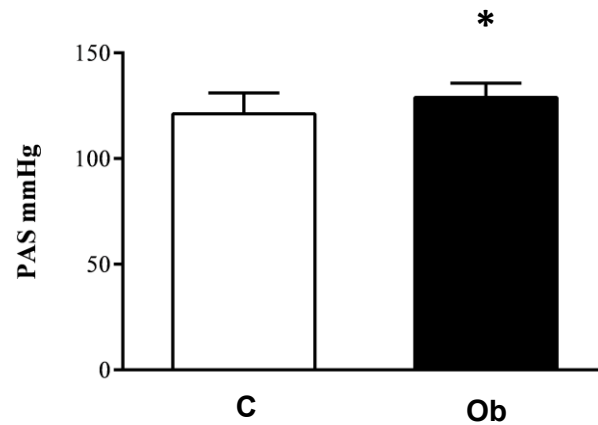


Figura 4. Pressão arterial sistólica final dos animais controle, (n=18) e obeso, (n=19). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p=0,009 vs C.

3.5 Perfil glicêmico

A Figura 5 mostra o resultado do teste de tolerância à glicose, que foi maior no grupo obeso em relação ao controle.

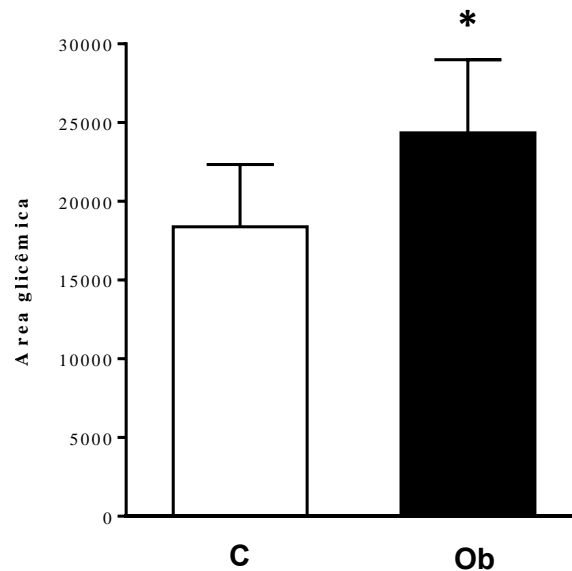


Figura 5. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, realizado nos animais controle (n=18) e obeso (n=19). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p<0,001 vs C.

3.6 Índice de resistência a insulina

A Figura 6 mostra o resultado do índice HOMA-IR dos grupos C e Ob. Os animais Ob apresentaram maior índice HOMA-IR em relação ao C.

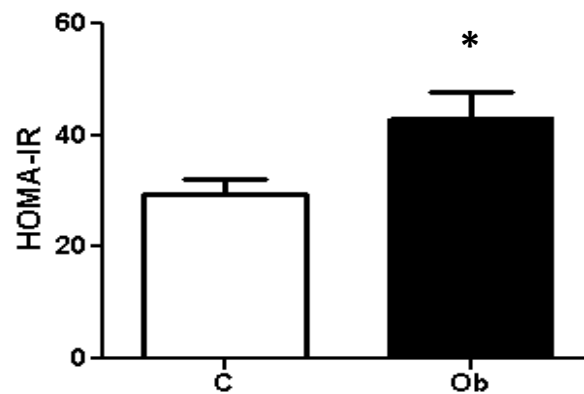


Figura 6: Índice HOMA-IR dos animais controle (n=15) e obeso (n=14). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p=0,02 vs C.

3.7 Perfil hormonal: insulina e leptina

Os hormônios séricos, insulina e leptina, foram maiores no grupo obeso em relação ao controle (Figura 7 e 8).

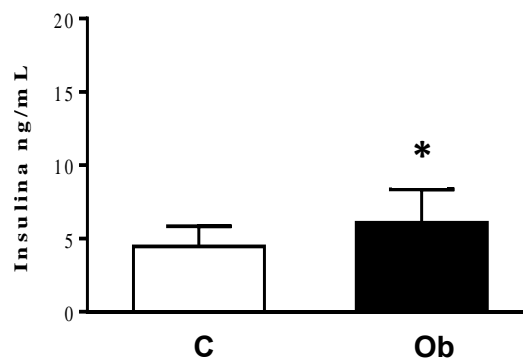


Figura 7. Nível de insulina nos animais controle (n=14) e obeso (n=15). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p= 0,03 vs C.

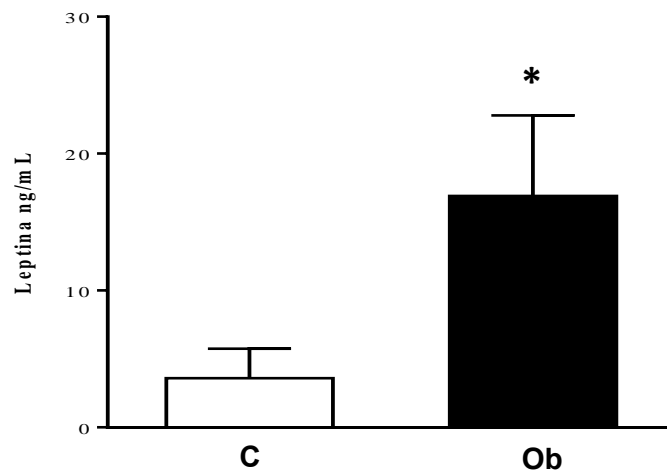


Figura 8. Nível de leptina nos animais controle (n=14) e obeso (n=11). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * $p < 0,001$ vs C.

