

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

**INFLUÊNCIA DA OXIDAÇÃO DE GLICOSE SOBRE A
FUNÇÃO MIOCÁRDICA DE RATOS OBESOS**

Dijon Henrique Salomé de Campos

BOTUCATU

2010

Díjon Henrique Salomé de Campos

**INFLUÊNCIA DA OXIDAÇÃO DE GLICOSE SOBRE A FUNÇÃO
MIOCÁRDICA DE RATOS OBESOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica “ Ciências da Saúde”

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

BOTUCATU – 2010

DEDICATÓRIA

A memória da minha avó Maria Lopez, que foi mais que uma mãe, que me transmitiu a sabedoria necessária para viver, a minha eterna saudade e gratidão

A minha mãe Janete, por me trazer a vida e compartilhar de todos os momentos tristes ou alegres da minha existência e a minha tia Sueli, companheira de todos os momentos, transmitindo calma e paciência frente às situações surgidas durante a realização deste trabalho, fazendo com que esses momentos fossem simples. Vocês são conjuntamente merecedoras das minhas conquistas e serei devedor de eterna gratidão.

Aos meus irmãos André e Lucas, meu respeito, amizade e admiração!

AGRADEÇO

A Deus, pela minha existência.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Cicogna, pela sábia orientação, ensino, cobranças e compromisso profissional! Ao senhor, devo eterna gratidão.

Aos Professores: Profa. Dra. Marina Politi Okoshi e Prof. Dr. Mário Matheus Sugizaki pela amizade, pronta colaboração profissional e pelas importantes sugestões no exame de qualificação.

Aos Professores Prof. Dr. Katashi Okoshi e Profa. Dra. Célia Regina Nogueira pela amizade e pronta colaboração profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani pela amizade e pronta colaboração nas inúmeras etapas de desenvolvimento e nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos meus companheiros e amigos nesta jornada: Paula Martinez, Ricardo Damatto, Aline Lima (Morango), Marcelo Cezar, Renata Luvizotto, Maria Teresa, Olga Mendes, Loreta Tomazi, Camila Rosa, Natasha Xavier, Camila Bonomo, Camila Gimenez, Gabriel Negreti, Daniele Guizoni, Sandro Conde, Marcos Minicucci, Lidiane (Sufê), Mariele (Vexa), Fabiana, Juliana Marino, Miriane e Regiane que compartilharam das mesmas dificuldades, expectativas e conquistas.

Aos meus companheiros e amigos da iniciação científica: Caroline Mazeto, Danielle (São Manuel), Adriana Deus, Carlos Alves, Paula Freire, Albano Bomben e Fernanda pela parceria nos trabalhos.

Em especial aos amigos: Ana Paula, André Leopoldo, André Nascimento e Silvio, sem vocês não seria possível a realização e a conclusão deste trabalho, fiquem com o meu eterno respeito e gratidão.

A todos os funcionários do Departamento de Clínica Médica: Ana Mengue, Alexandre Loureiro, Renato Pereira, Elisangela Silva, Laura Câmara, Mário e Bruno Fajiolli pela colaboração e disponibilidade em todo auxílio requisitado.

A todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação: Regina Spadin, Nathanael Salles, Janete Nunes Silva, Andréa Devidé e Lílian Cristina Nunes pela solícita disponibilidade em todos os momentos.

A todos os funcionários do Laboratório Experimental: José Carlos, Mário Bruno, Camila Camacho, Corina Julieta, De Lalla, Elenize Jamas, José Aparecido, Ângelo, Rogério, Sueli Clara, Sandra Fábio, Sueli Garcia e Vitor Souza pela colaboração e disponibilidade no que foi necessário. Em especial ao José Carlos e ao Mario Bruno por sempre atenderem as minhas diversas solicitações.

A Sandra Ângelo Fábio (Sandrinha) que além de ter sido precisa nas análises bioquímicas é uma grande amiga, fazendo que os momentos vividos no laboratório fossem extremamente prazerosos, devo a ti a alegria expressa no dia-a-dia do laboratório.

A FAPESP pelo suporte financeiro, viabilizando o desenvolvimento deste trabalho.

EPÍGRAFE

*"Nenhum vento sopra a favor de quem não sabe
para onde ir"*

(Sêneca)

RESUMO

Obesidade é uma doença metabólica crônica definida pelo acúmulo excessivo do tecido adiposo em relação à massa magra tecidual. Estudos clínicos mostram que a obesidade está associada à disfunção ventricular diastólica e não consistente comprometimento do desempenho sistólico. Os modelos experimentais que induzem obesidade por dietas têm sido utilizados como alternativa para se estudar as conseqüências das anormalidades cardíacas decorrentes do acúmulo de gordura. Pesquisas mostram que a função cardíaca em animais obesos pode estar preservada, diminuída ou aumentada. Alterações nos substratos energéticos, inibição da via glicolítica pelos ácidos graxos e redução na atividade da enzima piruvato desidrogenase (PDH) podem contribuir para a disfunção cardíaca induzida pela obesidade. Em razão da ausência de pesquisas que avaliaram a relação entre função cardíaca e metabolismo energético na obesidade, o objetivo deste estudo foi testar a hipótese que o desequilíbrio energético miocárdico, entre ácidos graxos e glicose, ocasionado pela obesidade, acarreta disfunção cardíaca. O prejuízo funcional nos animais obesos é decorrente de déficit de adenosina trifosfato (ATP), via glicolítica, para a bomba de cálcio (Ca^{2+}) do retículo sarcoplasmático (SERCA2). Com a finalidade de testar esta hipótese, foi inibida a via glicolítica miocárdica pela administração do iodoacetato. Além disso, o metabolismo energético também foi avaliado pela estimulação da PDH pelo dicloroacetato. Ratos *Wistar* machos, com 30 dias, foram distribuídos em dois grupos: controle (C; n=30) e obeso (Ob; n=30). Os ratos C receberam ração padrão para roedores e os Ob um ciclo de quatro rações hiperlipídicas por um período de 30 semanas. A gordura corporal total foi realizada pela somatória dos depósitos epididimal, retroperitoneal, visceral e a obesidade definida pelo índice de adiposidade. Os perfis nutricionais e metabólicos também foram avaliados nestes animais. O processo de remodelação cardíaca foi avaliado por meio de análises estruturais e funcionais. A estrutura foi analisada por meio de estudo macroscópico *post mortem*. O estudo funcional do músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo foi analisado em condições basais e por meio de manobras inotrópicas. A comparação dos grupos experimentais (controle e obeso) foi realizada pelo teste “t” de Student. A função cardíaca, a partir das diferentes

manobras inotrópicas, foi avaliada pela ANOVA no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%. A obesidade acarretou intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e resistência à insulina após 30 semanas. No entanto, o comportamento da pressão arterial sistólica foi semelhante entre os grupos. O estudo macroscópico *post mortem* mostrou que a obesidade não acarretou aumento dos pesos do coração e das câmaras cardíacas após 30 semanas. A obesidade não promoveu rigidez miocárdica e deterioração da função cardíaca em condição basal. As diversas manobras inotrópicas não evidenciaram alteração entre os grupos controle e obeso, desde que, o comportamento da tensão desenvolvida (TD) foi semelhante entre os grupos. O retorno dos valores da TD e da tensão de repouso (TR) aos níveis basais, após aumento da frequência cardíaca, mostrou que a disponibilidade de energia nos dois grupos foi semelhante. O estímulo da via glicolítica pelo dicloroacetato, não promoveu alteração entre os grupos controle e obeso. O bloqueio com iodoacetato mostrou que a via glicolítica na obesidade não está prejudicada. A análise da curva de regressão linear da TR mostrou que os ratos controles apresentaram maior contratatura do que os obesos. Em conclusão, o desequilíbrio energético na obesidade acarreta disfunção cardíaca. Ao contrário, a priorização da utilização de ácidos graxos proporciona proteção ao músculo cardíaco durante o bloqueio da glicólise, sugerindo que esta via metabólica é menos utilizada pelo miócitos nos animais obesos.

Palavras-chave: ratos; obesidade; função miocárdica; metabolismo energético.

ABSTRACT

Obesity is a chronic metabolic disorder defined by excessive accumulation of body fat relative to lean tissue. Clinical studies show that obesity is associated with ventricular dysfunction and not consistent impairment of systolic performance. Experimental models that induce obesity by diet have been used as an alternative to study the consequences of cardiac abnormalities resulting from accumulation of fat. Researches show that cardiac function in obese animals may be preserved, diminished or increased. Alterations in energy substrates, inhibition of the glycolytic pathway by fatty acids and reduced activity of the enzyme pyruvate dehydrogenase (PDH) may contribute to cardiac dysfunction induced by obesity. Due to the lack of research evaluating the relationship between cardiac function and energy metabolism in obesity, the objective of this study was to test the hypothesis that the myocardial energy imbalance between fatty acids and glucose, caused by obesity, leads to cardiac dysfunction. The functional impairment in the obese animals is due to deficit of adenosine triphosphate (ATP), glycolytic pathway for calcium (Ca^{2+}) pump of sarcoplasmic reticulum (SERCA2). For this purpose, was inhibited the myocardial glycolytic pathway by administration of iodoacetate. Moreover, energy metabolism was also assessed by stimulation of PDH by dichloroacetate. Thirty-day-old male Wistar rats were assigned to one of two groups (n=30 each): control (C) and obese (Ob). The C group was fed a standard diet and Ob group was fed cycles of four high-fat diets for 30 weeks. The total body fat was measured from the sum of the individual fat pad weights (epididymal, retroperitoneal and visceral) and the obesity defined by adiposity index. The nutritional and metabolic profiles of these animals were also evaluated. The cardiac remodeling process was assessed by structural and functional analysis. The structure was analyzed *post-death* for macroscopic study. Myocardial performance of isolated papillary muscle from the left ventricle (LV) was evaluated by under baseline conditions and after inotropic maneuvers. Comparisons between experimental groups (control and obese rats) were performed using Students-*t* test for independent samples. The cardiac function, after inotropic maneuvers, was analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures and complemented by Student-Newman-Keuls's posthoc test for specific

differences. The level of significance considered was 5 %. Obesity promoted glucose intolerance, hyperinsulinemia, hyperleptinemia and insulin resistance after 30 weeks. However, the behavior of systolic blood pressure was similar between groups. The *post-death* macroscopic study showed that obesity doesn't promote to an increase in heart weight and heart chambers at 30 weeks. Obesity did not cause myocardial stiffness and

damage on cardiac function under baseline conditions. Several inotropic maneuvers no make evident changes between control and obese, since the behavior of developed tension (DT) was similar between the groups. The return values of DT and resting tension (RT) to baseline levels, after an increase in frequency of stimulation, exhibited that the availability of energy in the two groups was similar. The stimulation of glycolytic pathway by dichloroacetate, did not promote alteration between the control and obese. The inhibition with iodoacetate showed that glycolytic pathway in obesity is not impaired. The linear regression analysis of RT displayed that control rats showed greater contracture than obese. In conclusion, the energy imbalance on obesity does not cause cardiac dysfunction. On the contrary, the prioritization of fatty acids utilization provides protection to cardiac muscle during the inhibition of glycolysis, suggesting that this pathway is fewer used by obese myocytes.

Keywords: rats, obesity, myocardial function, energy metabolism.

Lista de figuras

Figura 1- Ponto de separação do índice de adiposidade	28
Figura 2- Representação da curva de contração isométrica	35
Figura 3- Evolução semanal do peso corporal dos animais	42
Figura 4- Pressão arterial sistólica final	45
Figura 5- Teste de tolerância à glicose	46
Figura 6- Área glicêmica (GTT)	46
Figura 7- Teste de tolerância à insulina	47
Figura 8- Área glicêmica (ITT)	47
Figura 9- Níveis séricos de insulina e leptina	48
Figura 10- Rigidez miocárdica	52
Figura 11- Potenciação pós-pausa em dados absolutos	53
Figura 12- Potenciação pós-pausa em percentual de resposta em relação ao C	54
Figura 13- Elevação da concentração de cálcio extracelular em dados absolutos	55
Figura 14- Elevação da concentração de cálcio extracelular em percentual de resposta em relação ao C	56
Figura 15- Alteração da frequência cardíaca em dados absolutos	57
Figura 16- Alteração da frequência cardíaca em percentual de resposta em relação ao C	58
Figura 17- Bloqueio do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase em dados absolutos	59
Figura 18- Bloqueio do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase em percentual de resposta em relação ao C	60
Figura 19- Bloqueio do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase em regressão linear.....	61

Figura 20- Bloqueio do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase no declínio da tensão desenvolvida do músculo papilar	61
Figura 21- Efeitos do estímulo da piruvato desidrogenase em valores absolutos	62
Figura 22- Efeitos do estímulo da piruvato desidrogenase em percentual de resposta em relação ao C	63

Lista de quadros

Quadro 1- Composição de macro e micronutrientes das rações (%)	22
Quadro 2- Perfil de aminoácidos das rações (%)	23
Quadro 3- Perfil de carboidratos das rações (%).....	24
Quadro 4- Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%)	25

Lista de tabelas

Tabela 1- Perfil nutricional dos animais	44
Tabela 2- Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático	49
Tabela 3- Relação peso úmido/ seco nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático	49
Tabela 4- Estrutura macroscópica cardíaca post mortem	50
Tabela 5- Contração isométrica basal	51

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	16
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1- Animais	20
2.2- Protocolo Experimental	20
2.2.1- Composição das rações padrão e hiperlipídica	21
2.3- Perfil nutricional dos animais	25
2.4- Caracterização da obesidade	27
2.5- Determinação do momento inicial da obesidade	27
2.6- Constituição dos grupos controle e obeso	27
2.7- Obesidade e comorbidades	29
2.7.1- Hipertensão arterial sistêmica	29
2.7.2- Intolerância à glicose	29
2.7.3- Resistência sistêmica à insulina	30
2.7.4- Dislipidemias e Hiperlipidemia	31
2.7.5- Hiperinsulinemia e Hiperleptinemia	31
2.8- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático ..	31
2.9- Caracterização da remodelação cardíaca	32
2.9.1- Estrutura do coração post mortem	32
2.9.2- Função miocárdica in vitro - Músculo papilar isolado.....	32
2.9.2.1- Parâmetros funcionais	35
2.9.2.2- Protocolo funcional.....	36
2.9.2.2.1- Protocolo funcional em condição basal	37
2.9.2.2.2- Manobras inotrópicas e lusitrópicas	37
2.9.2.2.2.1- Potenciação pós-pausa	37
2.9.2.2.2.2- Elevação da concentração de cálcio extracelular	38

2.9.2.2.2.3- Alteração da frequência cardíaca	38
2.9.2.2.2.4- Bloqueio do gliceraldeído 3-fostato desidrogenase	39
2.9.2.2.2.5- Estímulo da piruvato desidrogenase	39
2.10- Análise estatística	40
3. RESULTADOS	42
3.1- Determinação do momento inicial de obesidade	42
3.2- Obesidade 30 semanas	42
3.2.1- Composição dos grupos controle e obeso	42
3.2.2- Perfil nutricional dos animais	43
3.2.3- Pressão arterial sistólica	45
3.2.4- Teste de tolerância à glicose	45
3.2.5- Teste de tolerância à insulina	46
3.2.6- Análise sérica dos hormônios insulina e leptina	48
3.2.7- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático..	48
3.2.8- Estrutura do coração post mortem	50
3.2.9- Função miocárdica in vitro - Músculo papilar isolado	51
3.2.9.1- Condição basal	51
3.2.9.2- Potenciação pós-pausa	52
3.2.9.3- Elevação de cálcio extracelular	54
3.2.9.4- Alteração de frequência cardíaca	56
3.2.9.5- Bloqueio do gliceraldeído 3-fostato desidrogenase	58
3.2.9.6- Estímulo da piruvato desidrogenase	62
4. DISCUSSÃO	64
4.1- Momento inicial da obesidade	64
4.2- Caracterização dos grupos controle e obeso	64
4.3- Perfil nutricional dos animais	65
4.4- Comorbidades	67
4.5- Remodelação cardíaca	69
5. CONCLUSÃO	73
6. REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO

Obesidade é uma doença metabólica crônica definida por um acúmulo excessivo do tecido adiposo em relação a massa magra tecidual ⁽¹⁾. Incide em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, afetando todas as idades e classes sócio-econômicas, sendo um dos principais fatores de risco para doenças crônicas e incapacitantes ⁽¹⁻⁴⁾. De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, aproximadamente 40 milhões de pessoas no Brasil apresentam sobrepeso e destas 10,5 milhões são obesas ⁽⁵⁾. Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, no ano de 2015, cerca de 2,3 bilhões de adultos estarão com sobrepeso, e destes, pelos menos 700 milhões serão considerados obesos (Índice de Massa Corporal [IMC] > 30 g/m²) ⁽¹⁾.

