



UNESP – Universidade Estadual Paulista

Faculdade de Medicina – Botucatu

Departamento de Clínica Médica - Laboratório de Músculo Isolado

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MIOCÁRDICA DE RATOS OBESOS

André Soares Leopoldo

BOTUCATU – 2007

André Soares Leopoldo

AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO MIOCÁRDICA DE RATOS OBESOS

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

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

BOTUCATU – 2007

DEDICATÓRIA

À memória do meu pai, Paulo Rodolfo Leopoldo, exemplo e referência, que me ensinou os valores e princípios que regem a minha vida! À minha querida mãe, guerreira e companheira de todos os momentos, que sempre me encoraja a enfrentar os desafios dessa vida. Minhas conquistas também lhes pertencem. Minha eterna gratidão e amor por vocês!

Aos meus irmãos, Fernando, Victor, Selma e Luciana, que sempre permaneceram ao meu lado compartilhando momentos de angústias, incertezas e alegrias, e me impulsionam para continuar a minha jornada. Vocês são muito especiais!

À minha esposa e companheira, Ana Paula, por existir e compartilhar diariamente com paciência e compreensão cada momento deste trabalho. Situações difíceis vividas com muito amor. Te amo!

Aos meus sogros, cunhados e sobrinhos, João, Dalva, Tico, Maria, Val, Miriam, Lucas e Caio, pela sempre calorosa acolhida e pelo apoio decisivo nesta empreitada. Minha sincera amizade!

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas pessoas notáveis que colocou em meu caminho e permitiram a realização deste estudo.

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, Professor Titular do Departamento de Clínica Médica da FMB – UNESP, pela amizade e sabedoria transmitida com determinação. Obrigado pela persistência de nos ensinar a busca incansável pelo conhecimento. Agradeço muito a quem com certeza continuarei admirando!

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani, Professor Titular da Disciplina do Departamento de Bioestatística do IBB – Unesp, pela presença e ajuda em todas as etapas de desenvolvimento dessa pesquisa, estando sempre pronto para responder as minhas dúvidas. Serei eternamente grato!

Ao Prof. Dr. Mário Matheus Sugizaki pela co-orientação, disponibilidade e apoio constante que enriqueceram este trabalho. Obrigado pela oportunidade!

À minha “família” do Laboratório, André Nascimento, Alessandro, Vanessa, Silvio, Dijon, Renata, Matheus, Paula, Ricardo, Isabel, Loreta, Olga, Alessandra, Rosângela, Cristiana, Maria Teresa, Sandro e Denise, por dividirem comigo todas as alegrias e angústias, comemorando ou buscando soluções. Vocês deram sentido especial a minha vida!

À Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, pela amizade e apoio contínuo em todos os momentos deste trabalho.

Aos Profs. Drs. Leonardo Zornoff e Marina Okoshi pela amizade e prontidão em colaborar quando solicitados.

Aos Profs. Drs. Katashi Okoshi e Sérgio Alberto Rupp de Paiva, pela atenção e valiosas sugestões prestadas na qualificação.

À Profa. Maeli Dal Pai Silva pela colaboração e respeito.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Clínica Médica, José Carlos Georgette, Mário Baptista Bruno, Sandra Ângela Fábio, Sueli Clara, José Aparecido, Rogério Monteiro, Elenize Jamas Pereira, Vitor Souza, Antonio Carlos de Lalla, Camila Renata Corrêa e Corina Julieta Corrêa, pela agradável convivência, colaboração e amizade conquistada. Vocês são pessoas fundamentais!

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

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação, Regina Célia Spadin, Lílían C. Nadal B. Nunes, Janete Ap. Herculano Nunes Sieva, Nathanael Pinheiro Salles, pela paciência e eficiência nas soluções de problemas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Mestrado e por viabilizar a realização deste estudo. Muito obrigado!

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

*“Deus nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados,
capacita os escolhidos. Fazer ou não fazer depende de
nossa vontade e perseverança”*

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

Lista de quadros.....	iii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	6
2.1. Animais e protocolo experimental.....	6
2.1.1. Critério de exclusão dos ratos nos grupos controle e obeso.....	6
2.2. Composição das dietas padrão e hipercalórica.....	7
2.3. Eficiência alimentar e ingestão calórica.....	11
2.4. Pressão arterial sistólica final.....	11
2.5. Teste oral de tolerância à glicose.....	11
2.6. Análises hormonais.....	12
2.7. Análise da gordura coproral.....	12
2.8. Estudo morfológico.....	13
2.9. Análise morfométrica do miocárdio.....	13
2.10. Estudo funcional.....	14
2.10.1. Intervenções farmacológicas.....	17
2.10.2. Calibração dos traçados.....	18
2.11. Análise estatística.....	19
3. RESULTADOS.....	21

3.1. Composição dos grupos.....	21
3.2. Características gerais.....	21
3.3. <i>Experimento Diltiazem</i>	24
3.3.1. Estudo morfológico.....	24
3.3.2. Estudo funcional.....	26
3.3.3. Rigidez passiva elástica miocárdica.....	28
3.4. <i>Experimento Ácido ciclopiazônico</i>	28
3.4.1. Estudo morfológico.....	28
3.4.2. Estudo funcional.....	29
4. DISCUSSÃO.....	32
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 1.....	8
Quadro 2. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 2.....	9
Quadro 3. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 3.....	9
Quadro 4. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 4.....	9
Quadro 5. Ingredientes utilizados no preparo da dieta 5.....	10
Quadro 6. Composição das dietas padrão e hipercalórica.....	10

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do sistema de registro miográfico.....	15
Figura 2. Representação da curva de contração isométrica obtida durante os experimentos.....	17
Figura 3. Evolução semanal do peso corporal dos animais controle e obeso.....	22
Figura 4. Perfil glicêmico dos animais controle e obeso.....	23
Figura 5. Análise histológica das áreas seccionais transversas dos miócitos dos animais controle e obeso no <i>experimento Diltiazem</i>	25
Figura 6. Tensão desenvolvida máxima obtida em contração isométrica nos ratos controle e obeso após a adição de diltiazem.....	27
Figura 7. Comportamento da tensão de repouso em função da variação do comprimento do músculo.....	28
Figura 8. Tensão desenvolvida máxima obtida em contração isométrica nos ratos controle e obeso após a adição de ácido ciclopiazônico.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características gerais dos grupos experimentais.....	21
Tabela 2. Características nutricionais dos ratos.....	23
Tabela 3. Concentrações plasmáticas dos hormônios leptina e insulina.....	24
Tabela 4. Características morfológicas do coração.....	25
Tabela 5. Influência da obesidade sobre as variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas na condição basal.....	26
Tabela 6. Influência do diltiazem sobre os parâmetros funcionais miocárdicos.....	27
Tabela 7. Características morfológicas do coração.....	29
Tabela 8. Influência da obesidade sobre as variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas na condição basal.....	30
Tabela 9. Influência do ácido ciclopiazônico sobre os parâmetros funcionais miocárdicos....	31

RESUMO

A obesidade é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em relação à massa magra tecidual. O número de indivíduos com sobrepeso vem crescendo mundialmente representando atualmente mais de um bilhão de pessoas, sendo que, mais de 30% desta população é obesa. No Brasil, a previsão é que 35% da população adulta brasileira se tornará obesa em 2025. Pesquisas clínicas indicam que a obesidade está associada com o aumento do risco de morbidade, mortalidade e redução na expectativa de vida, podendo acarretar diversas co-morbidades, como doenças cardiovasculares. Estudos mostram que a obesidade promove alterações hemodinâmicas, morfológicas e funcionais cardíacas, que se correlacionam com a duração e intensidade da obesidade. Modelos experimentais relacionando função cardíaca, obesidade e dieta hipercalórica por um período de 10 a 16 semanas, apresentam resultados inconsistentes. Enquanto alguns autores relataram comportamento preservado, outros observaram aumento ou diminuição do desempenho cardíaco. Em razão de poucos estudos avaliarem a relação entre função cardíaca e o trânsito intracelular de cálcio em animais obesos por dieta hipercalórica, o objetivo deste estudo foi avaliar a função cardíaca de ratos obesos submetidos a um ciclo de dietas hipercalóricas. Ratos *Wistar* machos, com 30 dias, foram randomizados em dois grupos: controle (C; n=28) e obeso (OB; n=25). O grupo C recebeu ração *Labina* (3,3 Kcal/g) e o OB um ciclo de cinco dietas hipercalóricas ($\approx 4,5$ kcal/g) durante 15 semanas. Foram analisados peso corporal final (PCF), percentual de gordura na carcaça (PG), pressão arterial sistólica final (PA), área seccional (AS) do músculo papilar, peso dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e as relações VE/PCF e VD/PCF. O perfil glicêmico foi investigado pelo teste oral de tolerância à glicose (TOTG) e os níveis plasmáticos de insulina e leptina avaliados por ELISA. A análise da função do músculo papilar foi realizada em contração isométrica e a participação dos canais L do sarcolema e da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2) por

meio de intervenções farmacológicas com diltiazem (10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M) e ácido ciclopiazônico (1, 3 e 30 μ M). Antes das manobras, a rigidez passiva elástica miocárdica foi determinada pela relação entre a variação do comprimento do músculo e a tensão de repouso. Os parâmetros avaliados foram: tensão máxima desenvolvida (TD), tensão de repouso (TR), tempos de contração (TPT) e relaxamento (TR_{50}), velocidades de variação ($+dT/dt$) e decréscimo da tensão desenvolvida ($-dT/dt$). As características gerais, nutricionais, hormonais e a pressão arterial sistólica final foram expressas em média $\pm$ desvio padrão e submetidos ao teste “*t*” de Student. A comparação do desempenho funcional miocárdico na condição basal foi realizada pelo teste multivariado T^2 de Hotelling e complementado com os intervalos de 95% de confiança simultâneos de Hotelling. A comparação das curvas da rigidez miocárdica foi realizada pelo teste do coeficiente angular e da constante de regressão linear. As ações do diltiazem e do ácido ciclopiazônico foram expressas em variações percentuais (Δ) e submetidas à análise de variância não paramétrica para o modelo de medidas repetidas. O nível de significância considerado foi de 5%. Os animais OB apresentaram PCF, GP, PG e PA maiores do que o C. Os pesos do VE e VD do grupo OB foram maiores do que o C, entretanto quando o VE e VD foram normalizados pelo PCF, os resultados foram similares entre os grupos. Não houve diferença na AS e glicemia de jejum entre os grupos. Os níveis de glicemia após administração de glicose, as concentrações de leptina e insulina foram elevados no grupo OB em relação aos animais C. A análise da função do músculo papilar no *experimento Diltiazem* mostrou, pelo teste T^2 de Hotelling, que em condições basais os grupos OB e C apresentaram desempenho funcional semelhante. Entretanto, a rigidez miocárdica foi maior nos animais obesos em relação ao controle. A avaliação dos parâmetros mecânicos no *experimento Ácido Ciclopiazônico* constatou, pelo teste T^2 de Hotelling, diferença entre os grupos na situação basal, em razão do tempo de contração ser menor no grupo obeso do que no controle. O comportamento mecânico do

miocárdio após bloqueio dos canais L acarretou menor variação da TR no grupo OB no *experimento Diltiazem*. O bloqueio da SERCA2 promoveu modificações funcionais semelhantes nos grupos C e OB. Em conclusão, a obesidade por um período de 15 semanas aumenta a rigidez miocárdica no *experimento Diltiazem*, diminui o tempo de contração no *experimento Ácido Ciclopiazônico* e não promove alterações dos canais L do sarcolema e da atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático.

Palavras-chave: obesidade, dieta hipercalórica, coração, músculo papilar, canal L, Serca2.