3.7 Perfil macroscópico cardíaco *post mortem*

A obesidade não acarretou alteração estrutural no coração (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil macroscópico cardíaco *post mortem*

Variáveis	Grupos		Valor de p =
	C (n=18)	Ob (n=19)	
Coração (g)	1,06 \pm 0,12	1,09 \pm 0,10	0,38
Tíbia (cm)	4,23 \pm 0,12	4,31 \pm 0,19	0,16
VE (g)	0,78 \pm 0,10	0,79 \pm 0,07	0,57
VD (g)	0,20 \pm 0,02	0,21 \pm 0,03	0,46
AT (g)	0,08 \pm 0,01	0,09 \pm 0,02	0,07
VE/Tíbia	0,184 \pm 0,023	0,184 \pm 0,015	0,94
VD/Tíbia	0,048 \pm 0,007	0,048 \pm 0,005	0,79

Dados expressos em média \pm desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio; VE/Tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pela tíbia; VD/Tíbia: relação do peso do ventrículo direito pela tíbia. Teste “t” de Student para amostras independentes.

3.8 Expressão das proteínas do trânsito de cálcio

A Figura 9 mostra os resultados obtidos na quantificação da proteína SERCA2a, nos animais dos grupos controle e obeso. Não houve diferença

significante entre os grupos.

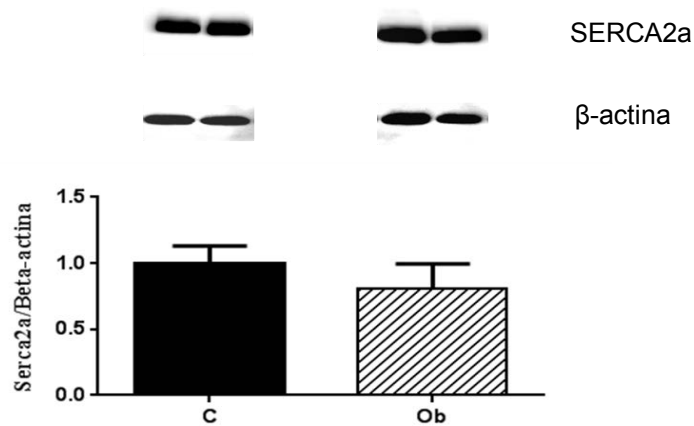


Figura 9. Expressão proteica da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) no miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6), normalizados pela β -actina (controle interno). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p=0,61 vs C.

A Figura 10 e 11 mostram que não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso para RYR e CSQ.

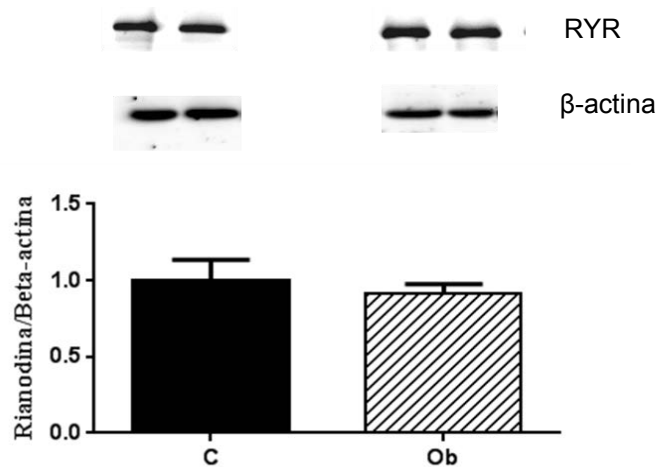


Figura 10. Expressão proteica do receptor rianodina (RYR) no miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6), normalizados pela β -actina (controle interno). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p=0,19 vs C.

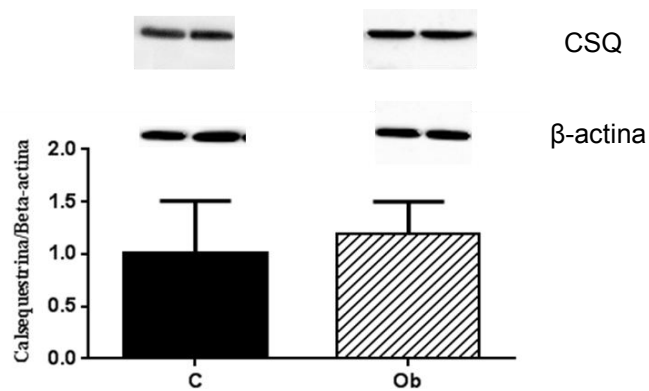


Figura 11. Expressão proteica da calsequestrina (CSQ) no miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6), normalizados pela β-actina (controle interno). Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p=0,62 vs C.

As Figuras 12, 13 e 14, respectivamente, mostram os resultados obtidos na expressão proteica da PLB, PLB Ser 16 e PLB Thr 17 dos grupos controle e obeso. Não houve diferença significativa entre os grupos.

