

UNESP **Universidade Estadual Paulista**
 “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Medicina de Botucatu

**INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DAS
METALOPROTEINASES 2 E 9 NA DIMINUIÇÃO DO
COLÁGENO TIPO I MIOCÁRDICO EM RATOS OBESOS**

Danielle Cristina Tomaz da Silva

BOTUCATU
2013

Danielle Cristina Tomaz da Silva

INFLUÊNCIA DA ATIVIDADE DAS
METALOPROTEINASES 2 E 9 NA DIMINUIÇÃO DO
COLÁGENO TIPO I MIOCÁRDICO EM RATOS OBESOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em “Fisiopatologia em Clínica Médica” da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista, para obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Cardiologia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

**BOTUCATU
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Silva, Danielle Cristina Tomaz da.

Influência da atividade das metaloproteinases 2 e 9 na diminuição do colágeno tipo I miocárdico em ratos obesos / Danielle Cristina Tomaz da Silva.
– Botucatu : [s.n.], 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Antonio Carlos Cicogna

Capes: 40101002

1. Obesidade. 2. Dietas. 3. Coração – Doenças. 4. Colágeno. 5. Rato como animal de laboratório. 6. Lipídios – Distúrbios do metabolismo.

Palavras-chave: Colágeno tipo I; Coração; Dieta hiperlipídica insaturada; MMP-2; MMP-9; Obesidade; Rato.

*O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;
é quem faz as verdadeiras perguntas.*

(Claude Lévi-Strauss)

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

*Aos meus pais, **Luiz Marcos e Maria José**, primeiros a lançarem as sementes do respeito e da educação, sempre me ensinando os valores e os princípios que conduzem a minha vida. O amor de vocês me fortalece e me dá segurança para seguir em frente! Tudo o que sou e conquisto, devo a vocês!*

*A minha irmã, **Aninha**, companheira e cúmplice, que sempre está ao meu lado, me apoiando com muito amor e carinho. Você é essencial na minha vida!*

*Ao meu namorado, **Renato**, “...luz aos meus olhos e chão aos meus pés...” pela nobreza de caráter, sempre carinhoso, companheiro e compreensivo. Te amo!*

*Aos meus queridos avós, **Luiz Romualdo** (in memoriam) e **Júlia, Belmiro** (in memoriam) e **Josefa**, sinônimos de amor, dedicação e segurança.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Jesus, por me dar força interior para superar as dificuldades da vida, mostrando sempre os melhores caminhos a seguir nas horas incertas.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, pela competência na orientação, respeito, dedicação, paciência, por acreditar na minha capacidade e pelos valiosos ensinamentos. O senhor foi fundamental no meu amadurecimento científico e pessoal.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, pela disponibilidade e competência. Muito obrigada pela atenção e auxílio nos momentos necessários.

Aos queridos amigos Loreta, Fernanda, Maria Teresa e Dijon, sempre dispostos e prontos a ajudar no que é preciso. Vocês foram essenciais na finalização deste trabalho. Obrigada!

Aos companheiros do grupo “Cicogna”, Adriana, Carlos, Paulinha, Dani Vileigas, Carol Adorni, Carol Mazeto, André, Ana Paula, Nascimento e Sílvio, por dividirem comigo todas as alegrias e angústias, comemorando ou buscando soluções.

A amiga Beatriz, “companheira de biotério”, pelas conversas agradáveis que tivemos e pela amizade construída. Períodos difíceis vividos com muita alegria.

As amigas do Laboratório de Eletroforese, Priscila, Andrea e Bruna pelos ensinamentos e auxílios na técnica de Zimografia.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Clínica Médica, Regiane, Miriane, Renata, Sandro, Aline, Camila Bonomo, Paula, Luana, Camila Moreno, Rodrigo, Marcelo e Ricardo. Obrigada pela amizade e pelos momentos de descontração vividos dia a dia.

As Profas. Dras. Maeli Dal Pai e Bertha Furlan Polegato, pela atenção e valiosas sugestões prestadas na qualificação.

Aos amigos e funcionários do Laboratório Experimental de Clínica Médica, José Carlos Georgette, Marcellê, Elizete, Mário, Sueli, Camila, Corina, Elenize, Renata, José Aparecido, Ângelo, Rogério, De Lalla, Diego, Eduardo, pela agradável convivência, colaboração e amizade conquistada.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Médica, Ana Maria Mengue, Mario Augusto Dallaqua, Bruno José Fajiolli, Alexandre Luis Loureiro, Laura Andrade Câmara, Renato Borges Pereira, Elisângela Aparecida da Silva Pilan, por todos os auxílios prestados.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação, Regina Célia Spadin, Andrea P. Longo Devidé, Diego C. Bovolim de Oliveira, Lílian C. Nadal Bianchi, Janete Ap. Herculano Nunes Sieva, Márcia Ferreira de Freitas Quadros, 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 e por viabilizar a realização deste estudo. Muito obrigada!

A todos, que de forma direta ou indireta, colaboraram para a concretização deste trabalho. Muito obrigada!

*“Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo ...
qualquer um pode recomeçar agora e
fazer um novo fim !”*

(Chico Xavier)

RESUMO

A obesidade, doença crônica metabólica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em relação à massa magra tecidual, é considerada uma epidemia global e um importante problema de saúde pública, que afeta tanto países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos. O adipócito recebe influência de diversas substâncias e secreta inúmeros peptídeos, como leptina, angiotensina I e II, TGF- β , entre outros, que atuam diretamente ou indiretamente no sistema cardiovascular. Assim, o tecido adiposo não é simplesmente um reservatório de energia, mas um ativo órgão endócrino, parácrino e autócrino com múltiplas funções, capaz de sintetizar e liberar mediadores que participam de diversos processos biológicos, incluindo os que ocorrem no coração. O coração é composto por miócitos, nervos, vasos e matriz extracelular. O principal componente da matriz é o colágeno, com predomínio dos tipos I e III, sendo que, o tipo I é o mais abundante, correspondendo a aproximadamente 80% do colágeno total miocárdico. O colágeno é produzido, principalmente, pelos fibroblastos e degradado pelas metaloproteinases (MMPs). O colágeno, em situação estável, contribui para a manutenção da arquitetura e função cardíaca; entretanto, em resposta a estímulos desencadeados por agentes neuro-hormonais e/ou mecânicos, pode sofrer alterações; esta mudança pode ser resultante do aumento da síntese e/ou diminuição da degradação ou vice-versa. Em pesquisa recente realizada em nosso laboratório foi encontrado diminuição dos níveis protéicos de colágeno tipo I miocárdico em ratos *Wistar* obesos, por dieta hiperlipídica insaturada por 30 semanas, em relação ao grupo controle. Em razão, dos resultados encontrados em nosso laboratório e da literatura mostrar que a leptina aumenta a atividade das MMP-2 e a síntese da expressão gênica da MMP-9, a proposta deste estudo foi testar a hipótese que a redução do colágeno tipo I miocárdico está associada ao aumento da atividade das MMPs 2 e 9 em ratos obesos por dieta hiperlipídica insaturada. Ratos *Wistar* machos, com 30 dias, foram randomizados em dois grupos: controle(C; n=25) e obeso (Ob; n=25). Os ratos C receberam ração padrão para roedores e os Ob um ciclo de quatro rações hiperlipídicas por 30 semanas. A obesidade foi definida pelo índice de adiposidade, calculada pela somatória dos depósitos epididimal, retroperitoneal e visceral. Foram avaliados os perfis nutricionais e metabólicos. O processo de remodelação cardíaca foi analisado por meio de estudos estruturais e moleculares; a hipertrofia foi avaliada *post mortem* por análise macroscópica e a molecular foi realizada por meio de análises do colágeno tipo I, leptina e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) através da técnica de Western Blot e a

atividade das MMP-2 e 9 por Zimografia. Os dados foram expressos por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade e submetidos ao teste "t" de Student para amostras independentes, com exceção da evolução semanal do peso corporal entre os grupos que foi realizada pela análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni. As associações entre determinadas variáveis analisadas foram realizadas pelo teste de correlação de Pearson. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%. Os animais Ob apresentaram peso corporal final, gordura corporal total e índice de adiposidade maiores em relação ao C. Foram visualizadas algumas comorbidades frequentemente associadas com a obesidade experimental, como intolerância a glicose, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipertensão arterial sistêmica. A obesidade promoveu diminuição da expressão proteica do colágeno tipo I, dos TIMPs 1 e 2, aumento da atividade das MMPs 2 e 9 e da leptina cardíaca. A análise de associação mostrou correlação significativa entre colágeno tipo I e MMP-2, colágeno tipo I e MMP-9, MMP-2 e leptina, MMP-9 e leptina, TIMPs 1,2 e MMP-2, MMP-9 e TIMP 1, e TIMP 1 e leptina. Em conclusão, a hipótese deste trabalho foi confirmada, pois a redução do colágeno tipo I cardíaco está associada ao aumento da atividade das MMPs 2 e 9 em ratos obesos por dieta hiperlipídica insaturada.

Palavras-chave: obesidade, dieta hiperlipídica insaturada, colágeno tipo I, MMP-2, MMP-9, coração, rato.