ABSTRACT

The obesity is a chronic metabolic disease characterized by the extreme accumulation of fat tissue in relation to the tissue lean mass. The number of individuals with overweight comes world-wide growing currently representing more than a billion of people, being that, more than 30% of this population are obese. In Brazil, the prevision is that 35% of the Brazilian adult population will become fat in 2025. Clinical research indicates that the obesity is associated with the increase of the risk of morbidity, mortality and reduction in the life expectancy, being able to cause diverse co-morbidities, as cardiovascular diseases. Studies show that the obesity promotes hemodinamical, morphological and functional heart alterations that correlate with the duration and intensity of the obesity. Experimental models, relating cardiac function, obesity and high fat diet for a period of 10 to 16 weeks, present inconsistent results. While some authors had told about preserved behavior, others had observed increase or reduction of the cardiac performance. In reason of few studies to evaluate the relation between cardiac function and the intracellular calcium cycling in fat animals by high fat diet, the objective of this study was to evaluate the cardiac function of submitted fat rats to a cycle of high fat diet. Male Wistar rats, with 30 days, were randomly in two groups: control (C; n=28) and obese (OB; n=25). Group C received a control low-fat diet *Labina* (3,3 Kcal/g) and the OB a cycle from five high fat diets (4,5 kcal/g) during 15 weeks. Final corporal weight (FBW), percentage of fat of the carcass (%CF), final systolic blood pressure (SBP), cross-sectional area (CSA) of the papillary muscle, left ventricle weight (LVW), right ventricle weight (RVW) and the ratio LV/FBW and RV/FBW were analyzed. The glicemic profile was investigated by the oral glucose tolerance test (OGTT) and the insulin and leptin plasma levels evaluated by ELISA. Cardiac performance was analyzed in isolated left ventricular papillary muscle by isometric contraction in basal condition and the

participation of sarcolemal L type channel and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA2) through pharmacological interventions with diltiazem (10^{-5} M, 10^{-4} M and 3×10^{-4} M) and ciclopiazonic acid (1 μM , 3 μM and 30 μM). Before the maneuvers, the myocardium stiffness was determined by relation between the muscle length variation and the resting tension. The following parameters were measured from isometric contraction: peak developed tension (DT, g/mm^2), resting tension (RT, g/mm^2), time to peak tension (TPT, ms), maximum rate of tension development ($+dT/dt$, $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$), maximum rate of tension decline ($-dT/dt$, $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$) and time from peak tension to 50% relaxation (RT_{50} , ms). The general, nutritional, hormonal characteristics and the final systolic blood pressure were expressed in means $\pm$ standard deviation and to test "t" of Student. The comparison of basal mechanical parameters was carried through by the multivariate T^2 de Hotelling and complemented test with the simultaneous intervals of reliable 95% of Hotelling. The comparison of the curves of the myocardium stiffness was carried through by the test of the angular coefficient and the constant of linear regression. The actions of the diltiazem and of the ciclopiazonic acid were expressed in percentile variations and submitted to the analysis of variance for non-normal distribution for the model of repeated measures. The considered level of significance was of 5%. Animals OB had presented bigger FBW, %CF and SBP than the C. The LVW and RVW of group OB were increased than the C, however when LV and RV were normalized by the FBW, the results were similar between the groups. It did not have difference at CSA and fasting glucose levels among the groups. The profile glucose, the concentrations of leptin and insulin were raised in group OB in relation to animals C. The analysis of the papillary muscle function in the experiment diltiazem showed, for the test T^2 de Hotelling that in basal conditions groups OB and C had presented similar functional performance. However, myocardium stiffness was bigger in the OB in relation to the C. The evaluation of the mechanical parameters in the ciclopiazonic acid experiment evidenced for the test T^2 de

Hotelling, the difference among the groups in the basal situation, in reason of TPT to be lesser in the group OB that in the C. The mechanical behavior of the myocardium after blockade of L type channel caused minor variation of the TR group OB in the experiment diltiazem. The blockade of the SERCA2 promoted similar functional modifications in groups C and OB. In conclusion, the obesity for a period of 15 weeks increases the myocardium stiffness in the experiment diltiazem, it diminishes TPT in the ciclopiazonic acid experiment and it does not promote alterations of sarcolemal L type channel and the activity of the SERCA2.

Keywords: obesity, high fat diet, heart, papillary muscle, L type channel; Serca2.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo em relação à massa magra tecidual. É considerada uma epidemia global e um importante problema de saúde pública, que afeta tanto países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos.⁽¹⁻³⁾ O número de indivíduos com sobrepeso vem crescendo mundialmente representando atualmente mais de um bilhão de pessoas, sendo que, mais de 30% desta população é obesa.⁽⁴⁾ Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística⁽⁵⁾ aproximadamente 40 milhões de pessoas no Brasil apresentam sobrepeso e, deste grupo, 10,5 milhões são obesos. A previsão é que 35% da população adulta brasileira será obesa em 2025, refletindo-se no aumento de custos e cuidados para a saúde pública.

Os mecanismos fisiopatológicos que levam à obesidade podem ser desencadeados pela interação de diversos fatores, entre eles, genéticos, psicológicos e ambientais, bem como o sedentarismo e os hábitos alimentares. O aumento do consumo de energia, a diminuição do gasto energético ou a combinação de ambos têm levado a um balanço calórico positivo com conseqüente aumento do peso corporal.⁽⁶⁾

A obesidade está associada com o aumento do risco de mortalidade, redução na expectativa de vida⁽⁷⁻¹¹⁾ e numerosas co-morbididades como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, resistência à insulina, doenças cardiovasculares, respiratórias, digestivas, osteoarticulares, renais, psicológicas, ginecológicas, obstétrica e estados pró-trombóticos e inflamatórios.^(4,12,13) As doenças cardiovasculares associadas à obesidade são hipertensão arterial, doença arterial coronariana, insuficiência cardíaca e fibrilação atrial.^(12,13)

O tecido adiposo não é simplesmente um reservatório de energia, mas um ativo órgão endócrino, parácrino e autócrino com múltiplas funções, capaz de sintetizar e liberar uma

importante variedade de mediadores que participam de diversos processos metabólicos e cardíacos.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ Atualmente, sabe-se que o adipócito recebe influência de diversas substâncias, como insulina, cortisol, catecolaminas, glucagon, hormônios tireoidianos, e secreta inúmeros peptídeos que podem atuar diretamente ou indiretamente na remodelação cardiovascular, como leptina, adiponectina, renina, angiotensinogênio, angiotensina I e II e receptores, enzima de conversão da angiotensina (ECA), resistina, fator de necrose tumoral α (TNF- α), inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) e interleucina 6 (IL-6).⁽¹⁴⁻¹⁶⁾ O aumento da leptina e da insulina está associado com ativação do sistema nervoso simpático.⁽¹⁷⁾

Estudos em seres humanos mostram que a obesidade, na presença⁽¹⁸⁻²⁶⁾ ou ausência de co-morbididades^(3,27-35) como hipertensão arterial, intolerância à glicose e dislipidemia, promove alterações hemodinâmicas, morfológicas e funcionais cardíacas. Estas anormalidades cardíacas se relacionam com a duração e intensidade da obesidade.^(26,32-34) A elevação da demanda metabólica induzida pelo excesso de peso corporal acarreta variações hemodinâmicas, como aumento da frequência cardíaca, do volume total sanguíneo, do retorno venoso, do débito cardíaco e modificações da reatividade vascular.^(18-20,26,27,29-31,33,34) A elevação da pré-carga, resultante do aumento do volume plasmático promove mudanças na morfologia como remodelação ventricular excêntrica.^(18-20,26,27,29-31,33,34) Entretanto, Peterson et al⁽¹⁸⁾ verificaram que a obesidade em mulheres jovens e saudáveis está associada com uma remodelação concêntrica do ventrículo esquerdo. A avaliação da função ventricular realizada por ecocardiograma mostra que indivíduos obesos geralmente apresentam disfunção diastólica do ventrículo esquerdo.^(3,18,19,21,27-29,31,35) Todavia, Otto et al⁽²⁵⁾ encontraram função diastólica preservada, verificando alteração no desempenho diastólico somente no ventrículo direito. Os estudos que avaliaram a performance sistólica na obesidade mostram resultados inconsistentes. Enquanto alguns autores encontraram o desempenho preservado,^(3,20,22,25,28,31) outros constataram aumento^(27,29) ou diminuição da função sistólica.^(18,32,33,34)

Pesquisas experimentais desenvolvidas em animais geneticamente obesos para avaliar o desempenho ventricular mostram, geralmente, disfunção diastólica e sistólica do ventrículo esquerdo.⁽³⁶⁻⁴²⁾ Assim, autores utilizando camundongos deficientes de leptina *Lep/Lep (ob/ob)*⁽³⁶⁻³⁹⁾ ou ratos *Zucker*⁽⁴⁰⁻⁴²⁾ verificaram em estudos *in vivo*,^(36,37) coração,^(40,42) músculo papilar⁽⁴¹⁾ e miócitos isolados,^(38,39,41) que a obesidade deprime a função cardíaca. Entretanto, outros pesquisadores, utilizando camundongos *UCP-DTA* ou *ob/ob*, constataram, respectivamente, em coração⁽⁴³⁾ e miócitos isolados,⁽⁴⁴⁾ função contrátil normal em situação basal e resposta funcional atenuada após reperfusão isquêmica⁽⁴³⁾ e estimulação β -adrenérgica.⁽⁴⁴⁾

Embora diversos trabalhos utilizem modelos genéticos para analisar a influência da obesidade sobre a função cardiovascular, estes animais por não serem dependentes de fatores dietéticos, podem não apresentar algumas anormalidades exibidas em humanos obesos, como hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão arterial.⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾ Desta forma, a obesidade induzida pelo consumo de dieta hipercalórica se torna uma ferramenta importante para o estudo das possíveis alterações cardíacas resultantes do excesso de tecido adiposo. As pesquisas experimentais relacionando função cardíaca e obesidade induzida por dieta hipercalórica apresentam resultados inconsistentes. Assim, autores utilizando coelhos⁽⁴⁸⁾ ou ratos⁽⁴⁹⁻⁵²⁾ submetidos à dieta hipercalórica de 8 a 14 semanas constataram *in vivo*,^(49,50) coração^(48,51) e miócito isolados,⁽⁵²⁾ que a obesidade não altera a função cardíaca. Entretanto, Ouwens et al⁽⁵³⁾ verificaram no músculo papilar de ratos que a dieta hipercalórica por 7 semanas acarretou aumento da força contrátil basal e diminuição da resposta mecânica com elevação da frequência cardíaca. Além disso, outros autores constataram em coração de coelhos⁽⁵⁴⁾ e miócitos de ratos,⁽⁵⁵⁾ que a obesidade por dieta hipercalórica durante um período de 12 semanas promoveu disfunção cardíaca basal^(54,55) e menor responsividade ao isoproterenol.⁽⁵⁴⁾

Os mecanismos responsáveis pela depressão da função cardíaca no modelo de obesidade por dieta hipercalórica, como nos animais geneticamente obesos, não estão estabelecidos. Alguns autores sugerem que acúmulo de colágeno intersticial miocárdico,^(43,48,56) lipotoxicidade,^(37,42,53) apoptose,⁽⁵⁰⁾ alteração na via β -adrenérgica^(44,54) e no trânsito de cálcio intracelular^(39,41,44,55) podem ser responsáveis pela disfunção cardíaca nos dois modelos de obesidade.

O trânsito de cálcio (Ca^{2+}) intracelular é um dos principais mecanismos reguladores da contratilidade e relaxamento cardíaco.⁽⁵⁷⁾ A contração cardíaca inicia-se com a abertura dos canais lentos de Ca^{2+} do sarcolema (canais L) com conseqüente entrada de Ca^{2+} extracelular. O influxo de cálcio interage com os receptores de rianodina do retículo sarcoplasmático (RS) que permitem a saída do íon do RS. O aumento do Ca^{2+} citosólico possibilita a ligação desse íon com troponina C (TnC) e a interação actina-miosina. A intensidade da contração depende da quantidade e da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . Quando a concentração intracelular de Ca^{2+} começa a diminuir, principalmente pela recaptura de cálcio da bomba de Ca^{2+} do RS (SERCA2), inicia-se o relaxamento. Outras proteínas, como o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e a bomba de Ca^{2+} do sarcolema atuam como reguladores do fluxo de Ca^{2+} do miocárdio. Portanto, o ciclo do trânsito de Ca^{2+} intracelular é modulado pela atividade de diferentes canais, principalmente pelos canais L que regulam a contração e a SERCA2 o relaxamento miocárdico.⁽⁵⁷⁾

Poucos estudos na literatura avaliaram a relação entre trânsito de cálcio intracelular, função mecânica e obesidade. Alguns autores utilizando modelos de obesidade genética com ratas *Zucker (fa/fa)*⁽⁴¹⁾ e camundongos deficientes de leptina *Lep/Lep (ob/ob)*,⁽³⁸⁾ mostraram no músculo papilar⁽⁴¹⁾ e miócitos⁽³⁸⁾ que a obesidade promoveu disfunção contrátil, manifestada por redução do pico de encurtamento, prolongamento dos tempos de contração e relaxamento. Segundo Ren et al,⁽⁴¹⁾ estas alterações são decorrentes de anormalidades no

trânsito de cálcio intracelular e/ou sistema β -adrenérgico. A diminuição da resposta ao aumento de cálcio extracelular ocorreria por uma redução da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio. Por outro lado, Relling et al,⁽⁵⁵⁾ avaliando o miócito isolado de ratos *Sprague-Dawley*, obesos por dieta hipercalórica, verificaram depressão funcional em situação basal, como prejuízo no encurtamento, redução na velocidade máxima de contração e relaxamento, prolongamento da duração da contração e do relaxamento. Estes autores sugerem que a diminuição da resposta mecânica à elevação do cálcio extracelular poderia ser conseqüente de redução da captação de cálcio no retículo sarcoplasmático do miocárdio.⁽⁵⁵⁾

Em razão de poucos trabalhos terem avaliado desempenho cardíaco e trânsito de cálcio intracelular no modelo de obesidade induzida por dieta hipercalórica, o objetivo deste estudo foi investigar a relação entre a função mecânica e o trânsito intracelular de cálcio no músculo papilar de ratos submetidos à obesidade. A hipótese desta pesquisa é que a obesidade acarreta depressão do desempenho cardíaco decorrente da redução do fluxo de cálcio pelos canais L do sarcolema e diminuição da atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2) do miocárdio.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e protocolo experimental

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, estando de acordo com o “Guia para Cuidados e Usos de Animais Experimentais”.

No presente estudo foram utilizados ratos Wistar machos, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” de Botucatu. Os ratos foram randomizados em dois grupos: controle (C) e obeso (OB). Os animais C receberam ração comercial *Labina* (Purina, Paulínia, SP, Brasil) e os OB ciclos de cinco dietas hipercalóricas que se sucediam de forma rotativa, semanalmente, por um período de 15 semanas. A ingestão alimentar dos animais foi controlada diariamente e o consumo de água mensurado semanalmente. Os animais foram pesados semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, à temperatura ambiente de 24 °C e submetidos a ciclos de iluminação de 12 horas.