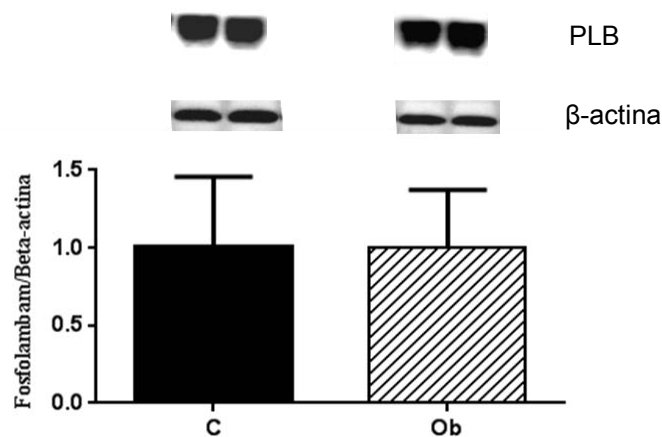


Figura 12. Expressão proteica da fosfolambam (PLB) no miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6), normalizados pela β-actina (controle interno). Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p=0,71 vs C.

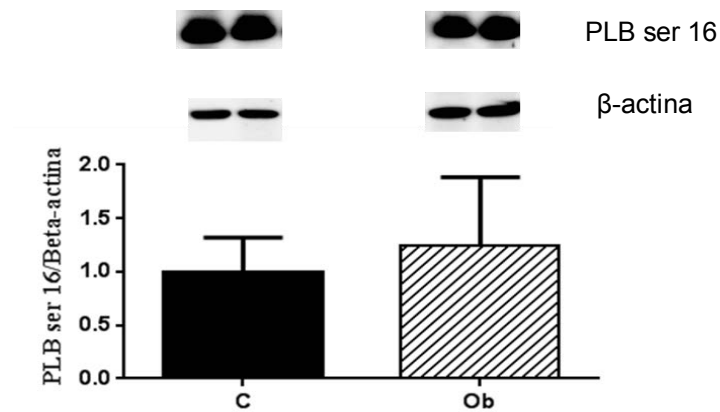


Figura 13. Expressão proteica da fosfolambam serina 16 (PLB ser 16) no miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6), normalizados pela β -actina (controle interno). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p=0,42 vs C.

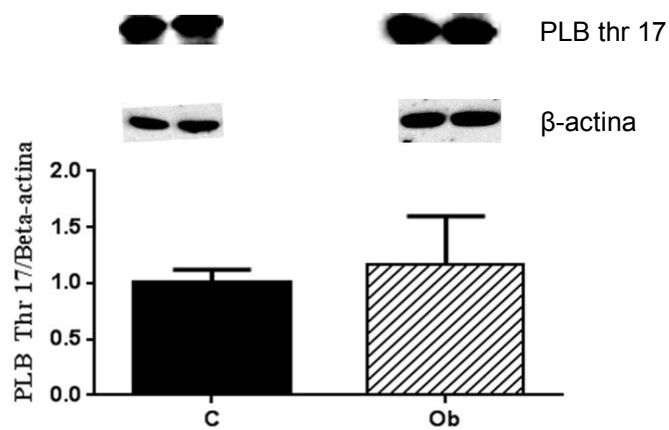


Figura 14. Expressão proteica da fosfolambam thr 17 (PLB thr 17) no miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6), normalizados pela β -actina (controle interno). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p=0,58 vs C.

A Figura 15 mostra o resultado obtido na expressão proteica do Canal L nos animais controle e obeso. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.

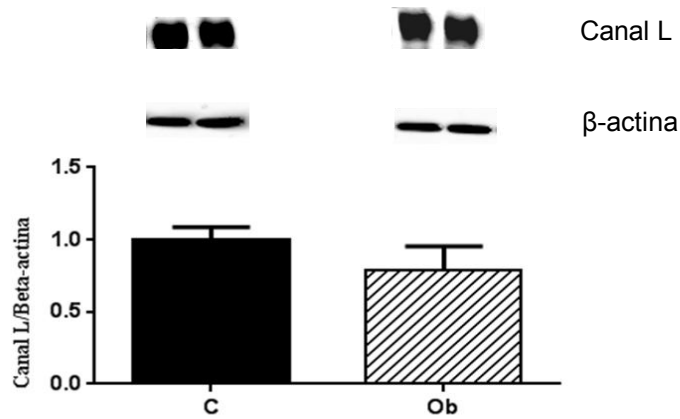


Figura 15. Expressão proteica do canal de cálcio do tipo L (Canal L) no miocárdio dos animais controle (n=6) e obesos (n=6), normalizados pela β -actina (controle interno). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p=0,10 vs C.

A Figura 16 mostra o resultado obtido na expressão proteica do NCX nos animais controle e obeso. Não houve diferença significativa entre os dois grupos.