ABSTRACT

Obesity is a chronic metabolic disorder characterized by excessive adipose tissue accumulation in relation to lean tissue. Currently, it is a global epidemic and a major public health problem that affects both developed as well as undeveloped countries. The adipocyte receives influence of several substances and secretes numerous peptides, such as leptin, angiotensin I and II, TGF- β , among others, that act directly or indirectly on the cardiovascular system. Thus, adipose tissue is not simply an energy reservoir, but an active endocrine, paracrine and autocrine organ with multiple functions, able to synthesize and release mediators that participate in many biological processes, including those that occur in the heart. The heart is composed of myocytes, nerves, vessels and extracellular matrix. The main component of matrix is collagen, predominantly type I and III, being type I the most abundant, corresponding to approximately 80% of total myocardial collagen. Collagen is mainly produced by fibroblasts and degraded by metalloproteinases (MMPs). Collagen, in a stable condition, contributes to the maintenance of cardiac architecture and function, however, in response to stimuli triggered by neuro-hormonal and/or mechanical agents, it may change, and this change can be due to increased synthesis and/or decreased degradation, or vice versa. In recent research conducted in our laboratory, we found decreased protein levels of myocardial type I collagen in obese Wistar rats by unsaturated high-fat diet for 30 weeks. Due to the results found in our laboratory and because the literature shows that leptin increases MMP-2 activity and MMP-9 gene expression, the purpose of this study was to test the hypothesis that the reduction of myocardial type I collagen is associated with increased MMPs 2 and 9 activities in obese rats by unsaturated high-fat diet. Thirty-day-old male Wistar rats were randomized into two groups: control (C; n=25) and obese (Ob; n=25). The C group was fed a standard diet and the Ob group was fed cycles of four high-fat diets for 30 weeks. Obesity was characterized by the adiposity index, calculated by the sum of the epididymal, retroperitoneal and visceral deposits. The nutritional and metabolic profiles were evaluated. The cardiac remodeling process was analyzed by structural and molecular studies; the hypertrophy was assessed post-death by macroscopic analysis and the molecular analysis of type I collagen, leptin and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) proteins expression was performed by Western Blot and the MMP-2 and 9 activities were performed by zymography. Data were expressed in mean \pm standard deviation and submitted Student's t-test for independent samples, except for the weekly evolution of body weight between groups

was performed by analysis of variance (ANOVA), complemented by Bonferroni's posthoc test. The associations between certain variables were performed by Pearson's correlation test. The significance level for all variables was 5%. The Ob animals showed increased final body weight, total body fat and adiposity index compared to C. Some comorbidities often associated with experimental obesity, such as glucose intolerance, hyperinsulinemia, hyperleptinemia and hypertension, were observed. Obesity promoted reduction of type I collagen, and TIMPs 1 and 2 protein expression, and it increased the activity of MMPs 2 and 9 and cardiac leptin. The analysis of association showed significant correlation between type I collagen and MMP-2, type I collagen and MMP-9, MMP-2 and leptin, MMP-9 and leptin, TIMPs 1,2 and MMP-2, MMP-9 and TIMP 1, and TIMP 1 and leptin. In conclusion, the hypothesis of this study was confirmed as the reduction of type I collagen is associated with increased activity of MMPs 2 and 9 in obese rats by unsaturated high-fat diet.

Keywords: obesity, unsaturated high-fat diet, type I collagen, MMP-2, MMP-9, heart, rat.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Composição de macro e micronutrientes das rações (%).....	23
Quadro 2 - Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%).....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Eventos intra e extracelulares envolvidos na formação da fibrila de colágeno....	19
Figura 2 - Evolução semanal do peso corporal.....	35
Figura 3 - Pressão arterial sistólica final.....	38
Figura 4 - Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose.....	38
Figura 5 - Níveis séricos de insulina.....	39
Figura 6 - Níveis séricos de leptina.....	39
Figura 7 - Expressão proteica do colágeno tipo I cardíaco.....	41
Figura 8 - Relação entre MMP-2 ativas(ativa e ativa intermediária) e inativa cardíaca.....	42
Figura 9 - Atividade da MMP-9 cardíaca.....	42
Figura 10 - Expressão proteica do TIMP 1 cardíaco.....	43
Figura 11 - Expressão proteica do TIMP 2 cardíaco.....	44
Figura 12 - Expressão proteica da leptina cardíaca.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil nutricional.....	37
Tabela 2 - Perfil morfológico cardíaco.....	40
Tabela 3 - Medida de associação linear entre as variáveis.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3. RESULTADOS.....	35
4. DISCUSSÃO.....	47
5. CONCLUSÃO.....	53
6. REFERÊNCIAS.....	54

1- INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica metabólica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em relação à massa magra tecidual. Atualmente é considerada uma epidemia global e importante problema de saúde pública, que afeta países desenvolvidos e subdesenvolvidos⁽¹⁻⁴⁾. O número de indivíduos com sobrepeso vem crescendo mundialmente, representando mais de um bilhão de pessoas, sendo que, mais de 30% desta população é obesa⁽⁵⁾. Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística⁽⁶⁾, aproximadamente 40 milhões de pessoas no Brasil apresentam sobrepeso e, deste grupo, 10,5 milhões são obesos. A previsão é que 35% da população adulta brasileira será obesa em 2025, refletindo-se no aumento de custos e cuidados para a saúde pública.

A obesidade está associada com o aumento do risco de mortalidade, redução na expectativa de vida⁽⁷⁻¹¹⁾ e numerosas co-morbidades como diabetes mellitus tipo II, resistência a insulina, dislipidemias e doenças respiratórias, digestivas, osteoarticulares, renais crônicas, psicológicas, ginecológicas, cânceres, inflamatórias e cardiovasculares^(5,12-14).

Os mecanismos fisiopatológicos que levam à obesidade podem ser desencadeados pela interação de diversos fatores, entre eles, genéticos, psicológicos e ambientais, como o sedentarismo e os hábitos alimentares. O aumento do consumo de energia, a diminuição do gasto energético ou a combinação de ambos têm levado a um balanço calórico positivo com aumento do peso corporal, conseqüente ao aumento do número e/ou tamanho dos adipócitos^(15,16).

O adipócito recebe influência de diversas substâncias, como insulina, cortisol, catecolaminas, glucagon, hormônios tireoidianos; e secreta inúmeros peptídeos, como leptina, renina, angiotensina I e II, TNF- α , TGF- β , entre outros, que atuam diretamente ou indiretamente no sistema cardiovascular. Assim, o tecido adiposo não é simplesmente um

reservatório de energia, mas um ativo órgão endócrino, parácrino e autócrino com múltiplas funções, capaz de sintetizar e liberar mediadores que participam de diversos processos biológicos, incluindo os que ocorrem no coração⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

O coração é composto por miócitos, nervos, vasos e matriz intersticial; o principal componente da matriz é o colágeno, com predomínio dos tipos I e III, sendo que, o tipo I corresponde aproximadamente à 80% do colágeno miocárdico total⁽²⁰⁾. O colágeno, em situação estável, contribui para a manutenção da arquitetura e função cardíaca⁽²¹⁾.

O colágeno é produzido principalmente pelos fibroblastos; para sua síntese (Figura 1), as cadeias polipeptídicas individuais de colágeno, denominadas de pré-pró-colágenos, sintetizadas pelos ribossomos, ligados às membranas do retículo endoplasmático (RE), são liberadas para o seu lúmen, denominados neste momento, de pró- cadeia α . Esses precursores não possuem somente pequenos peptídeos-sinal aminoterminais, necessários para direcionar o polipeptídeo nascente para o RE, mas também, aminoácidos adicionais denominados pró-peptídeos nas extremidades N e C terminais. No lúmen do RE, prolina e lisina selecionadas são hidroxiladas para formar hidroxiprolina e hidroxilisina, e algumas das hidroxilisininas são glicosiladas. Cada pró- cadeia α combina-se com outras duas para formar uma molécula helicoidal de três fitas, ligadas por pontes de hidrogênio, denominadas de pró-colágeno, que serão posteriormente secretadas para o meio extracelular. Após esta secreção, os pró-peptídeos das moléculas de pró-colágeno fibrilares são removidos por enzimas proteolíticas específicas, possibilitando a conversão das moléculas de pró-colágeno em moléculas de colágeno, as quais se reúnem no espaço extracelular para formar uma fibrila de colágeno bem maior; posteriormente, elas são reforçadas pela formação de ligações covalentes cruzadas, inter e intramolecular, entre as lisinas das moléculas de colágeno. A agregação das fibrilas de colágeno em feixes maiores, originam uma fibra de colágeno⁽²²⁾.

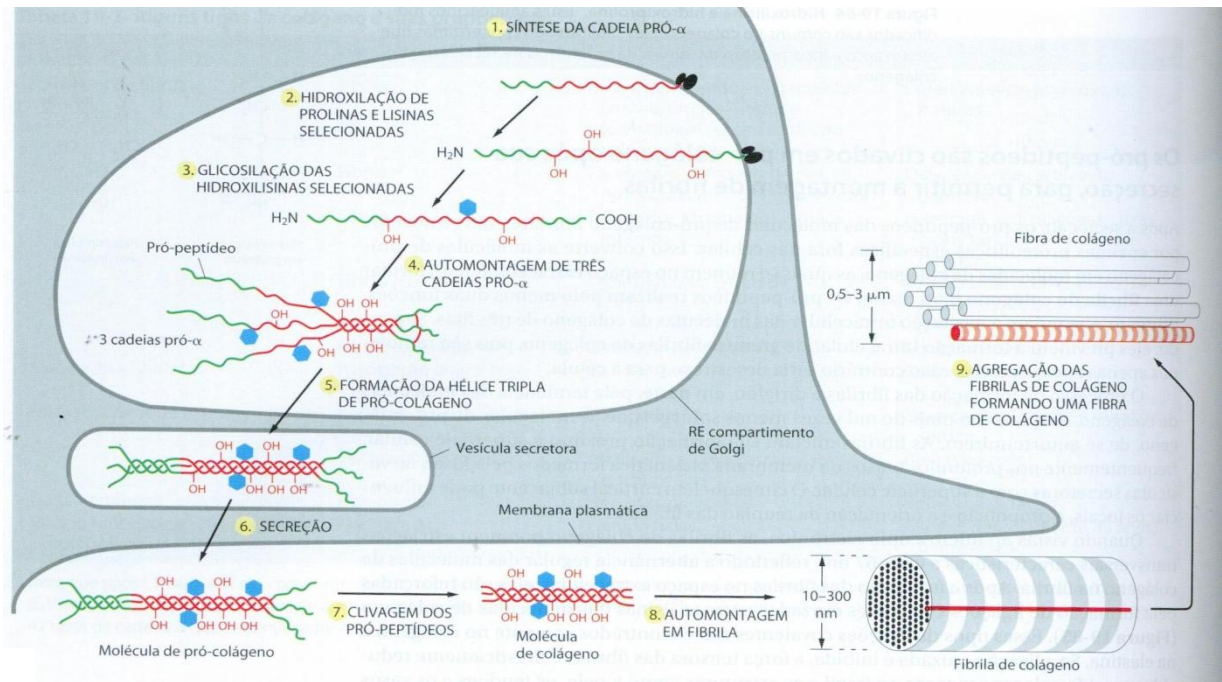


Figura 1: Eventos intra e extracelulares envolvidos na formação da fibrila de colágeno.
 Fonte: Adaptado de Alberts B.; 2010, p. 1188.