O estudo foi realizado em dois experimentos, denominados *Diltiazem* (C, n=20; OB, n=20) e *Ácido Ciclopiazônico* (C, n=15; OB, n=15). A realização da pesquisa em dois momentos distintos ocorreu devido à impossibilidade de utilizar as duas drogas em um mesmo ensaio.

2.1.1. Critérios de exclusão dos ratos nos grupos controle e obeso

Na experimentação biológica, em especial nos estudos com animais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais, não está assegurada uma resposta homogênea nos grupos

experimentais. Animais que recebem o mesmo tratamento podem mostrar variabilidade de resposta. Neste sentido, ratos submetidos às dietas padrão e hipercalórica podem apresentar, em maior ou menor escala, características comuns de respostas. Por essa razão, torna-se necessário estabelecer critérios que possibilitem a separação dos animais. No presente estudo, a exclusão dos animais nos grupos controle e obeso foi realizada **após as 15 semanas de tratamento**, por meio de dois critérios:

1- ingestão alimentar semanal (IAS): estabeleceu-se um intervalo de 95% de confiança (IC) para a média da IAS dos ratos controle e obeso. Excluiu-se do grupo controle os animais com IAS acima do limite superior do IC do respectivo grupo por um período igual ou superior a 12 semanas. O mesmo procedimento de exclusão ocorreu para os animais do grupo obeso; entretanto, nesse grupo foram excluídos os ratos com IAS abaixo do limite inferior do IC do respectivo grupo;

2- peso corporal final: para os animais não excluídos pelo critério de IAS estabeleceu-se um IC de 95% para a média do peso corporal dos animais controle e obeso. Adotou-se como ponto de separação (PS) entre os grupos, o ponto médio entre o limite superior do controle e o limite inferior do obeso, sendo excluídos do grupo controle os animais com peso corporal acima do PS e do grupo obeso os animais com peso corporal abaixo do PS.

2.2. Composição das dietas padrão e hipercalórica

As dietas experimentais seguiram as especificações do guia “Nutrient requirements of the laboratory rat” para ratos de laboratório.⁽⁵⁸⁾ A dieta padrão utilizada foi a Purina *Labina* (Paulínia, SP, Brasil) e as dietas hipercalóricas, 1, 2, 4, e 5, padronizadas neste laboratório, foram constituídas de uma mistura de pó de ração comercial *Labina*, alimentos industrializados, suplementos de proteínas, vitaminas e minerais.⁽⁵⁹⁾ A mistura foi

homogeneizada com água, transformada em *pellets*, seca em estufa ventilada Fanem® à temperatura de 55 ± 5 °C e, posteriormente, armazenada em freezer (Metalfrio, Double Action, Brasil) à -20 °C. A dieta 3 era composta pela dieta padrão e pela água oferecida aos animais, acrescida de sacarose na concentração de 300 gramas por litro. Os ingredientes utilizados no preparo das dietas estão apresentados nos Quadros 1 a 5.

O estudo bromatológico realizado para a análise da composição nutricional das dietas, padrão e hipercalórica, foi realizado no Laboratório de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Botucatu, e está apresentado no Quadro 6.⁽⁶⁰⁾

Quadro 1-Ingredientes utilizados no preparo da dieta 1

Ingredientes	Peso (g)
Pó Labina (Purina® / SP)	355
Amendoim torrado	176
Caseína	123
Óleo de milho	82
Achocolatado	88
Bolacha Maisena	176
Total	1000

Para cada kg de ração foram acrescentados: ferro, 19,4 mg; potássio, 138,4 mg; selênio, 73,1 µg; sulfato de molibdênio, 150,0 µg; vitamina A, 769,21 µg de equivalente de retinol (RE); vitamina B6, 6 mg; vitamina B12, 34,6 µg; vitamina D, 61,53 µg de equivalente de calciferol; vitamina E, 73,3 mg de α -tocoferol e biotina, 120 µg.

Quadro 2-Ingredientes utilizados no preparo da dieta 2

Ingredientes	Peso (g)
Pó Labina (Purina®/ SP)	439
Amendoim torrado	218
Caseína	129
Óleo de milho	61
Batata frita	153
Total	1000

Para cada kg de ração foram acrescentados: ferro, 26,7 mg; selênio, 62,7 µg; sulfato de molibdênio, 150,0 µg; vitamina A, 704,14 µg de RE; vitamina B6, 6 mg; vitamina B12, 32,5 µg; vitamina D, 56,33 µg de equivalente de calciferol; vitamina E, 67,2 mg de α -tocoferol e biotina, 110 µg.

Quadro 3-Ingredientes utilizados no preparo da dieta 3

Ingredientes	Quantidade
Ração Labina (Purina®/ SP)	<i>Ad libitum</i>
Água + açúcar	300 g sacarose/ litro água

Quadro 4-Ingredientes utilizados no preparo da dieta 4

Ingredientes	Peso (g)
Pó Labina (Purina®/ SP)	371
Amendoim torrado	185
Caseína	99
Óleo de milho	68
Macarrão instantâneo	185
Queijo ralado	92
Total	1000

Para cada kg de ração foram acrescentados: ferro, 24,1 mg; potássio, 35,6 mg; selênio, 70,8 µg; sulfato de molibdênio, 150,0 µg; vitamina A, 750,45 µg de RE; vitamina B6, 6 mg; vitamina B12, 34,2 µg; vitamina D, 60,4 µg de equivalente de calciferol; vitamina E, 71,9 mg de α -tocoferol e biotina, 120 µg.

Quadro 5-Ingredientes utilizados no preparo da dieta 5

Ingredientes	Peso (g)
Pó Labina (Purina®/ SP)	359
Amendoim torrado	179
Caseína	105
Óleo de milho	80
Leite condensado	161
Bolacha Wafer	116
Total	1000

Para cada kg de ração foram acrescentados: ferro, 25,2 mg; potássio, 104,8 mg; selênio, 73,1 µg; sulfato de molibdênio, 150,0 µg; vitamina A, 764,56 µg de RE; vitamina B6, 6 mg; vitamina B12, 34,5 µg; vitamina D, 61,17 µg de equivalente de calciferol; vitamina E, 72,8 mg de α -tocoferol e biotina, 120 µg.

Quadro 6-Composição nutricional das dietas padrão e hipercalórica

Componentes	Dietas				
	Padrão	Dieta 1	Dieta 2	Dieta 4	Dieta 5
Proteína (%)	27,73	28,52	31,43	31,23	27,49
Carboidrato (%)	46,18	41,34	28,27	24,33	35,50
Gordura (%)	4,15	17,46	25,97	24,20	23,68
Minerais (%)	7,32	3,43	4,60	5,12	3,93
Fibras (%)	6,21	2,97	4,98	10,01	3,98
Umidade (%)	8,41	6,28	4,75	5,11	5,42
Calorias (Kcal/g)	3,33	4,36	4,72	4,40	4,65

OBS: A dieta 3 não está apresentada no quadro por ser constituída de dieta padrão *Labina* (Purina, Paulínia, SP) e água acrescida de sacarose na concentração de 300 g/litro (1,2 kcal/ml de água).

2.3. Eficiência alimentar e ingestão calórica

Com a finalidade de analisar a capacidade do animal em converter a energia alimentar consumida em peso corporal foi calculada a eficiência alimentar (EA), dividindo-se o ganho total de peso dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal).^(55,61) A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor calórico de cada dieta (g x kcal).⁽⁶²⁾

2.4. Pressão arterial sistólica final

Após 15 semanas de protocolo experimental, os animais foram submetidos à aferição da pressão arterial sistólica caudal. Os ratos foram previamente aquecidos à temperatura de 40 °C por 5 minutos, em uma caixa de madeira (50x40 cm) forrada com maravalha de *Pinus* autoclavada, com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal.

A pressão arterial sistólica foi medida por pletismografia, utilizando-se eletroesfigmomanômetro, Narco Bio-System[®], modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA). O manguito foi colocado em torno da cauda do animal, e era conectado a um transdutor de pulso (Gould). O manguito era insuflado a um valor superior à pressão arterial sistólica, e, em seguida desinsuflado até que as pulsações arteriais fossem registradas em polígrafo Gould, modelo RS 3200.⁽⁶³⁾

2.5. Teste oral de tolerância à glicose

Com a finalidade de mostrar que o modelo de obesidade induz alterações no perfil glicêmico,^(62,64) foi realizado o teste oral de tolerância à glicose ao final do protocolo experimental. As coletas sanguíneas foram realizadas na artéria caudal, após os animais serem submetidos a um período de jejum de 12 a 15 horas. Foi coletada amostra de sangue na condição basal, em seguida, foi administrada gavagem com solução de glicose a 20% (Glicose

Monohidratada, Merck, São Paulo, Brasil) equivalente a 3 g/kg.^(61,62) Amostras de sangue foram então coletadas na cauda dos animais nos momentos 0, 60, 120, 180 e 240 minutos. O aparelho utilizado na mensuração dos níveis glicêmicos foi o glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche Diagnostic Brazil Ltda, SP, Brazil).

2.6. Análises hormonais

Para caracterizar o modelo de obesidade foram realizadas as dosagens dos hormônios leptina e insulina. Ao término do tratamento, os animais foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico, 50 mg/kg, intraperitoneal, e sacrificados por decapitação. O sangue foi coletado em tubos com heparina, em seguida, centrifugado a 3000 x g por 15 minutos a 4 °C e armazenado à -80°C. As concentrações plasmáticas de leptina e insulina foram determinadas pelo método ELISA com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, USA), utilizando-se kits específicos (Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA).^(50,65)

2.7. Análise da gordura corporal

Com a finalidade de quantificar a gordura corporal na carcaça dos animais foi realizada a análise da gordura corporal. Foram utilizados 11 animais de cada grupo do *experimento Diltiazem*. Após os animais serem anestesiados (pentobarbital sódico, 50 mg/kg, intraperitoneal), decapitados e toracotomizados, descartou-se as vísceras restando apenas a carcaça. Esta foi armazenada e seca a uma temperatura de 100 ± 5 °C durante 72 horas em estufa ventilada Fanem[®]. Após a secagem, a carcaça foi embrulhada em papel filtro e a gordura extraída em aparelho Extrator de Soxhlet (Corning Incorporated, USA). A porcentagem de gordura na carcaça foi determinada pela fórmula $PP-PSSG/PPr \times 100\%$, onde

PP= peso pós-secagem, PSSG= peso seco após extração da gordura e PPr= peso pré-secagem.⁽⁶⁶⁾

2.8. Estudo morfológico

As variáveis morfológicas para caracterizar os animais foram: peso corporal inicial (PCI), peso corporal final (PCF), peso do ventrículo esquerdo (VE), relação entre o peso do VE e o peso corporal final (VE/PCF), peso do ventrículo direito (VD), relação entre o peso do VD e o peso corporal final (VD/PCF) e área seccional do músculo papilar (AS).

2.9. Análise morfométrica do miocárdio

Com a finalidade de verificar o tamanho do miócito foi realizada a análise morfométrica do músculo cardíaco. As preparações histológicas foram realizadas no Laboratório Experimental do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Após os animais serem anestesiados (pentobarbital sódico, 50 mg/kg, intraperitoneal), decapitados e toracotomizados, o coração foi rapidamente removido; uma amostra do ventrículo esquerdo foi retirada por meio de um corte transversal a 6 mm do ápice e colocada em solução de formol a 10% por 24 h.⁽⁶⁷⁾ A seguir, o tecido miocárdico foi lavado em água corrente por 24 h, transferido para solução de etanol 70% e incluso em bloco de parafina. Os cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em lâmina com solução de hematoxilina-eosina (HE).

Os cortes histológicos foram projetados em aumento de 40 vezes com o auxílio de microscópio, LEICA DM LS, acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a um computador dotado de programa de análise de imagens (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). Para cálculo das áreas seccionais dos miócitos foram mensuradas 50 a 70 células por ventrículo. Os miócitos analisados, localizados na camada

subendocárdica da parede muscular, deveriam estar seccionados transversalmente e apresentar forma arredondada com núcleo visível no centro da célula.⁽⁶⁷⁾ As áreas seccionais transversas dos miócitos (AST; μm^2), utilizadas como indicador de remodelação ventricular, foram obtidas em 7 animais de cada grupo do *experimento Diltiazem*.

2.10. Estudo funcional

O desempenho mecânico dos músculos papilares foi avaliado de acordo com a técnica utilizada rotineiramente em nosso laboratório.⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾ Ao término do período experimental, os animais foram anestesiados e submetidos à toracotomia mediana. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Krebs-Henseleit⁽⁷¹⁾ com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 1,25 CaCl_2 ; 1,16 MgSO_4 ; 1,18 KH_2PO_4 ; 5,50 glicose e 24,88 NaCO_3 , mantidos à temperatura de 28 °C, previamente oxigenada durante 10 minutos com 95% de oxigênio (O_2) e 5% de dióxido de carbono (CO_2). 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 ao meio a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior, do ventrículo esquerdo. Estes foram cuidadosamente dissecados, mantendo-se nas suas extremidades segmentos da parede ventricular. Esses segmentos tinham como finalidade evitar a lesão das extremidades dos músculos, quando os mesmos fossem presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 a 4,2 mm. O músculo papilar utilizado, após ter suas extremidades presas aos anéis, foi rapidamente transferido para câmara de vidro contendo solução de Krebs-Henseleit,⁽⁷¹⁾ continuamente oxigenada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 e mantida à temperatura de 28 °C, graças ao uso de banho circulante (PAPST, K-5058, GERMANY). O músculo 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 (Kyowa

120T 20B). O fio de aço atravessava uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. A porção superior tendinosa do músculo foi conectada a um fio de aço, semelhante ao anterior, que estava ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica. Sobre esta extremidade existia um micrômetro (The L.S. Starrett. Co. Athol.Mass.USA. nº463) que, controlando a extensão dos movimentos da alavanca, permitia ajustar o comprimento de repouso do músculo. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso, por fio de aço, um peso de 2,5 a 5,0 g, denominado pré-carga, que tinha por finalidade promover o estiramento inicial do músculo papilar. A alavanca era de magnésio, alumínio, rígida e leve, sendo a razão entre os braços longo e curto de 4:1. O esquema do sistema utilizado é mostrado na Figura 1.