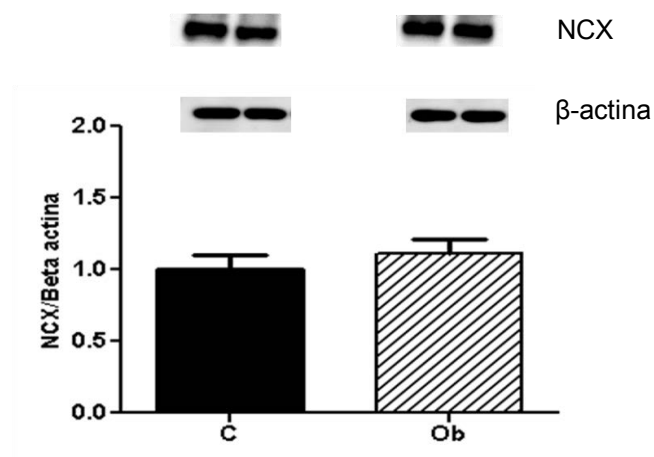


Figura 16. Expressão proteica do trocador Na⁺/Ca²⁺ sarcolemal (NCX) no miocárdio dos animais controle (n=6) e obesos (n=6), normalizados pela β -actina (controle interno). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. *p=0,47 vs C.

A Tabela 3 resume os valores de p encontrados no trabalho, em relação às proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio.

Tabela 3. Valores de p para as proteínas cardíacas

Proteínas	Valor de p
Canal L	0,10
RYR	0,19
NCX	0,47
PLB ser 16	0,42
PLB thr 17	0,58
SERCA2a	0,61
CSQ	0,62
PLB	0,71

Canal L: canal de cálcio do tipo L; RYR: receptor de rianodina; NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sarcolemal; PLB ser 16: fosfolambam serina 16; PLB thr 17: fosfolambam treonina 17; SERCA2a: bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático; CSQ: calsequestrina e PLB: Fosfolambam total.

4. DISCUSSÃO

4.1 Momento inicial da obesidade

Pesquisadores que utilizam modelo experimental de obesidade por dieta não identificam o momento da diferença entre os grupos estudados, em relação ao tecido adiposo; apenas mostram quando a dieta promove diferença no peso corporal entre os grupos, e não identificam se o aumento da massa corporal está associado à elevação do índice de adiposidade ^(67,68). Neste estudo a dieta hiperlipídica acarretou obesidade a partir da 3ª semana de tratamento; o peso corporal foi maior nos animais Ob em relação ao C. Pesquisas anteriores mostraram que o aumento do peso corporal está associado a elevação da gordura corporal total ^(21,47).

4.2 Constituição dos grupos controle e obeso

Modelos experimentais de obesidade são utilizados para mostrar o efeito do excesso de tecido adiposo sobre diferentes órgãos. Em experimentos biológicos não é assegurado uma resposta homogênea; por essa razão em “MATERIAL E MÉTODOS” foi descrito um critério de classificação dos grupos com o objetivo de identificar os animais que se tornaram verdadeiramente obesos. Após o uso desse critério foram descartados 7 animais do grupo controle resultando em C=18 e 6 ratos do grupo obeso originando Ob=19. A aplicação deste método possibilitou grupos mais homogêneos em relação ao grau de adiposidade. Estes resultados obtidos são similares aos publicados anteriormente por nosso grupo ^(21,35,69).

4.3 Dieta hiperlipídica e perfil nutricional

A dieta hiperlipídica utilizada foi rica em ácidos graxos saturados láurico (30%), mirístico (11%) e palmístico (12%) (Anexo 1), com alto teor energético de 3,85 Kcal/g, quando comparado com a normolipídica, 3,10 Kcal/g. A dieta foi eficiente em promover obesidade, pois o peso, a gordura corporal total e o índice de adiposidade dos animais obesos foram significativamente maiores do que os controles; estes dados estão de acordo com alguns autores ^(22,35,47).

A dieta hiperlipídica promove menor saciedade e consequentemente maior ingestão alimentar, porém, neste estudo a ingestão foi menor no grupo obeso em relação ao controle ⁽⁷⁰⁻⁷²⁾. Esse experimento mostra que embora animais obesos tenham ingerido menor quantidade de alimento ou semelhantes calorias, é possível mesmo com igual quantidade de ingestão alimentar e calórica, ocorrer obesidade ⁽¹⁸⁾. Dietas com alta quantidade de gordura podem aumentar a eficiência alimentar devido ao baixo efeito térmico dos lipídios para serem metabolizados ⁽¹⁸⁾. Os ácidos graxos que não são utilizados para produção de energia, são depositados na forma de triglicerídeos nos adipócitos.

4.4 Comorbidades

A obesidade pode acarretar comorbidades cardiovasculares, metabólicas e hormonais, como referido anteriormente no item MATERIAL E MÉTODOS. O teste

de tolerância à glicose mostrou que os animais obesos apresentaram áreas glicêmicas maiores que os ratos controle; além disso, também foram aumentados os níveis séricos de insulina e HOMA-IR, mostrando que a obesidade promoveu intolerância a glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina.

A insulina possui papel fundamental na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios, aumentando a síntese e atenuando a liberação de triglicerídeos das células adiposas. A resistência à ação da insulina ocorre quando os níveis circulantes normais deste hormônio são insuficientes para regular o processo de captação de glicose pela célula ⁽⁷³⁾. Nesta condição, as células β do pâncreas tendem a secretar quantidades maiores de insulina, hiperinsulinemia, aumentando a captação de glicose, procurando evitar a hiperglicemia ⁽⁷⁴⁾. A resistência à ação da insulina pode ser provocada por modificações nos receptores, na afinidade e na via de sinalização da insulina ⁽⁷⁵⁾. Os resultados desse estudo estão de acordo com diversos autores ^(21,35,76–78).