Os mecanismos que causam a obesidade podem ser desencadeados pela interação de diversos fatores, como os genéticos, os psicológicos, os ambientais, o sedentarismo e os hábitos alimentares. A maior disponibilidade e consumo de dietas altamente energéticas e palatáveis tem acarretado elevação do peso corporal ^(4,6,7). Por essa razão, a obesidade induzida por dieta é o modelo mais apropriado para se estudar as conseqüências dessa patologia ^(4,6,7).

A obesidade está associada com o aumento no risco de mortalidade e redução na expectativa de vida ^(8,9) e numerosas co-morbidades como, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, resistência a insulina e doenças cardiovasculares como, hipertensão arterial, doença arterial coronariana, fibrilação atrial e insuficiência cardíaca ^(10,11).

Estudos clínicos mostram que obesidade está associada a disfunção ventricular, geralmente, diastólica ⁽¹²⁻²²⁾, e não consistente comprometimento do desempenho sistólico ^(3,12,13,16,18,19,22-24). Pesquisas em animais geneticamente obesos mostram, na sua maioria, disfunção contrátil e de relaxamento cardíaco ⁽²⁵⁻³³⁾. Em modelos de obesidade induzida por dieta hipercalórica os resultados são divergentes, desde que mostram função ventricular preservada ^(25,34), diminuída ⁽³⁵⁻³⁸⁾ ou aumentada ⁽³⁹⁾.

Os mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela depressão da função cardíaca, em diversos modelos, não estão totalmente esclarecidos. Diferentes fatores poderiam contribuir para a disfunção: alteração no processo excitação-contracção, nas proteínas contráteis, na matriz extracelular, na modulação autonômica, necrose ou apoptose dos miócitos e déficit de oxigênio ou no substrato energético ⁽⁴⁰⁻⁴³⁾.

O coração é um órgão cujas células estão adaptadas para contrações ininterruptas e altamente coordenadas. Para exercer sua função necessita de constante suprimento de substâncias metabólicas altamente energéticas. O coração é capaz de utilizar uma variedade de substratos e de se adaptar rapidamente às alterações da oferta do tipo do suprimento energético ⁽⁴⁴⁾. Os principais nutrientes utilizados pelo coração são os ácidos graxos e a glicose. Em condições aeróbicas normais, aproximadamente 70% da produção de energia miocárdica deriva do metabolismo de ácidos graxos, sendo a contribuição glicolítica em torno de 30% ⁽⁴⁵⁻⁴⁹⁾. O miocárdio não participa da síntese de ácidos graxos, sendo que a utilização deste substrato depende fundamentalmente de suprimentos exógenos. As fontes para o coração incluem os ácidos graxos livres do plasma e os liberados pelos triglicérides por ação das lípases lipoproteicas ^(50,51). A glicose utilizada pelo

miocárdio é derivada do plasma ou de estoques intracelulares de glicogênio ⁽⁵²⁾. A glicose é o principal substrato para o metabolismo oxidativo do coração quando os níveis plasmáticos de ácidos graxos são baixos e as concentrações de glicose e de insulina são altas, como no estado pós-prandial ⁽⁵¹⁾. Há uma relação inversa entre a concentração de ácidos graxos plasmáticos e a oxidação de glicose pelo tecido miocárdico ⁽⁴⁾. O aumento dos níveis de ácidos graxos inibe a glicólise no citosol e a ação da piruvato desidrogenase (PDH) ^(4,53). A inibição do metabolismo da glicose pela oxidação dos ácidos graxos foi observada pela primeira vez no coração isolado ⁽⁵⁴⁾ e também ocorre no coração *in vivo* ^(52,55).

Os efeitos da obesidade na seleção do substrato energético pelo miocárdio não foram extensivamente investigados ⁽⁴⁾. Estudos clínicos ^(55,56) e experimentais ^(4,48,52) em obesos têm mostrado que o fator responsável pela escolha do substrato energético cardíaco são os níveis plasmáticos elevados de ácidos graxos e triglicérides ^(4,57,58); na obesidade, o aumento da captação e da oxidação dos ácidos graxos está associada com o decréscimo da utilização de glicose pelo miocárdio ^(4,48,52,55,56). Além disso, o conteúdo de triglicérides no miocárdio pode estar aumentado ⁽⁵⁸⁾. A elevação dos ácidos graxos circulantes e dos triglicérides está associada com o aumento do índice de massa corporal ^(53,58).

As alterações nos substratos energéticos utilizados pelo miocárdio podem ser responsabilizados pela disfunção cardíaca constatada em obesos ^(4,30,59,60). Resultados de estudos experimentais mostram que além da lipotoxicidade, isto é, acúmulo de lipídeos e seus derivados no cardiomiócito ^(4,61), outro fator que pode contribuir para a disfunção cardíaca está relacionado com a inibição da via glicolítica pelos ácidos graxos. A bomba de cálcio (Ca^{2+}) do retículo sarcoplasmático (SERCA2) é a proteína responsável pela recaptura do cálcio citosólico para o

retículo sarcoplasmático. Ensaios realizados em miocárdio de rato sugerem que o ATP gerado pela oxidação da glicose é o preferencialmente utilizado pela SERCA2^(48,49,62-64). Experimentos mostraram que a inibição da glicólise deteriora o relaxamento do miocárdio na isquemia e pós reperfusão, sugerindo que o ATP gerado pela via glicolítica pode ser essencial para o relaxamento adequado⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾. Estudos em camundongos db/db obesos e diabéticos^(60,68) mostraram que a normalização do metabolismo dos ácidos graxos e da glicose cardíaco, com aumento da oxidação da glicose e conseqüente diminuição da utilização de ácidos graxos, reverte a disfunção contrátil encontrada nesses animais^(60,68). Além dessa alteração na via glicolítica desencadeada pelos ácidos graxos, autores verificaram diminuição da atividade da piruvato desidrogenase (PDH) no miocárdio de ratos Zucker⁽⁶⁹⁾ e de camundongos ob/ob obesos⁽³⁰⁾. Segundo esses investigadores, a redução na atividade da PDH, responsável pela transformação do piruvato para acetil-coA, poderia também contribuir para a disfunção cardíaca nos animais obesos.

O objetivo deste trabalho foi testar a hipótese que o desequilíbrio energético miocárdico entre ácidos graxos e glicose acarreta disfunção cardíaca nos animais obesos decorrente de déficit de ATP para a SERCA2. Com a finalidade de testar esta hipótese, foi inibida a via glicolítica miocárdica pela administração do iodoacetato (IAA), droga que bloqueia a atividade da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase⁽⁶⁶⁾. A inibição intensificará a disfunção cardíaca nos ratos obesos. Como a depressão do desempenho cardíaco pode também estar relacionada com a diminuição da atividade da PDH^(70,71), esta enzima foi estimulada pelo dicloroacetato (DCA). O aumento da atividade da enzima reverterá a queda do desempenho cardíaco.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais

No presente estudo foram utilizados 60 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”⁽⁷²⁾ e aprovados pela Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.

2.2- Protocolo Experimental

Os ratos foram randomizados em dois grupos: tratados com dietas normocalóricas (DN, n= 30) ou hipercalóricas (DH, n= 30). 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), por período de 34 semanas. As rações hiperlipídicas foram alternadas a cada 24 horas. 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.⁽⁷³⁾

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. Os perfis de aminoácidos, carboidratos e 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, 3 e 4, respectivamente.

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 aminoácidos das rações (%)

Aminoácidos	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Ácido Aspártico	10,81	9,92
Ácido Glutâmico	20,12	18,99
Serina	5,23	5,06
Glicina	4,48	4,32
Histidina	2,50	2,43
Arginina	7,47	7,07
Treonina	3,38	4,01
Alanina	4,53	4,69
Prolina	5,93	5,80
Tirosina	3,34	3,48
Valina	5,05	5,33
Metionina	1,89	2,43
Cistina	1,63	1,85
Isoleucina	4,22	4,38
Leucina	7,78	7,96
Fenilalanina	5,01	5,01
Lisina	5,62	6,59
Triptofano	1,01	0,68

Quadro 3- Perfil de carboidratos das rações (%)

Carboidratos	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Raffinose	1,74	0,81
Maltose	1,07	1,60
Glicose Livre	0,82	1,63
Glicose	46,58	42,37
Frutose Livre	0,62	0,96
Frutose	20,93	16,46
Sacarose	8,83	11,57
Lactose	0,65	4,48
Fucose	0,17	0,15
Arabinose	5,55	6,78
Galactose	4,55	6,08
Xilose	5,47	4,27
Rhamnose	0,22	0,26
Manose	2,80	2,58

Quadro 4- 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
Palmitico (c16:0)	16,56	15,09
Heptadecanóico (c17:0)	0,02	0,08
Esteárico (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, lipídios, glicemia e

albumina sérica. A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada ração (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). A quantidade de gordura corporal total foi determinada pela somatória dos 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.⁽⁷⁴⁾ Para análise do perfil glicêmico, lipídico e protéico, 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 proteínas foram determinadas utilizando-se kits específicos (CELM®, Barueri, São Paulo, Brasil) e analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Technicon, RA-XT™ System, Global Medical Instrumentation, Minnessota, USA). Os níveis de ácidos graxos não-esterificados (NEFA) foram avaliados utilizando kit colorimétrico (WAKO NEFA-C, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) pelo método de Johnson & Peters.⁽⁷⁵⁾

2.4- Caracterização da obesidade

A obesidade foi determinada utilizando-se o índice de adiposidade. Diversos autores utilizam este índice para avaliara a quantidade de gordura corporal em roedores.^(34,76-78). Este método é facilmente realizado e permite analisar os depósitos de gordura corporal de maneira consistente.

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 quarta semana de tratamento, observou-se aumento significativo do peso corporal no grupo DH em relação ao DN, sendo considerado como início da obesidade no grupo DH. Esta decisão foi adotada com base em estudo prévio do nosso grupo, no qual verificou-se que a diferença do peso corporal entre os grupos era resultante do maior índice de adiposidade nos ratos DH.^(79,80).

2.6- Constituição dos grupos controle e obeso

Após 30 semanas do início da obesidade, os grupos de animais que receberam ração padrão e hiperlipídica foram denominados controle (C) e obeso (Ob), respectivamente.

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 poderiam apresentar, em maior ou menor escala, características comuns, como, por exemplo, o índice de adiposidade. Estudo publicado previamente

⁽⁸¹⁾ 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.

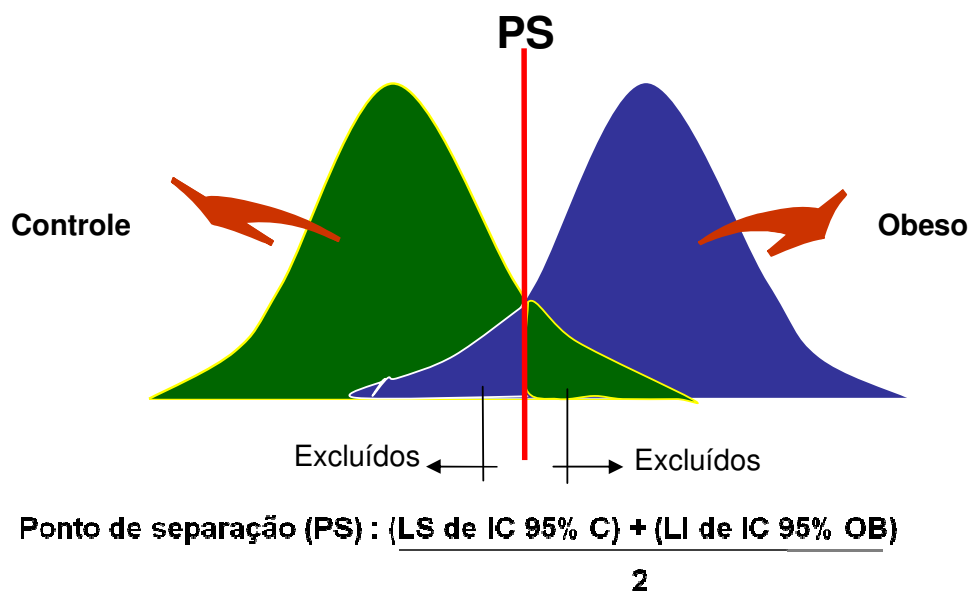


Figura 1. Ponto de separação do índice de adiposidade entre os grupos controle e obeso

2.7- Obesidade e comorbidades

Desde que a obesidade pode apresentar comorbidades, as alterações no perfil cardiovascular, metabólico e hormonal, como hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia ^(37,38,82,83) foram avaliadas nos ratos obesos.

2.7.1- Hipertensão arterial sistêmica

Como os animais obesos podem apresentar hipertensão arterial sistêmica,⁽⁸²⁻⁸⁴⁾ foi mensurada a pressão arterial sistólica (PAS). A PAS foi aferida indiretamente por plestimografia de cauda, utilizando-se electro-sphymomanometer, 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

Como os animais obesos podem apresentar níveis glicêmicos normais em condições basais, foi analisado o perfil glicêmico após uma sobrecarga de 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 pelo perfil da curva e área glicêmica.

2.7.3- Resistência sistêmica à insulina

Como os animais obesos podem apresentar resistência à ação da insulina, ^(38,83,85) foi analisado o perfil glicêmico após uma sobrecarga de insulina. A partir deste teste foi possível constatar se os ratos obesos apresentavam níveis glicêmicos elevados em relação ao grupo C após infusão de insulina. As coletas sanguíneas, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal após um período de jejum de 6 horas e após administração intraperitoneal de insulina regular (Novolin[®] R, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark), equivalente a 1,5 UI/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, considerado condição basal e após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos da administração da insulina. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek GO Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, São Paulo, Brasil). A resistência à insulina foi avaliada pelo perfil da curva e área glicêmica.

2.7.4- Dislipidemias e Hiperglicemia

Como os animais obesos podem apresentar alterações do perfil lipídico e glicêmico, ^(37,85-87) foram avaliadas as concentrações séricas de glicose, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteínas de alta e baixa densidade e ácidos graxos não-esterificados (NEFA). A metodologia utilizada foi descrita no item 2.3, referente à avaliação nutricional dos animais.

2.7.5- Hiperinsulinemia e Hiperleptinemia

Como os animais obesos podem apresentar hiperinsulinemia e hiperleptinemia, ^(37,38,85-88) 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 Devics, Sunnyvale, CA, USA).

2.8- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

Em razão da obesidade poder acarretar aumento na volemia corporal dos ratos, ⁽⁸⁹⁾ o que poderia promover acúmulo de líquido nos tecidos, foi realizada a avaliação do teor de água tecidual nas amostras de ventrículos esquerdo e direito, átrio, pulmão e fígado. Após a remoção do tecido, realizou-se a pesagem in natura. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa (Kamp Metalúrgica, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), sob temperatura de $55 \pm 5^\circ\text{C}$, por um período de 48 horas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: $[(\text{PN}-\text{PS})/\text{PN}] \times 100\%$, onde PN representa o peso in natura e o PS o peso seco.

2.9- Caracterização da remodelação cardíaca

Como a obesidade pode acarretar remodelação cardíaca, ^(12-22,25-33,35-39) o coração foi analisado por meio de estudos estruturais e funcionais. A estrutura foi avaliada *post mortem* por análises macroscópicas. A função foi analisada *in vitro* utilizando o músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo. Os métodos utilizados para análise da remodelação cardíaca estão descritos abaixo:

2.9.1- Estrutura do coração *post mortem*

A análise estrutural, macroscópica *post mortem*, permite identificar a presença de hipertrofia cardíaca a nível atrial e ventricular. A presença de hipertrofia foi determinada pela análise dos seguintes parâmetros: peso total do coração, do átrio, dos ventrículos esquerdo e direito, e das respectivas relações com o comprimento da tíbia.

