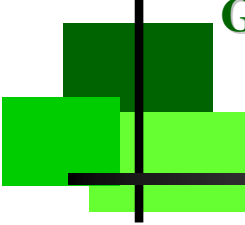


Ana Paula Lima Leopoldo

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO
TRÂNSITO DE CÁLCIO MIOCÁRDICO**



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

UNESP- Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Clínica Médica
2007

Ana Paula Lima Leopoldo

**INFLUÊNCIA DA OBESIDADE SOBRE A EXPRESSÃO
GÊNICA DAS PROTEÍNAS REGULADORAS DO
TRÂNSITO DE CÁLCIO MIOCÁRDICO**

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**

Co-orientadora: **Profa. Dra. Célia Regina Nogueira**

**BOTUCATU
2007**

Aos meus pais, João e Dalva

Nada mais merecido do que homenagear pessoas tão importantes! Vocês são os responsáveis pela minha vida e me prepararam para o futuro.

Vocês fazem a diferença com seu exemplo e são os responsáveis pelo meu sucesso. Obrigada por serem os pais mais maravilhosos do mundo. Amo vocês.”

Ao meu marido André,

pela dedicação, amor e por compartilhar esta trajetória, valorizando e incentivando cada ato de esforço e conquista. Obrigada pelo seu bom humor, fundamental para que esta caminhada terminasse com sucesso.

À minha amada família,

Tico, Maria, Val, Miriam, Lucas e Caio, por todo apoio, torcida e amor, recebidos durante mais esta etapa da minha vida. Vocês são fundamentais!

À família Leopoldo,

agora também minha família, Tânia, Fernando, Victor e Selma, pelos momentos de descontração, amizade e constante suporte emocional. À grande amiga, “cunhada” e professora Luciana Santucci, pelo incentivo e auxílio constante com o inglês. À tia Elza pelo grande carinho. Minha eterna admiração!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, sempre presente em minha vida, iluminando meu caminho e me dando força e serenidade para superar os obstáculos.

Agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna, pela oportunidade de aprendizado, amizade e confiança. Seu exemplo exerceu uma profunda influência sobre meu desenvolvimento pessoal e profissional. Minha eterna admiração!

À Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, pela co-orientação, disponibilidade e apoio constante, que com certeza enriqueceram este trabalho. Obrigada pela disponibilização de seu laboratório, recursos e equipamentos.

Ao Prof. Carlos Roberto Padovani, pela prontidão em avaliar todos os resultados deste trabalho. Obrigada pela amizade, incentivo e por acreditar que aprenderíamos Bioestatística.

Ao Prof. Dr. Mário Sugizaki, pela sua ajuda fundamental ao me apresentar para o Dr. Cicogna. Obrigada pela disponibilidade e apoio essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Robson Francisco Carvalho, pelo enorme auxílio na aprendizagem de Biologia Molecular. Obrigada pela amizade e paciência em todas as etapas desta pesquisa.

Aos eternos amigos do "Lab Cic": André Nascimento, Sílvio, Alessandro, Vanessa, Dijon, Matheus, Ricardo, Isabel, Olga, Alessandra, Rosângela, Cristiana e Denise. Obrigada pela amizade e convivência. O trabalho foi grande, mas permeado de alegria, diversão e principalmente risadas. À galerinha da BioMol: Renata, Paula, Loreta, Maria Teresa, Aline, Sandro e Sueli, que sempre ajudavam a resolver os problemas e me faziam rir, mesmo quando a vontade era de chorar. Todos vocês sabem mais do que ninguém, o quão difícil é a pós-graduação sem a companhia dos amigos.

Aos amigos do Laboratório Experimental de Clínica Médica, José Carlos, Mário, Elenize, Sandra, Vitor, José Aparecido, Rogério, De Lalla, Camila e Corina, pela ajuda e agradável convívio. Esta pesquisa é resultado do trabalho em conjunto, da cooperação e da amizade de pessoas como vocês. Muito obrigada!

Aos Prfs. Drs. Álvaro Campana e Marina Politi Okoshi, pelas críticas e sugestões durante o exame de qualificação, que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos Profs Drs. Katashi Okoshi e Maeli Dal Pai Silva pela atenção e colaboração.