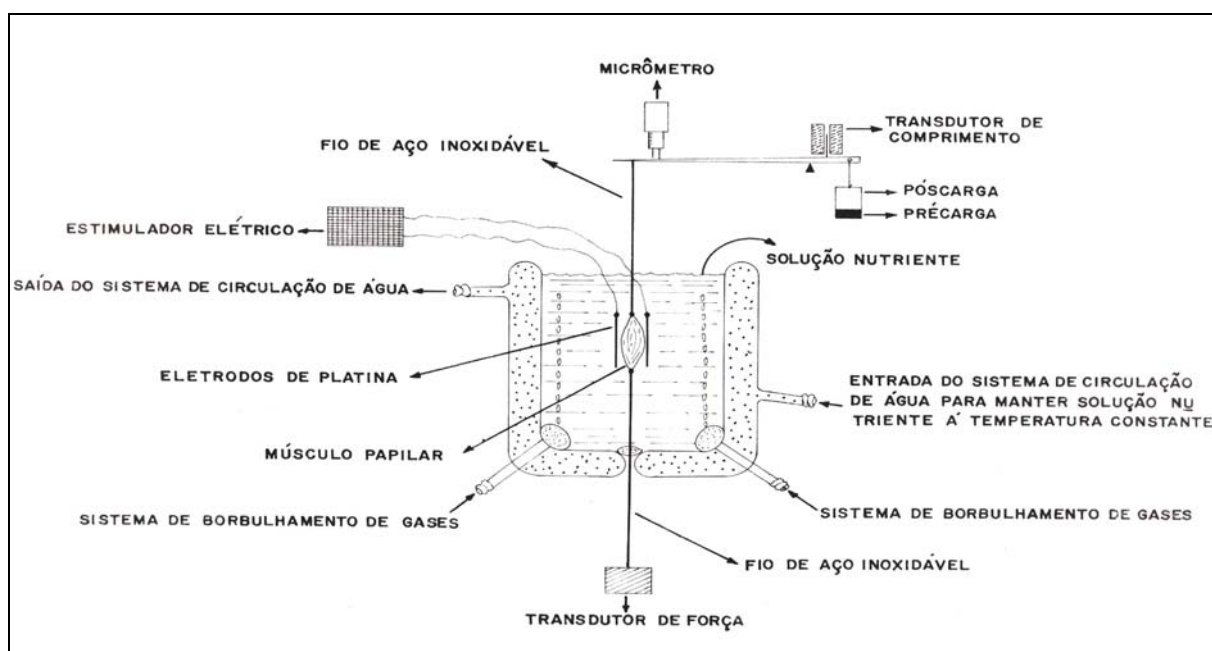


Figura 1. Representação esquemática do sistema de registro miográfico

Os músculos papilares foram estimulados 12 vezes por minuto por meio de eletrodos de platina tipo agulha (E8 – Grass), posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados a estimulador elétrico que emitia estímulos em onda quadrada de 5 mili-segundos. A voltagem de estímulo, 12 a 15 volts, correspondia a 10%

acima do valor mínimo necessário para provocar a resposta mecânica máxima do músculo. O pH da solução Krebs-Henseleit variou de 7,38 a 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução foi mantida entre 550 a 600 mmHg.

Após período de 60 minutos, nos quais os músculos contraíam contra a pré-carga sem desenvolverem força - contração isotônica - foi colocada carga adicional de 50 g, pós-carga, na extremidade do braço curto da alavanca. A carga total, pré-carga mais a pós-carga, impedia os músculos de encurtarem, 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 com a força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denomina-se $L_{\text{máx}}$. Após atingir $L_{\text{máx}}$, 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 $L_{\text{máx}}$. O registro das curvas de tensão foi iniciado após verificar-se que o músculo permanecia estável em contração isométrica durante 15 minutos. Os seguintes parâmetros foram analisados: tensão desenvolvida (TD, g/mm^2), tensão de repouso (TR, g/mm^2), tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT, ms), velocidade de variação da tensão desenvolvida ($+dT/dt$, $\text{g/mm}^2/\text{s}$), velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida ($-dT/dt$, $\text{g/mm}^2/\text{s}$) tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo (TR_{50} , ms). A Figura 2 é uma ilustração representativa das curvas de contração isométricas obtidas durante os experimentos.

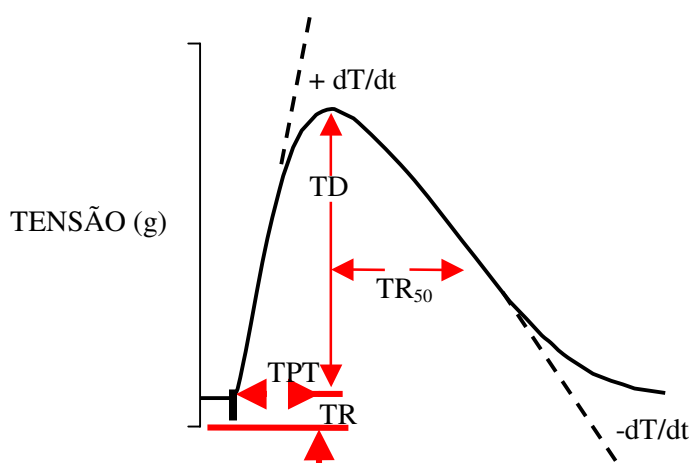


Figura 2. Representação da curva de contração isométrica obtida durante os experimentos.

2.10.1. Intervenções farmacológicas

O estudo funcional foi realizado em dois experimentos, *Diltiazem* e *Ácido Ciclopiazônico*. No experimento *Diltiazem*, os músculos foram avaliados na condição basal e após bloqueio específico do canal L sarcolemal por meio de adição de diltiazem (*Diltiazem Hydrochloride*, Sigma[®]-Aldrich, St Louis, MO, USA) na solução nutriente Krebs-Henseleit nas doses 10^{-5}M , 10^{-4}M , $3 \times 10^{-4}\text{M}$.^(72,73) No experimento *Ácido Ciclopiazônico*, os músculos papilares foram analisados na condição basal e após bloqueio específico da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA2) por meio de adição de ácido ciclopiazônico (*Penicillium cyclopium*, Sigma[®]-Aldrich, St Louis, MO, USA) na solução nutriente nas doses $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$, $30\mu\text{M}$.⁽⁷⁴⁻⁷⁸⁾

Os registros das contrações isométricas no experimento 1 foram realizados em condição basal e 20 minutos após adição de cada dose de diltiazem na solução nutriente com concentração de cálcio de 1,25 mM; no experimento 2, as contrações foram registradas em condição basal e após 10 minutos da adição de cada dose de ácido ciclopiazônico com concentração de cálcio de 0,625 mM. Antes das manobras, foi determinada a relação entre tensão de repouso e comprimento diastólico do músculo. Com essa finalidade, a tensão de

repouso foi analisada em comprimentos musculares correspondentes a 90%, 92%, 94%, 96%, 98% e 100% de $L_{m\acute{a}x}$. A curva do comportamento da TR em relação a variações no comprimento do músculo foi realizada pelo modelo de regresso exponencial, por meio da seguinte equação: $\log(TR) = -51,1118 + 25,5425.\log(L_{m\acute{a}x})$ para o grupo controle e $\log(TR) = -58,1992 + 29,1455.(\log L_{m\acute{a}x})$ no grupo obeso.

Os parâmetros usados para caracterizar os músculos papilares, individualmente, foram: comprimento (mm), peso do músculo (mg) e área seccional (mm^2). O comprimento *in vitro*, ($L_{m\acute{a}x}$) foi medido com auxílio de um catetmetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, USA). A porão do músculo entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. A rea seccional foi calculada dividindo-se o peso do músculo pelo seu comprimento em $L_{m\acute{a}x}$, considerando-se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme e peso específico aproximadamente unitário.

Os músculos papilares dissecados inadequadamente ou que apresentaram comportamento funcional fora do padrão de normalidade foram excluídos do estudo. Considerou-se como comportamento mecânico inadequado, os valores obtidos em contrao isométrica que apresentavam afastamento superior a dois desvios padrão da mdia, ou seja, valor cujo escore em valor absoluto era superior a 1,96.⁽⁷⁹⁾ Foram utilizados músculos papilares que apresentavam área seccional entre 0,5 e 1,5 mm^2 .

2.10.2. Calibrao dos traçados

As curvas de contrao isométrica foram registradas em um polígrafo (GOULD, RS 3200, Gould Inc., T&M, Valley Visw, Ohio) com velocidade de transporte de papel de 100 mm/s. Em cada experimento, o fator de calibrao para o cálculo da tensão desenvolvida máxima foi realizado acoplando-se diretamente os dois fios de aço que sustentavam a extremidade superior e a inferior dos músculos papilares, e colocando-se um peso de 10

gramas no braço curto da alavanca. A deflexão registrada correspondia, em razão da diferença entre os comprimentos dos braços da alavanca de 4 para 1, a uma tensão de 2,5 g. Relacionando-se a altura da deflexão em milímetros com o valor da tensão, obtinha-se o fator de calibração necessário para o cálculo dos valores da TD e da TR. Os valores do TPT e TR₅₀ foram obtidos considerando-se que cada milímetro do papel correspondia ao tempo de 10 ms. Conhecendo-se a velocidade de transporte do papel e o fator de calibração da tensão desenvolvida foi possível determinar os valores da $+dT/dt$ e $-dT/dt$. Os valores da TD, TR, $+dT/dt$ e da $-dT/dt$ foram divididos pela área seccional do músculo papilar. Este processo de normalização permitiu comparar o desempenho de músculos de diferentes tamanhos.

2.11. Análise estatística

A análise das variáveis dos animais relativas às características gerais e nutricionais, visando o agrupamento dos grupos controles e dos grupos obesos utilizados nos experimentos *Diltiazem* e *Ácido Ciclopiazônico*, foi realizada pela técnica de razão de variâncias dos grupos objetivando a homogeneidade da variação residual.⁽⁸⁰⁾

As características gerais, nutricionais e hormonais foram expressas em média $\pm$ desvio padrão e submetidos ao teste “*t*” de Student para amostras independentes. A comparação dos perfis evolutivos do peso corporal e do perfil glicêmico entre os grupos foi realizada pela técnica de análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.⁽⁸¹⁾

A comparação do desempenho funcional miocárdico na condição basal entre os grupos, expressos em média $\pm$ desvio padrão, foi realizado pelo teste multivariado T^2 de Hotelling complementado com os intervalos de 95% confiança simultâneos de Hotelling.⁽⁸²⁾ A comparação entre as curvas de regressão foi realizada pelo teste do coeficiente angular e da constante de regressão linear.⁽⁸³⁾

As ações do diltiazem e do ácido ciclopiazônico sobre a função mecânica do músculo papilar foram expressas em variações percentuais (Δ). O cálculo das variações percentuais foi realizado pela seguinte fórmula: $\Delta(\%) = (M1-M2)/ M1 \times 100$, onde M1 é o valor na condição basal e M2 é o valor em resposta a variação da concentração de diltiazem ou ácido ciclopiazônico. A comparação das variações das concentrações do diltiazem e ácido ciclopiazônico foi realizada pela técnica da análise de variância não paramétrica para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes, sendo as medidas descritivas expressas em mediana e semi-amplitude total.⁽⁸⁰⁾ O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.⁽⁸⁰⁾

3. RESULTADOS

3.1. Composição dos grupos

A partir dos critérios estabelecidos para a composição dos grupos controle e obeso foram utilizados no *experimento Diltiazem* dezesseis animais no grupo controle (**C, n=16**) e treze no grupo obeso (**OB, n=13**) e no *experimento Ácido Ciclopiazônico* doze animais do grupo controle (**C, n=12**) e doze no grupo obeso (**OB, n=12**). As variáveis relativas às características nutricionais, peso corporal, pressão arterial sistólica final e perfil glicêmico dos grupos de animais, controle e obeso, constituintes dos *experimentos Diltiazem e Ácido Ciclopiazônico* foram agrupadas conforme descrito na Análise Estatística.

3.2. Características gerais

A Tabela 1 mostra os dados referentes às características gerais dos animais utilizados nos dois experimentos após o agrupamento. O peso corporal final, o percentual de gordura e a pressão arterial dos animais obesos foram maiores do que o controle.

Tabela 1. Características gerais dos grupos experimentais.

Parâmetros	Grupos	
	C (n=28)	OB (n=25)
PCI (g)	105 ± 10	111 ± 12
PCF (g)	442 ± 30	557 ± 62*
Gordura (%)#	8 ± 3	17 ± 7**
PA (mmHg)	108 ± 9	121 ± 15**

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; OB: obeso; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; # porcentagem de gordura da carcaça de 11 animais de cada grupo do *experimento diltiazem*; PA: pressão arterial sistólica final. *p<0,0001 vs C. ** p<0,001 vs C. Teste “t” de Student para amostras independentes.