2.9.2- Função miocárdica *in vitro* - Músculo papilar isolado

A técnica que utiliza o músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo, realizada rotineiramente em nosso laboratório, ⁽⁹⁰⁻⁹²⁾ avalia a função mecânica do miocárdico *in vitro*. Esta preparação permite detectar alterações precoces na contração e no relaxamento do músculo cardíaco, ⁽⁹²⁾ independente das variações da pós-carga, pré-carga, frequência cardíaca, influência hormonal e substrato energético, o que é difícil de ser obtido na avaliação do coração *in vivo*. Além disso, como a adaptação do organismo à obesidade pode causar efeitos indiretos no coração, o estudo com músculo papilar isolado tem a vantagem de possibilitar a análise direta da função miocárdica. O estudo funcional do músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo foi realizado conforme técnica descrita abaixo.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico, 50mg/kg/ip, eutanasiados por decapitação e submetidos à toracotomia mediana. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Krebs-Henseleit⁽⁹³⁾ com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 2,5 CaCl₂; 1,16 MgSO₄; 1,18 KH₂PO₄; 5,50 glicose e 24,88 NaCO₃, mantidos à temperatura de 28°C, previamente oxigenada durante 10 minutos com 95% de oxigênio (O₂) e 5% de dióxido de carbono (CO₂). Após permanecerem aproximadamente 1 minuto na solução, os corações foram retirados e o ventrículo direito dissecado com a finalidade de expor o septo interventricular; este foi dividido a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior, do ventrículo esquerdo. Os músculos papilares foram cuidadosamente dissecados, mantendo-se nas suas extremidades segmentos da parede ventricular. Esses fragmentos serão presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 a 4,2 mm; a fixação dos anéis nestes fragmentos tem como finalidade evitar a lesão da extremidade dos músculos papilares. Estes, após terem suas extremidades presas aos anéis, foram rapidamente transferidos para câmara de vidro contendo a mesma solução de Krebs-Henseleit descrita acima, continuamente oxigenada com 95% de O₂ e 5% de CO₂ e mantida à temperatura de 28°C, graças ao uso de banho circulante (Refrigerating/Heating -20°C to 150°C, PolyScience Division of Preston Industries, Inc., Niles, IL, USA). O músculo papilar foi posicionado verticalmente e sua extremidade inferior acoplada a um fio de aço inoxidável, 0,38 mm de diâmetro, conectado a um transdutor de força (Grass FT03 Force Displacement Transducer, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA). O fio de aço atravessava uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho

da câmara de vidro. A porção superior tendinosa do músculo papilar foi conectada a um fio de aço, semelhante ao anterior, que estava ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica de metal. Sobre esta extremidade existia um micrômetro (L.S. Starrett. Co. Athol. Mass. nº463, USA.) que controlava a extensão dos movimentos da alavanca, permitindo ajustar o comprimento de repouso do músculo papilar. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso, por fio de aço, semelhante aos anteriores, um peso de 5,0 g, denominado pré-carga, que tinha por finalidade promover o estiramento inicial do músculo papilar. A alavanca era constituída de alumínio ou bronze, rígida e leve, sendo a razão entre os braços longo e curto de 4:1.

Os músculos papilares foram estimulados 12 vezes por minuto (0,2 Hz) por meio de eletrodos de platina tipo agulha (Grass E8, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, USA), posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados a estimulador elétrico (Grass S48, GRASS Technologies, Na Astro-Med, Ic. Product Group, West Warwick, RI, USA) que emitia estímulos em onda quadrada de 5 mili-segundos. A voltagem de estímulo utilizada foi, 12 a 15 volts, aproximadamente 10% acima do valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. O pH da solução foi entre 7,38 a 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução foi mantida entre 550 a 600 mmHg.

Após um período de 60 minutos, durante os quais os músculos contraíram contra a pré-carga sem desenvolverem força, contração isotônica, foi colocado uma carga adicional de 50 g, denominada pós-carga, na extremidade do braço curto da alavanca. A carga total, pré-carga acrescida da pós-carga, impedia que os músculos encurtassem, passando os mesmos a desenvolverem somente força, contração

isométrica. O excessivo estiramento muscular que poderia ser causado pela adição da pós-carga foi evitado pelo micrômetro que impedia a movimentação da alavanca. Após a estabilização do músculo em contração isométrica, este foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular associado à força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denominou-se L_{max} . Após atingir o L_{max} , o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em contração isométrica para determinação final de L_{max} . O registro das variáveis foi iniciado após verificar-se que o músculo permaneceu estável em contração isométrica durante 15 minutos.

2.9.2.1- Parâmetros funcionais

Os seguintes parâmetros mecânicos foram analisados a partir de curvas obtidas durante uma contração isométrica: tensão desenvolvida (TD, g/mm^2), tensão de repouso (TR, g/mm^2), velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida ($+dT/dt$, $g/mm^2/s$) e velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida ($-dT/dt$, $g/mm^2/s$). A Figura 1 ilustra a curva de contração isométrica que foi obtida durante os experimentos.

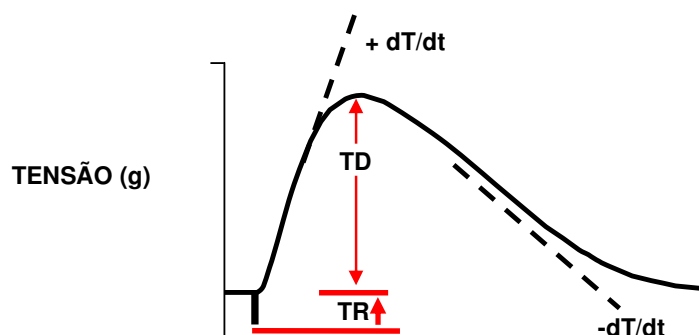


Figura 2. Representação da curva de contração isométrica

As contrações isométricas foram registradas em um sistema de aquisição de dados computadorizado (AcqKnowledge[®] MP100, Biopac Systems, Inc, Santa Barbara, CA, USA). A análise das curvas permitiu determinar os valores dos parâmetros mecânicos. Os valores da TD, TR, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ foram divididos pela área seccional do músculo papilar. Este processo de normalização permitiu comparar o desempenho de músculos de diferentes tamanhos. Os dados obtidos foram apresentados de duas formas neste trabalho: valores absolutos e percentuais médio de resposta do grupo tratado em relação à média do grupo controle. Neste último caso, os valores obtidos do grupo controle corresponderam à 1,0.

2.9.2.2- Protocolo funcional

O desempenho mecânico dos músculos papilares em contração isométrica foi analisado sob condição basal e após diferentes manobras inotrópicas e lusinotrópicas. Essas foram utilizadas com a finalidade de identificar alterações da contração e do relaxamento que poderiam não ser observadas em condições basais. Além disso, as mesmas podem auxiliar no entendimento dos possíveis mecanismos relacionados com as alterações da função mecânica do miocárdio. As manobras mais freqüentemente utilizadas são: potencial pós-pausa, variação da concentração de cálcio extracelular e alteração da freqüência de estímulo cardíaco, que permitem identificar a participação do trânsito de cálcio intracelular na patogênese da disfunção do miocárdio.

2.9.2.2.1- Protocolo funcional em condição basal

A obtenção dos dados em condição basal foi realizada com concentração de cálcio de 2,5 mM na solução de Krebs-Henseleit. Além disso, nesta concentração de cálcio também foi obtida a curva entre tensão de repouso e variações de comprimento diastólico do músculo (curva de tensão-comprimento). O comportamento da curva permite inferir a rigidez miocárdica do músculo papilar. Com essa finalidade, a TR foi analisada em comprimentos musculares correspondentes a 90%, 92%, 94%, 96%, 98% e 100% de $L_{\text{máx}}$. A análise do comportamento da TR em relação a variações no comprimento do músculo foi realizada pelo modelo de regressão potencial, por meio da seguinte equação: $(TR) = 79,074643 - 1,731019\text{Comp} + 0,009481\text{Comp}^2$ para o grupo controle e $(TR) = 78,935064 - 1,725145\text{Comp} + 0,009429\text{Comp}^2$ no grupo obeso. Além disso, os coeficientes angulares e de inclinação da curva tensão-comprimento foram calculados.

2.9.2.2.2- Manobras inotrópicas e lusitrópicas

As seguintes manobras inotrópicas e lusinotrópicas miocárdicas com efeitos positivos e negativos foram realizadas:

2.9.2.2.2.1- Potenciação pós-pausa

A potenciação potencial pós-pausa (PPP) é um instrumento utilizado para estudar a função de liberação e armazenamento de cálcio pelo retículo sarcoplasmático.⁽⁹⁴⁾ Além disso, esta manobra permite analisar indiretamente o

trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$. A relação entre PPP e a função miocárdica foi realizada com concentração de cálcio de 0,5 mM na solução de Krebs-Henseleit e após períodos de repouso de 10, 30 e 60 segundos com intervalos de 5 minutos entre cada elevação. Os períodos crescentes tiveram como finalidade disponibilizar maiores quantidades de cálcio citosólico e, portanto, intensificar a magnitude do desempenho do músculo cardíaco.

2.9.2.2.2- Elevação da concentração de cálcio extracelular

A elevação da concentração de cálcio intracelular acarreta aumento do fluxo desse íon por meio dos canais lentos de Ca^{+2} e pela troca $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$,⁽⁹⁵⁾ o que permite avaliar os mecanismos relacionados com o transporte de cálcio intracelular e a função miocárdica. A elevação da concentração de cálcio na solução de Krebs-Henseleit foi realizada com aumentos sequenciais de Ca^{+2} de 0,5 para 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM com intervalos de 5 minutos entre cada concentração.

2.9.2.2.3- Alteração da frequência cardíaca

A relação entre frequência de batimentos e função cardíaca permite avaliar o trânsito de cálcio intracelular e o acoplamento excitação-contração.⁽⁹⁶⁾ Esta manobra foi realizada com concentração de cálcio de 1,0 mM⁽⁹⁶⁾ na solução de Krebs-Henseleit e após aumento seqüencial da frequência de estímulo de 0,2 para 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 1,0 e 0,2Hz, com intervalos de 5 minutos entre cada elevação.

2.9.2.2.2.4- Bloqueio do gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH)

O iodoacetato (Sigma[®]-Aldrich, St Louis, MO, USA) é um bloqueador específico da enzima gliceraldeído 3-fostato desidrogenase, inibindo a via glicolítica, ou seja, a formação de piruvato⁽⁶⁶⁾. A dose de iodoacetato diluída em água ultrapura e o tempo de exposição ao bloqueador para a realização do experimento foi, respectivamente, 10^{-3} M e 75 minutos; este foi o tempo necessário para a maioria dos músculos papilares apresentarem tensão desenvolvida com valor igual a zero gramas.

2.9.2.2.2.5- Estímulo da piruvato desidrogenase (PDH)

O dicloroacetato (Sigma[®]-Aldrich, St Louis, MO, USA) é um estimulador específico da enzima piruvato desidrogenase^{70,71)}. A dose de dicloroacetato diluída em água ultrapura e o tempo de exposição ao estimulador para a realização do experimento foi, respectivamente, 1mM e 60 minutos; este tempo de exposição foi escolhido porque nos estudos pilotos não foi encontrada variação da tensão desenvolvida após este período.

Após o término das manobras de avaliação mecânica do músculo papilar, os mesmos foram retirados da preparação e usados para a avaliação da área seccional. Os parâmetros morfológicos utilizados para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (mm^2). O comprimento in vitro, ($L_{\text{máx}}$) foi medido com auxílio de um catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando-

se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme e peso específico aproximadamente unitário, a área seccional foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento determinado em $L_{máx}$.

Os músculos papilares dissecados inadequadamente ou que apresentaram comportamento funcional fora do padrão de normalidade foram excluídos do estudo. O desempenho mecânico foi considerado inadequado quando os valores das variáveis obtidas em contração isométrica apresentaram afastamento superior a 1,96 desvios padrão da média. Os músculos papilares que apresentaram área seccional entre 0,5 e 1,5 mm² foram utilizados no experimento.

2.10- Análise estatística

O perfil nutricional, as co-morbidades associadas à obesidade e as análises macroscópicas e funcionais referentes à remodelação cardíaca, foram expressas por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade e submetidas ao teste "t" de Student para amostras independentes ⁽⁹⁷⁾.

A comparação do perfil glicêmico entre os grupos, visualizado tanto pelo teste de tolerância à insulina quanto pelo teste de tolerância à glicose, 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⁽⁹⁸⁾.

As variáveis relacionadas ao estudo funcional do músculo papilar após a realização das diferentes manobras inotrópicas e lusinotrópicas e a ação do bloqueador e do estimulador da via gicolítica foram estudadas pela ANOVA no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e

complementada com o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls⁽⁹⁹⁾.

A análise do comportamento da TD e TR após administração do bloqueador da via glicolítica, foi realizada por meio da construção de modelo de regressão linear. A comparação entre os modelos foi feita pelo teste do coeficiente angular e da constante de regressão ⁽¹⁰⁰⁾.

A comparação entre as curvas de regressão da TR em relação ao comprimento do músculo foi realizada pelo teste do coeficiente angular e da constante de regressão ⁽¹⁰⁰⁾. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

3. RESULTADOS

3.1- Determinação do momento inicial de obesidade

O peso corporal foi semelhante nas três primeiras semanas de tratamento em ambos os grupos C e Ob; entretanto, após a 4ª semana de tratamento, o peso corporal dos animais Ob foi significativamente maior que os C (Figura 3).

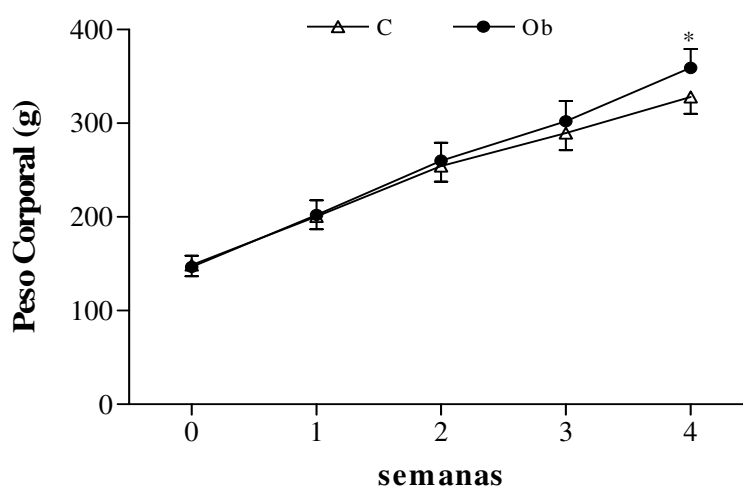


Figura 3. Evolução semanal do peso corporal dos animais controle (C, n=30) e obeso (Ob, n=30). Dados expressos em média \pm desvio padrão. ANOVA para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C.

3.2- Obesidade 30 semanas

3.2.1- Composição dos grupos controle e obeso

Na 30ª semana de tratamento após o início da obesidade, após a aplicação do critério estabelecido para a composição dos grupos experimentais, vinte e dois animais de cada grupo permaneceram no estudo, controle (C; n=22) e obeso (Ob; n=22).

3.2.2- Perfil nutricional dos animais

A Tabela 1 mostra o perfil nutricional dos animais C e Ob. O peso corporal inicial e final, o ganho de peso, a ingestão calórica, a eficiência alimentar, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total, índice de adiposidade e valores séricos glicose foram maiores no Ob do que no C. A ingestão alimentar foi menor no Ob do que no C. Não houve diferença significativa entre os grupos nas dosagens séricas de proteína, triglicérides, colesterol, HDL, LDL e NEFA.