Os componentes da matriz extracelular são degradados por enzimas proteolíticas, denominadas proteases, que agem próximo às células produtoras destas proteínas. As enzimas mais abundantes são as metaloproteinases de matriz (MMPs), as quais dependem da ligação de Ca^{2+} ou Zn^{2+} para se tornarem ativas. Foram identificadas mais de 20 tipos diferentes de MMPs⁽²⁴⁾, as quais são classificadas em 5 grandes grupos de acordo com a especificidade do substrato e a sua homologia interna: colagenases (MMP- 1, 8, 13 e 18), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelinas (MMP - 3, 10 e 11), tipo-membrana (MT-MMP 1 a 4, 14 a 17) e a matrilisina (MMP- 7).

Vários mecanismos atuam para assegurar que a degradação dos componentes da matriz pelas MMPs sejam precisamente controlados; os principais são: ativação local, confinamento por receptores de superfície celular e secreção de inibidores, incluindo os inibidores de tecidos de metaloproteinases (TIMPs)⁽²²⁾. Há quatro tipos mais conhecidos de TIMPs: 1, 2, 3 e 4, dos quais o TIMP-1 e TIMP-2 são os mais caracterizados⁽²³⁾.

O colágeno, em resposta a estímulos desencadeados por agentes neuro-hormonais e/ou mecânicos, pode sofrer alterações^(21, 25-28); esta mudança pode ser resultante do aumento da síntese e/ou diminuição da degradação ou vice-versa. Diversos trabalhos têm analisados os colágeno tipo I e/ou III, em diferentes tecidos e modelos experimentais de obesidade⁽²⁹⁻³⁴⁾. Entretanto, há escassa informação sobre o comportamento desses tipos de colágeno no coração, em animais obesos por dieta hiperlipídica; estudo utilizando coelhos obesos por dieta hiperlipídica durante 12 semanas, observou aumento de colágeno tipo I e III cardíaco⁽³⁵⁾.

Em pesquisa recente realizada em nosso laboratório, Silva et al⁽³⁶⁾ mostraram que ratos *Wistar* obesos, por dieta hiperlipídica insaturada por 30 semanas, apresentaram menores níveis protéicos de colágeno intersticial tipo I miocárdico em relação ao grupo controle; os autores não encontraram alterações do colágeno III entre os grupos.

Em razão, dos resultados encontrados por Silva et al e da literatura mostrar que a leptina aumenta a atividade da MMP-2⁽³⁷⁻⁴⁰⁾ e a expressão gênica da MMP-9^(41,42), a proposta deste estudo foi testar a hipótese que a redução do colágeno tipo I miocárdico está associada ao aumento da atividade das MMPs 2 e 9 em ratos obesos por dieta hiperlipídica insaturada.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais

No presente estudo foram utilizados ratos *Wistar* machos, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento da Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos no biotério de origem sob 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”⁽⁴³⁾.

2.2- Protocolo Experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

Os ratos foram randomizados em dois grupos: tratados com dietas normocalórica (DN, n= 25) ou hipercalórica (DH, n= 25). Os ratos DN receberam ração padrão para roedores (RC Focus 1765, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil) e os DH ciclos de quatro rações hiperlipídicas (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil), que se sucederam de forma rotativa, por um período de 34 semanas. Os ratos DN e DH receberam 50 g de ração e após 24 horas a quantidade não ingerida foi mensurada. A oferta de água foi *ad libitum*.

As rações idealizadas no Laboratório Experimental de Músculo Papilar Isolado do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, foram adaptadas a partir de modelo dietético utilizado anteriormente pelo grupo⁽⁴⁴⁾.

2.2.1- Composição das rações padrão e hiperlipídica

A ração padrão RC Focus 1765 foi composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico. As quatro rações hiperlipídicas RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416 apresentaram a mesma composição nutricional, com exceção dos aditivos flavorizantes, queijo, bacon, chocolate ou baunilha, respectivamente; as rações foram constituídas de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplemento mineral e vitamínico.

A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hiperlipídica, mensurada pela empresa Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil, está apresentada no Quadro 1. O perfil dos ácidos graxos, avaliados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil, estão apresentados nos Quadros 2.

Quadro 1- Composição de macro e micronutrientes das rações (%)

Componentes	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Vitaminas e Minerais	11,3	12,1
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Calorias (Kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2

Quadro 2- Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%)

Ácidos graxos	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Capróico (c6:0)	0,00	0,02
Caprílico (c8:0)	0,03	0,03
Cáprico (c10:0)	0,02	0,05
Láurico (c12:0)	0,33	0,25
Mirístico (c14:0)	0,30	0,33
Palmítico (c16:0)	16,56	15,09
Heptadecanóico (c17:0)	0,02	0,08
Estearíco (c18:0)	3,90	4,36
Palmitoléico (c16:1)	0,06	0,15
Oléico (c18:1n9c)	27,96	37,94
Linoléico (c18:2n6c)	47,10	40,83
α-Linolênico (c18:3n3c)	3,72	0,87
Ácidos Graxos Saturados	21,16	20,21
Ácidos Graxos Insaturados	78,84	79,79

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 e glicose, lipídios e proteínas séricas. A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada dieta (g x kcal). Com a finalidade de analisar a capacidade de o animal converter a energia consumida em peso corporal, foi calculada a

eficiência alimentar (EA), 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). O índice de adiposidade foi calculado, dividindo-se a gordura corporal total pelo peso corporal final, multiplicado por 100⁽⁴⁵⁾. A quantidade de gordura corporal total foi determinada pela somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral. Para análise do perfil glicêmico, lipídico e protéico sérico, os ratos foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg/IP, Cristália® Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil) e eutanasiados por decapitação. A seguir, 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 glicose, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteínas de alta (HDL) e baixa (LDL) densidade e ácidos graxos livres não esterificados (NEFA) foram determinadas utilizando-se kits específicos (BIOCLIN®, Belo Horizonte, MG, Brasil) e analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Technicon, RA-XT™ System, Global Medical Instrumentation, Minnessota, USA). Os níveis de NEFA foram avaliados por kit colorimétrico (WAKO Pure Chemical Industries Ltd, Osaka, Japão).

2.4- Caracterização da obesidade

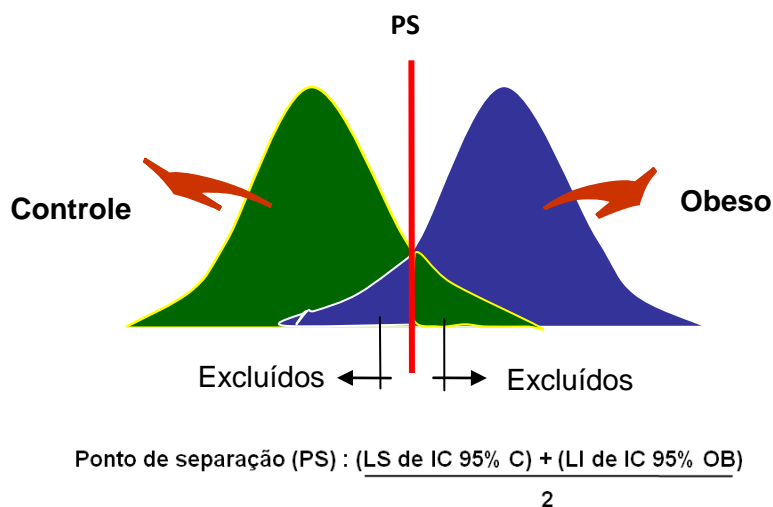
A obesidade foi caracterizada utilizando-se o índice de adiposidade. Diversos autores utilizam este índice para avaliar a quantidade de gordura corporal em roedores⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾. Este método é facilmente realizado e permite analisar os depósitos de gordura corporal de maneira precisa e consistente.

2.5- Determinação do momento inicial e final da obesidade

O momento do início da obesidade foi determinado a partir da aferição semanal do peso corporal dos animais. Quando foi observado aumento significativo do peso corporal no grupo DH em relação ao DN, foi considerado o início da obesidade. A partir deste momento, os grupos de animais DN e DH foram denominados grupos controle (C) e obeso (Ob), respectivamente; os grupos permaneceram recebendo as dietas por mais 30 semanas, quando foram eutanasiados. O momento inicial da obesidade foi adotada com base em estudos prévios do nosso grupo, no qual se verificaram que a diferença do peso corporal entre os grupos era resultante do maior índice de adiposidade nos ratos DH^(50,51).

2.6- Constituição dos grupos controle e obeso

Na experimentação biológica, em especial estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada uma homogeneidade de resposta. Neste sentido, os ratos submetidos à ração padrão e hiperlipídica podem apresentar, em maior ou menor escala, características comuns, como, por exemplo, o índice de adiposidade. Estudo publicado previamente⁽⁵²⁾ mostrou que este fato pode conduzir a um erro de classificação, ou seja, animais submetidos à ração padrão 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 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 obeso

2.7- Obesidade e comorbidades

Em virtude da obesidade poder apresentar comorbidades cardiovascular, metabólica e hormonal, como hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia^(35,46,53-59) as seguintes variáveis foram analisadas nos grupos controle e obeso:

2.7.1- Pressão arterial sistêmica (PAS)

Como os animais obesos podem apresentar hipertensão arterial sistêmica⁽⁵³⁻⁵⁵⁾ foi mensurada a pressão arterial sistólica (PAS). A PAS foi aferida indiretamente por plestimografia de cauda, utilizando-se electro-sphygmomanometer, Narco Bio-System[®], modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, 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 polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA).