A dislipidemia observada neste estudo foi caracterizada pelos níveis elevados de TG, LDL, CT e NEFA. O aumento do TG foi, provavelmente, devido a maior ingestão alimentar desse lipídio, desde que as dietas hiperlipídica contem aproximadamente 95% de triglicérides ^(79,80). Santos et al enfatiza que a ingestão de ácidos graxos saturados está fortemente correlacionada com os níveis de colesterol ⁽⁸¹⁾. Os ácidos graxos saturados, na sua maioria, aumentam os níveis séricos das

lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (LDL) ^(82,83). O aumento do NEFA do rato obeso pode estar associado com a maior capacidade de liberação ou menor capacidade de captação dos ácidos graxos pelos adipócitos. Os resultados estão em concordância com pesquisadores ^(35,78).

Nesse trabalho os ratos obesos apresentaram hiperleptinemia. A leptina é secretada por adipócitos e age no sistema nervoso central modulando a ingestão alimentar, o balanço energético e a oxidação de lipídios ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾. As concentrações de leptina estão correlacionadas com a gordura corporal, influenciando tanto a lipogênese quanto a lipólise ⁽⁷²⁾. Após a sua produção, a leptina é excretada para a corrente sanguínea, cruza a barreira hemato-encefálica, através de um transporte ativo, e no cérebro estimula ou inibe a liberação de vários neurotransmissores, diminuindo o apetite e aumentando o gasto energético estimulando o sistema nervoso simpático ^(87,88). A hiperleptinemia, encontrada em pessoas obesas, é atribuída a alterações no receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hemato-encefálica, fenômeno denominado resistência à leptina ^(85,89,90,87). O aumento da leptina nos ratos obesos está de acordo com a literatura ^(21,35,76,78).

Nesse trabalho foi constatado aumento na PAS do grupo obeso, o que difere de pesquisas com animais obesos por dieta hiperlipídica ^(22,47). Os mecanismos responsáveis pela alteração da pressão arterial incluem a hiperatividade do sistema

nervoso simpático, aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS) e estresse oxidativo, que pode resultar em vasoconstrição periférica, aumento da reabsorção renal de sódio e melhoria da função cardíaca. Essa suposição encontra suporte na literatura que mostra que a obesidade está associada com aumento dos níveis das catecolaminas, sistema renina-angiotensina-aldosterona e presença do stress oxidativo ^(16,27,50,67,91).

A análise macroscópica *post mortem* mostrou que os animais não desenvolveram remodelação cardíaca avaliada pelos pesos dos ventrículos e átrios, e a suas relações com a tíbia. Esses dados estão de acordo com o trabalho de Tomaz et al ⁽⁷⁶⁾, e em discordância com outros autores como Lima-Leopoldo et al ⁽²¹⁾. Entretanto, é importante ressaltar nos trabalhos citados anteriormente, que a obesidade foi induzida por ácidos graxos insaturados. Embora existam discordâncias dos dados, Oliveira-Júnior e et ⁽¹⁹⁾ observaram que ratos obesos, por dieta hiperlipídica insaturada (70%) e saturada (30%) por 20 semanas, apresentaram aumento do volume do núcleo, e não alteração do tamanho do cardiomiócito; esses investigadores mostraram que houve uma associação entre a variação do tamanho nuclear e a taxa de gordura saturada.

O principal objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da obesidade por dieta saturada sobre a quantidade de proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio. Os resultados da análise estatística dos dados mostram que não foi possível constatar

diferenças significantes entre os grupos controles e obesos. Os níveis descritivos dos testes realizados indicam que a obesidade pode promover efeito diferenciado sobre a expressão das proteínas estudadas. Para algumas variáveis foram destacados os valores de p ; por exemplo, o do Canal L que apresentou um $p=0,10$, que embora não significante, foi muito inferior em relação ao da PLB, que expressou um $p=0,71$. Enquanto o Canal L mostrou uma variação absoluta de 0,3, correspondente a uma redução de 30% do obeso em relação ao controle, a PLB teve uma queda de 4%. Essa diferença de comportamento das proteínas sugere que as adipocinas ou as comorbidades produzidas pelo tecido adiposo atuam, biologicamente, de maneira diferenciada sobre as proteínas analisadas. A revisão bibliográfica não adicionou informações que permitem avaliar qual(ais) seria(m) o(s) possível(is) mediador(es), que ativaria(m) o(s) fator(es) transcricional(is) responsável(is) pela síntese proteica, o que possibilitaria inferir a razão da diferença de comportamento desses polipeptídios. É importante lembrar que as concentrações das proteínas são resultantes da produção e degradação; portanto não podemos afastar que a postura dos valores relativos observados podem não ter sido somente consequente à síntese, mas também há um processo de degradação, mais evidente em determinados polipeptídios. Em razão do comportamento diferenciado das proteínas frente à obesidade, pode-se inferir que o controle da produção e/ou da degradação dos polipeptídios nesta patologia, é possivelmente diferenciado em

relação a cada uma das proteínas estudadas. Esses achados abrem perspectivas de futuros estudos, no sentido de visualizar os fatores envolvidos no controle transcricional das proteínas ou na degradação, o que poderia ajudar na compreensão do metabolismo proteico.