Tabela 1. Perfil nutricional dos animais

Variáveis	Grupos	
	C (n=22)	Ob (n=22)
PCI (g)	328,0 ± 18,2	359,8 ± 16,6*
PCF (g)	497,7 ± 25,6	561,7 ± 35,7*
Ganho de peso (g)	159,3 ± 26,8	201,9 ± 28,7*
Ingestão alimentar (g/dia)	25,1 ± 1,7	21,8 ± 1,8*
Ingestão calórica (kcal/dia)	74,3 ± 5,4	86,1 ± 6,2*
Eficiência alimentar (%)	1,25 ± 0,15	1,34 ± 0,18*
Epididimal (g)	6,65 ± 1,96	9,21 ± 3,80*
Retroperitoneal (g)	7,86 ± 2,35	11,58 ± 4,90*
Visceral (g)	8,31 ± 3,37	11,43 ± 4,58*
Gordura corporal total (g)	21,8 ± 7,82	32,8 ± 9,31*
Índice de adiposidade (%)	4,28 ± 1,65	5,96 ± 1,54*
Glicose (mg/dL)	107 ± 22,1	126 ± 19,3*
Triglicérides (mg/dL)	60,1 ± 15,2	66,1 ± 24,4
Colesterol (mg/dL)	58,3 ± 10,5	59,0 ± 8,1
HDL (mg/dL)	24,8 ± 4,3	27,1 ± 4,9
LDL (mg/dL)	14,0 ± 3,3	12,2 ± 2,8
Proteína (g/dL)	6,4 ± 0,3	6,7 ± 0,4
NEFA (mmol/L)	0,27 ± 0,05	0,28 ± 0,06

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; HDL: lipoproteína de alta intensidade; LDL: lipoproteína de baixa intensidade; NEFA: ácidos graxos não-esterificados. Teste "t" de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C. # p<0,10 vs C.

3.2.3- Pressão arterial sistólica

A Figura 4 mostra o resultado da pressão arterial sistólica final realizada nos grupos C e Ob. Não houve diferença significativa na pressão arterial sistólica final entre os grupos; portanto, a obesidade durante 30 semanas não acarretou hipertensão arterial.

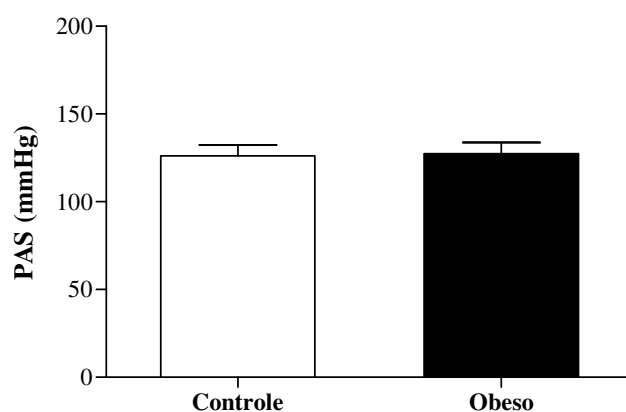


Figura 4. Pressão arterial sistólica final dos animais controle (C, n=22) e obeso (Ob, n=22). Dados expressos em média \pm erro-padrão. Teste "t" de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

3.2.4- Teste de tolerância à glicose

A Figura 5 mostra o resultado do teste de tolerância à glicose realizado nos grupos C e Ob. Os níveis glicêmicos foram semelhantes no momento basal entre os grupos. Após a administração intraperitoneal de glicose, a glicemia foi elevada no grupo Ob nos momentos 15, 30, 60, 90 e 120 em relação ao grupo C. A área glicêmica foi maior no grupo Ob em relação ao C (Figura 6).

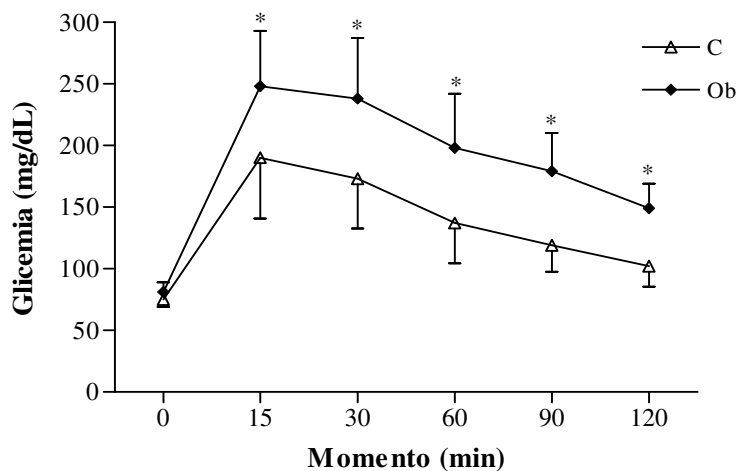


Figura 5. Teste de tolerância à glicose dos animais controle (C, n=22) e obeso (Ob, n=22). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C.

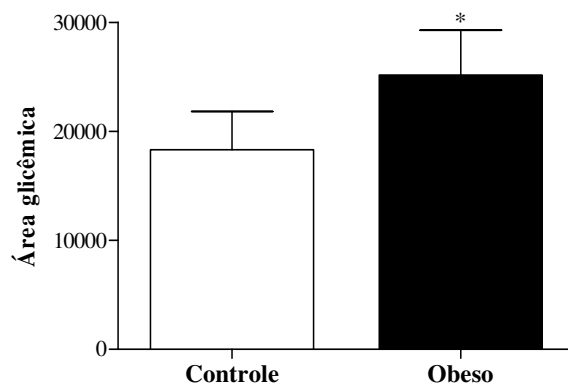


Figura 6. Área glicêmica dos animais controle (C, n=22) e obeso (Ob, n=22). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs C.

3.2.5- Teste de tolerância à insulina

As Figuras 7 e 8 mostram o resultado do teste de tolerância à insulina realizado nos grupos C e Ob. Os níveis glicêmicos basais e após a administração

intraperitoneal de insulina foram semelhantes entre os grupos. Não houve diferença estatística na área glicêmica entre os grupos.

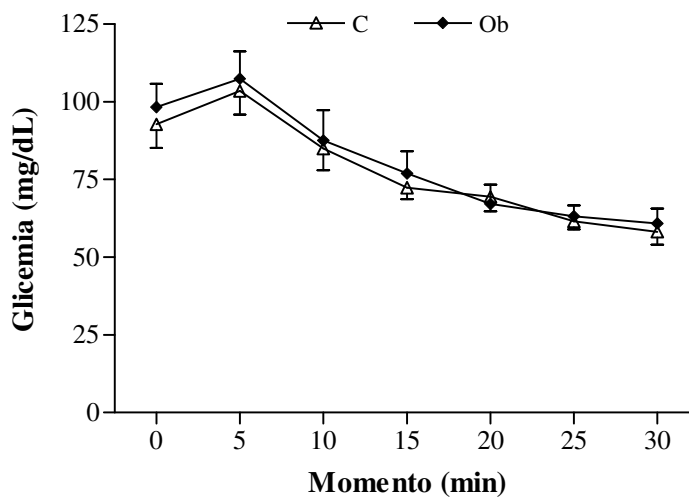


Figura 7. Teste de tolerância à insulina dos animais controle (C, n=22) e obeso (Ob, n=22). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni.

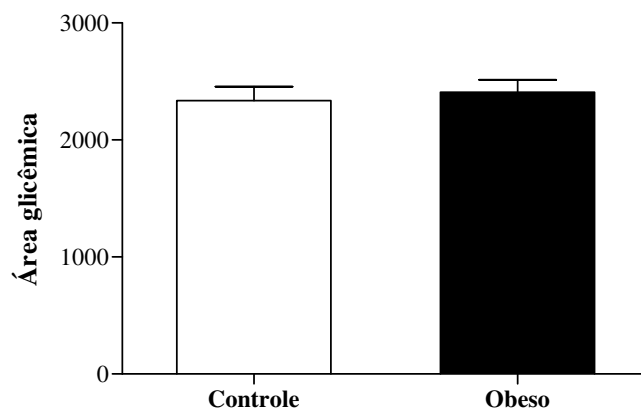


Figura 8. Área glicêmica dos animais controle (C, n=22) e obeso (Ob, n=22) obtida no teste de tolerância à insulina. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes.

3.2.6- Análise sérica dos hormônios insulina e leptina

A Figura 9 mostra as dosagens de insulina e leptina dos ratos C e Ob. Após trinta semanas de obesidade os animais Ob apresentaram níveis séricos de insulina e leptina maiores que os C.

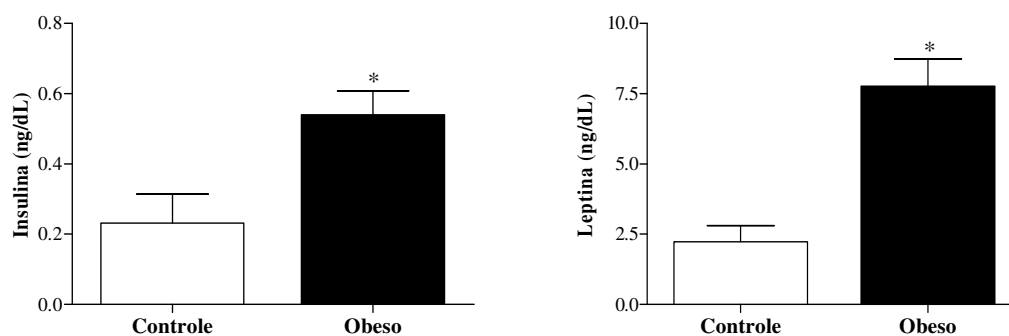


Figura 9. Níveis séricos de insulina e leptina dos animais controle (C, n=10) e obeso (Ob, n=10). Dados expressos em média \pm erro-padrão. Teste "t" de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs C.

3.2.7- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A Tabela 2 mostra teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos ratos C e Ob. Os animais Ob apresentaram menor quantidade de água no fígado que os animais C. Entretanto, não houve diferença significativa na quantidade de água no VE, VD, AT e pulmão.

Tabela 2. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

Variáveis	Grupos	
	C (n=22)	Ob (n=22)
VE (%)	75,4 ± 0,8	75,4 ± 0,8
VD (%)	75,9 ± 0,9	75,6 ± 1,0
AT (%)	77,7 ± 1,2	77,4 ± 1,9
Pulmão (%)	77,6 ± 0,6	77,6 ± 0,7
Fígado (%)	67,8 ± 0,9	66,2 ± 1,4*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso submetidos à 30 semanas de tratamento; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Teste "t" de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

A Tabela 3 mostra a relação peso úmido/peso seco cardíaco, pulmonar e hepático dos ratos C e Ob. Os animais Ob apresentaram menor relação no fígado que os animais C. Entretanto, não houve diferença significativa nas relações do VE, VD, AT e pulmão.

Tabela 3 Relação peso úmido/ seco nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

Variáveis	Grupos	
	C (n=22)	Ob (n=22)
VE	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,03
VD	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,03
AT	0,23 ± 0,02	0,23 ± 0,01
Pulmão	0,20 ± 0,02	0,20 ± 0,01
Fígado	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio. * p<0,05 vs C. Teste "t" de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C.

3.2.8- Estrutura do coração *post mortem*

A Tabela 4 mostra a estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos ratos C e Ob. Após trinta semanas de obesidade, não houve diferença significativa no comprimento da tíbia, nos pesos do VE, VD, AT e coração. Também não foi visualizada diferença quando normalizados pela Tíbia nos dois grupos.

Tabela 4 Estrutura macroscópica cardíaca *post mortem*

Variáveis	Grupos	
	C (n=22)	Ob(n=22)
Tíbia (cm)	4,37 ± 0,09	4,35 ± 0,08
VE (g)	0,89 ± 0,08	0,94 ± 0,09 [#]
VD (g)	0,30 ± 0,07	0,32 ± 0,05
AT (g)	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,01
Coração (g)	1,29 ± 0,06	1,38 ± 0,05
VE/Tíbia (g/mm)	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02 [#]
VD/Tíbia (g/mm)	0,055 ± 0,01	0,060 ± 0,01
AT/Tíbia (g/mm)	0,021 ± 0,003	0,023 ± 0,002
Coração/Tíbia (g/mm)	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,02

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/Tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia; VD/Tíbia: relação do peso do ventrículo direito pelo comprimento da tíbia; AT/Tíbia: relação do peso do átrio pelo comprimento da tíbia. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos. Teste "t" de Student para amostras independentes. [#] 0,05 < p < 0,10 vs C.

3.2.9- Função miocárdica *in vitro* - Músculo papilar isolado

A avaliação da função miocárdica *in vitro* por meio de músculo papilar isolado do VE, em condições basais e durante manobras inotrópicas, está apresentada na Tabela 5 e nas Figuras 10-22.

3.2.9.1- Condição basal

Os valores basais da TD, TR, +dT/dt e -dT/dt e das áreas seccionais dos músculos papilares foram semelhantes entre os grupos; (Tabela 5).

Tabela 5. Contração isométrica basal

Variáveis	Grupos	
	C (n=22)	Ob (n=22)
TD (g/mm ²)	7,14 ± 1,77	6,89 ± 1,54
TR (g/mm ²)	0,68 ± 0,24	0,67 ± 0,20
+dT/dt (g/mm ² /s)	69,4 ± 18,1	62,9 ± 14,6
-dT/dt (g/mm ² /s)	22,1 ± 5,9	21,6 ± 4,9
Área seccional (mm ²)	0,97 ± 0,24	0,98 ± 0,27

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; concentração de cálcio basal: 2.5 mM; TD: tensão máxima desenvolvida; TR: tensão de repouso; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Teste "t" de Student para amostras independentes.

A influência da variação do comprimento muscular sobre a tensão de repouso do músculo papilar está apresentada na Figura 10. Não foram observadas diferenças significantes entre os dois grupos analisadas pelo modelo de regressão não linear. Este resultado mostra que a obesidade não aumentou o grau de rigidez do miocárdio.

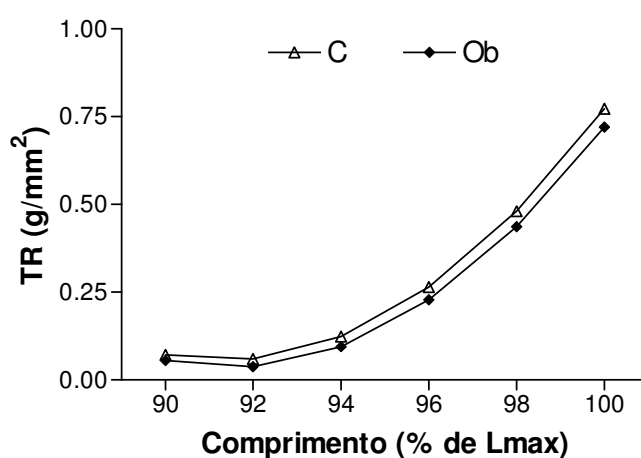


Figura 10. Comportamento da tensão de repouso em função do comprimento do músculo em Lmáx.

3.2.9.2- Potenciação pós-pausa

Os efeitos da pausa na função do músculo papilar em valores absolutos (g/mm^2) e percentual médio de resposta (%) estão mostrados nas Figuras 11 e 12, respectivamente. A manobra não acarretou diferença de comportamento da TD, TR, $+dT/dt$ e $-dT/dt$ entre os dois grupos.