Um agradecimento carinhoso e especial, 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 e Elisângela Aparecida da Silva e aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação: Regina Célia Spadin, Lílian C. Nadal B. Nunes, Janete Ap. Herculano Nunes Sieva e Nathanael Pinheiro Salles. Obrigada pela pronta colaboração sempre de forma agradável e atenciosa em todos os momentos.

Agradeço ao CNPq pelo auxílio financeiro.

"Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei
sobre os ombros de gigantes."

Isaac Newton

Lista de quadros.....	vii
Lista de figuras.....	vii
Lista de tabelas.....	viii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	7
3.1. Animais e Protocolo Experimental.....	7
3.1.1. Critério de exclusão dos ratos nos grupos controle e obeso.....	7
3.2. Composição das dietas padrão e hipercalórica.....	8
3.3. Eficiência alimentar e ingestão calórica.....	11
3.4. Pressão arterial sistólica final.....	11
3.5. Teste oral de tolerância à glicose.....	12
3.6. Análises hormonais.....	12
3.7. Análise da gordura corporal.....	13
3.8. Análise morfológica.....	13
3.9. Análise morfométrica do miocárdio.....	13
3.10. Determinação dos níveis do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio no miocárdio.....	14
3.10.1. Extração do RNA.....	14

3.10.1.1 Verificação da integridade do RNA por eletroforese.....	16
3.10.2. Transcrição reversa do RNA (RT).....	16
3.10.3. Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	17
3.10.3.1. <i>Primers</i>	19
3.10.4. Quantificação da PCR.....	20
3.10.5. Padronização dos <i>primers</i> utilizados na RT-PCR.....	22
3.11. Análise estatística.....	24
4. RESULTADOS.....	25
4.1. Composição dos grupos.....	25
4.2. Características gerais e nutricionais.....	25
4.3. Níveis de RNA das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio do sarcolema e do retículo sarcoplasmático miocárdico.....	29
5. DISCUSSÃO.....	32
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	38

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ingredientes da dieta 1.....	9
Quadro 2. Ingredientes da dieta 2.....	9
Quadro 3. Ingredientes da dieta 3.....	10
Quadro 4. Ingredientes da dieta 4.....	10
Quadro 5. Ingredientes da dieta 5.....	10
Quadro 6. Composição das dietas.....	11

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da mobilização de Ca^{2+} durante a contração e o relaxamento miocárdico.....	4
Figura 2. Representação das fases da curva de amplificação do Canal L.....	19
Figura 3. Quantificação das bandas.....	21
Figura 4. Gel em agarose (1%), determinação da temperatura do Canal L.....	22
Figura 5. Gel em agarose (1%), determinação do número de ciclos do Canal L.....	23
Figura 6. Gel em agarose (1%), reação em cadeia da polimerase (PCR) duplex.....	23
Figura 7. Evolução do peso corporal dos animais.....	26
Figura 8. Teste oral de tolerância à glicose.....	27
Figura 9a e 9b. Área seccional transversa do miócito.....	28
Figura 10a. Gel em agarose (1%), expressão do Canal L.....	29
Figura 10b. Gel em agarose (1%), níveis de expressão do Canal L.....	viii
Figura 11a. Gel em agarose (1%), expressão do trocador Na^+/Ca^{2+} (NCX).....	29
Figura 11b. Gel em agarose (1%), níveis de expressão do NCX.....	29

Figura 12a. Gel em agarose (1%), expressão da ATPase de cálcio (Serca2a).....	30
Figura 12b. Gel em agarose (1%), níveis de expressão da Serca2a.....	30
Figura 13a. Gel em agarose (1%), expressão do receptor rianodina (RyR).....	30
Figura 13b. Gel em agarose (1%), níveis de expressão do RyR.....	30
Figura 14a. Gel em agarose (1%), expressão do fosfolambam (PLB).....	31
Figura 14b. Gel em agarose (1%), níveis de expressão do PLB.....	31
Figura 15a. Gel em agarose (1%), expressão da calsequestrina (CSQ2).....	31
Figura 15b. Gel em agarose (1%), níveis de expressão da CSQ2.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>Primers</i>	20
Tabela 2. Padronização dos <i>primers</i>	23
Tabela 3. Características gerais e nutricionais dos animais.....	26
Tabela 4. Características hormonais dos animais.....	27
Tabela 5. Características cardíacas dos animais.....	28