A Figura 3 mostra a evolução semanal do peso corporal dos animais durante o experimento, que foi diferente entre o grupo controle e obeso a partir da 2ª semana de tratamento.

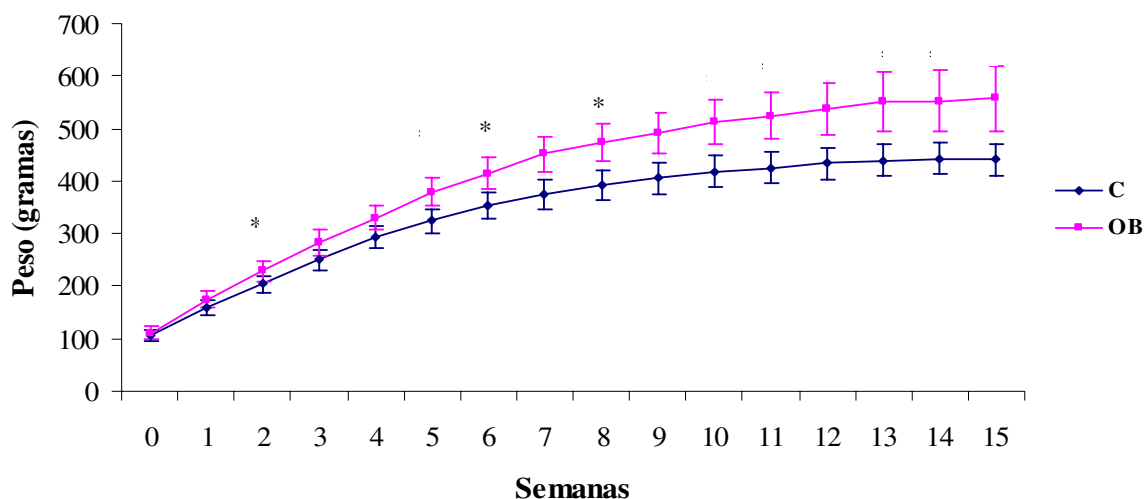


Figura 3-Evolução semanal do peso corporal dos animais controle (C, n=28) e obeso (OB, n=25). Os dados estão expressos em média e desvio-padrão da média. * $p < 0,05$ vs C. Análise de medidas repetidas para dois grupos independentes.

A Tabela 2 mostra a ingestão alimentar, consumo de água, ingestão calórica e a eficiência alimentar dos ratos. Não houve diferença no consumo de água entre os animais. Durante todo o período experimental, os animais obesos ingeriram menor quantidade de ração que os C, porém a ingestão calórica e a eficiência alimentar foram maiores nos animais OB do que no C.

Tabela 2. Características nutricionais dos ratos.

Variáveis	Grupos	
	C (n=28)	OB (n=25)
IA (g/dia)	21,9 ± 1,5	17,0 ± 1,8*
CA (ml/dia)	40,3 ± 3,9	42,4 ± 4,6
IC (g x Kcal/dia)	72,4 ± 4,9	85,6 ± 9,6*
EA (g/kcal)	0,044 ± 0,003	0,050 ± 0,005*

Dados expressos em média ± desvio padrão; C: controle; OB: obeso; IA: ingestão alimentar; CA: consumo de água; IC: ingestão calórica; EA: eficiência alimentar. * $p < 0,001$ vs C. Teste “t” de Student para amostras independentes.

A Figura 4 mostra o resultado do teste oral de tolerância à glicose realizada ao final do experimento após os animais permanecerem em jejum de 12-15 horas. Os valores glicêmicos basais foram similares nos dois grupos. Após a gavagem, os níveis de glicemia foram mais elevados no OB do que C nos momentos 60, 120, 180 e 240 minutos.

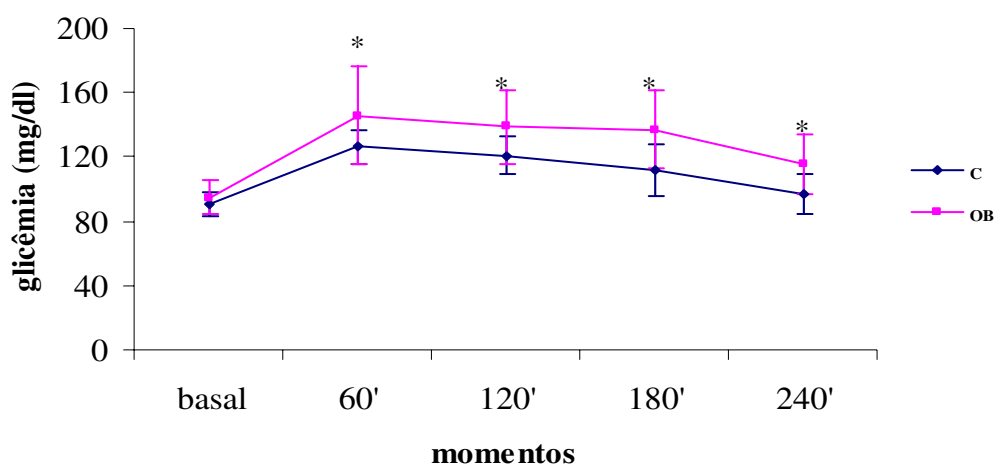


Figura 4-Perfil glicêmico dos animais controle (C, n= 28) e obeso (OB, n= 25) submetidos ao teste oral de tolerância a glicose. Os dados estão expressos em média e desvio padrão. Análise de medidas repetidas em dois grupos independentes.* $p < 0,05$ vs C.

Na Tabela 3 estão apresentadas os níveis plasmáticos de leptina e de insulina, que foram mais elevados nos animais obesos do que nos controle.

Tabela 3. Concentrações plasmáticas dos hormônios leptina e insulina.

Hormônios	Grupos	
	C (n=13)	OB (n=13)
Leptina (ng/ml)	2,31 ± 0,53	4,82 ± 1,34*
Insulina (ng/ml)	0,45 ± 0,19	1,48 ± 0,67*

Dados expressos em média ± desvio padrão; C: controle; OB: obeso; Concentrações de leptina e insulina realizadas em animais do *experimento diltiazem*. * p<0,001 vs C. Teste “t” de Student para amostras independentes.

3.3. *Experimento Diltiazem*

3.3.1. Estudo morfológico

A Tabela 4 mostra as características morfológicas do coração dos animais utilizados no *experimento diltiazem*. Embora os animais OB apresentassem pesos do ventrículo esquerdo e direito maiores do que os C, as relações VE/PCF e VD/PCF não foram diferentes entre os grupos. A área seccional transversa dos miócitos, área seccional e o comprimento dos músculos papilares em L_{máx} foram semelhantes nos dois grupos.

Tabela 4. Características morfológicas do coração.

Variáveis	Grupos	
	C (n=11)	OB (n=11)
VE (g)	0,85 ± 0,08	1,00 ± 0,07*
VD (g)	0,23 ± 0,02	0,28 ± 0,03*
VE/PCF (mg/g)	1,93 ± 0,20	1,84 ± 0,19
VD/PCF (mg/g)	0,52 ± 0,03	0,52 ± 0,04
AST (μm^2) #	180 ± 13	188 ± 13
Lmáx (mm)	8,92 ± 1,02	8,86 ± 1,18
MP (mg)	7,70 ± 1,22	8,80 ± 1,97
AS (mm^2)	0,86 ± 0,12	0,99 ± 0,19

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão. C: controle; OB: obeso; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; VE/PCF: relação ventrículo esquerdo pelo peso corporal final; VD/PCF: relação ventrículo direito pelo peso corporal final; # AST: área seccional transversa dos miócitos de 7 animais do *experimento diltiazem*; Lmáx: comprimento do músculo associado à tensão máxima desenvolvida; MP: peso do músculo papilar; AS: área seccional do músculo papilar. Teste “t” de Student. * $p < 0,05$ vs C.

A Figura 5 é uma ilustração representativa das áreas seccionais transversas dos miócitos dos animais controle e obeso, respectivamente.

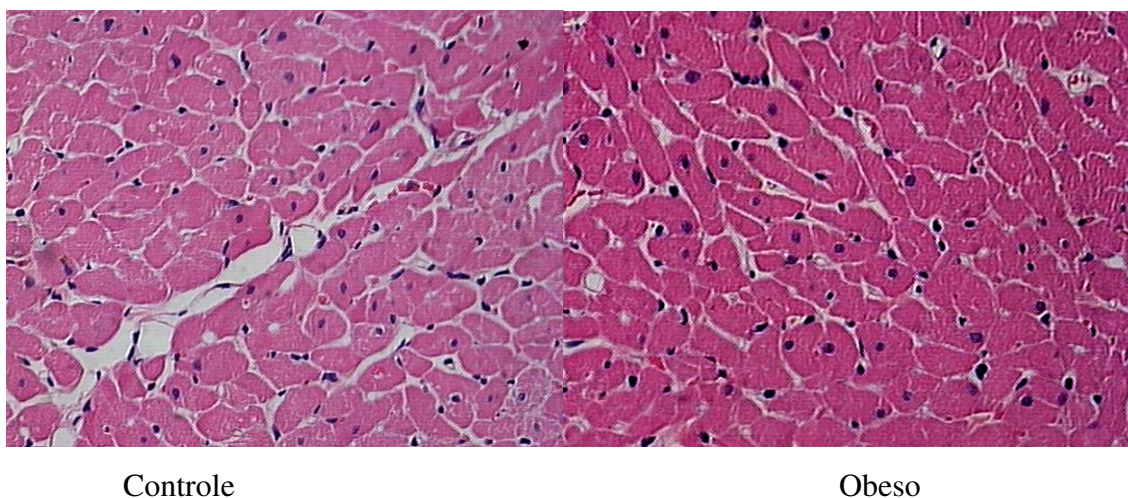


Figura 5- Análise histológica das áreas seccionais transversas dos miócitos dos animais controle e obeso no *experimento Diltiazem*. HE 200 X.

3.3.2-Estudo funcional

A Tabela 5 mostra os dados funcionais do músculo papilar obtidos em condições basais com concentração de cálcio de 1,25 mM. Os resultados indicam que a obesidade não acarretou alteração mecânica, desde que as variáveis analisadas apresentaram comportamento semelhante nos dois grupos.

Tabela 5. Influência da obesidade sobre as variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas na condição basal.

Parâmetros	Grupos	
	C (n=11)	OB (n=11)
TD (g/mm ²)	4,1 ± 0,7	4,3 ± 0,9
TR (g/mm ²)	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,5
TPT (ms)	160 ± 11	171 ± 17
+dT/dt (g/mm ² /s)	43 ± 7	43 ± 10
-dT/dt (g/mm ² /s)	17 ± 4	17 ± 5
TR ₅₀ (ms)	159 ± 10	170 ± 30
Resultado T² Hotelling	p>0,05	

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; OB: obeso; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; TR₅₀: tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo. Teste multivariado T² de Hotelling.

A influência do diltiazem sobre as variáveis funcionais, expressas em porcentagem de variação (%), foi realizada com concentração de cálcio de 1,25 mM e está apresentada na Tabela 6. A elevação na concentração de diltiazem de 10⁻⁵ para 3x10⁻⁴ M acarretou redução crescente e similar da TD, da +dT/dt e da -dT/dt em ambos os grupos. A droga provocou diminuição semelhante da TR₅₀ no grupo controle e no obeso. A TR decresceu com o aumento da concentração da droga no grupo controle; no obeso, a TR sofreu uma redução maior e

similar nas doses de 10^{-4} M e 3×10^{-4} M do que na concentração de 10^{-5} M. A variação da TR foi menor no OB do que no grupo controle. O TPT sofreu redução semelhante nas três doses de diltiazem no grupo controle; no obeso, a redução foi diferente nas doses de 10^{-5} M e 10^{-4} M. Os registros da tensão desenvolvida após adição do diltiazem em ambos os grupos estão apresentados na figura 6.

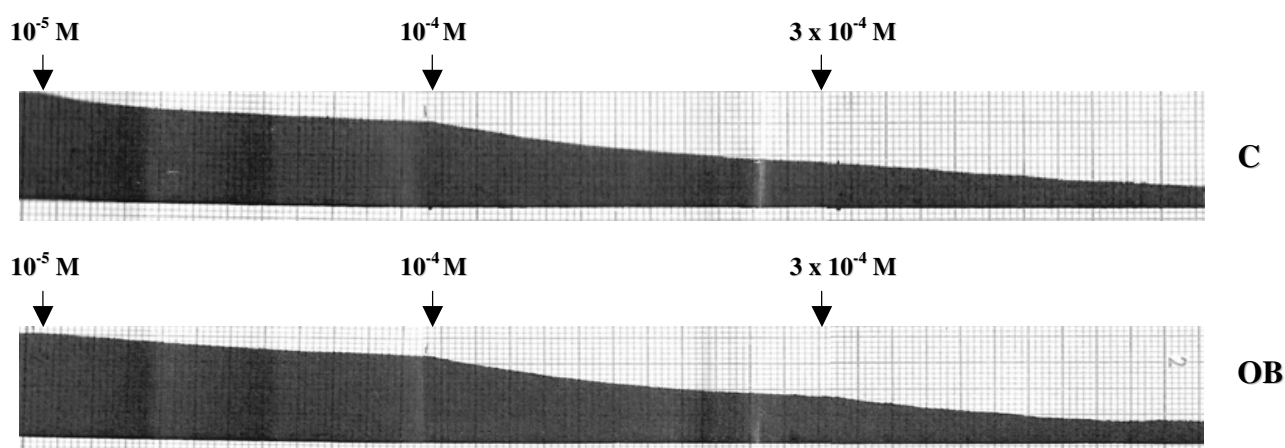


Figura 6. Tensão desenvolvida máxima obtida em contração isométrica nos ratos controle (C) e obeso (OB) após a adição de diltiazem nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M na solução nutriente.