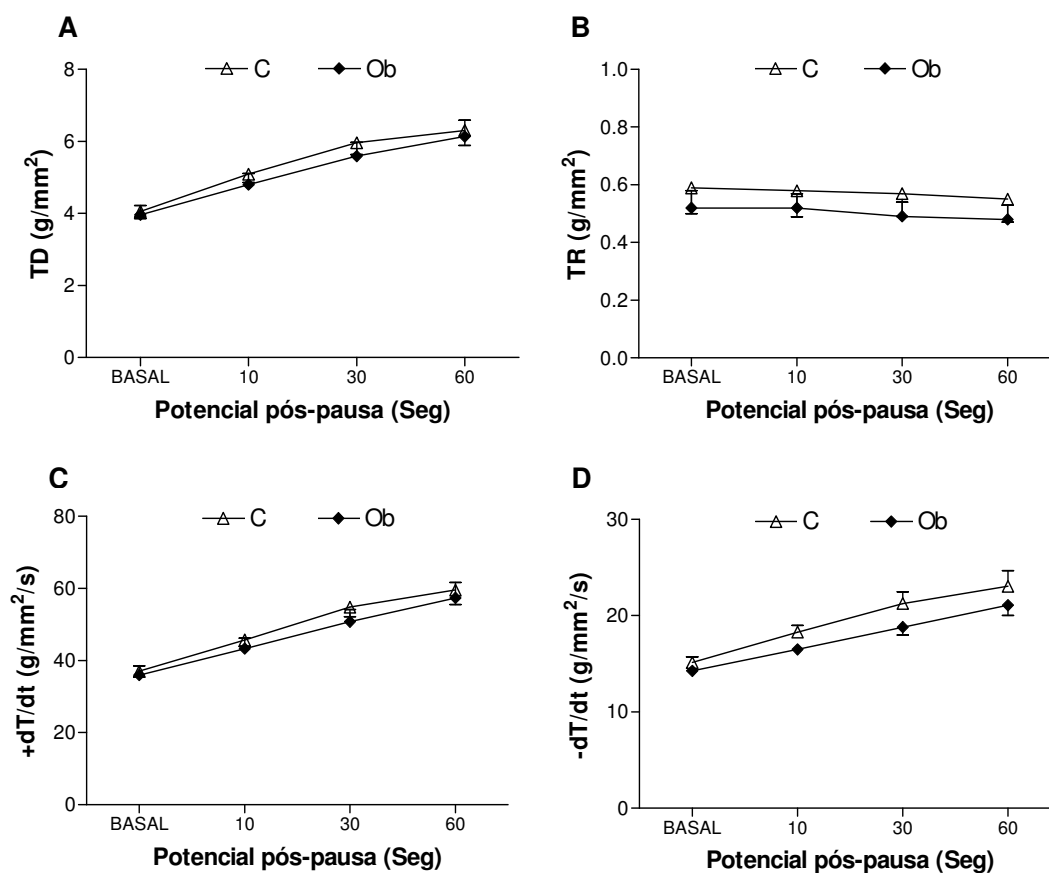


Figura 11. Potenciação pós-pausa realizada no miocárdio de ratos controles ($n=12$) e obesos ($n=12$) após a estimulação elétrica ser cessada durante 10, 30 e 60 segundos. **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso); **C:** $+dT/dt$ (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** $-dT/dt$ (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados absolutos expressos em média \pm erro-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

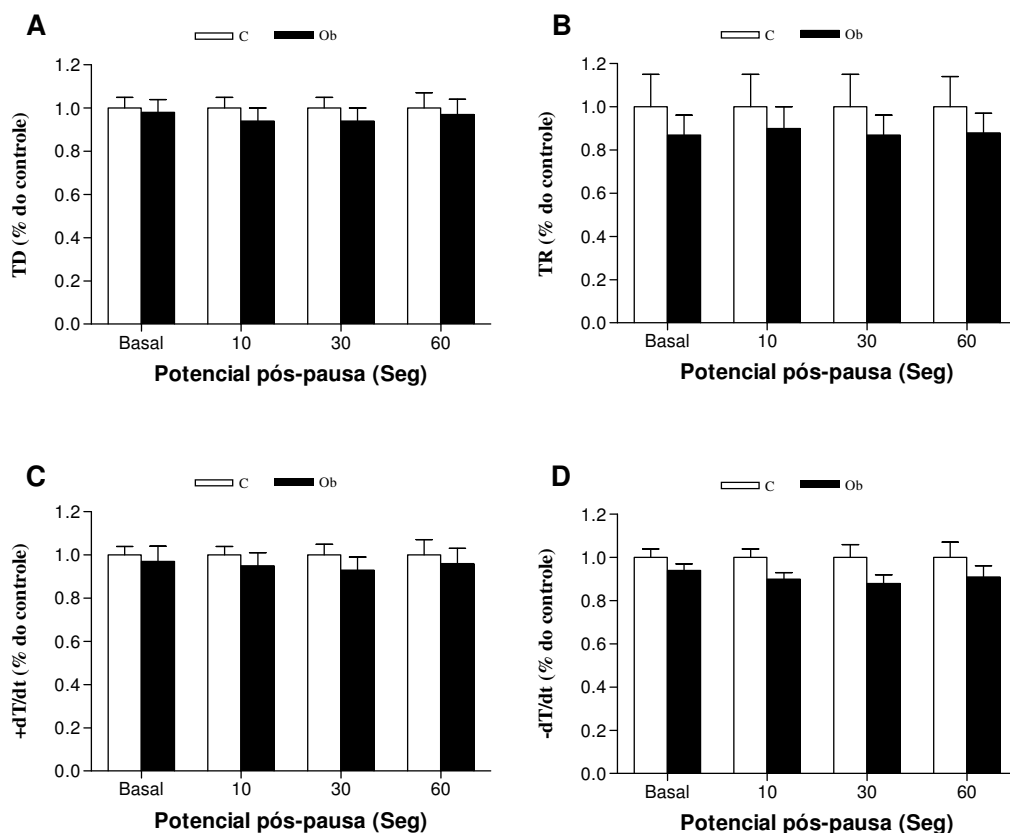


Figura 12. Potenciação pós-pausa expresso em percentual (%) de resposta do grupo Ob em relação ao C após a estimulação elétrica ser cessada durante 10, 30 e 60 segundos. **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso); **C:** +dT/dt (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** -dT/dt (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados expressos em percentual médio \pm erro-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

3.2.9.3- Elevação de cálcio extracelular

Os efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular na função do músculo papilar em valores absolutos (g/mm^2) e percentual de resposta médio (%) estão sumarizados e ilustrados nas Figuras 13 e 14. A obesidade não foi capaz de promover alterações entre os grupos nas diferentes concentrações de cálcio nas variáveis analisadas, TD, TR, +dT/dt e -dT/dt.

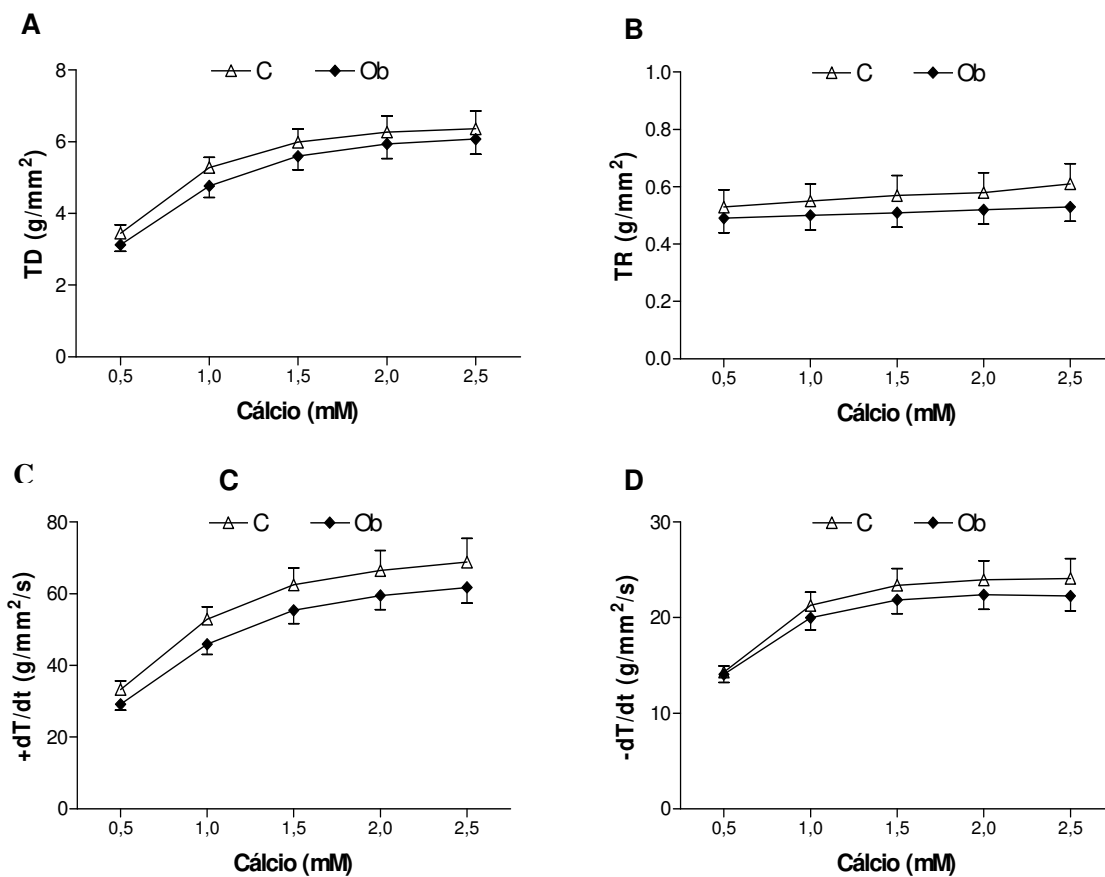


Figura 13. Efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular no miocárdio de ratos controles ($n= 12$) e obesos ($n= 12$). **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso); **C:** +dT/dt (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** -dT/dt (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados absolutos expressos em média \pm erro-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

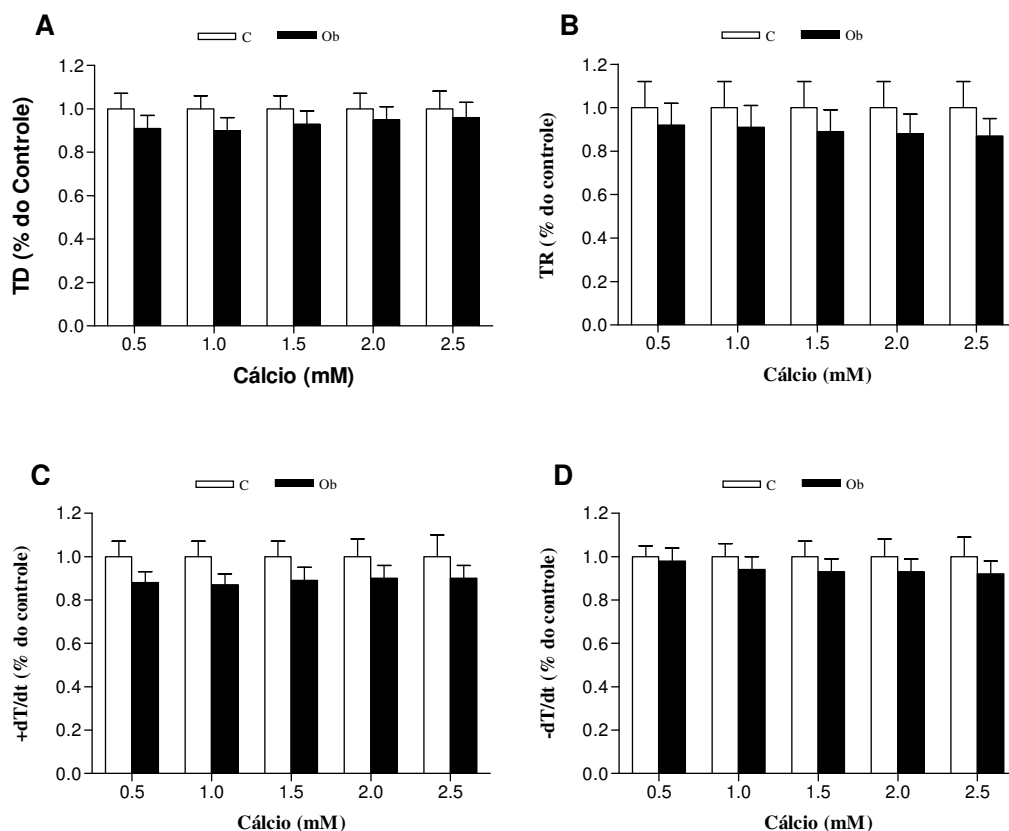


Figura 14. Efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular expresso em percentual (%) de resposta do grupo Ob em relação ao C. **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso); **C:** +dT/dt (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** -dT/dt (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados expressos em percentual médio \pm desvio-erro. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

3.2.9.4- Alteração de freqüência cardíaca

Os efeitos da alteração da freqüência do estímulo na função do músculo papilar estão apresentados nas Figuras 15 e 16. Não foram observadas alterações nas variáveis TD, TR, +dT/dt e -dT/dt entre os grupos após variação da freqüência de estímulo.

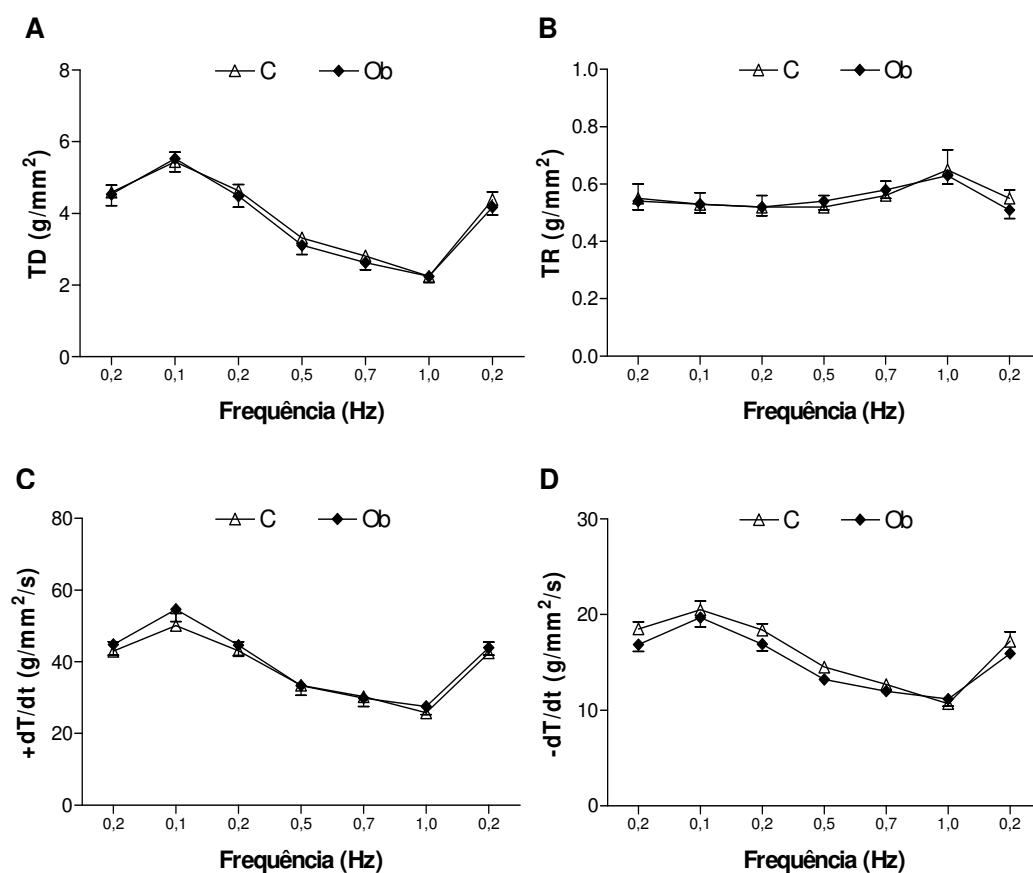


Figura 15. Efeitos da alteração da frequência cardíaca no miocárdio de ratos controles ($n=10$) e obesos ($n=10$). **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso); **C:** $+dT/dt$ (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** $-dT/dt$ (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados absolutos expressos em média \pm erro-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

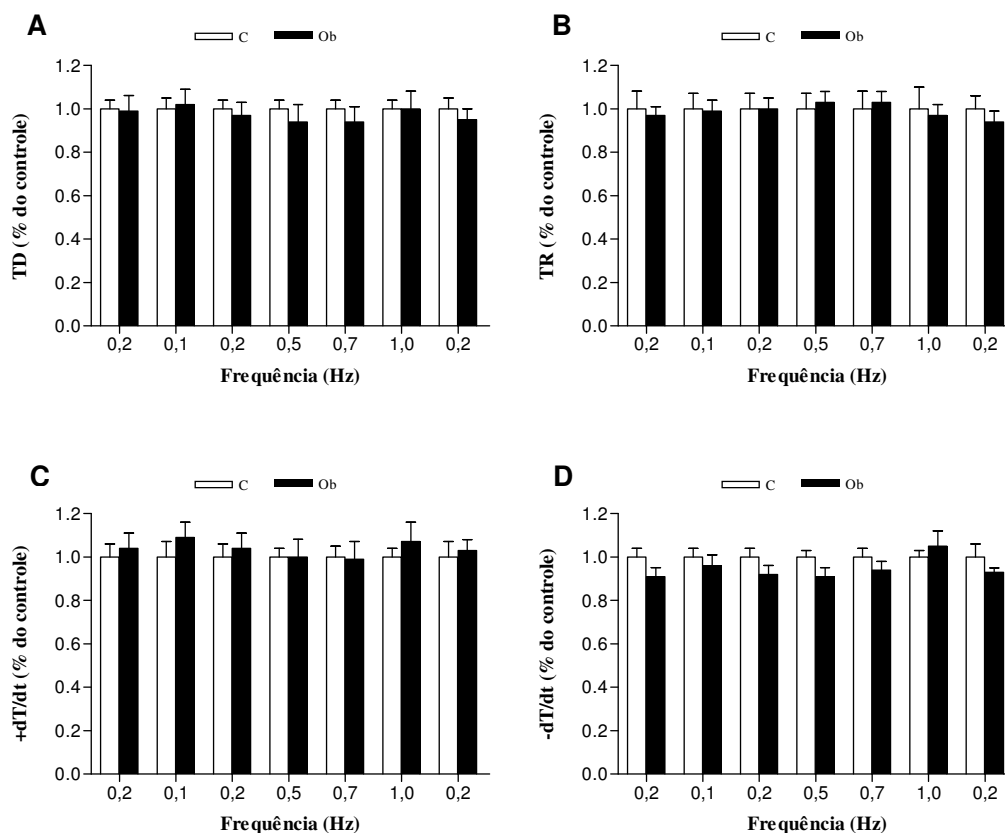


Figura 16. Efeitos da alteração da frequência cardíaca expresso em percentual (%) de resposta do grupo Ob em relação ao C. **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso); **C:** +dT/dt (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** -dT/dt (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados expressos em percentual médio \pm erro-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

3.2.9.5- Bloqueio do gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH)

Os efeitos do bloqueio do GAPDH pelo iodoacetato sobre a função do músculo papilar em valores absolutos (g/mm^2) e percentual de resposta médio (%) estão sumarizados e ilustrados nas Figuras 17 e 18. Não foram observadas alterações nas variáveis TD, TR, +dT/dt e -dT/dt entre os grupos após o bloqueio.