2.7.2- Intolerância à glicose

Em razão dos animais obesos poderem apresentar níveis glicêmicos normais em condições basais, foi analisado o perfil glicêmico após uma sobrecarga de glicose através do teste de tolerância a glicose. A partir deste teste foi possível constatar se os ratos obesos desenvolveram intolerância à glicose, isto é, apresentavam níveis de glicemia elevados em relação ao grupo C após a sobrecarga de glicose. 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

Os animais obesos podem apresentar alterações do perfil glicêmico, lipídico e proteico^(35,56-58); assim, foram avaliadas as concentrações séricas de glicose, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteínas de alta (HDL) e baixa densidade (LDL), ácidos graxos livres e proteínas totais. A metodologia utilizada foi descrita no item 2.3, referente à avaliação nutricional dos animais.

2.7.4- Perfil hormonal: insulina e leptina

Em virtude dos animais obesos poderem apresentar elevação da insulina e leptina^(46,56-59), foram analisados os níveis séricos destes hormônios. As concentrações hormonais foram determinadas pelo método de ELISA utilizando-se kits específicos (Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.8- Caracterização da remodelação cardíaca

Como a obesidade pode acarretar remodelação cardíaca⁽⁶⁰⁻⁷¹⁾, o coração foi analisado por meio de estudos estruturais e moleculares. A hipertrofia foi avaliada *post mortem* por análise macroscópica e a molecular foi realizada por meio de análises protéicas da matriz extracelular do ventrículo esquerdo. Os métodos utilizados estão descritos abaixo:

2.8.1- Hipertrofia cardíaca

A presença de hipertrofia foi determinada pela análise dos seguintes parâmetros: peso total do coração, do átrio, dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD), e das respectivas relações com o peso corporal e com o peso do músculo sóleo (MS).

2.8.2- Determinação do colágeno tipo I miocárdico

2.8.2.1- Técnica de Western Blot

A expressão protéica do colágeno tipo I foi analisada por *Western Blot*⁽³⁵⁾. 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⁽⁷²⁾, 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⁽⁷³⁾. A metodologia de Western Blot está descrita abaixo.

2.8.2.1.1- 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 de lise hipotônico (10 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholate). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. 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 armazenados em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford, utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

2.8.2.1.2- Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração protéica, as amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e 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 240mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed). O gel de resolução apresentava uma concentração de 6 a 15%, 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 peso molecular das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), aproximadamente 3 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

2.8.2.1.3- Transferência e identificação das proteínas

Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS (Tris-HCl 20mM pH 7,6 e NaCl 137mM). 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 tampão TBS-T pH 7,4 (Tris-HCl 20mM, NaCl 137mM e detergente Tween 20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M pH2,8, NaCl 5M e Tween 20) e 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-deteção 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).

Anticorpo primário

- *Collagen type I, Mouse IgG1* (ABCAM, Cambridge, MA, USA).

Anticorpo de normalização

- *β -actin, Rabbit IgG1* (CELL SIGNALING, Danvers, MA, USA).

Os anticorpos secundários, conjugados a peroxidase (IgG anti-mouse ou anti-coelho, ECL, Amersham Biosciences, NJ-USA), anti-anticorpos primários, foram utilizados na titulação de 1:10000. Os anticorpos primários e secundários foram testados em diferentes titulações, assim como a solução bloqueadora e demais etapas metodológicas.

2.8.2.1.4- Quantificação das proteínas

As análises quantitativas das bandas protéicas (blots) foram realizadas pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, USA), *software* livre, disponível no endereço <http://www.scioncorp.com/>.

2.8.3- Determinação da atividade das metaloproteinases 2 e 9 miocárdica

As metaloproteinases 2 e 9 foram determinadas pela técnica de Zimografia previamente relatada por Tyagi et al⁽⁷⁴⁾. Amostras do ventrículo esquerdo foram diluídas em tampão de lise (Tris 50mM, pH 7,4, NaCl 0.2M, Triton-X 0,1% e CaCl₂ 10mM). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. 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 *ependorfs* e armazenados em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford, utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão. Após a quantificação da concentração protéica, as amostras das proteínas foram diluídas em tampão (Tris 0,5M, pH 6,8, 100% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA,

USA). As amostras, contendo 20µg de proteínas, foram distribuídas em gel de SDS-poliacrilamida 8%, com 1% de gelatina. A corrida eletroforética foi efetuada a 100V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), aproximadamente 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%) até o azul de bromofenol atingir o fundo do gel. O gel foi removido e lavado duas vezes de 30 minutos com Triton-X 100 e a seguir, lavado duas vezes de 5 minutos com solução Tris 50mM, pH 8,4. O gel então, foi incubado a 37°C *overnight* em solução de ativação (Tris 50mM, pH 8,4 e CaCl₂ 5mM). A coloração do gel foi realizada com 0,5% de comassie blue, por 2h e a descoloração foi feita com solução de 30% de metanol e 10% ácido acético até o clareamento das bandas sobre fundo escuro. O processo de coloração e descoloração foi realizado em temperatura ambiente, em agitador. A seguir, o gel foi fotografado e a intensidade da ação gelatinolítica (bandas claras) analisada em analisador de imagem UV-UVP White Darkhon. As análises quantitativas das bandas protéicas (blots) foram realizadas pelo fotodocumentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

2.8.4- Determinação das TIMPs 1 e 2 miocárdica

Em razão do aumento da atividade das MMPs miocárdicas poderem ser decorrentes da diminuição da expressão protéica das TIMPs 1 e 2, estas foram analisadas pela técnica de *Western Blot*, descrita acima, no item 2.9.2.

Anticorpos primários

- *TIMP 1, Rabbit IgG1* (ABCAM, Cambridge, MA, USA).
- *TIMP 2, Mouse IgG1* (ABCAM, Cambridge, MA, USA).

Anticorpo de normalização

- *β-actin, Rabbit IgG1* (CELL SIGNALING, Danvers, MA, USA).

2.8.5- Determinação da leptina miocárdica

Em razão da literatura evidenciar que o tecido adiposo secreta o hormônio leptina e que a atividade das MMPs 2 e 9 está relacionada ao aumento da leptina miocárdica, foi também realizada a expressão proteica da leptina no tecido cardíaco pela técnica de *Western Blot*, descrita acima, no item 2.9.2.

Anticorpo primário

- *Leptina, Mouse IgG1* (ABCAM, Cambridge, MA, USA).

Anticorpo de normalização

- *β -actin, Rabbit IgG1* (CELL SIGNALING, Danvers, MA, USA).

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⁽⁷⁵⁾.

A evolução semanal do peso corporal entre os grupos foi realizada pela análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas⁽⁷⁵⁾ e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni⁽⁷⁶⁾.

As associações entre determinadas variáveis analisadas foram realizadas pelo teste de correlação de Pearson.

O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

3. RESULTADOS

3.1- Caracterização do momento inicial da obesidade

O peso corporal foi semelhante nas três primeiras semanas de tratamento em ambos os grupos C e Ob; entretanto, após a 4^a semana de tratamento, o peso corporal dos animais Ob foi significativamente maior que os C (Figura 2).

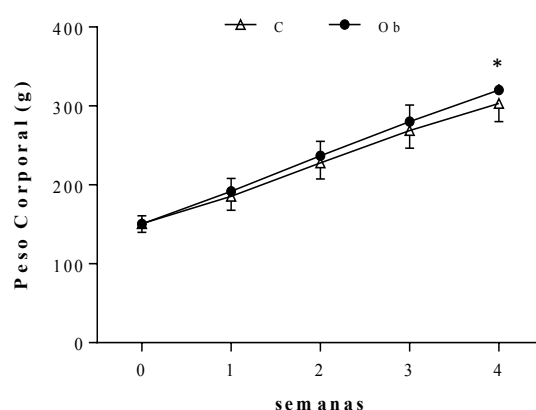


Figura 2. Evolução semanal do peso corporal dos animais controle (C; n=25) e obeso (Ob; n=25). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. ANOVA para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste post-hoc de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C. Foi apresentado na figura apenas a comparação entre os grupos C e Ob nas diferentes semanas.

3.1- Composição dos grupos controle e obeso

Na 30^a semana de tratamento após o início da obesidade, foi aplicado o critério estabelecido para a composição dos grupos, permanecendo no estudo vinte animais do grupo controle (C; n=20) e vinte e um do grupo obeso (Ob; n=21). Portanto, foram excluídos cinco animais do grupo C e quatro do Ob.

3.2– Perfil nutricional

A Tabela 1 mostra o perfil nutricional dos animais C e Ob. O peso corporal final, o ganho de peso, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores no Ob em relação ao C. Durante o período experimental, os animais Ob ingeriram menor quantidade de ração e calorias em relação aos C; porém, a eficiência alimentar foi maior nos animais Ob comparados aos C. A concentração dos ácidos graxos livres não esterificados (NEFA) foram menores nos animais Ob em relação aos C. Não houve diferença significativa entre os grupos nas demais dosagens séricas.

Tabela 1. Perfil nutricional dos animais

Variáveis	Grupos	
	C (n=20)	Ob (n=21)
PCI (g)	151 ± 11	151 ± 11
PCF (g)	480 ± 51	534 ± 58 *
Ganho de peso (g)	177 ± 35	218 ± 43 *
CNA (cm)	25,4 ± 0,4	25,3 ± 0,6
Gordura epididimal (g)	9,3 ± 2,3	14,2 ± 3,4 *
Gordura retroperitoneal (g)	10,5 ± 3,3	21,7 ± 5,9 *
Gordura visceral (g)	6,3 ± 1,4	11,2 ± 4,2 *
GCT (g)	26,1 ± 6,2	47,2 ± 12,3 *
Índice de adiposidade	5,6 ± 0,9	8,8 ± 1,6 *
Ingestão alimentar (g)	22,8 ± 2,1	17,0 ± 2,3 *
Ingestão calórica (kcal)	67,4 ± 6,3	62,1 ± 8,2 *
Eficiência alimentar (%)	2,1 ± 0,2	2,7 ± 0,2 *
Glicose (mg/dL)	91,3 ± 10,6	94,8 ± 10,6
Triglicérides (mg/dL)	112,0 ± 36,3	101,0 ± 37,0
HDL (mg/dL)	25,5 ± 2,5	26,3 ± 3,1
LDL (mg/dL)	29,2 ± 5,7	28,7 ± 3,8
Proteína (g/dL)	6,4 ± 0,4	6,3 ± 0,5
Albumina (g/dL)	3,1 ± 0,1	3,2 ± 0,2
NEFA (mmol/L)	0,65 ± 0,14	0,56 ± 0,12 *

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 não-esterificados. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

3.3 – Pressão arterial sistólica

A Figura 3 mostra o resultado da pressão arterial sistólica final realizado nos grupos C e Ob. Houve aumento da pressão arterial sistólica final nos animais Ob em relação aos C.