Tabela 6. Influência do diltiazem sobre os parâmetros funcionais miocárdicos

		TD (g/mm ²)	TR (g/mm ²)	+dT/dt (g/mm ² /s)	-dT/dt (g/mm ² /s)	TPT (ms)	TR ₅₀ (ms)
C	10^{-5}	-16 ± 7^C	-14 ± 11^C	-15 ± 24^C	-11 ± 11^C	-4 ± 11^A	-10 ± 8^A
	10^{-4}	-57 ± 9^B	-21 ± 10^B	-53 ± 13^B	-52 ± 10^B	-2 ± 8^A	-17 ± 12^A
	3×10^{-4}	-82 ± 13^A	-24 ± 10^A	-80 ± 8^A	-74 ± 1^A	-2 ± 16^A	-13 ± 18^A
OB	10^{-5}	-20 ± 12^C	$-8 \pm 22^{*B}$	-15 ± 23^C	-11 ± 13^C	-9 ± 8^B	-12 ± 11^A
	10^{-4}	-60 ± 11^B	$-11 \pm 10^{*A}$	-53 ± 10^B	-53 ± 10^B	-11 ± 10^A	-11 ± 20^A
	3×10^{-4}	-81 ± 12^A	$-12 \pm 15^{*A}$	-77 ± 14^A	-78 ± 12^A	-9 ± 17^{AB}	-15 ± 23^A

Valores relativos (%) expressos em mediana $\pm$ semi-amplitude total. C: controle; OB: obeso; 10^{-5} , 10^{-4} e 3×10^{-4} M: concentrações de diltiazem; Basal: Ca^{2+} com 1,25 mM; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; TR₅₀: tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo. * representa diferença significativa entre os grupos C e OB; A, B e C: letras distintas mostram diferença significativa da influência do diltiazem intra grupo; ANOVA, Medidas Repetidas; $p < 0,05$.

3.3.3. Rigidez passiva elástica miocárdica

O comportamento da TR obtidas em contração isométrica a partir de diferentes percentuais de comprimento do músculo, de 90% a 100% de $L_{\text{máx}}$, está apresentado na figura 7. A curva da rigidez mostra que o comportamento da TR foi diferente entre os dois grupos e à medida que o músculo era estirado, ocorria elevação da TR. A partir deste resultado podemos afirmar que a rigidez do miocárdio foi mais elevada nos ratos obesos do que nos controles.

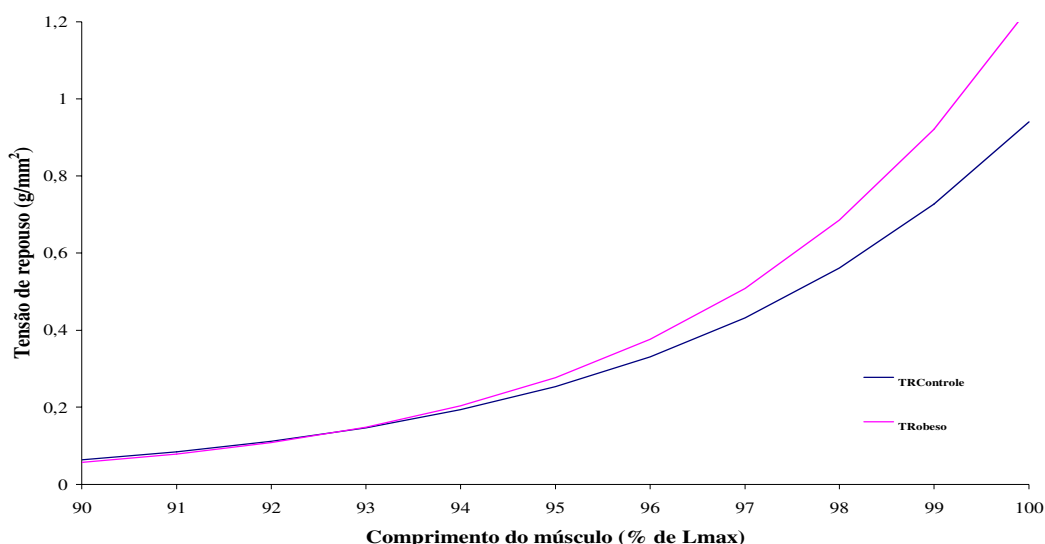


Figura 7. Comportamento da tensão de repouso em função da variação do comprimento do músculo.

3.4. Experimento Ácido Ciclopiazônico

3.4.1. Estudo morfológico

A Tabela 7 mostra as características morfológicas do coração dos animais utilizados no *experimento Ácido Ciclopiazônico*. Embora os animais OB apresentassem pesos do ventrículo esquerdo e direito maiores do que os C, as relações VE/PCF e VD/PCF não foram

diferentes entre os grupos. A área seccional e o comprimento dos músculos papilares em Lmáx foram semelhantes nos dois grupos.

Tabela 7. Características morfológicas do coração.

Parâmetros	Grupos	
	C (n=10)	OB (n=11)
VE (g)	0,82 ± 0,04	1,03 ± 0,11*
VD (g)	0,21 ± 0,04	0,27 ± 0,04*
VE/PCF (mg/g)	1,89 ± 0,13	1,82 ± 0,14
VD/PCF (mg/g)	0,47 ± 0,08	0,49 ± 0,06
Lmáx (mm)	8,72 ± 1,08	8,84 ± 0,69
MP (mg)	7,63 ± 2,20	8,19 ± 1,78
AS (mm ²)	0,88 ± 0,28	0,93 ± 0,20

Valores expressos em média ± desvio padrão. C: controle; OB: obeso; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; VE/PCF: relação ventrículo esquerdo pelo peso corporal final; VD/PCF: relação ventrículo direito pelo peso corporal final; Lmáx: comprimento do músculo associado à tensão máxima desenvolvida; MP: peso do músculo papilar; AS: área seccional do músculo papilar. Teste “t” de Student. * p<0,05 vs C.

3.4.2. Estudo funcional

A Tabela 8 mostra os dados funcionais do músculo papilar obtidos em condições basais com concentração de cálcio de 1,25 mM. A análise estatística mostrou que os comportamentos dos grupos foram diferentes às custas do tempo de contração (TPT), que foi menor no grupo OB do que no C.

Tabela 8. Influência da obesidade sobre as variáveis funcionais obtidas em contrações isométricas na condição basal.

Parâmetros	Grupos	
	C (n=10)	OB (n=11)
TD (g/mm ²)	5,7 ± 1,8	5,3 ± 1,5
TR (g/mm ²)	0,8 ± 0,2	0,8 ± 0,2
TPT (ms)	162 ± 13	142 ± 8*
+dT/dt (g/mm ² /s)	52 ± 13	60 ± 18
-dT/dt (g/mm ² /s)	19 ± 8	22 ± 4
TR ₅₀ (ms)	186 ± 33	163 ± 23
Resultado T ² Hotelling		p<0,01

Dados expressos em média ± desvio padrão. C: controle; OB: obeso; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; TR₅₀: tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo. * p<0,05 vs C. Teste multivariado T² de Hotelling complementado com os intervalos de 95% confiança simultâneos de Bonferroni.

A influência do ácido ciclopiazônico (CPA) sobre as variáveis funcionais, expressas em porcentagem de variação (%), foi realizada com concentração de cálcio de 0,625 mM e está apresentada na Tabela 9. A elevação da concentração de ácido ciclopiazônico de 1 µM para 30 µM acarretou redução progressiva e semelhante da TD, da +dT/dt e da -dT/dt em ambos os grupos. A droga reduziu de forma similar a TR, TR₅₀ e TPT no grupo controle e no obeso. A análise dos dados mostra que os grupos apresentaram comportamento semelhante após a adição de CPA. Os registros da tensão desenvolvida após a adição de CPA em ambos os grupos estão apresentados na Figura 8.

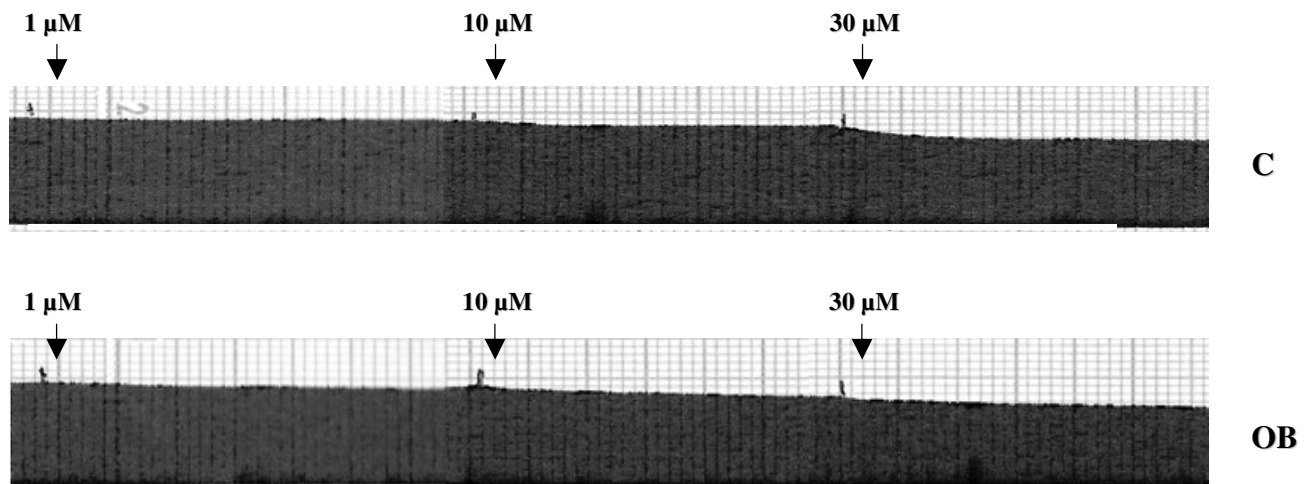


Figura 8. Tensão desenvolvida máxima obtida em contração isométrica em ratos controle (C) e obeso (OB) após a adição de ácido ciclopiazônico nas concentrações de 1, 10 e 30 μM na solução nutriente.

Tabela 9. Influência do ácido ciclopiazônico sobre os parâmetros funcionais miocárdicos

		TD (g/mm ²)	TR (g/mm ²)	+dT/dt (g/mm ² /s)	-dT/dt (g/mm ² /s)	TPT (ms)	TR ₅₀ (ms)
C	1 μM	-4 $\pm$ 8 ^C	-8 $\pm$ 55 ^A	-4 $\pm$ 14 ^C	-0 $\pm$ 6 ^C	-0 $\pm$ 12 ^A	-4 $\pm$ 12 ^A
	10 μM	-11 $\pm$ 11 ^B	-4 $\pm$ 54 ^A	-10 $\pm$ 13 ^B	-9 $\pm$ 14 ^B	-1 $\pm$ 9 ^A	-2 $\pm$ 19 ^A
	30 μM	-26 $\pm$ 12 ^A	-12 $\pm$ 64 ^A	-24 $\pm$ 15 ^A	-24 $\pm$ 14 ^A	-2 $\pm$ 10 ^A	-8 $\pm$ 19 ^A
OB	1 μM	-5 $\pm$ 4 ^C	-0 $\pm$ 25 ^A	-3 $\pm$ 8 ^C	-0 $\pm$ 5 ^C	-0 $\pm$ 5 ^A	-4 $\pm$ 8 ^A
	10 μM	-15 $\pm$ 7 ^B	-13 $\pm$ 25 ^A	-13 $\pm$ 9 ^B	-12 $\pm$ 12 ^B	-1 $\pm$ 7 ^A	-4 $\pm$ 11 ^A
	30 μM	-29 $\pm$ 9 ^A	-15 $\pm$ 30 ^A	-31 $\pm$ 6 ^A	-24 $\pm$ 13 ^A	-1 $\pm$ 7 ^A	-5 $\pm$ 11 ^A

Valores relativos (%) expressos em mediana $\pm$ semi-amplitude total. C: controle; OB: obeso; 1 μM , 10 μM e 30 μM : concentrações de ácido ciclopiazônico; Basal: Ca²⁺ com 0,625 mM; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; TPT: tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt: velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; TR₅₀: tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo. * representa diferença significativa entre os grupos C e OB; A, B e C: letras distintas mostram diferença significativa da influência do ácido ciclopiazônico intra-grupo; ANOVA, Medidas Repetidas; p<0,05.

4. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, diversos pesquisadores têm utilizado modelos experimentais de obesidade para o estudo das possíveis alterações morfológicas, moleculares, bioquímicas e funcionais decorrentes do acúmulo de peso corporal.^(49-51,53,55,64,84,85) A obesidade experimental pode ser realizada a partir de modelos genéticos ou dietéticos. Embora animais geneticamente obesos têm sido utilizados, apenas 5% da obesidade humana é consequência de alteração genética.⁽⁸⁶⁾ Desta forma, a indução de obesidade experimental por dieta hipercalórica tem sido frequentemente utilizado com a finalidade de reproduzir as características e os hábitos alimentares inadequados comumente observados em humanos obesos.^(49-51,53,55,64,84,85)

O modelo experimental de obesidade proposto neste trabalho foi realizado por meio de cinco dietas hipercalóricas, peletizadas, provenientes do aumento da taxa de gordura. As dietas apresentavam sabores diferentes e eram oferecidas de forma rotativa com o objetivo de aumentar a ingestão alimentar, e, conseqüentemente, o ganho de peso corporal dos animais. A apresentação das dietas na forma de pellets possibilitou aferir precisamente o consumo alimentar. A dieta padrão apresentava conteúdo calórico de 3,3 kcal/g, enquanto que a densidade energética das dietas hipercalóricas era aproximadamente de 4,5 kcal/g, ou seja, representando um aumento de 35% na quantidade de calorias (Quadro 6). Os níveis de proteínas e de micronutrientes da dieta hipercalórica estavam de acordo com as necessidades sugeridas para o crescimento e o desenvolvimento dos animais.

Neste experimento, a dieta hipercalórica acarretou nos ratos obesos elevação no peso e na quantidade de gordura corporal. O peso dos animais obesos aumentou 20,6% em relação ao dos controles. Alguns autores relatam que o peso corporal pode não ser um bom indicativo da quantidade de gordura e, desta forma utilizam a análise da taxa de gordura na carcaça.⁽⁶⁶⁾ A avaliação da gordura na carcaça dos ratos obesos mostrou aumento de 112,5% em relação aos

controles, indicando que o peso corporal pode, realmente, subestimar o grau de obesidade. A elevação do peso corpóreo à custa do acúmulo de gordura está de acordo com outros trabalhos que verificaram que a dieta hiperlipídica promoveu obesidade.^(49,65,87-89) Os períodos de indução à obesidade realizados na literatura variam entre 8 a 16 semanas de tratamento.^(51,68, 91-93) Os dados deste experimento em relação à evolução do peso corporal estão de acordo com outros pesquisadores,⁽⁶⁵⁾ que mostraram diferença no peso entre os grupos a partir da segunda semana de tratamento. Entretanto, os resultados divergem de outros autores, que utilizando dieta hiperlipídica por 12 semanas, verificaram diferença significativa entre o peso corporal dos dois grupos a partir da 7 semana de tratamento.⁽⁵⁵⁾ Embora os animais OB ingeriram menor quantidade de alimentos, o maior ganho de peso corporal neste grupo foi devido ao aumento do consumo de calorias e a melhor eficiência alimentar (Tabela 2). O aumento na eficiência tem sido constatado em trabalhos com dieta rica em gordura.⁽⁴⁹⁾ Outros autores sugerem que a quantidade de lipídios na dieta é o principal fator de acúmulo de gordura nos animais obesos.^(62,87,88) Estes pesquisadores mostraram que os animais desenvolviam obesidade, embora consumissem a mesma quantidade de calorias.^(62,87,88)

Os animais obesos utilizados no presente estudo apresentaram diversas características frequentemente observadas na obesidade humana e experimental.^(3,65,66,90) Os ratos desenvolveram hiperinsulinemia, resistência à insulina, hiperleptinemia e elevação da pressão arterial. O teste oral de tolerância à glicose mostrou que embora a glicemia basal fosse semelhante nos dois grupos ($p < 0,07$), os animais obesos após uma sobrecarga de glicose, apresentaram níveis glicêmicos elevados em relação ao controle. Estes resultados sugerem que os ratos obesos desenvolveram resistência à insulina, o que acarretou menor captação de glicose pelos tecidos. Em resposta a resistência à insulina ocorreu aumento dos níveis circulantes de insulina produzidos pelo pâncreas.

Em nossos estudos foi possível verificar aumento nas concentrações plasmáticas de leptina após 15 semanas de obesidade. A leptina é produzida pelo tecido adiposo e age no sistema nervoso aumentando a saciedade.^(17,91) Os níveis de leptina se correlacionam com a quantidade de gordura corporal, diminuindo a lipogênese e aumentando a lipólise.⁽⁹²⁾ Atualmente tem sido relatado que as dietas hiperlipídicas inibem a ação da leptina, e como consequência elevam a ingestão alimentar devido a uma falha no mecanismo da saciedade e acarretam aumento da adiposidade.^(92,93) Entretanto, no presente estudo, podemos sugerir que o papel da leptina de controle da saciedade foi observado, pois os animais obesos ingeriram menor quantidade de alimento.

Neste experimento, a obesidade aumentou a pressão arterial sistólica final nos animais obesos. O comportamento da pressão arterial dos animais do presente estudo está em concordância com alguns autores^(48,51) e em divergência com outros, que observaram pressão arterial inalterada com a obesidade.^(49,55) Os mecanismos responsáveis pela elevação da pressão arterial, incluem a hiperatividade do sistema nervoso simpático,⁽¹⁷⁾ aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)^(46,50,51) e estresse oxidativo,⁽¹⁷⁾ os quais acarretam vasoconstrição periférica e aumento da reabsorção de sódio renal. A ativação do sistema nervoso simpático está relacionada com aumento dos níveis de leptina, insulina e ácidos graxos livres.⁽¹⁷⁾

O presente estudo mostrou que a obesidade não acarretou hipertrofia cardíaca nos animais obesos. O período de indução à obesidade em nossos experimentos promoveu aumento no peso dos ventrículos esquerdo e direito no grupo obeso. Contudo, quando os pesos dos ventrículos foram normalizados para o peso corporal não houve diferença entre os grupos C e OB, devido ao aumento do peso corporal dos ratos obesos. A normalização do peso ventricular para o peso corporal dos animais tem sido muito utilizada na literatura para a avaliação da hipertrofia cardíaca. Entretanto, o uso deste índice é controverso quando se

comparam animais com pesos corporais diferentes. A análise morfométrica do tecido cardíaco não mostrou diferença significativa entre os dois grupos, e está de acordo com pesquisas que não verificaram aumento da área do miócito.^(46,49)

O presente estudo teve como objetivo principal investigar os efeitos da obesidade sobre a função mecânica do miocárdio de ratos e a sua relação com o cálcio intracelular. A utilização do músculo papilar permite avaliar a função miocárdica intrínseca e detectar alterações mecânicas precoces não observadas quando se aborda o coração *in situ*. Além disso, esta preparação possibilita o controle preciso da pós-carga e da pré-carga, o que é difícil de ser obtido no coração *in vivo*, como também a análise da contratilidade miocárdica independentemente de variações de carga e de frequência cardíaca. Este ensaio é extremamente utilizado para avaliação das respostas da contração e do relaxamento à ação de manobras inotrópicas. Por outro lado, as informações obtidas neste tipo de preparação podem não refletir a função cardíaca *in vivo*, pois não sofre a influência de alterações metabólicas e hormonais existentes, por exemplo, na obesidade.

A análise da função do músculo papilar no *experimento Diltiazem* mostrou, pelo teste T^2 de Hotelling, que em condições basais os grupos OB e C apresentaram desempenho funcional semelhante. Entretanto, a rigidez miocárdica foi maior nos animais obesos em relação ao controle. A avaliação dos parâmetros mecânicos no *experimento Ácido Ciclopiazônico* constatou, pelo teste T^2 de Hotelling, diferença entre os grupos na situação basal, em razão do tempo de contração ser menor no grupo obeso do que no controle. A rigidez miocárdica não foi avaliada neste experimento. Não encontramos explicação para o comportamento diferente dos músculos papilares na situação basal nos dois experimentos, desde que a metodologia utilizada foi a mesma.

Os estudos que avaliaram a função mecânica no miocárdio de ratos obesos induzidos por dieta hipercalórica apresentam resultados inconsistentes.^(48,50-53,55) Carroll et al⁽⁵⁰⁾

constatarem no coração isolado de coelhos obesos por 12 semanas, que os valores da $+dP/dt$ e a $-dP/dt$ foram semelhantes entre os grupos,^(48,51) ou seja, a obesidade não alterou a função cardíaca. Este resultado está em concordância com autores,⁽⁵²⁾ que em miócito isolados de ratos obesos por 14 semanas, constatarem função preservada, e em divergência com Ouwens et al⁽⁵³⁾ que em ratos obesos por 7 semanas verificaram aumento da força contrátil basal no músculo papilar. Relling et al⁽⁵⁵⁾ observaram depressão da função mecânica, contrátil e relaxamento, em miócitos isolados de ratos obesos por 12 semanas.

Atualmente diversas pesquisas têm utilizado intervenções farmacológicas com a finalidade de identificar alterações nas fases de contração e relaxamento que podem, eventualmente, não serem observadas em condições basais. Além disso, as mesmas auxiliam no entendimento dos possíveis mecanismos responsáveis pelas alterações no desempenho funcional do miocárdio.

Neste estudo, avaliamos o cálcio intracelular miocárdico por meio de bloqueadores específicos dos canais L do sarcolema e da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático. Estas intervenções farmacológicas possibilitam verificar a participação dos canais L e a atividade da SERCA2 na contração e no relaxamento miocárdico.⁽⁵⁷⁾ A função do canal L do sarcolema nos miócitos cardíacos é mediar o influxo de cálcio extracelular na membrana plasmática. Com a abertura dos canais L de cálcio, o influxo de Ca^{2+} promove aumento da concentração de Ca^{2+} livre no citosol. Este aumento de Ca^{2+} é decorrente da liberação de grande quantidade de Ca^{2+} do RS que ocorre por meio de um mecanismo conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+} .⁽⁵⁷⁾ Diversos autores têm utilizado em pesquisas experimentais diferentes tipos de bloqueadores dos canais de cálcio, entre eles, nifedipina, verapamil e diltiazem.^(72,73,94) O diltiazem inibe o influxo de cálcio no músculo cardíaco por meio de bloqueio competitivo com o cálcio que entra pelos canais lentos voltagem-dependentes. As concentrações de diltiazem utilizada e o tempo de ação da droga no músculo papilar estão de

acordo com trabalhos prévios.^(72,73,94) As porcentagens de queda da tensão desenvolvida (TD) mostraram que as doses utilizadas de diltiazem promoveram bloqueio eficiente do canal L. O bloqueio do canal L acarretou somente diferença de comportamento da TR entre os dois grupos, que variou menos no grupo OB do que no C. Este resultado sugere que a menor variação da TR pode estar relacionada com o maior resíduo de cálcio citosólico e/ou maior afinidade do cálcio pela troponina-C no grupo OB. Esses fenômenos poderiam também ser responsáveis pela maior rigidez miocárdica observada no rato OB (Figura 7).

O retículo sarcoplasmático (RS), maior sítio de acúmulo e liberação de cálcio durante o ciclo cardíaco, tem importante papel na regulação do ciclo de contração e relaxamento do coração. A atividade da SERCA2, responsável pela recaptura de Ca^{+2} do citosol pelo RS, é dependente da concentração de cálcio citoplasmático, da quantidade de cálcio no retículo sarcoplasmático e da fosfolambam.⁽⁹⁵⁾ Pesquisas experimentais têm utilizado diferentes drogas bloqueadoras da atividade da SERCA2 no coração, entre elas, a tapsigargina e o ácido ciclopiazônico.^(74-78,96,97) O ácido ciclopiazônico (CPA) tem sido descrito como um inibidor específico da atividade da SERCA2^(74-78,96,97) produzindo respostas inotrópicas negativas, como diminuição da força contrátil e prolongamento do tempo e velocidade do relaxamento. A maioria das concentrações de CPA utilizada em músculo papilar de coelhos ou ratos relatadas na literatura variam de 1 e 30 μM , podendo atingir 100 μM .^(74,76,98-100) Portanto, as doses empregadas no experimento estão de acordo com os padrões da literatura. O tempo de exposição do músculo à droga na solução nutriente varia de 1 a 30 min.^(74,76,98-100) No presente estudo, o tempo de 10 minutos, pode ter sido insuficiente para provocar um bloqueio mais eficaz da SERCA2. Segundo Baudet et al,⁽⁷⁶⁾ a inibição da recaptura do cálcio pelo CPA é incompleta, mesmo em altas concentrações e longos tempos de exposição. A inibição da SERCA2 em altas concentrações pode acarretar mudanças no efluxo de cálcio em favor do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{+2}$. Os resultados deste experimento mostraram que o bloqueio da SERCA2

acarretou resposta semelhante nos dois grupos, sugerindo que a atividade da SERCA2 não foi alterada nos ratos obesos. Como o SERCA2 é responsável pela recaptura de 92% do cálcio citosólico em ratos,⁽⁵⁷⁾ o provável aumento do resíduo diastólico de cálcio observado no *experimento diltiazem* não teria relação com depressão da atividade da SERCA2.

O resultado da função no miocárdio dos animais OB diverge da nossa hipótese de trabalho, pois a obesidade não acarretou depressão da função mecânica e diminuição do fluxo de cálcio pelos canais L e da atividade da SERCA2. A função mecânica preservada ou melhorada observada neste experimento pode estar relacionada ao tempo de exposição à obesidade. Desde que trabalhos mostram que as alterações decorrentes do excesso de gordura se correlacionam com a duração e intensidade deste acúmulo,^(26,32-34) os resultados do tempo de exposição à obesidade nos ratos foi suficiente apenas para promover alterações corporais, endócrinas e pressão arterial. Trabalhos futuros, com aumento do tempo de exposição do coração à obesidade, poderão comprovar a nossa hipótese inicial que o aumento de gordura poderá acarretar depressão da função miocárdica.