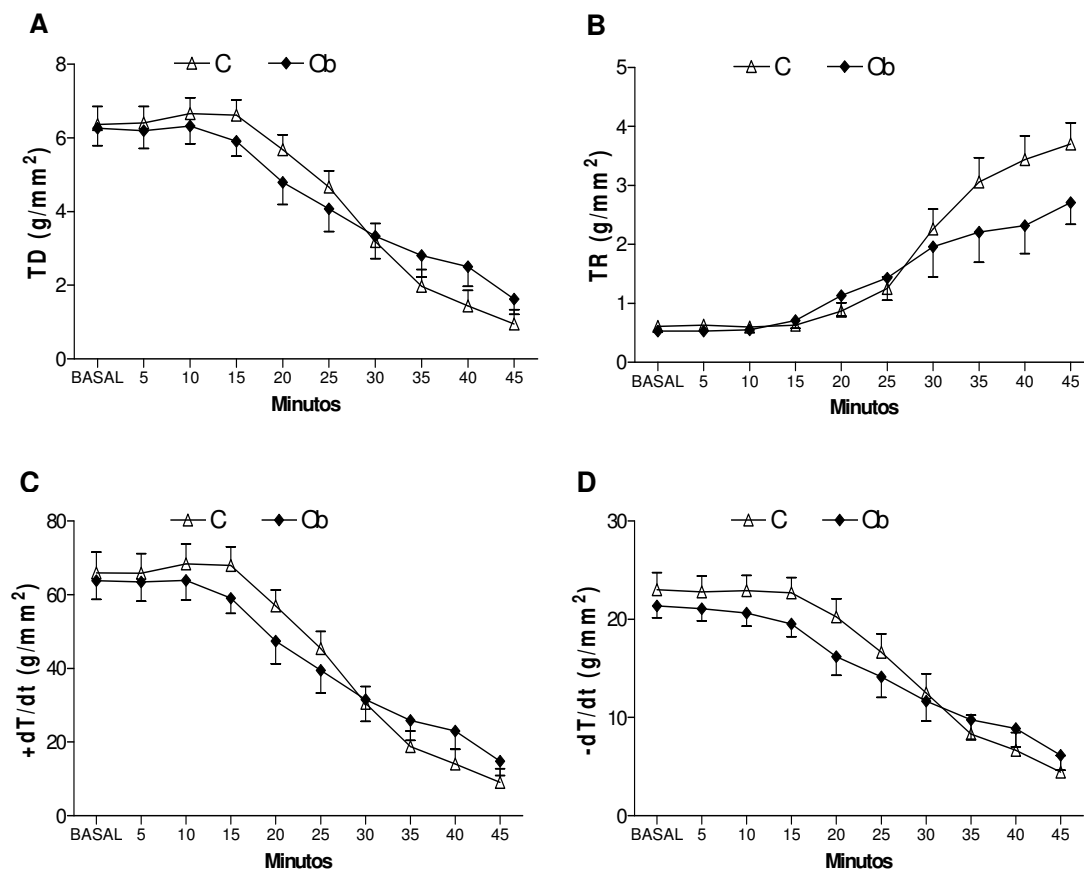


Figura 17. Efeitos do bloqueio do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase com iodoacetato no miocárdio de ratos controles ($n=12$) e obesos ($n=12$). **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** (tensão de repouso); **C:** $+dT/dt$ (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** $-dT/dt$ (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados absolutos expressos em média \pm erro-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

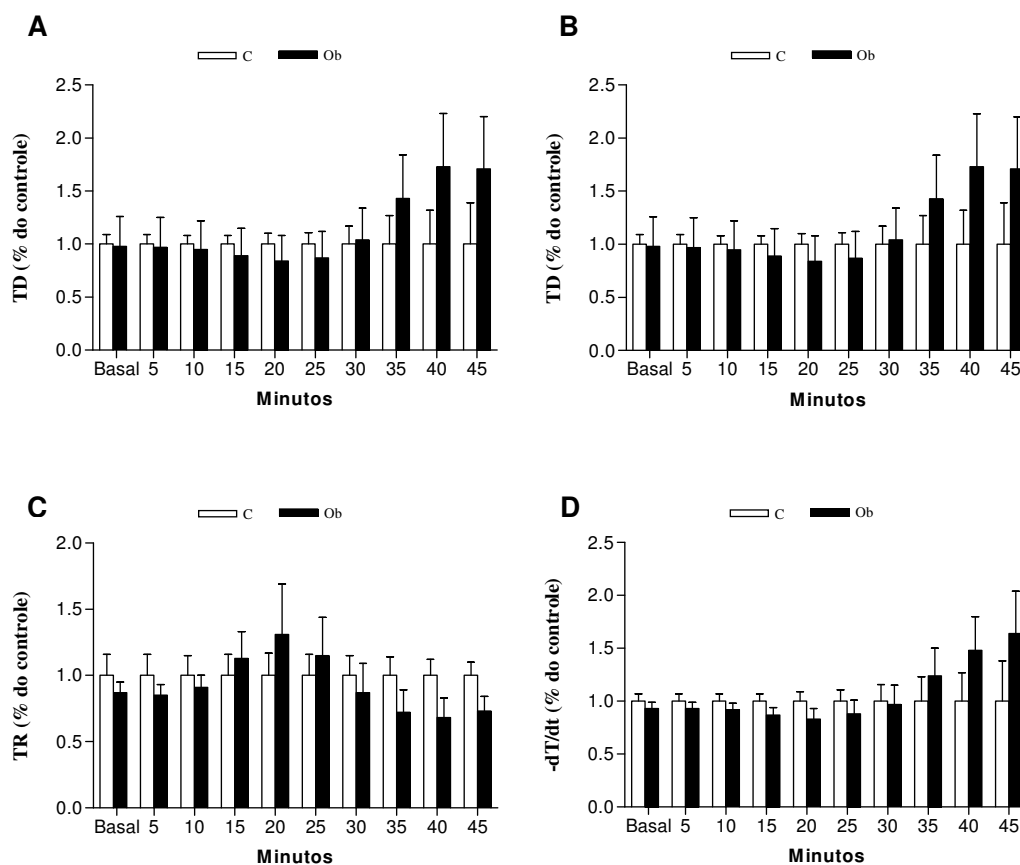


Figura 18. Efeitos do bloqueio do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase com iodoacetato no miocárdio de ratos expresso em percentual (%) de resposta do grupo Ob em relação ao C. **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso); **C:** +dT/dt (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** -dT/dt (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados expressos em percentual médio \pm erro-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

As Figuras 19A e 19B mostram a regressão linear da TD e TR, respectivamente, em função dos momentos de avaliação após o bloqueio pelo iodoacetato. A TD não mostrou diferença significativa entre o grupo Ob e C. A TR apresentou uma diferença de comportamento, sendo a inclinação da reta mais acentuada no grupo C.

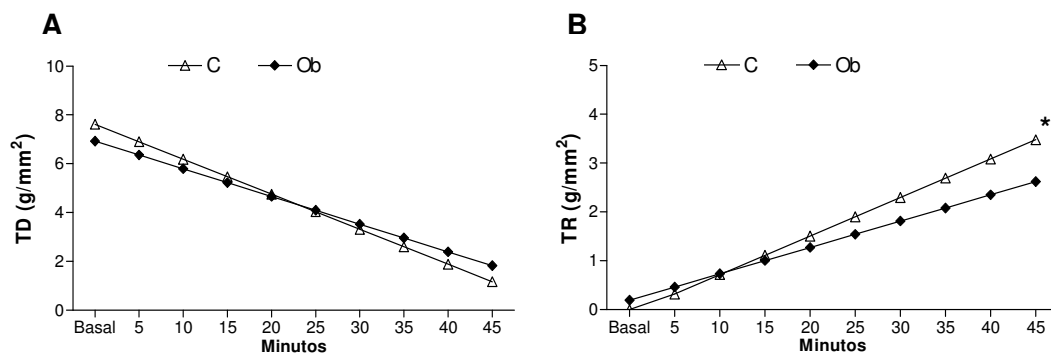


Figura 19. Efeitos do bloqueio do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase com iodoacetato no miocárdio de ratos pelo modelo de regressão linear. **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso). * $p < 0,05$ vs C.

O efeito do bloqueio do GAPDH pelo iodoacetato sobre a porcentagem de declínio da tensão desenvolvida no músculo papilar está apresentada na Figura 20. Não houve diferença entre os grupos Ob em relação ao C após a adição do bloqueador na solução nutritiva.

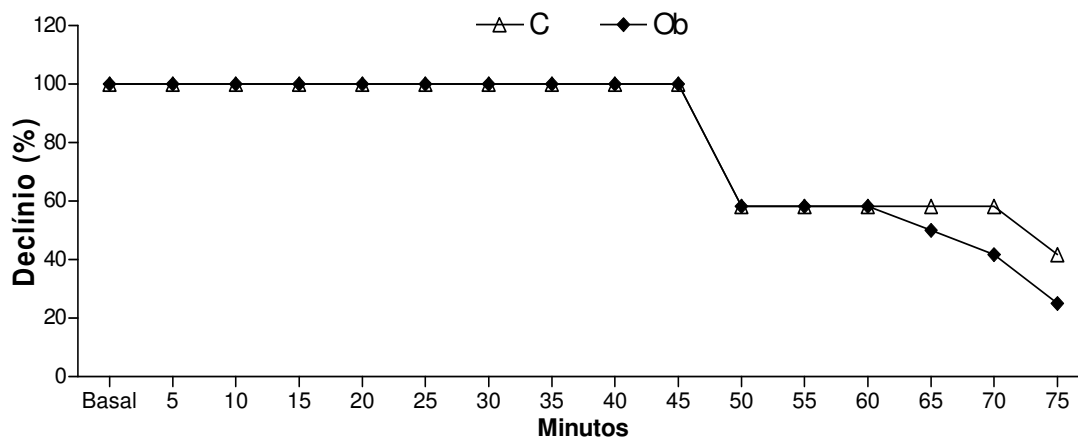


Figura 20. Efeitos do bloqueio do gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase com iodoacetato no miocárdio de ratos expresso em percentual (%) de declínio da tensão desenvolvida no músculo papilar. Teste “t” de Student para amostras independentes.

3.2.9.6- Estímulo da piruvato desidrogenase (PDH)

As Figuras 21 e 22 mostram a influência do estímulo da PDH pelo dicloroacetato sobre a função do músculo papilar. Não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos após estímulo com dicloroacetato.

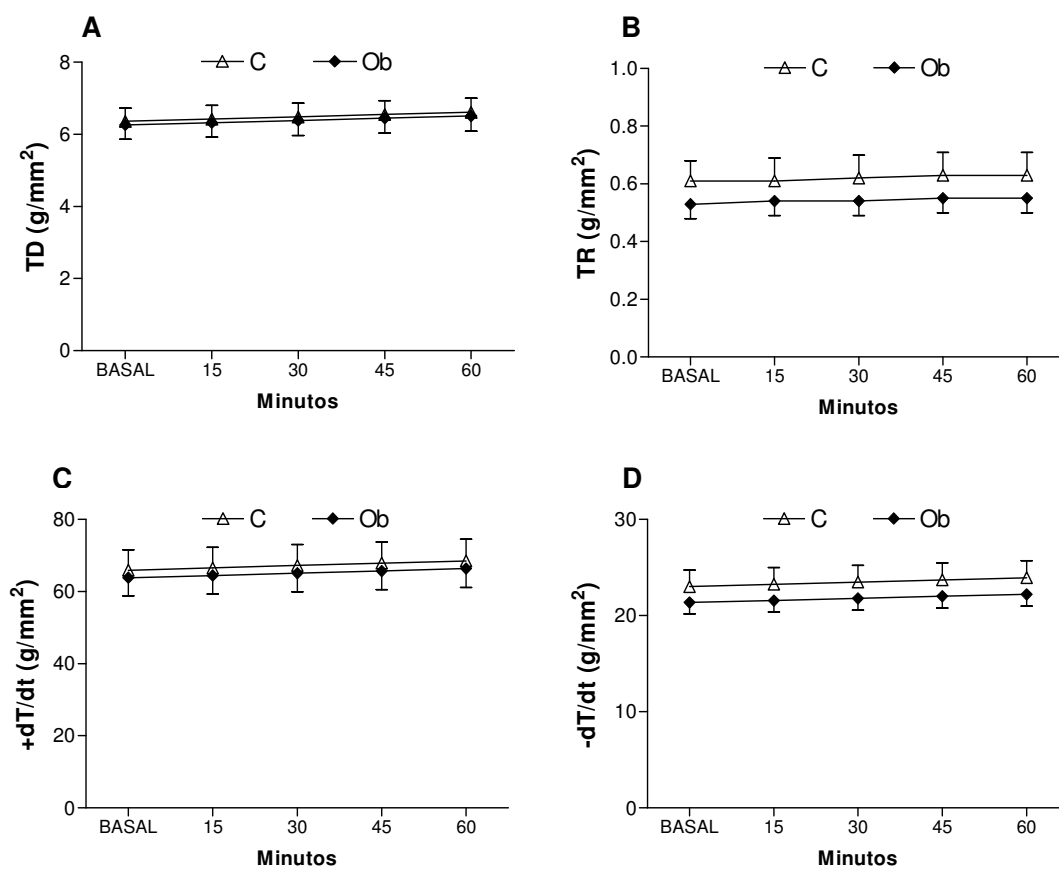


Figura 21. Efeitos do estímulo da piruvato desidrogenase com dicloroacetato no miocárdio de ratos controles (n= 10) e obesos (n= 10). **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:**(tensão de repouso); **C:** +dT/dt (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** -dT/dt (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados absolutos expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