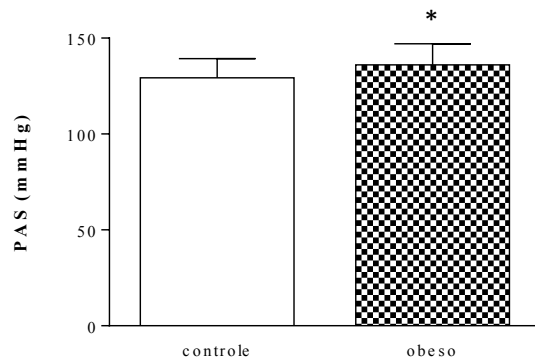


Figura 3. Pressão arterial sistólica final dos animais controle, (n=20) e obeso, (n=21). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

3.4 – Perfil glicêmico

A Figura 4 mostra o resultado do teste de tolerância à glicose realizado nos grupos C e Ob. A área glicêmica foi maior no grupo Ob em relação ao C.

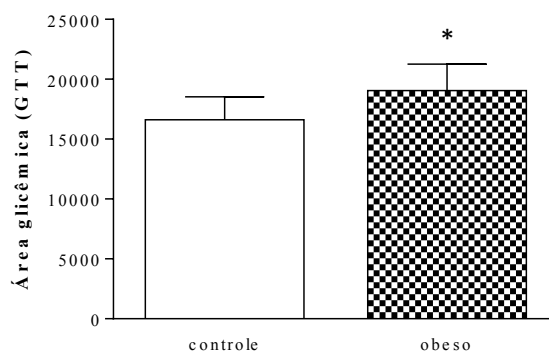


Figura 4. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, realizado nos animais controle, (n=20) e obeso, (n=21). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

3.5 – Perfil hormonal: insulina e leptina

As Figuras 5 e 6 ilustram as dosagens de insulina e de leptina, respectivamente. Ambas as figuras mostram que os níveis destes hormônios séricos foram maiores nos grupos Ob em relação ao C.

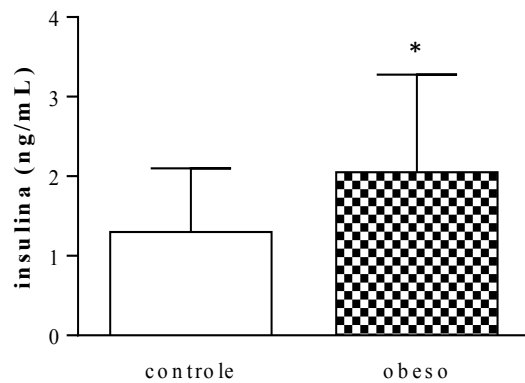


Figura 5. Nível de insulina realizado nos animais controle, (n=20) e obeso, (n=21). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. .* p<0,05 vs C.

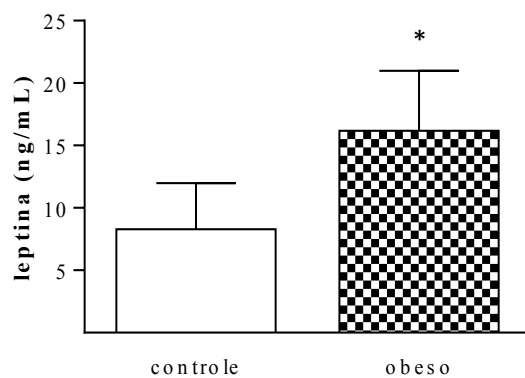


Figura 6. Nível de leptina realizado nos animais controle, (n=20) e obeso, (n=21). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. .* p<0,05 vs C.

2.5 - Perfil morfológico cardíaco

A Tabela 2 mostra o perfil morfológico cardíaco dos ratos C e Ob. O peso do MS, VD e a relação VE/PCF dos animais OB foram maiores em relação aos C. Não houve diferença significativa nos demais parâmetros analisados.

Tabela 2. Perfil morfológico cardíaco dos animais C e Ob

Variáveis	Grupos	
	C (n=20)	Ob (n=21)
PCF (g)	480 ± 51	534 ± 58 *
Coração (g)	1,10 ± 0,10	1,17 ± 0,13
MS (g)	0,19 ± 0,02	0,22 ± 0,03 *
VE (g)	0,79 ± 0,08	0,83 ± 0,10
VD (g)	0,22 ± 0,03	0,24 ± 0,03 *
AT (g)	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,02
VE/PCF	1,72 ± 0,11	1,61 ± 0,12 *
VD/PCF	0,48 ± 0,09	0,47 ± 0,05
AT/PCF	0,20 ± 0,03	0,18 ± 0,03
VE/MS	4,19 ± 0,37	3,96 ± 0,60
VD/MS	1,18 ± 0,17	1,16 ± 0,21
AT/MS	0,50 ± 0,05	0,46 ± 0,10

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso. PCF: peso corporal final; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; PCF: peso corporal final, MS: músculo sóleo, VE/PCF: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final; VD/PCF: relação do peso do ventrículo direito pelo peso corporal final; AT/PCF: relação do peso do átrio pelo peso corporal final; VE/MS: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo peso do músculo sóleo; VD/MS: relação do peso do ventrículo direito pelo peso do músculo sóleo; AT/MS: relação do peso do átrio pelo peso do músculo sóleo. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

2.6 - Expressão proteica do colágeno tipo I cardíaco

A Figura 7 mostra os resultados obtidos na expressão proteica do colágeno tipo I, pela técnica de Western Blot. Houve diminuição significativa do colágeno tipo I nos animais do grupo Ob em relação ao C.

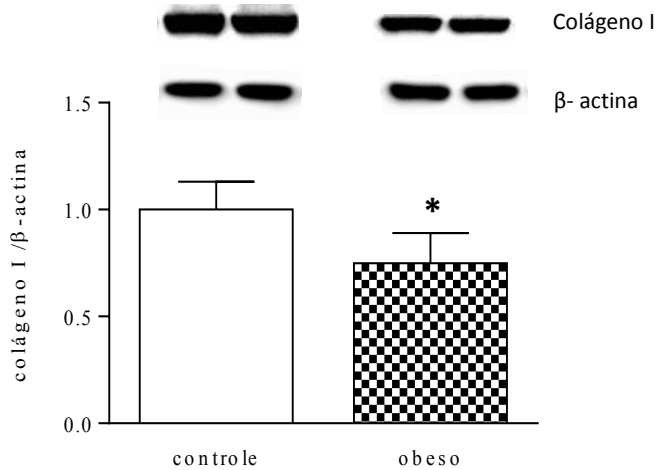


Figura 7. Expressão proteica do colágeno I miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. .* p<0,05 vs C.

2.7 – Atividade das metaloproteinases (MMPs) 2 e 9 cardíacas

As Figuras 8 e 9 mostram os resultados obtidos na atividade colagenolítica das MMP-2 e MMP-9, respectivamente, pela técnica de Zimografia. No gel de eletroforese foram identificadas duas bandas de degradação correspondentes à MMP-2: a MMP-2 inativa (pró-MMP-2) com peso molecular de aproximadamente 72 KDa e a forma ativa com peso molecular de aproximadamente 64 KDa; entre ambas as bandas citadas, é possível identificar a banda da MMP-2 de degradação intermediária (Figura 8). A MMP-9 foi visualizada apenas em sua forma ativa, com peso molecular de aproximadamente 92 KDa (Figura 9). Houve aumento significativo de ambas MMPs nos animais do grupo Ob em relação ao C.

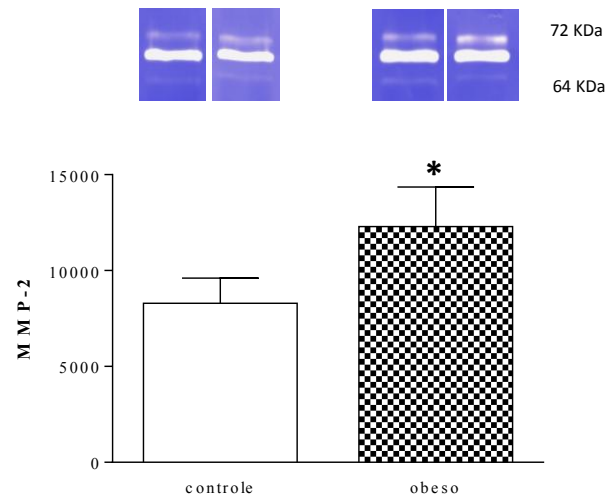


Figura 8. Relação entre MMP-2 ativas (ativa e ativa intermediária) e inativa dos animais controle (n=6) e obeso (n=6). MMP-2 inativa=72 KDa e MMP-2 ativa=64 KDa. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

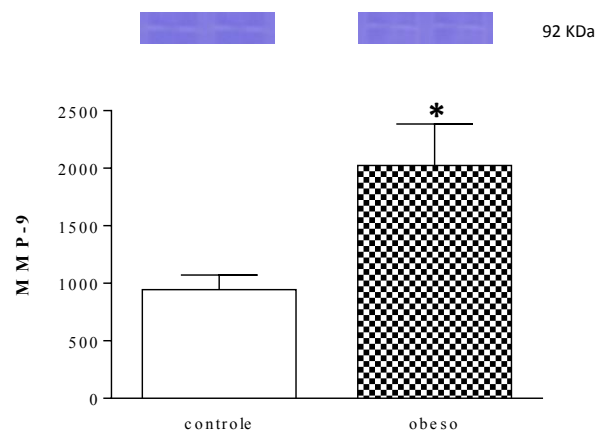


Figura 9. Atividade da MMP-9 dos animais controle (n=6) e obeso (n=6). Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

2.8 - Expressão proteica do TIMP-1 cardíaco

A Figura 10 mostra os resultados obtidos na expressão protéica do TIMP-1, pela técnica de Western Blot. Houve diminuição significativa do TIMP-1 nos animais do grupo Ob em relação ao C.