Os dados da literatura são restritivos no estudo da relação obesidade por dieta saturada-coração-proteínas do trânsito de cálcio. Relling et al ⁽¹⁸⁾ utilizando ratos Sprague–Dawley submetidos a uma dieta hiperlipídica observou aumento da expressão proteica SERCA2a, PLB e diminuição da PLB fosforiladas; esses autores não especificaram o tipo de dieta utilizada, saturada ou insaturada. Lima-Leopoldo et al ⁽²¹⁾, utilizando dieta hiperlipídica insaturada por 30 semanas em ratos *Wistar*, constataram diminuição da PLB ser 16 e não encontraram alterações da SERCA2a, Canal L, PLB, PLB thr 17 e CSQ. Esses trabalhos se contrapõem ao de Freire et al ⁽³⁵⁾ que, usando a mesma metodologia, não observaram alteração na PLB ser 16. Dincer et al ⁽⁹²⁾ analisando cães apresentando síndrome metabólica em condição pré-diabética resultante de uma ração canina industrializada e enriquecida com banha de porco não encontraram diferenças significativas na RYR e RYR fosforilada. Lin et al ⁽⁹³⁾ encontraram redução do canal L em ratos Zucker obesos. Minhas et al ⁽⁵⁷⁾ encontraram um aumento da SERCA2a e diminuição da PLB fosforilada nas proteínas envolvidas no acoplamento excitação-contração de Ca^{2+} em camundongos *ob/ob*.

5. CONCLUSÃO

Os resultados desse trabalho mostram que a obesidade por dieta hiperlipídica saturada não promove alteração significativa nos níveis das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico, contrariando a hipótese do trabalho.

6. REFERÊNCIAS

1. Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res*. 2007 Aug;101(4):335–47.
2. Mathew B, Patel SB, Reams GP, Freeman RH, Spear RM, Villarreal D. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. *Am J Med Sci*. 2007 Jul;334(1):23–30.
3. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. *Circulation*. 2002 Jun;105(24):2923–8.
4. O'Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg*. 2002 Dec;184(6B):4S–8S.
5. Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation*. 2004 Nov;110(19):3081–7.
6. World Health Organization. Obesity and overweight. Geneva:WHO. [Access: 5/12/2014]. Available from: <http://www.who.int>.
7. Monteiro CA, Mondini L, de Souza AL, Popkin BM. The nutrition transition in Brazil. *Eur J Clin Nutr*. 1995 Feb;49(2):105–13.
8. Francischi RPP de, Pereira LO, Freitas CS, Klopfer M, Santos RC, Vieira P, et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Rev Nutr*. 2000 Apr;(1):17-29.
9. BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro; 2010.
10. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 May;26(5):968–76.
11. Rolls BJ, Shide DJ. The influence of dietary fat on food intake and body weight. *Nutr Rev*. 1992 Oct;50(10):283–90.
12. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Jun;89(6):2522–5.
13. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM*. 2006 Sep;99(9):565–79.

14. Tchernof A. The visceral adipocyte and cardiometabolic risk factors. *International Chair on Cardiometabolic Risk*. 2008 Jan; 1(1):10-13.
15. Raman RP. Obesity and health risks. *J Am Coll Nutr*. 2002 Apr;21(2):134S-139S.
16. Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006 Mar;15(2):173–8.
17. Tavares TB, Nunes SM, Santos MDO. Obesidade e qualidade de vida: revisão da literatura. *Med Minas Gerais* 2010 Aug; 20(3):359–66.
18. Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*. 2006 Mar;24(3):549–61.
19. Oliveira Junior SA, Padovani CR, Rodrigues SA, Silva NR, Martinez PF, Campos DH, et al. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. *Cardiovasc Diabetol*. 2013 Jan;12(65):1-10.
20. Pardo Silva MC, De Laet C, Nusselder WJ, Mamun AA, Peeters A. Adult obesity and number of years lived with and without cardiovascular disease. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Jul;14(7):1264–73.
21. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, da Silva DCT, do Nascimento AF, de Campos DHS, Luvizotto R a M, et al. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation at serine-16 without affecting calcium handling. *J Appl Physiol*. 2014 Sep;117(6):669–78.
22. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RAM, et al. Myocardial dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arq Bras Cardiol*. 2011 Sep;97(3):232–40.
23. Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, et al. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca²⁺ handling. *Braz J Med Biol Res*. 2008 Jul;41(7):615–20.
24. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 1994 Apr 15;476(2):279–93.
25. Knollmann BC, Roden DM. A genetic framework for improving arrhythmia therapy. *Nature*. 2008 Feb 21;451(7181):929–36.
26. De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Júnior SA de O, et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca²⁺ channels. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009 Jun;87(6):426–31.

27. Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Nov;31(11):1652–9.
28. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002 Jan 10;415(6868):198–205.
29. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983 Jul;245(1):C1–14.
30. Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2005 Dec;68(3):366–75.
31. Opie LH. Myocardial contraction and relaxation. In: Opie LH. *The Heart. Physiology from cell to circulation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.209-31.
32. Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem*. 2007 Jan;45:523–37.
33. Kiss E, Ball NA, Kranias EG, Walsh RA. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase protein levels. Effects on Ca2+ transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res*. 1995 Oct;77(4):759–64.
34. Tsutsui H, Ishibashi Y, Imanaka-Yoshida K, Yamamoto S, Yoshida T, Sugimachi M, et al. Alterations in sarcoplasmic reticulum calcium-storing proteins in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol*. 1997 Jan;272(1 Pt 2):H168–75.
35. Freire PP, Alves CAB, de Deus AF, Leopoldo APL, Leopoldo AS, da Silva DCT, et al. Obesity does not lead to imbalance between myocardial phospholamban phosphorylation and dephosphorylation. *Arq Bras Cardiol*. 2014 Jul;103(1):41–50.
36. Marmot MG, Syme SL, Kagan A, Kato H, Cohen JB, Belsky J. Epidemiologic studies of coronary heart disease and stroke in Japanese men living in Japan, Hawaii and California: prevalence of coronary and hypertensive heart disease and associated risk factors. *Am J Epidemiol*. 1975 Dec;102(6):514–25.
37. Lima fel de, Menezes TN, Tavares MP, Szarfarc SC, Flsberg RM. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Rev Nutr*. 2000 Aug;13(2):73-80.
38. Castro LCV, Franceschini S do CC, Priore SE, Pelúzio M do CG. Nutrição e doenças cardiovasculares: os marcadores de risco em adultos. *Rev Nutr*. 2004 Sep;17(3):369–77.

39. Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN, et al. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006 Jul;291(1):H38–44.
40. Dyntar D, Eppenberger-Eberhardt M, Maedler K, Pruschy M, Eppenberger HM, Spinas GA, et al. Glucose and palmitic acid induce degeneration of myofibrils and modulate apoptosis in rat adult cardiomyocytes. *Diabetes*. 2001 Sep;50(9):2105–13.
41. Hickson-Bick DLM, Sparagna GC, Buja LM, McMillin JB. Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002 Feb;282(2):H656–64.
42. Jeckel KM, Miller KE, Chicco AJ, Chapman PL, Mulligan CM, Falcone PH, et al. The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. *Lipids Health Dis*. 2011 Jan;10:92.
43. Jalili T, Manning J, Kim S. Increased translocation of cardiac protein kinase C beta2 accompanies mild cardiac hypertrophy in rats fed saturated fat. *J Nutr*. 2003 Feb;133(2):358–61.
44. Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health; 1985.
45. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RAM, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008 Aug;52(6):968–74.
46. Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics*. 1996 Jun;34(3):389–98.
47. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, do Nascimento AF, de Campos DHS, Luvizotto R de AM, et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2a in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol*. 2011 Nov;226(11):2934–42.
48. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli ELB, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res*. 2008 Jan;41(3):253–9.
49. Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am J Hypertens*. 2005 May;18(5 Pt 1):692–8.
50. Smith AD, Brands MW, Wang M-H, Dorrance AM. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006 Mar;231(3):282–7.

51. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract.* 1996 Mar;31(1-3):27–35.
52. Naderali EK, Brown MJ, Pickavance LC, Wilding JP, Doyle PJ, Williams G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin Sci (Lond).* 2001 Nov;101(5):499–506.
53. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension.* 2000 Apr;35(4):1009–15.
54. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985 Jul;28(7):412–9.
55. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia.* 2005 Jun;48(6):1229–37.
56. Li S-Y, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia.* 2006 Jun;49(6):1434–46.
57. Minhas KM, Khan SA, Raju SVY, Phan AC, Gonzalez DR, Skaf MW, et al. Leptin repletion restores depressed {beta}-adrenergic contractility in ob/ob mice independently of cardiac hypertrophy. *J Physiol.* 2005 Jun 1;565(Pt 2):463–74.
58. Pascual M, Pascual DA, Soria F, Vicente T, Hernández AM, Tébar FJ, et al. Effects of isolated obesity on systolic and diastolic left ventricular function. *Heart.* 2003 Oct;89(10):1152–6.
59. Iacobellis G, Ribaudo MC, Leto G, Zappaterreno A, Vecci E, Di Mario U, et al. Influence of excess fat on cardiac morphology and function: study in uncomplicated obesity. *Obes Res.* 2002 Aug;10(8):767–73.
60. Schram K, Sweeney G. Implications of myocardial matrix remodeling by adipokines in obesity-related heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2008 Aug;18(6):199–205.
61. Sharma S, Adroque J V, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J.* 2004 Nov;18(14):1692–700.
62. Bueno CR, Ferreira JCB, Pereira MG, Bacurau AVN, Brum PC. Aerobic exercise training improves skeletal muscle function and Ca²⁺ handling-related