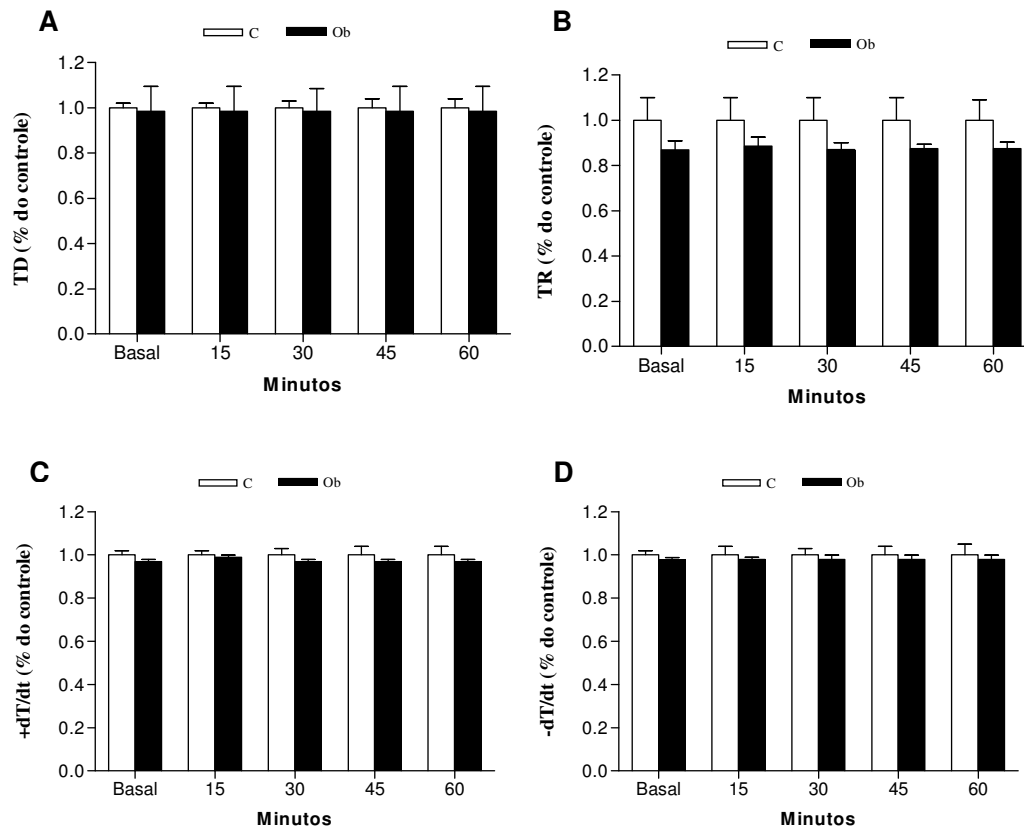


Figura 22. Efeitos do estímulo da piruvato desidrogenase com dicloroacetato no miocárdio de ratos expresso em percentual (%) de resposta do grupo Ob em relação ao C. **A:** TD (tensão máxima desenvolvida); **B:** TR (tensão de repouso); **C:** +dT/dt (velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida); **D:** -dT/dt (velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida). Dados expressos em percentual médio \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas para grupos independentes e complementada com teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

4. DISCUSSÃO

4.1- Momento inicial da obesidade

Os resultados desta investigação mostraram que a dieta hiperlipídica promoveu obesidade a partir da 4^a semana de tratamento. Estudo constatou que ratos, Sprague-Dawley, tornavam-se obesos na 4^a semana com dieta rica em carboidratos ⁽¹⁰¹⁾. Lima-Leopoldo e Leopoldo ^(79,80) em nosso laboratório verificaram diferença no peso corporal e no índice de adiposidade na 3^a semana após tratamento com dieta hiperlipídica. Com a exceção do trabalho citado acima, os investigadores que trabalham com modelo experimental de obesidade por dieta não identificam o momento do início da obesidade ⁽⁸²⁾. Este fato pode ocasionar erro de interpretação, principalmente em experimentos de curta duração.

4.2- Caracterização dos grupos controle e obeso

Embora a dieta hipercalórica tenha ocasionado obesidade, há uma probabilidade de resposta divergente no ganho de adiposidade entre os animais obesos; este fato também pode ocorrer nos animais controles submetidos à dieta normocalórica ⁽⁸¹⁾. Devido esta heterogeneidade de resposta, que poderia resultar na utilização de animais com peso normal como obesos ou vice versa, foi utilizado um critério de classificação, aplicado sobre o índice de adiposidade, para constituição dos grupos controle e obeso (Material e Métodos, item 2.6). Após a aplicação do critério, as perdas por não adesão ao procedimento foram de 26,7% nos grupo controle e obeso. Este dado significa que 26,7% dos animais controle, por exemplo, apresentavam o mesmo índice de adiposidade encontrado nos obesos. Esta constatação poderia alterar os resultados deste experimento. Portanto a aplicação

deste critério possibilita estudos com populações de animais mais homogêneas em relação ao grau de adiposidade. Os resultados obtidos com o critério são similares aos publicados anteriormente por nosso grupo ⁽⁸¹⁾.

4.3- Perfil nutricional dos animais

No período avaliado a dieta foi capaz de desenvolver obesidade, pois o índice de adiposidade foi 39,2% maior do que o controle. Os dados deste estudo estão de acordo com trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório que utilizaram a mesma metodologia ^(79,80). Autores que utilizaram dieta rica em gordura, em períodos mais curtos, também observaram obesidade.

Neste experimento, a dieta hiperlipídica também acarretou nos ratos obesos elevação no peso e na gordura corporal total. O peso dos animais obesos aumentou 13,0% em relação ao controle. O resultado, em relação ao peso corporal, está de acordo com alguns autores, ^(83,102) que utilizando dieta hiperlipídica, por 10 e 16 semanas observaram aumento no peso corporal de 15,6% e 15,5%, respectivamente, no obeso. Entretanto, divergem de outras pesquisas ^(103,104) que verificaram, elevação de 23,4% e 35,6% no peso corporal em relação o controle, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, por 28 e 17 semanas, respectivamente. Neste estudo, a gordura corporal total foi 56,2% maior que seu respectivo controle. Autores mostram que o peso corporal pode não ser um bom indicador de classificação de obesidade em animais ^(81,87). Este fato pode ser verificado neste estudo; enquanto o índice de adiposidade aumentou 39,2%, o peso corporal variou de 13,0%.

Obesidade é uma epidemia mundial conseqüente a maior ingestão e oferta de dietas altamente energéticas e palatáveis e da redução no gasto energético ⁽¹⁰⁵⁾. Por esta razão, intervenções dietéticas em animais, com maior disponibilidade energética, têm sido utilizadas para promover obesidade, desde que pesquisas em seres humanos apresentam diversas limitações éticas.

Nesta investigação, a obesidade foi induzida por meio de uma dieta hipercalórica, ricas em ácidos graxos mono e poliinsaturados (Quadro 4). A dieta hipercalórica apresenta teor energético de 3,65 Kcal/g e a normocalórica 2,95 Kcal/g, gerando uma diferença de 24% no conteúdo calórico.

Trabalhos anteriores mostraram que a ingestão de dieta hiperlipídica promoveu menos saciedade e, conseqüentemente, maior ingestão alimentar ^(37,86). Estes resultados diferem deste estudo, em que foi observado menor consumo de dieta hiperlipídica. Entretanto, o tratamento acarretou maior ingestão calórica nos Ob em relação ao C, mesmo com os animais obesos ingerindo menor quantidade de ração. A eficiência alimentar é empregada para constatar a conversão de alimentos ingeridos em ganho de peso corporal ⁽³⁸⁾. O maior aumento desta variável nos obesos, indica que estes animais apresentaram maior eficiência alimentar que os controles. Estes dados estão em concordância com trabalho que verificou maior eficiência alimentar, em ratos submetidos à dieta hiperlipídica por 15 semanas ⁽⁷⁸⁾. Entretanto, outro estudo não observou diferença na eficiência alimentar entre os grupos. ⁽³⁷⁾

O ganho de peso corporal é dependente do equilíbrio entre o consumo e gasto energético. A obesidade neste trabalho ocorreu devido a maior consumo calórico e eficiência alimentar das rações hiperlipídicas. Há evidências que o alto consumo de gordura não é acompanhado por aumento proporcional da sua

oxidação. Este fenômeno favorece a deposição dos lipídeos no tecido adiposo, como triacilglicerol, favorecendo também o aumento no peso corporal ⁽¹⁰⁵⁾.

4.4- Comorbidades

Neste trabalho foram visualizadas algumas comorbidades associadas com a obesidade experimental ^(37,38,82,83) como intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. O teste de tolerância à glicose mostrou maiores áreas glicêmicas nos ratos obesos. Portanto o desequilíbrio entre captação e utilização da glicose, acarretou intolerância à glicose. O teste de tolerância à insulina não acarretou alterações da área glicêmica entre os grupos controle e obeso em cada momento de avaliação. A ausência de alteração pode ter ocorrido devido ao fato dos animais obesos apresentarem maior taxa de insulina endógena, que quando associada à exógena normalizam os níveis de glicose. A insulina exerce um papel central na regulação da glicose e atua de maneira coordenada em eventos celulares ⁽¹⁰⁶⁾. Além disso, a insulina afeta o metabolismo de lipídeos, aumentando a síntese e atenuando a liberação de triglicérides das células adiposas ⁽¹⁰⁷⁾. A resistência à ação da insulina ocorre quando os níveis circulantes normais deste hormônio são insuficientes para regular estes processos ⁽¹⁰⁷⁾. Nesta condição, o pâncreas secreta maiores quantidades de insulina, hiperinsulinemia, aumentando a captação de glicose, mantendo os níveis glicêmicos dentro da normalidade ⁽¹⁰⁸⁾. Os resultados estão de acordo com estudos que observaram que uma dieta rica em gordura promoveu intolerância à glicose e hiperinsulinemia em períodos curtos ^(85,109,110) e prolongados de obesidade ^(111,112).

Neste estudo ocorreu aumento nos níveis de leptina e insulina. A variação da leptina, similar ao comportamento da taxa de adiposidade, foi maior no obeso em relação ao controle. A elevação da leptina foi devida aos maiores depósitos de gordura (Tabela 1), desde que há uma correlação entre os níveis de leptina e o tecido adiposo^(81,113). Leptina, um hormônio derivado do tecido adiposo, participa do balanço energético, regulando o consumo alimentar e a oxidação dos lipídeos⁽¹¹⁴⁻¹¹⁶⁾. A redução da ingestão dos alimentos nos obesos (Tabela 1) sugere que o aumento da leptina foi efetivo no controle do apetite. O aumento nos níveis de insulina nos obesos manteve a homeostasia dos carboidratos e lipídeos séricos, desde que a insulina tem participação fundamental na regulação metabólica destes dois substratos^(117,118). A dislipidemia observada na obesidade é caracterizada pelos níveis elevados de triglicérides (TG), colesterol, LDL e ácidos graxos não-esterificados (NEFA) e diminuição dos níveis séricos de HDL.^(119,120) Estas alterações não ocorreram neste estudo. Os dados de TG corroboram com trabalhos que não identificaram diferença nos níveis de TG durante 12 semanas de obesidade^(37,38). Divergem de pesquisas, realizadas em nosso laboratório, com a mesma metodologia^(79,80), e de outros autores^(88,104) que encontraram elevação do TG. Os dados em relação os níveis de HDL, estão de acordo com dados obtidos por nosso grupo^(79,80). Entretanto, não corroboram com Du Toit et al⁽¹⁰⁴⁾ que observaram diminuição em ratos obesos por 16 semanas e elevação dos níveis de HDL após 12 semanas de obesidade⁽³⁷⁾. Os dados em relação ao LDL corroboram⁽⁸⁰⁾ e divergem⁽⁷⁹⁾ de outros autores, que constataram diminuição deste lipídeo. Os níveis séricos de NEFA também não sofreram influência da obesidade. Os resultados divergem da literatura que, geralmente, mostra níveis elevados de NEFA em ratos obesos.⁽⁸⁸⁾ A concentração deste ácido graxo não-esterificado é utilizada para indicar a

mobilização de gordura durante períodos carentes de disponibilidade energética.⁽¹²¹⁾ A análise conjunta do comportamento dos lipídeos mostra que os fatores reguladores do seu metabolismo, como insulina e leptina, foram capazes de manter a homeostasia das gorduras séricas. Entretanto, pode ter ocorrido a deposição de lipídeos nos tecidos musculares, entre eles o coração.

A pressão arterial sistólica final não se alterou com a obesidade. Os resultados concordam com autores^(37,38) e diverge de outros que mostraram elevação dos níveis da PAS⁽¹⁰⁴⁾.

4.5- Remodelação cardíaca

O presente estudo mostra que a obesidade apresentou uma tendência a acarretar hipertrofia do ventrículo esquerdo, isolada ou normalizada pela tíbia, nos animais obesos ($0,05 > p < 0,10$). A normalização do peso das câmaras cardíacas pelo comprimento da tíbia tem sido muito utilizada na literatura como avaliador da hipertrofia cardíaca⁽¹²²⁾. Carrol et al⁽³⁷⁾ mostraram que ratos obesos, alimentados por 12 semanas, não apresentaram remodelação do coração. Entretanto os dados deste experimento divergem com algumas pesquisas que mostraram que a obesidade induzida por dieta hiperlipídica promoveu remodelação cardíaca^(79,80,83,102). Em nosso laboratório, utilizando a mesma metodologia, Lima-Leopoldo⁽⁸⁰⁾ e Leopoldo⁽⁷⁹⁾ verificaram remodelação cardíaca.

Neste estudo a função miocárdica foi analisada *in vitro* por meio de músculos papilares isolados do VE. A utilização de músculos papilares com áreas seccionais diferentes poderia ocasionar erros de interpretação, pois há uma relação inversa entre a área e o desenvolvimento de força pelo músculo⁽¹²³⁾. Os animais utilizados

em ambos os grupos apresentaram áreas seccionais semelhantes; esta homogeneização permite descartar a influência da área seccional sobre os resultados obtidos.

A utilização da técnica de músculos papilares isolados permite avaliar a função miocárdica basal. As diversas manobras inotrópicas e lusinotrópicas são realizadas com a intenção de mostrar alterações que podem não ser visualizadas em condições basais. Neste trabalho as manobras utilizadas foram o potenciação pós-pausa, elevação da concentração extracelular de cálcio e da freqüência de estímulo e estímulo e bloqueio da via glicolítica miocárdica.

Os resultados obtidos neste estudo mostram que a obesidade não desenvolveu deterioração da função cardíaca em condição basal e rigidez miocárdica. Este comportamento é corroborado por dados do nosso grupo ⁽⁷⁹⁾ e outros autores trabalhando em corações isolados obtidos de coelhos obesos por 12 semanas ⁽³⁶⁾ e em miócitos isolados de ratos obesos por 14 semanas ⁽¹²⁴⁾. Entretanto, divergem de pesquisadores que verificaram depressão da função mecânica em miócitos isolados de ratos obesos por 12 semanas ⁽³⁹⁾ e de outros que constataram elevação do desempenho contrátil basal do músculo papilar, em ratos obesos por 7 semanas.

As manobras de potenciação pós-pausa, alteração da concentração extracelular de cálcio e da freqüência de estímulo não evidenciou nenhuma alteração entre os grupos controle e obeso; este comportamento pode ser observado pelos dados em valores absoluto e também pela porcentagem de variação em relação ao controle e estão de acordo com pesquisas realizadas em nosso laboratório empregando as mesmas metodologias ⁽⁷⁹⁾. A semelhança de comportamento da função mecânica entre os grupos controle e obeso mostra que a

obesidade não alterou as proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio. O retorno dos valores da TD e da TR após o aumento da frequência cardíaca, manobra que aumenta o consumo de oxigênio, mostra que a disponibilidade de energia nos dois grupos era semelhante. Não encontramos estudos com estes tipos de manobras em ratos obesos.

O estímulo da via glicolítica miocárdica pelo dicloroacetato não acarretou alteração entre os grupos controle e obeso; este comportamento pode ser observado pelos dados em valores absolutos e também pela porcentagem de variação em relação ao controle. A ausência de variação funcional com o estímulo mostra que a disponibilidade energética na condição basal era suficiente para os músculos manterem sua capacidade máxima de trabalho.

Os dados do bloqueio glicolítico com iodoacetato, sobre a função miocárdica, em valores absolutos e porcentagem de variação em relação ao controle, não revelaram diferença entre os grupos. Entretanto, a análise da curva de regressão linear da TR (Figura 17 B) mostrou que os animais obesos apresentaram uma inclinação da reta significativamente menor em relação aos controles. Este dado, oposto ao esperado, mostrou que os ratos controles apresentaram aumento da TR maior que os obesos. Esta variação estaria relacionada com o elevação do cálcio citosólico dependente da menor recaptura pela SERCA2 e/ou maior afinidade entre cálcio e troponina C. A menor elevação da TR no obeso sugere maior disponibilidade de energia para a SERCA2 e/ou menor afinidade entre cálcio e troponina C.

A menor contratatura nos obesos sugere que ocorreu priorização dos ácidos graxos no miocárdio dos ratos obesos em detrimento da glicose; este aumento de disponibilidade energética, ATP, proporcionada pelos ácidos graxos acarretou uma

proteção ao músculo cardíaco durante o bloqueio da via glicolítica. Portanto a obesidade promoveu alteração metabólica capaz de proteger o miocárdio em situações que ocorra diminuição de energia pela via da glicose.