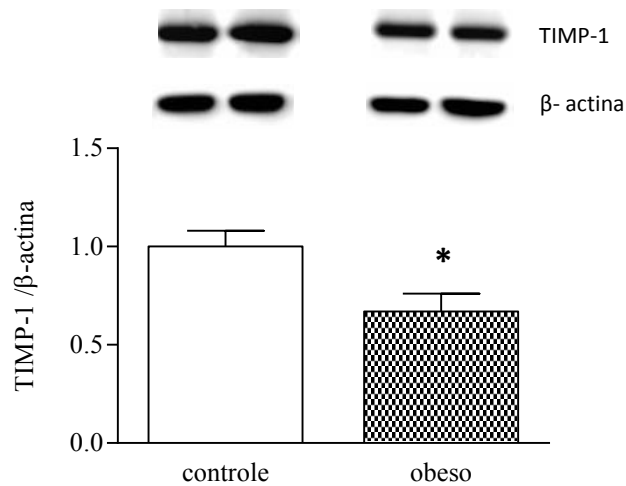


Figura 10. Expressão protéica da TIMP-1 do miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6). Dados expressos em média \pm desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs C.

2.6 - Expressão proteica do TIMP-2 cardíaco

A Figura 11 mostra os resultados obtidos na expressão protéica do TIMP-2, pela técnica de Western Blot. Houve diminuição significativa do TIMP-2 nos animais do grupo Ob em relação ao C.

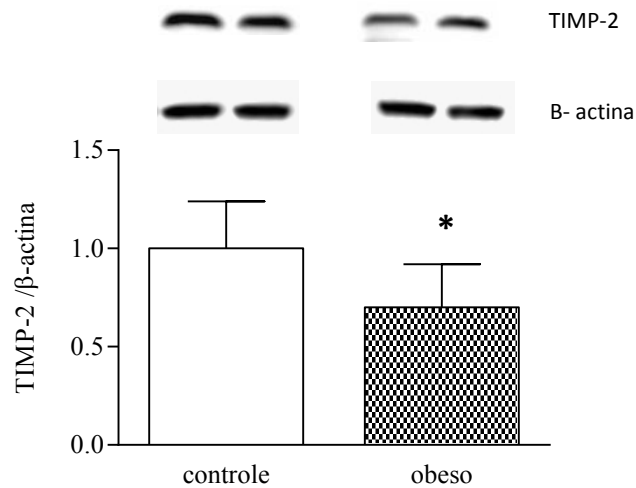


Figura 11. Expressão protéica da TIMP-2 do miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6). Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

2.6 - Expressão proteica da leptina cardíaca

A Figura 12 mostra os resultados obtidos na expressão protéica da leptina, pela técnica de Western Blot. Houve aumento significativa da leptina nos animais do grupo Ob em relação ao C.

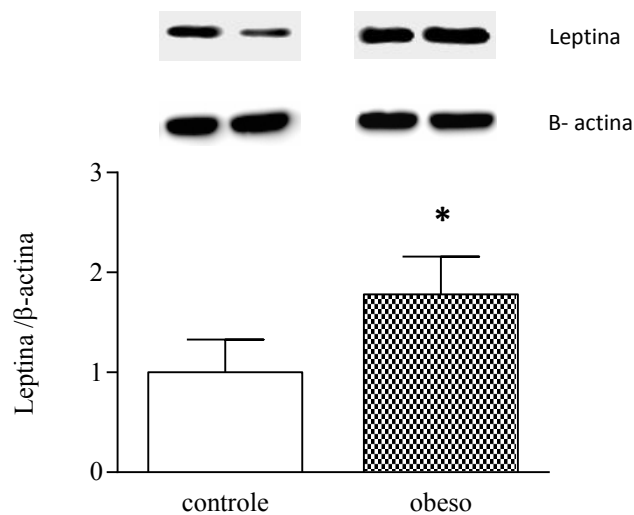


Figura 12. Expressão protéica da leptina do miocárdio dos animais controle (n=6) e obeso (n=6). Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

2.7 – Associação linear entre as variáveis cardíacas

A tabela 3 mostra a associação linear realizada entre determinadas variáveis estudadas nos animais C e Ob. Houve associação significativa entre a diminuição do colágeno tipo I e o aumento da atividade das MMPs-2 e 9, aumento da atividade das MMPs-2 e 9 e elevação da leptina, aumento da atividade da MMP-2 e diminuição dos TIMPs 1 e 2, aumento da atividade da MMP-9 e diminuição do TIMP 1, e diminuição do TIMP 1 e elevação da leptina. Não houve associação significativa entre o aumento da atividade da MMP-9 e diminuição do TIMP 2, e diminuição do TIMP 2 e elevação da leptina.

Tabela 3. Medida de associação linear entre as variáveis

Associação	Coefficiente de correlação	Valor de <i>p</i>
Colágeno I X MMP-2	- 0,723	0,008 *
Colágeno I X MMP-9	- 0,660	0,019 *
MMP-2 X LEPTINA	0,766	0,004 *
MMP-9 X LEPTINA	0,804	0,002 *
MMP-2 X TIMP 1	- 0,815	0,001 *
MMP-2 X TIMP 2	- 0,597	0,040 *
MMP-9 X TIMP 1	- 0,779	0,003 *
MMP-9 X TIMP 2	- 0,344	0,274
TIMP 1 X LEPTINA	- 0,656	0,020 *
TIMP 2 X LEPTINA	- 0,273	0,390

MMP: metaloproteinase; TIMP: inibidores de tecidos de metaloproteinases. Teste de correlação de Pearson; controle, n=6 e obeso, n=6. * $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

4.1 – Momento inicial da obesidade

Os dados deste experimento mostraram que a dieta hiperlipídica acarretou obesidade a partir da 4ª semana de tratamento; o peso corporal foi maior nos animais Ob em relação ao C. Os pesquisadores que utilizam modelo experimental de obesidade por dieta não identificam o momento do início da obesidade; apenas demonstram o momento em que a dieta promove diferença no peso corporal entre os grupos, não identificando se a elevação no peso corporal está associada à elevação na gordura corporal e/ou índice de adiposidade.^(77,78) Entretanto, Leopoldo⁽⁵⁰⁾, em nosso laboratório, verificou diferença no peso corporal e também, no índice de adiposidade na 3ª semana após tratamento com dieta hiperlipídica; levando em conta esse trabalho, quando neste estudo, os animais apresentaram diferença no peso corporal, foi considerado o início da obesidade.

4.2 – Constituição dos grupos controle e obeso

Foi aplicado um critério de classificação dos grupos, descrito na seção “Material e métodos”, de acordo com o índice de adiposidade, com a finalidade de identificar os animais verdadeiramente controle e obeso. Na experimentação biológica, em especial estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada uma homogeneidade de resposta. Neste sentido, os ratos submetidos à ração padrão e hiperlipídica podem apresentar, em maior ou menor escala, características comuns de resposta, o que poderia resultar na utilização de animais com peso normal no grupo obeso ou vice-versa. O descarte dos animais pela ausência de adesão ao critério estabelecido foi de 20% e 16% no grupo controle e obeso, respectivamente. A aplicação deste método possibilitou trabalharmos com populações de animais mais homogêneas em relação ao grau

de adiposidade. Estes resultados obtidos são similares aos publicados anteriormente por nosso grupo⁽⁵²⁾.

4.3 – Perfil nutricional

A dieta hiperlipídica, rica em ácidos graxos insaturados, utilizada neste estudo, 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⁽⁷⁹⁻⁸²⁾. Em pesquisa⁽⁸³⁾ com ratos Sprague-Dawley tratados com dieta hiperlipídica, com equilíbrio de ácidos graxos saturados e insaturados durante 12 semanas, não houve diferença significativa no peso corporal; entretanto, segundo alguns autores, o peso corporal pode não ser um bom indicador de classificação de obesidade^(52,58). Este fato também foi observado neste estudo, que mostrou um aumento de 80,5% na gordura corporal total e 57 % no índice de adiposidade em relação ao controle; porém, o peso corporal aumentou apenas 11,2%.

As principais causas da obesidade é a maior ingestão e oferta de alimentos altamente energéticos e palatáveis, e/ou redução no gasto energético⁽⁸⁴⁾. A dieta hiperlipídica utilizada neste estudo é rica em ácidos graxos mono e poliinsaturados (Quadro 2), apresentando teor energético de 3,65 Kcal/g, enquanto a dieta padrão, apresenta 2,95 Kcal/g, gerando uma diferença de 24% no conteúdo calórico. Pesquisas mostram que o consumo de dieta hiperlipídica promove menos saciedade e, conseqüentemente, maior ingestão alimentar^(57,85). Estes dados diferem dos nossos resultados, pois os animais Ob ingeriram menor quantidade de ração e calorias em relação aos C. Entretanto, a eficiência alimentar foi maior nos animais Ob em virtude do efeito térmico dos alimentos, visto que os lipídeos necessitam de baixa quantidade de energia (2-3%) para serem metabolizados; desta forma, os lipídeos que não são necessários na produção de energia, são depositados na forma de triglicérides nos adipócitos;

esta variável é muito importante no estudo da obesidade, ela permite verificar a conversão de ingestão alimentar em ganho de peso corporal⁽⁴⁶⁾. No nosso estudo, o aumento da eficiência alimentar está de acordo com diversos trabalhos, que utilizaram ratos submetidos à dieta hiperlipídica, insaturada, por diferentes semanas de tratamento^(79-82,86).