5. CONCLUSÃO

A exposição à obesidade por um período de 15 semanas aumenta a rigidez miocárdica no *experimento Diltiazem*, diminui o tempo de contração no *experimento Ácido Ciclopiazônico* e não promove alterações dos canais L do sarcolema e da atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático.

6. REFERÊNCIAS*

1. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the Pathophysiology of Obesity-associated Cardiovascular Disease. *Circulation* 2002; 105:2923-8.
2. O'Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg.* 2002; 184:4S-8S.
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; 110:3081-7.
4. World Health Organization. Obesity and overweight. Geneva: WHO;2005 [access 2005 Mar 20]. Available from: <http://www.who.int>.
5. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE; 2003.
6. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2522-5.
7. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Alisson DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003; 289:187-93.
8. Hu FB, Willett WC, Li T, Stampfer MJ, Colditz GA, Manson JE. Adiposity as compared with physical activity in predicting mortality among women. *New Engl J Med* 2004; 351:2694-703.
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. *New Engl J Med* 2005; 352:1138-45.
10. Silva MCP, de Laet C, Nusselder WJ, Mamun AA, Peeters A. Adult obesity and number of years lived with and without cardiovascular disease. *Obesity* 2006; 14:1264-73.
11. Wilson PWF, D'Agostino RB, Sullivan L, Parise Helen, Kannel WB. Overweight and Obesity as determinants of cardiovascular risk. *Arch Int Med* 2002; 162:1867-72.
12. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *Q J Med* 2006; 99: 565-79.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal: sample references. [homepage on the Internet]. Bethesda:U.S. National Library of Medicine; 2003 [last updated 2003 July 09; cited 2005 Jun 01]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer X, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Circulation* 2006; 113:898-918.
14. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2548-56.
15. Mohamed-Ali V, Pinkney JH, Coppack SW. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Dis* 1998; 22:1145-58.
16. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine* 2006; 29:81-90.
17. Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol and Hypertens* 2006; 15:173-8.
18. Peterson LR, Waggoner AD, Scechtman KB, Meyer T, Gropler RJ, Barzilai B, et al. Alterations in left ventricular structure and function in Young Healthy Obese Women. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:1399-404.
19. Schmieder RE, Messerli FH. Obesity hypertension. *Med Clin of North Am* 1987; 71:991-1001.
20. Morricone L, Malavazos AE, Coman C, Donati C, Hassan T, Caviezel F. Echocardiographic abnormalities in normotensive obese patients: relationship with visceral fat. *Obes Res* 2002; 10:489-98.
21. 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; 95:1527-8.
22. 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. 97:725-9.
23. Messerli FH. Cardiovascular effects of obesity and hypertension. *Lancet* 1982; 1:1165-8.
24. Messerli FH, Sundgaard-Riise K, Reisin E, Dreslinski G, Dunn FG, Frohlich E. Disparate cardiovascular effects of obesity and arterial hypertension. *Am J Med* 1983; 74:808-12.
25. Otto ME, Belohlavek M, Khandheria B, Gilman G, Svatikova A, Somers V. Comparison of right and left ventricular function in obese and nonobese men. *Am J Cardiol* 2004; 93:1569-72.
26. Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of clinical syndrome. *Am J Med Sci* 2001; 321:225-36.
27. Berkalp B, Cesur V, Corapcioglu D, Erol C, Baskal N. Obesity and left ventricular diastolic dysfunction. *Int J Cardiol* 1995; 52:23-6.
28. Crisostomo LL, Araújo LMB, Câmara E, Carvalho C, Silva FA, Vieira M, et al. Comparison of left ventricular mass and function in obese versus nonobese women <40 years of age. *Am J Cardiol* 1999; 84:1127-9.

29. Iacobellis G, Ribaudo MC, Leto G, Zappaterreno A, Vecci E, Di Mario U, et al. Influence of excess fat on cardiac morphology and function: Study in uncomplicated obesity. *Obes Res* 2002; 10:767-73.
30. Iacobellis G, Ribaudo MC, Zappaterreno A, Iannucci CV, Di Mario U, Leonetti F. Adapted changes in left ventricular structure and function in severe uncomplicated obesity. *Obes Res* 2004; 12:1616-21.
31. Pascual M, Pascual DA, Soria F, Vicente T, Hernández AM, Tébar FJ, et al. Effects of isolated obesity on systolic and diastolic left ventricular function. *Heart* 2003; 89:1152-6.
32. Scaglione R, Dichiaro MA, Indovina A, Lipari R, Ganguzza A, Parrinello G, et al. Left ventricular diastolic and systolic function in normotensive obese subjects: influence of degree and duration of obesity. *Europ Heart J* 1992; 13:738-42.
33. de Divitiis O, Fazio S, Petitto M, Maddalena G, Contaldo F, Mancini M. Obesity and cardiac function. *Circulation* 1981; 64:477-81.
34. Alpert MA, Lambert CR, Panayiotou H, Terry BE, Cohen MV, Massey CV, et al. Relation of duration of morbid obesity to left ventricular mass, systolic function, and diastolic filling, and effect of weight loss. *Am J Cardiol* 1995; 76:1194-7.
35. Mureddu GF, de Simone G, Greco R, Rosato GF, Contaldo F. Left ventricular filling pattern in uncomplicated obesity. *Am J Cardiol* 1996; 77:509-14.
36. Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Ui JY, 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; 146:5341-9.
37. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard MLS, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 2003; 144:3483-90.
38. Dong F, Zhang X, Yang X, Esberg LB, Yang H, Zhang Z, et al. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient *ob/ob* obese mice. *J Endocrinol* 2006; 188:25-36.
39. Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in *Lep/Lep* obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia* 2006; 49:1434-46.
40. Paradise NF, Pilati CF, Payne WR, Finkelstein JA. Left ventricular function of the isolated, genetically obese rat's heart. *Am J Physiol* 1985; 17:H438-44.
41. 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; 7:390-400.
42. 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; 51:2587-95.

43. Cittadini A, Mantzoros CS, Hampton TG, Travers KE, Katz SE, Morgan JP, et al. Cardiovascular abnormalities in transgenic mice with reduced brown fat. *Circulation* 1999; 100:2177-83.
44. Minhas KM, Khan SA, Raju SVY, 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; 565:463-74.
45. Carroll JF, Dwyer TM, Grady AW, Reinhart GA, Montani JP, Cockrell K, et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and neurohumoral activity in a new animal model of obesity. *Am J Physiol* 1996; 271:H373-8
46. 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:H547-52.
47. Pawloski CM, Kanagy NL, Mortensen LH, Fink GD. Obese *zucker* rats are normotensive on normal and increased sodium intake. *Hypertension* 1992; 19:I90-5.
48. Carroll JF, Summers RL, Dzielak DJ, Cockrell K, Montani J-P, Mizelle HL. Diastolic compliance is reduced in obese rabbits. *Hypertension* 1999; 33:811-5.
49. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 2006; 48:65-72.
50. Okere IC, Chandler MP, McElfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN, et al. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circul Physiol* 2006; 291:H38-44.
51. Boustani-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* 2006. Epub ahead of print.
52. 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; 14:778-86.
53. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia* 2005; 48:1229-37.
54. Carroll JF, Jones AE, Hester RL, Reinhart GA, Cockrell K, Mizelle HL. Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. *Hypertension* 1997; 30:1376-81.
55. Relling DP, Esberg LB, Frang CX, Johnson WT, Murphy J, Carlson EC, et al. High-fat-diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hyperten* 2006; 24:549-61.
56. Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbits. *Am J Hypertens* 2005; 18:692-8.

57. Opie LH. Myocardial contraction and relaxation. In: Opie LH, ed. The heart. Physiology, from cell to circulation. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 209-31.
58. The National Academy of Sciences. Nutrient requirements of the laboratory rat. 4th ed. Washington; 1995.
59. Nascimento AF. Influência das dietas padrão e hipercalórica sobre o comportamento corporal e bioquímico de ratos *Wistar*. [dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2006.
60. Silva DJ, Queiroz AC. Análise dos alimentos: métodos químicos e biológicos. 2nd ed. Viçosa: UFV; 1990.
61. Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli ELB. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Basic Nutr Invest* 2004; 20:230-4.
62. Borst SE, Conover CF. High-fat induces increased tissue expression of TNF- α . *Life Sci* 2005; 77:2156-65.
63. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med* 1971; 78:957-62.
64. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male *Wistar* rat. *Diabetes Res Clin Pract* 1996; 31:27-35.
65. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes* 2005; 29: 1368-78.
66. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio DA, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr* 2003; 133:1081-7.
67. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279:H1534-9.
68. 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; 320:244-8.
69. Cicogna AC, Robinson KG, Conrad CH, Squire R, Okoshi MP, Bing OH. Role of myocardial contractile status and relaxation in ventricular dysfunction during the transition of the heart hypertrophy to failure. *Arq Bras Cardiol* 1997; 69:381-4.
70. Gut AL, Okoshi MP, Padovani CR, Aragon FF, Cicogna AC. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and beta-adrenergic system changes. *Nutr Res* 2003; 23:911-9.
71. Krebs HA, Henseleit K. Untersuchungen über die harnstoffbildung im tierkörper. *Hoppe-Seyler Z Physiol Chem* 1932; 210:33-66.

72. Klitzner TS, Chen FH, Raven RR, Wetzel GT, Friedman WF. Calcium current and tension generation in immature mammalian myocardium: effects of diltiazem. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23:807-15.
73. Yamazaki M, Kamitani K, Ito Y, Momose Y. Effects of halothane and diltiazem on I-type calcium currents in single smooth muscle cells from rabbit portal veins. *Br J Anaesth* 1994; 73:209-13.
74. Agata N, Tanaka H, Shigenobu K. Possible action of cyclopiazonic acid on myocardial sarcoplasmic reticulum: inotropic effects neonatal and adult rat heart. *Br J Pharmacol* 1993; 108:571-2.
75. Badaoui A, Huchet-Cadiou C, Leoty C. Effects of cyclopiazonic acid on membrane currents contraction and intracellular calcium transients in frog hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27:2495-505.
76. Baudet S, Shaoulain R, Bers DM. Effects of thapsigargin and cyclopiazonic acid on twitch force and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content of rabbit ventricular muscle. *Circul Res* 1993; 73:813-9.
77. du Toit EF, Opie LH. Inhibitors of Ca^{2+} ATPase pump of sarcoplasmic reticulum attenuate reperfusion stunning in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24: 678-84.
78. Takahashi S, Kato Y, Adachi M, Agata N, Tanaka H, Shigenobu K. Effects of cyclopiazonic acid on rat myocardium: inhibition of calcium uptake into sarcoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272:1095-100.
79. Souza JMP. A distribuição de probabilidade normal e seu uso em situações empíricas; a variável padronizada z (z score). *Rev Bras Saúde Ocup* 1991; 72:17-20.
80. Norman GR, Streiner DI. *Biostatistics: the bare essentials*. St. Louis: Mosby; 1994.
81. Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc* 1977; 72:469-78.
82. Johnson RA, Wichern DW. *Applied multivariate statistical analysis*. 4th ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1998.
83. Draper NR, Smith H. *Applied regression analysis*. 3rd ed. New York: John Wiley; 1998.
84. 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; 10:956-63.
85. Gosh S, An D, Pulinilkunnil T, Qi D, Lau H, Abrahani A, et al. Role of dietary acids and acute hyperglycemia in modulation cardiac cell death. *Nutrition* 2004; 20:916-23.
86. Halpern A. *Obesidade*. São Paulo: Contexto; 1998.
87. Flatt JP. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. *Am J Clin Nutr* 1987; 45:296-306.
88. Flatt JP. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:952S-9S.
89. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* 1976; 17:461-71.

90. Das M, Gabriely I, Barzilai N. Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obesity Rev* 2004; 5:13-9.
91. Mantzoros CS. The role of leptin in human obesity and disease: a review of current evidence. *Ann Int Med* 1999; 130:671-80.
92. Ainslie DA, Proietto J, Fam BC, Thorburn AW, et al. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. *Am J Clin Nutr* 2000; 71:438-42.
93. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med* 1995; 1:1311-4.
94. Cicogna AC, Padovani CR, Brooks WW, Schine L, Robinson KG, Conrad CH, et al. Protective effects of diltiazem on the mechanical performance of the hypoxic myocardium. *Braz J Med Biol Res* 1993; 26:859-68.
95. Periasamy M, Huke S. SERCA pump level is a critical determinant of Ca^{2+} homeostasis and cardiac contractility. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1053-63.
96. Dettbarn C, P Palade. Effects of three sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{++} pump inhibitors on release channels of intracellular stores. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 285: 739-45.
97. Schwinger RHG, Brixius K, Bavendiek U, Hoischen S, Müller-Ehmsen J, Bölc B, al. Effect of cyclopiazonic acid on the force-frequency relationship in human nonfailing myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 283:286-92.
98. Miller CD, Richard JL, Hembrough FB, Osweiler GD, Cox DF. In vitro effects of cyclopiazonic acid mycotoxin on turkey papillary muscles. *Am J Vet Res* 1990; 51:836-8.
99. Pery-Man N, Chemla D, Coirault C, Suard I, Riou B, Lecarpentier Y. A comparison of cyclopiazonic acid and ryanodine effects on cardiac muscle relaxation. *Am J of Physiol* 1993; 265:H1364-72.
100. Teshima R, Onose J, Okunuki H, Sawada J. Effect of $\text{Ca}^{(2+)}$ ATPase inhibitors on MCP-1 release from bone marrow-derived mast cells and the involvement of p38 MAP kinase activation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 121:34-43.