A diferença de comportamento entre a TR e a TD, sendo a TD igual entre os grupos, poderia estar relacionada com a razão entre a quantidade máxima de cálcio que se difunde e é removida do citosol durante um ciclo cardíaco. Esta razão, de acordo com Katz ⁽¹²⁵⁾, aproximadamente 150, mostra que a quantidade de cálcio que é removida é menor do que a difundida para o interior da célula ⁽¹²⁵⁾. Desde que a SERCA2, a grande responsável pela recaptura do íon cálcio em roedores ⁽¹²⁶⁾, utiliza ATP para sua função básica, um déficit energético para esta organela teria conseqüências deletérias mais graves na diástole do que na sístole ⁽¹²⁵⁾. Portanto, o aumento do cálcio citosólico poderia promover aumento mais intenso da TR do que a queda da TD nos animais controles.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, o desequilíbrio energético na obesidade não acarreta disfunção cardíaca. Ao contrário, a priorização da utilização de ácidos graxos proporciona proteção ao músculo cardíaco durante o bloqueio da glicólise, sugerindo que esta via metabólica é menos utilizada pelo miócito nos animais obesos.

6. REFERÊNCIAS

- 1) World Health Organization. Obesity and overweight. Geneva:WHO. [Access 20/05/2006]. Available from: <http://www.who.int/en/>
- 2) Freedman DS, Williamson DF, Croft JB, Ballew C, Byers T. Relation of body fat distribution to ischemic heart disease. The National Health and Nutrition Examination survey I (NHANES I) epidemiologic follow-up study. *Am J Epidemiol.* 1995;142(1):53-63.
- 3) 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(19):3081-7.
- 4) Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res.* 2007;101(4):335-47.
- 5) BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.
- 6) Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr.* 2006;136(3):582-7.
- 7) Thakker GD, Frangogiannis NG, Bujak M, Zymek P, Gaubatz JW, Reddy AK, et al. Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(5):H2504-14.
- 8) Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA.* 2003;289(2):187-93.
- 9) Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med.* 2005;352(11):1138-45.
- 10) Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM.* 2006;99(9):565-79.

- 11) Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(5):968-76.
- 12) 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(10):1152-6.
- 13) 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(8):767-73.
- 14) 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(8):550-7.
- 15) Mureddu GF, de Simone G, Greco R, Rosato GF, Contaldo F. Left ventricular filling pattern in uncomplicated obesity. *Am J Cardiol.* 1996;77(7):509-14.
- 16) 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(9):1127-9.
- 17) 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(6):489-98.
- 18) 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(8):1399-404.
- 19) Berkalp B, Cesur V, Corapcioglu D, Erol C, Baskal N. Obesity and left ventricular diastolic dysfunction. *Int J Cardiol.* 1995;52(1):23-6.

- 20) Di Stante B, Galandauer I, Aronow WS, McClung JA, Alas L, Salabay C, et al. Prevalence of left ventricular diastolic dysfunction in obese persons with and without diabetes mellitus. *Am J Cardiol.* 2005;95(12):1527-8.
- 21) Mehta SK, Holliday C, Hayduk L, Wiersma L, Richards N, Younoszai A. Comparison of myocardial function in children with body mass indexes ≥ 25 versus those < 25 kg/m². *Am J Cardiol.* 2004;93(12):1567-9.
- 22) Zarich SW, Kowalchuk GJ, McGuire MP, Benotti PN, Mascioli EA, Nesto RW. Left ventricular filling abnormalities in asymptomatic morbid obesity. *Am J Cardiol.* 1991;68(4):377-81.
- 23) Scaglione R, Dichiaro MA, Indovina A, Lipari R, Ganguzza A, Parrinello G, et al. Left ventricular diastolic and systolic function in normotensive obese subject: influence of degree and duration of obesity. *Eur Heart J.* 1992;13(6):738-42.
- 24) Dorbala S, Crugnale S, Yang D, Di Carli MF. Effect of body mass index on left ventricular cavity size and ejection fraction. *Am J Cardiol.* 2006;97(5):725-9.
- 25) 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(1):25-36.
- 26) Sharma S, Adroque 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(14):1692-700.
- 27) Minhas KM, Khan SA, Raju SV, Phan AC, Gonzalez DR, Skaf MW, et al. Leptin repletion restores depressed β -adrenergic contractility in ob/ob mice independently of cardiac hypertrophy. *J Physiol.* 2005;565(2):463-74.
- 28) Ren J, Walsh MF, Jefferson L, Natavio M, Ilg KJ, Sowers JR, et al. Basal and ethanol-induced cardiac contractile response in lean and obese Zucker rat hearts. *J Biomed Sci.* 2000;7(5):390-400.
- 29) Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the

- onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology*. 2005;146(12):5341-9.
- 30) Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 2005;112(17):2686-95.
- 31) 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)plasmatic reticulum Ca^{2+} ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia* 2006;49(6):1434-46.
- 32) Wang P, Lloyd SG, Zeng H, Bonen A, Chatham JC. Impact of altered substrate utilization on function in isolated hearts from Zucker diabetic fatty rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288(5):H2102-10.
- 33) Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S., et al. Impaired long chain fatty oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. *Diabetes*. 2002;51(8):2587-95.
- 34) Carroll JF, Zenebe WJ, Strange T. Cardiovascular function in rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006;48(1):65-72.
- 35) Carroll JF, Jones AE, Hester RL, Reinhart GA, Cockrell K, Mizelle HL. Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. *Hypertension*. 1997;30(6):1376-81.
- 36) Carroll JF, Summers RL, Dzielak DJ, Cockrell K, Montani JP, Mizelle HL. Diastolic compliance is reduced in obese rabbits. *Hypertension*. 1999;33(3):811-5.
- 37) Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am J Hypertens*. 2005;18(5):692-8.

- 38) 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 lipotoxic and apoptosis. *J Hypertens*. 2006;24(3):549-61.
- 39) 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(6):1229-37.
- 40) Cohn JN, Ferrarri R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569-82.
- 41) Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol Estado de São Paulo*. 2000;10(1):8-16.
- 42) Boluyt MO, Bing OH, Lakatta EG. The ageing spontaneously Hypertensive rat as a model of the transition from stable compensated hypertrophy to heart failure. *Eur Heart J*. 1995;16(N):19-30.
- 43) Sugizaki MM, Leopoldo AS, Okoshi MP, Bruno A, Conde SJ, Lima-Leopoldo AP, et al. Severe food restriction induces myocardial dysfunction related to SERCA2 activity. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87(9):666-73.
- 44) Korzick DH. Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update. *Adv Physiol Educ*. 2003;27(1-4):192-200.
- 45) Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005;85(3):1093-129.
- 46) An D, Pulinilkunnil T, Qi D, Ghosh S, Abrahani A, Rodrigues B. The metabolic "switch" AMPK regulates cardiac heparin-releasable lipoprotein lipase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(1):246-53.

- 47) Sambandam N, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog Lipid Res.* 2003; 42(3):238-56.
- 48) Okoshi K, Guimaraes JF, Di Muzio BP, Fernandes AA, Okoshi MP. Miocardiopatia Diabética. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2007;51(2):160-7.
- 49) An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;291(4):H1489-506.
- 50) Augustus AS, Kako Y, Yagyu H, Goldberg IJ. Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2003;284(2):E331-9.
- 51) Teusink B, Voshol PJ, Dahlmans VE, Rensen PC, Pijl H, Romijn JA, et al. Contribution of fatty acids released from lipolysis of plasma triglycerides to total plasma fatty acid flux and tissue-specific fatty acid uptake. *Diabetes.* 2003;52(3): 614-20.
- 52) Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation.* 1999;99(4):578-88.
- 53) Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, et al. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes.* 2004;53(9):2366 –74.
- 54) Randle PJ, Garland PB, Hales CN, Newsholme EA. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet.* 1963;1(7285):785-9.
- 55) Nuutila P, Koivisto VA, Knuuti J, Ruotsalainen U, Teras M, Haaparanta M, et al. Glucose-free fatty acid cycle operates in human heart and skeletal muscle in vivo. *J Clin Invest.* 1992;89(6):1767-74.
- 56) Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, et al. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation.* 2004;109(18):2191-6.

- 57) Koutsari C, Jensen MD. Thematic review series: patient-oriented research. Free fatty acid metabolism in human obesity. *J Lipid Res.* 2006;47(8):1643-50.
- 58) Szczepaniak LS, Dobbins RL, Metzger GJ, Sartoni-D'Ambrosia G, Arbique D, Vongpatanasin W, et al. Myocardial triglycerides and systolic function in humans: in vivo evaluation by localized proton spectroscopy and cardiac imaging. *Magn Reson Med.* 2003;49(3):417-23.
- 59) Aasum E, Belke DD, Severson DL, Riemersma RA, Cooper M, Andreassen M, et al. Cardiac function and metabolism in Type 2 diabetic mice after treatment with BM 17.0744, a novel PPAR-alpha activator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(3):H949-57.
- 60) Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2000;279(5):E1104-13.
- 61) Unger RH. Hyperleptinemia: protecting the heart from lipid overload. *Hypertension.* 2005;45(6):1031-4.
- 62) Entman ML, Bornet EP, Van Winkle WB, Goldstein MA, Schwartz A. Association of glycogenolysis with cardiac sarcoplasmic reticulum: II. Effect of glycogen depletion, deoxycholate solubilization and cardiac ischemia: evidence for a phosphorylase kinase membrane complex. *J Mol Cell Cardiol.* 1977;9(7):515-28.
- 63) Weiss JN, Lamp ST. Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. *Science.* 1987;238(4823):67-9.
- 64) Weiss JN, Lamp ST. Cardiac ATP-sensitive K⁺ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *J Gen Physiol.* 1989;94(5):911-35.
- 65) Jeremy RW, Koretsune Y, Marban E, Becker LC. Relation between glycolysis and calcium homeostasis in postischemic myocardium. *Circ Res.* 1992;70(6):1180-90.

- 66) Kusuoka H, Marban E. Mechanism of the diastolic dysfunction induced by glycolytic inhibition. Does adenosine triphosphate derived from glycolysis play a favored role in cellular Ca^{2+} homeostasis in ferret myocardium? *J Clin Invest.* 1994;93(3):1216-23.
- 67) Weiss J, Hiltbrand B. Functional compartmentation of glycolytic versus oxidative metabolism in isolated rabbit heart. *J Clin Invest.* 1985;75(2):436-47.
- 68) Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL. Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(3):H976-82.
- 69) Chatham JC, Seymour AM. Cardiac carbohydrate metabolism in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Res.* 2002; 55(1):104-12.
- 70) Taniguchi M, Wilson C, Hunter CA, Pehowich DJ, Clanachan AS, Lopaschuk GD. Dichloroacetate improves cardiac efficiency after ischemia independent of changes in mitochondrial proton leak. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(4):H1762-9.
- 71) Wambolt RB, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF. Dichloroacetate improves postischemic function of hypertrophied rat hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2000;36(4):1378-85.
- 72) Committee on Care and Use of Laboratory Animals. Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health; 1985.
- 73) Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52(6):968-74.
- 74) Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics.* 1996;34(3):389-98.
- 75) Johnson MM, Peters JP. Technical note: an improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma. *J Anim Sci.* 1993;71(3):753-6.

- 76) 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(11):1652-9.
- 77) 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(4):R1357-64.
- 78) 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(1):E6-11.
- 79) Leopoldo AS. Exame geral de qualificação, doutorado, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2010.
- 80) Lima-Leopoldo AP. Exame geral de qualificação, doutorado, Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. 2010.
- 81) 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(3):253-9.
- 82) 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(4):R943-9.
- 83) 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(3):282-7.
- 84) Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2000;35(4):1009-15.

- 85) 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(1-3):27-35.
- 86) 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(11):1368-78.
- 87) 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(4):1081-7.
- 88) 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(5):499-506.
- 89) Halpern A, Mancini MC. O tratamento da obesidade no paciente portador de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens.* 2000;7(2):166-71.
- 90) Okoshi K, Ribeiro HB, Okoshi MP, Matsubara BB, Gonçalves G, Barros R, et al. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J.* 2004;45:647-56.
- 91) Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OHL. Participação do estado contrátil e do relaxamento miocárdico na disfunção ventricular durante a transição hipertrofia-falência cardíaca. *Arq Bras Cardiol.* 1997;69(6):381-4.
- 92) Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci.* 2000;320(4):244-8.
- 93) Krebs HA, Henseleit K. Studies on urea formation in the animal organism. *Hoppe-Seylers Z Physiol Chem.* 1932;210:33-66.
- 94) Yamato T, Yamasaki S, Misumi Y, Kino M, Obata T, Aomine M. Postrest contraction in the ventricular papillary muscle of spontaneously diabetic WBN/Kob rat. *Exp Anim.* 2001;50(1):19-31.

- 95) David JS, Vivien B, Lecarpentier Y, Coriat P, Riou B. Interaction of protamine with alpha-and beta adrenoceptor stimulations in rat myocardium. *Anesthesiology*. 2001;95(5):1226-33; Erratum in *Anesthesiology*. 2002;96(2):521.
- 96) Layland J, Kentish JC. Positive force- and $[Ca^{2+}]_i$ -frequency relationships in rat ventricular trabeculae at physiological frequencies. *Am J Physiol*. 1999;276(1Pt2):H9-H18.
- 97) Norman GR, Streiner DI. *Biostatistics: The bare essentials*. St. Louis (Mosby) 1994.
- 98) Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc*. 1977;72:469-78.
- 99) Johnson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis*. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1998.
- 100) Draper NR, Smith H. *Applied regression analysis*. 3rd ed. New York: John Wiley; 1998.
- 101) Levin BE, Triscari J, Sullivan AC. Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity in rat. *Am J Physiol*. 1983;244(3):R347-55.
- 102) 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(2):R547-52.
- 103) Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. *Obes Res*. 2002;10(9):956-63.
- 104) 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(4):346-54.
- 105) 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(2):350-5.

- 106) 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(3):219-27.
- 107) Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106(2):165-9
- 108) Jellinger PS. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone.* 2007;8(7):S30-42.
- 109) Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab.* 2004;6(2):120-6.
- 110) Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Li K. High-fat- and Lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasma resistin and adiponectin levels. *Ann Nutr Metab.* 2006;50(6):499-505.
- 111) 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(6):1133-42.
- 112) Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004;53(3):S215-9.
- 113) Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Löllmann B, Lowell BB, Flier JS. Levels leptin reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med.* 1995;1(12):1311-4.
- 114) Unger RH. Lipotoxic diseases. *Annu Rev Med.* 2002;53:319-36.
- 115) Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:413-37.
- 116) Unger RH. Leptin physiology: a second look. *Regul Pept.* 2000;92(1-3):87-95.
- 117) Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. *Diabetologia.* 2002;45(11):1475-83.

- 118) Stahl A, Evans JG, Pattel S, Hirsch D, Lodish HF. Insulin cause fatty acid transport protein translocation and enhanced fatty acid uptake in adipocytes. *Dev Cell*. 2002;2(4):477-88.
- 119) Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation*. 2003;108(13):1546-51.
- 120) Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med*. 2005;56:45-62.
- 121) Holmes JH, Lambourne LJ. The relation between plasma free fatty acid concentration and the digestible energy intake of cattle. *Res Vet Sci*. 1970;11(1):27-36.
- 122) Lu MC, Tzang BS, Kuo WW, Wu FL, Chen YS, Tsai CH, et al. More activated cardiac mitochondrial-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity*. 2007;15(11):2634-42.
- 123) Bing OH, Wiegner AW, Brooks WW, Fishbein MC, Pfeffer JM. Papillary muscle structure-function relations in the aging spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hipertens A*. 1988;10(1):37-58.
- 124) Ricci E, Smallwood S, Chouabe C, Mertani HC, Raccurt M, Morel G, et al. Electrophysiological characterization of left ventricular myocytes from obese Sprague-Dawley rat. *Obesity*. 2006;14(5):778-86.
- 125) Katz AM. Excitation-contraction coupling: extracellular and intracellular calcium cycles. In: Katz AM. *Physiology of the heart*. 4th ed. Philadelphia: Lipponcott Williams&Wilkins; 2006. p. 162-199.
- 126) Opie LH, Bers DM. Excitation-contraction coupling and calcium. In: Opie LH. *Heart physiology: from cell to circulation*. 4th ed. Philadelphia: Lipponcott Williams&Wilkins;2004.p. 159-185.