4.4 - Comorbidades

Neste trabalho foram constatadas algumas comorbidades relacionadas com a obesidade experimental^(46,48,55,85,87), como intolerância a glicose, hiperinsulinemia, dislipidemias, hiperleptinemia e hipertensão arterial sistêmica. O teste de tolerância à glicose mostrou que os animais obesos apresentaram áreas glicêmicas e níveis de insulina sérica maiores em relação aos controles, significando que a obesidade promoveu intolerância a glicose e hiperinsulinemia. A insulina possui papel fundamental na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios⁽⁸⁸⁾, aumentando a síntese e atenuando a liberação de triglicérides das células adiposas⁽⁸⁹⁾. A intolerância à glicose associada ao aumento da insulina sérica mostra que os animais apresentaram resistência à ação da insulina. Estes resultados estão de acordo com autores que utilizaram ratos obesos por dieta hiperlipídica, insaturada^(80-82,86). Neste estudo não encontramos hipertrigliceridemia e diminuição nos níveis do NEFA no grupo obeso. Estes resultados estão em contraste com trabalhos anteriores, realizados em nosso laboratório. Não encontramos explicação para estes comportamentos divergentes.

A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo, participando do balanço energético, regulando o consumo alimentar, a oxidação dos lipídios^(90,91) e a biologia dos colágenos⁽³⁷⁻⁴⁰⁾. Diversos estudos mostram que os níveis de leptina se correlacionam com a quantidade de gordura corporal^(91,92). A obesidade induzida por dietas hiperlipídicas promove um estado de resistência a leptina^(91,93); estudos tem demonstrado que esta resistência é decorrente da incapacidade da leptina atuar no hipotálamo, como resultado do prejuízo no

transporte da barreira hemato-encefálica^(94,95). Além disso, a alteração das vias de sinalização molecular da leptina, consequente a hiperleptinemia também pode levar a resistência a leptina^(91,94).

A pressão arterial sistólica (PAS) aumentou nos animais obesos em relação aos controles; como o controle da pressão arterial envolve o sistema neuro-humoral, como por exemplo, o sistema nervoso simpático⁽⁹⁶⁾ e o sistema renina-angiotensina-aldosterona⁽⁹⁷⁻⁹⁹⁾, os quais promovem vasoconstrição periférica, aumento da absorção de sódio renal e da função cardíaca, podemos inferir que o sistema neuro-humoral está ativado nos animais obesos. Enquanto alguns estudos não observaram alteração da PAS em animais obesos por dieta hiperlipídica insaturada^(81,82), outros pesquisadores utilizando animais obesos por dieta hiperlipídica com equilíbrio de ácidos graxos saturados e insaturados mostraram aumento dos níveis da PAS^(100,101).

4.5- Remodelação cardíaca

O estudo morfológico *pós-mortem* do coração não mostrou alterações significativas. A única alteração encontrada foi o aumento na massa do ventrículo direito em valores absoluto, porém, quando normalizados pelo peso corporal e peso do músculo sóleo não houve diferença entre os grupos. A diminuição do peso do ventrículo esquerdo normalizado pelo peso corporal deve-se ao fato do peso corporal do obeso ser significativamente maior em relação ao do controle, visto que a normalização pelo peso do músculo sóleo não acarretou diferença entre os grupos. Se considerarmos que o aumento da pressão arterial no grupo obeso foi consequente à hiperatividade neuro-humoral, podemos deduzir que esta hiperatividade não deve ter tido consequência na hipertrofia das células cardíacas.

O objetivo principal deste trabalho foi verificar a relação entre diminuição do colágeno tipo I miocárdico e atividade das MMPs 2 e 9 nos animais obesos em relação aos controles.

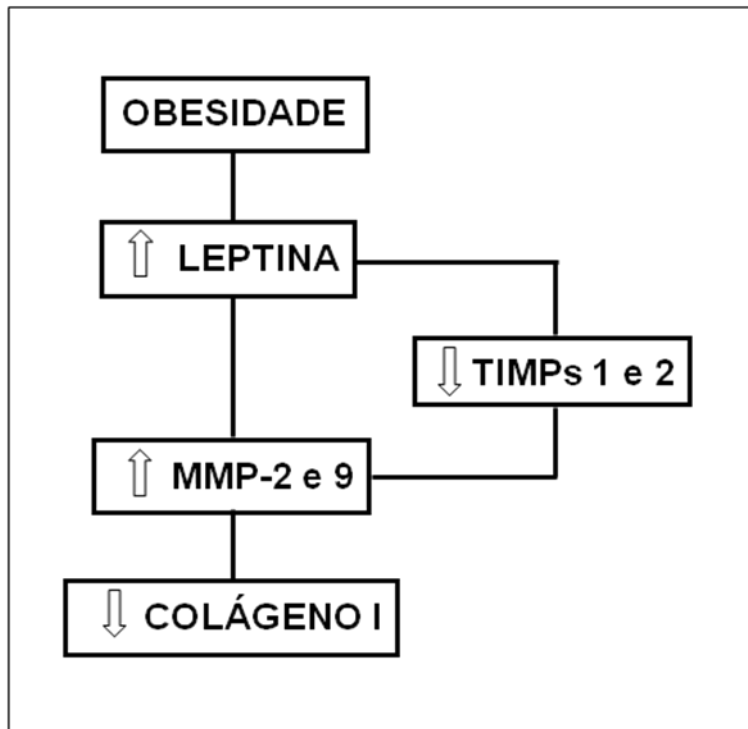
Os resultados desta investigação no miocárdio mostraram que a redução da expressão proteica do colágeno tipo I foi acompanhada do aumento da atividade das MMPs-2 e 9, diminuição dos TIMPs 1 e 2 e elevação da expressão da leptina.

A alteração do colágeno miocárdico pode ser resultante da elevação da síntese e/ou diminuição da degradação ou vice-versa. Os dados deste trabalho mostram que a elevação da degradação do colágeno tipo I nos obesos deve ter prevalecido, visto que ocorreu associação significativa entre a redução do colágeno tipo I e o aumento da atividade das MMPs-2 e 9; esta elevação pode ter sido consequente ao aumento da leptina, em virtude dos animais que apresentaram maior nível deste hormônio, terem também mostrado maior atividade das MMPs; estes achados não refletem, necessariamente, uma relação de causa e efeito. No entanto, uma relação de causa e efeito direta entre a leptina, atividade e expressão gênica das MMPs 2 e 9, respectivamente, foi evidente em alguns trabalhos da literatura⁽³⁷⁻⁴²⁾.

Embora, o aumento da atividade das MMPs possa estar relacionado com a elevação da leptina, outro fator modificador desta enzima é o comportamento dos TIMPs. Os resultados deste trabalho mostraram que houve diminuição dos TIMPs 1 e 2 nos animais obesos, o que também pode ter influenciado no aumento das MMPs; a associação significativa entre MMP 2 e TIMPs 1, 2, e MMP-9 e TIMP 1 corrobora com esta ideia. A redução da expressão proteica do TIMP 1 miocárdico está correlacionada significativamente com o aumento da leptina; este achado está de acordo com Schram et al, que encontraram redução significativa na expressão do RNA mensageiro do TIMP 1 após a elevação da concentração de leptina em cultura de células cardíacas⁽³⁷⁾.

Não encontramos trabalhos que avaliaram a associação entre as variáveis cardíacas estudadas, colágeno tipo I, MMPs-2 e 9, TIMPs 1 e 2 e leptina em animais obesos por dieta hiperlipídica insaturada. Portanto, é importante ressaltar que este é o primeiro trabalho que avaliou o comportamento dessas variáveis neste modelo.

Em resumo, este trabalho mostra:



5. CONCLUSÃO

Em conclusão, a hipótese deste trabalho foi confirmada, desde que a redução do colágeno tipo I cardíaco está associado ao aumento da atividade das MMPs 2 e 9 em ratos obesos por dieta hiperlipídica insaturada.

6. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Obesity and overweight. Geneva:WHO. [Access: 22/10/2012]. Available from: <http://www.who.int>.
2. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the Pathophysiology of Obesity-Associated Cardiovascular Disease. *Circulation*. 2002;105:2923-28.
3. O' Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg*. 2002;184:4S-8S.
4. 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;110:3081-87.
5. World Health Organization. Obesity and Overweight. access: 06/08/2012. Available from: <http://www.who.int>.
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares. 2003;140.
7. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of Life lost due to obesity. *JAMA*. 2003;289:187-193.
8. Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *N Engl J Med*. 2004;351:2694-2703.
9. Olshansky S, Passaro D, Hershow R, Layden J, Carnes B, Brody J, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005;352:1138-45.
10. Silva MCP, De Laet C, Nusselder WJ, Mamun A, Peeters A. Adult obesity and number of years lived with and without Cardiovascular Disease. *Obesity*. 2006;14:1264-73.
11. Wilson PWF, D' Agostino RB, Sullivan L, Parise H, Kannel WB. Overweight and Obesity as determinants of Cardiovascular risk. *Arch Intern Med*. 2002;162:1867-72.
12. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *Q J Med*. 2006;99:565-579.
13. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer X, et al. Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. *Circulation*. 2006;113:898-918.
14. Lavie CJ, Milani RV, Ventura HO. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1925-32.

15. Lancha LOP, Ferraz PLC, Junior AHL. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2012;5:75–87
16. Sowers JR, Whaley-Connell A, Hayden MR. The Role of Overweight and obesity in the cardiorenal syndrome. *Cardiorenal Med*. 2011;1:5-12.
17. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine*. 2006; 9:81-90.
18. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004; 89:2548-56.
19. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Dis*.1998; 22:1145-58.
20. Lopes JDM, Gomes RAS, Hial V, Lopes ICR, Reis MA, Teixeira VPA. Correlações entre o teor de colágeno no miocárdico ventricular esquerdo humano medido através de métodos bioquímico e morfométrico. *Arq Bras Cardiol*. 2002;79:10-4.
21. Matsubara LS, Narikawa S, Ferreira ALA, Paiva SAR, Zornoff LM, Matsubara BB. Remodelação miocárdica na sobrecarga crônica de pressão e volume no coração de ratos. *Arq Bras Cardiol*. 2006;86:126-30.
22. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular. In: Alberts B. *Biologia molecular da célula*. 5th ed. Porto Alegre: Artmed; 2010;1131-204.
23. Mann DL. *Heart failure*. Philadelphia:Saunders;2004.
24. Murphy G, Knauper V. Relating matrix metalloproteinase structure to function: Why the hemopectin domain? *Matrix Biol*. 1997; 15: 511-8.
25. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Franco M, Cicogna AC. Myocardial fibrosis rather than hypertrophy induces diastolic dysfunction in renovascular hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 1997; 75:1328-34.
26. Weber KT. Cardioreparation in hypertensive hear disease. *Hipertension*. 2001;38:588-91.
27. Baldi A, Abbate A, Bussani R, Patti G, Melfi R, Angelini A. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34:165-74.
28. Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 2007;117:568-75.
29. Adapala VJ, Adedokun SA, Considine RV, Ajuwon KM. Acute inflammation plays a limited role in the regulation of adipose tissue COL1A1 protein abundance. *J Nutr Biochem*. 2012;23:567-72.