- protein expression in sympathetic hyperactivity-induced heart failure. *J Appl Physiol*. 2010 Sep;109(3):702–9.
63. Rolim NPL, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, et al. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics*. 2007 May;29(3):246–52.
 64. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May, 72:248–54.
 65. Norman GR, Streiner DI. *Biostatistics: the bare essentials*. St. Louis: Mosby; 1994.
 66. Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc* 1977;72:469-78.
 67. Boustany CM, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005 Jul;289(1):R181–6.
 68. Levin BE, Triscari J, Sullivan AC. Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity in rat. *Am J Physiol*. 1983 Mar;244(3):R347–55.
 69. Campos DHS de, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF do, Oliveira-Junior SA de, Silva DCT da, et al. Obesity Preserves Myocardial Function During Blockade of the Glycolytic Pathway. *Arq Bras Cardiol*. 2014 Sep 103(4):330-7.
 70. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006 Jul;48(1):65–72.
 71. Dourmashkin JT, Chang G-Q, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes (Lond)*. 2005 Nov;29(11):1368–78.
 72. Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr*. 2000 Feb;71(2):438–42.
 73. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest*. 2000 Jul;106(2):165–9.
 74. Jellinger PS. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone*. 2007 Jan;8 Suppl 7:S30–42.
 75. Field CJ, Ryan EA, Thomson AB, Clandinin MT. Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism

- in adipocytes from control and diabetic animals. *J Biol Chem*. 1990 Jul;265(19):11143–50.
76. Silva DCT da, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Campos DHS de, Nascimento AF do, Oliveira Junior SA de, et al. Influence of Term of Exposure to High-Fat Diet-Induced Obesity on Myocardial Collagen Type I and III. *Arq Bras Cardiol*. 2014 Feb; 102(2):157–64.
 77. Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*. 2009 Jun;52(6):1133–42.
 78. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DCT, Nascimento AF do, Campos DHS de, Luvizotto R de AM, et al. Influence of Long-Term Obesity on Myocardial Gene Expression. *Arq Bras Cardiol*. 2013 Mar;100(3):229-37.
 79. Djoussé L, Pankow JS, Eckfeldt JH, Folsom AR, Hopkins PN, Province MA, et al. Relation between dietary linolenic acid and coronary artery disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr*. 2001 Nov;74(5):612–9.
 80. Dewailly E E, Blanchet C, Gingras S, Lemieux S, Sauvé L, Bergeron J, et al. Relations between n-3 fatty acid status and cardiovascular disease risk factors among Quebecers. *Am J Clin Nutr*. 2001 Nov;74(5):603–11.
 81. Santos TM. Lipídios. In: Dutra-de Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências nutricionais*. São Paulo: Sarvier; 1998. p. 87-97.
 82. Mustad VA, Etherton TD, Cooper AD, Mastro AM, Pearson TA, Jonnalagadda SS, et al. Reducing saturated fat intake is associated with increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women. *J Lipid Res*. 1997 Mar;38(3):459–68.
 83. Estadella D, da Penha Oller do Nascimento CM, Oyama LM, Ribeiro EB, Dâmaso AR, de Piano A. Lipotoxicity: effects of dietary saturated and transfatty acids. *Mediators Inflamm*. 2013 Jan, 2013:1-14.
 84. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med*. 2002 Jan;53:319–36.
 85. Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res*. 2007 Sep;101(6):545–59.
 86. Nascimento AF, Luvizotto RAM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Seiva FR, Justulin LA, et al. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci*. 2011 Jun;88(23-24):1031–8.
 87. Romero CEM, Zanesco A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. *Rev Nutr*. 2006 Feb;19(1):85-91.

88. Hall JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Kuo J, Fitzgerald S. Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Braz J Med Biol Res.* 2000 Jun;33(6):605–18.
89. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 1996 Sep;98(5):1101–6.
90. Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell.* 2001 Feb 23;104(4):531–43.
91. Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Nicotera A, Parisi E, Di Rosa G, et al. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *Int J Mol Sci.* 2014 Jan;16(1):378–400.
92. Dincer UD, Araiza A, Knudson JD, Shao CH, Bidasee KR, Tune JD. Dysfunction of cardiac ryanodine receptors in the metabolic syndrome. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Jul;41(1):108–14.
93. Lin Y-C, Huang J, Kan H, Castranova V, Frisbee JC, Yu H-G. Defective calcium inactivation causes long QT in obese insulin-resistant rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012 Feb;302(4):H1013–22.

7-ANEXO

Anexo 1. Perfil de ácidos graxos (%)

Ácidos graxos	Rações	
	Normolipídica	Hiperlipídica
Capróico (c6:0)	0,11	0,13
Caprílico (c8:0)	1,99	2,18
Cáprico (c10:0)	2,12	2,32
Undecanoico (c11:0)	0,02	0,02
Láurico (c12:0)	30,81	33,73
Tridecanoico (c13:0)	0,04	0,04
Mirístico (c14:0)	11,06	12,10
Pentadecanoico (c15:0)	0,01	0,00
Palmítico (c16:0)	11,95	11,18
Heptadecanóico (c17:0)	0,04	0,02
Esteárico (c18:0)	2,89	2,66
Araquídico (c20:0)	0,24	0,22
Behênico (c22:0)	0,12	0,12
Tricosanóico (c23:0)	0,02	0,01
Lignocérico (c24:0)	0,08	0,07
Palmitoléico (c16:1)	0,04	0,02
Heptadecenoico (c17:1)	0,02	0,01
Oléico (c18:1n7)	19,48	20,71
Cis-vacênico (c18:1n7)	0,49	0,33
Linoléico (c18:2n6)	16,69	12,95
α -Linolênico (c18:3n3)	1,67	1,05
Eicosanoico (c20:1n9)	0,10	0,11
Ácidos Graxos Saturados	61,52	64,81
Ácidos Graxos Insaturados	38,48	35,19