30. Nie J, Bradshaw AD, Delany AM, Sage EH. Inactivation of SPARC enhances high-fat diet-induced obesity in mice. *Connect Tissue Res.* 2011;52:99-108.
31. Patsch JM, Kiefer FW, Varga P, Pail P, Rauner M, Stupphann D, et al. Increased bone resorption and impaired bone microarchitecture in short-term and extended high-fat diet-induced obesity. *Metabolism.* 2011;60:243-9.
32. Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J.* 2005;19:136-8.
33. Lo L, McLennan SV, Williams PF, Bonner J, Chowdhury S, McCaughan GW, et al. Diabetes is a progression factor for hepatic fibrosis in a high fat fed mouse obesity model of non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol.* 2011;55:435-44.
34. Huber J, Löffler M, Bilban M, Reimers M, Kadl A, Todoric J, et al. Prevention of high-fat diet-induced adipose tissue remodeling in obese diabetic mice by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Int J Obes (Lond).* 2007;31:1004-13.
35. Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodelling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am J Hyperten.* 2005;18:692-8.
36. Silva, DCT, Lima-Leopoldo, AP, Leopoldo AS, Campos DHS, Nascimento AF, Oliveira-Junior SA, Padovani CR, Cicogna AC. Influence of term of exposure to high-fat diet-induced obesity on myocardial collagen type I and III. Submetido ao *Can J Physiol Pharmacol.*
37. Schram K, De Girolamo S, Madani S, Munoz D, Thong F, Sweeney G. Leptin regulates MMP-2, TIMP-1 and collagen synthesis via p38 MAPK in HL-1 murine cardiomyocytes. *Cell Mol Biol Lett.* 2010;15:551-63.
38. Schram K, Wong MM, Palanivel R, No EK, Dixon IM, Sweeney G. Increased expression and cell surface localization of MT1-MMP plays a role in stimulation of MMP-2 activity by leptin in neonatal rat cardiac myofibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 2008;44:874-81.
39. Madani S, De Girolamo S, Muñoz DM, Li RK, Sweeney G. Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res.* 2006; 69:716-25.
40. Schram K, Ganguly R, No EK, Fang X, Thong FS, Sweeney G. Regulation of MT1-MMP and MMP-2 by leptin in cardiac fibroblasts involves Rho/ROCK-dependent actin cytoskeletal reorganization and leads to enhanced cell migration. *Endocrinology.* 2011;152:2037-47.
41. Tao M, Yu P, Nguyen BT, Mizrahi B, Savion N, Kolodgie FD, et al. Locally Applied Leptin Induces Regional Aortic Wall Degeneration Preceding Aneurysm Formation in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012 Dec 6. [*Epub ahead of print*].

42. Schroeter MR, Stein S, Heida NM, Leifheit-Nestler M, Cheng IF, Gogiraju R, et al. Leptin promotes the mobilization of vascular progenitor cells and neovascularization by NOX2-mediated activation of MMP9. *Cardiovasc Res.* 2012;93:170-80.
43. Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health; 1985.
44. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52:968-74.
45. Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics.* 1996;34:389-98.
46. Relling DP, Esberg LB, Frang CX, Johnson WT, Murphy J, 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 Hyperten.* 2006;24:549-61.
47. 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.* 2007;31:1652-9.
48. Levin BE, Richard D, Michel C, Servatius R. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279:R1357-64.
49. Lauterio TJ, Barkan A, DeAngelo M, DeMott-Friberg R, Ramirez R. Plasma growth hormone secretion is impaired in obesity-prone rats before onset of diet-induced obesity. *Am J Physiol.* 1998;275:E6-11.
50. Leopoldo AS. Exame geral de defesa, doutorado, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2010.
51. Lima-Leopoldo AP. Exame geral de defesa, doutorado, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2010
52. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli EL, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res.* 2008;41:253-9.
53. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287:R943-9.
54. Smith AD, Brands MW, Wang MH, Dorrance AM. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Exp Biol Med.* 2006;231:282-7.

55. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2000;35:1009-15.
56. 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;31:27-35.
57. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes*. 2005;29:1368-78.
58. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio DA, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003;133:1081-7.
59. 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*. 2001;101:499-506.
60. Carroll JF, Summers RL, Dzielak DJ, Cockrell K, Montani J-P, Mizelle HL. Diastolic compliance is reduced in obese rabbits. *Hypertension*. 1999;33:811-5.
61. 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;48:1229-37.
62. Li SY, 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 Ca^{2+} -ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia*. 2006;49:1434-46.
63. Minhas KM, Khan SA, Raju SVY, Phan AC, Gonzalez DR, Skaf MW, et al. Leptin repletion restores depressed b-adrenergic contractility in ob/ob mice independently of cardiac hypertrophy. *J Physiol*. 2005;565:463-74.
64. Pascual M, Pascual DA, Soria F, Vicente T, Hernández AM, et al. Effects of isolated obesity on systolic and diastolic left ventricular function. *Heart*. 2003;89:1152-6.
65. Iacobellis G, Ribaldo 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;10:767-73.
66. Alpert MA, Lambert CR, Terry BE, Cohen MV, Mukerji V, Massey CV, et al. Interrelationship of left ventricular mass, systolic function and diastolic filling in normotensive morbidly obese patients. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1995;19:550-7.
67. Morricone L, Malavazos AE, Coman C, Donati C, Hassan T, Caviezel F. Echocardiographic abnormalities in normotensive obese patients: relationship with visceral fat. *Obes Res*. 2002;10:489-98.
68. Peterson LR, Waggoner AD, Schechtman KB, Meyer T, Gropler RJ, Barzilai B, et al. Alterations in left ventricular structure and function in young healthy obese women:

- assessment by echocardiography and tissue doppler imaging. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:1399-404.
69. Dong F, Zhang X, Yang X, Esberg LB, Yang H, Zhang Z, et al. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *J Endocrinol.* 2006;188:25-36.
 70. Sharma S, Adroge JV, 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;18:1692-700.
 71. Schram K, Sweeney G. Implications of myocardial matrix remodeling by adipokines in obesity-related heart failure. *Trends Cardiovasc Med.* 2008;18:199-205.
 72. Rolim NP, 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;29:246-52.
 73. De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Júnior AS, et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca²⁺ channels. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2009;87:426-31.
 74. Tyagi SC, Matsubara L & Weber KT. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin Biochem.* 1993;26:191-198.
 75. Norman GR, Streiner DI. *Biostatistics: the bare essentials.* St. Louis: Mosby; 1994.
 76. Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc.* 1977;72:469-78.
 77. 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;289:R181-6.
 78. Levin BE, Triscari J, Sullivan AC. Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity in rat. *Am J Physiol.* 1983;244:R347-55.
 79. Medei E, Lima-Leopoldo AP, Pereira-Junior PP, Leopoldo AS, Campos DH, Raimundo JM, et al. Could a high-fat diet rich in unsaturated fatty acids impair the cardiovascular system? *Can J Cardiol.* 2010;26:542-8.
 80. Nascimento AF, Luvizotto RA, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Seiva FR, Justulin LA Jr, et al. Long-term high-fat diet-induced obesity decreases the cardiac leptin receptor without apparent lipotoxicity. *Life Sci.* 2011;88:1031-8.
 81. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, do Nascimento AF, de Campos DH, Luvizotto RA, et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2a in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol.* 2011;226:2934-42.

82. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RA, et al. Myocardial dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97:232-40.
83. da Silva AA, Kuo JJ, Tallam LS, Hall JE. Role of endothelin-1 in blood pressure regulation in a rat model of visceral obesity and hypertension. *Hypertension.* 2004;43:383-7.
84. Astrup A, Buemann B, Western P, Toubro S, Raben A, Christensen NJ. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr.* 1994;59:350-5.
85. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension.* 2006;48:65-72.
86. Omar B, Pacini G, Ahrén B. Differential development of glucose intolerance and pancreatic islet adaptation in multiple diet induced obesity models. *Nutrients.* 2012;4:1367-81.
87. 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;52:1133-42.
88. Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção de insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001;45:219-27.
89. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106:165-9.
90. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med.* 2002; 53:319-36.
91. Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res.* 2007;101:545-59.
92. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995;1:1155-61.
93. Sahu A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology.* 2004;145:2613-20.
94. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 1996;98:1101-6.
95. Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, et al. The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology.* 2000;71:187-95.

96. Crisostomo LL, Araújo LM, Câmara E, Carvalho C, Silva FA, Vieira M, et al. Comparison of left ventricular mass and function in obese versus nonobese women <40 years of age. *Am J Cardiol.* 1999;84:1127-9.
97. 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;41:108-14.
98. Srinivasan SR, Bao W, Wattigney WA, Berenson GS. Adolescent overweight is associated with adult overweight and related multiple cardiovascular risk factors: the Bogalusa Heart Study. *Metabolism.* 1996;45:235-40.
99. Scaglione R, Dichiaro MA, Indovina A, Lipari R, Ganguzza A, Parrinello G, et al. Left ventricular diastolic and systolic function in normotensive obese subjects: influence of degree and duration of obesity. *Eur Heart J.* 1992;13:738-42.
100. Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;281:R547-52.
101. du Toit EF, Nabben M, Lochner A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol.* 2005;100:346-54.