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, representando um problema de abrangência mundial que afeta principalmente países industrializados. As comorbidades acarretadas pela obesidade resultam em conseqüências econômicas para a saúde pública e estão associadas com prejuízo da qualidade de vida e aumento da mortalidade. Pesquisas clínicas mostram que o excesso de gordura acarreta diversas anormalidades cardíacas, as quais se relacionam com a duração e intensidade da obesidade. Modelos experimentais, como a obesidade induzida por dieta hipercalórica, têm sido utilizados para o estudo das alterações moleculares, bioquímicas, morfológicas e funcionais acarretadas pelo acúmulo de tecido adiposo. Em razão da carência de estudos relacionando obesidade por dieta hipercalórica e cálcio intracelular miocárdico, o objetivo deste estudo foi analisar a expressão gênica das proteínas do sarcolema, canal L e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), e do retículo sarcoplasmático, ATPase de cálcio (Serca 2a), receptor rianodina (RyR), fosfolambam (PLB) e calsequestrina (CSQ2), envolvidas na regulação do cálcio intracelular miocárdico de ratos obesos. Ratos *Wistar* machos, com 30 dias, foram randomizados em dois grupos: controle (C; n=13) e obeso (Ob; n=13). 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), porcentagem de gordura da carcaça (% GC), pressão arterial sistólica final (PA), peso dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) e as relações VE/PCF e VD/PCF. O perfil glicêmico foi estimado pelo teste de tolerância à glicose (GTT) e os níveis plasmáticos de insulina e leptina avaliados por ELISA. A expressão gênica das proteínas envolvidas no trânsito de cálcio foi analisada por RT-PCR. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e submetidos ao teste *t*-Student, com nível de significância de 5%. O resultado da PA mostra que os animais do grupo Ob não ficaram hipertensos. O grupo Ob

apresentou PCF, %GC, VE e VD maiores do que os animais C. Entretanto, quando o VE e VD foram normalizados pelo PCF, os resultados foram similares entre os grupos. O perfil glicêmico e os níveis de leptina e insulina foram elevados no grupo Ob em relação aos animais C. O estudo da expressão gênica das proteínas reguladoras do trânsito de Ca^{2+} mostrou que a obesidade promove aumento dos níveis de RNAm da Serca 2a, RyR e PLB. No entanto, os níveis de RNAm do canal L, do NCX e da CSQ2 foram semelhantes entre os grupos. Em conclusão, a obesidade acarreta aumento da expressão gênica das proteínas do retículo sarcoplasmático, Serca 2a, RyR e PLB, envolvidas na homeostase do cálcio intracelular miocárdico.

Palavras-chave: obesidade, dieta hipercalórica, coração e trânsito de cálcio.

ABSTRACT

The obesity is characterized by the extreme accumulation of corporal fat, representing a problem of world-wide embracing that mainly affects industrialized countries. The comorbidities caused by the obesity result in economic consequences for the public health and they are associated with damage of the life quality and increase of mortality. Clinical research shows that the fat excess causes diverse heart abnormalities, which relates with the duration and intensity of the obesity. Experimental models, as the induced obesity by high fat diet, have been used for the study of the molecular, biochemical, morphologic and functional alterations caused by the accumulation of fat tissue. In despite of the lack of studies relating to obesity by high fat diet and myocardium intracellular calcium, the objective of this study was to analyze the expression gene of sarcolemal proteins, L type channel and exchanger $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX), and of the sarcoplasmic reticulum, ATPase of calcium (Serca2a), ryanodine receptor (RyR), phospholamban (PLB) and calsequestrin (CSQ2), involved in the regulation of myocardium intracellular calcium of obese rats. Male Wistar rats, with 30 days, were randomly in two groups: control (C; n=13) and obese (Ob; n=13). Group C received a control low-fat diet *Labina* (3,3 Kcal/g) and the Ob cycles 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), weight of the left ventricles (LV) and right (RV) and the ratio LV/FBW and RV/FBW were analyzed. The profile glucose was esteemed by the oral glucose tolerance test (GTT) and the insulin and leptin plasma levels evaluated by ELISA. The expression gene of Ca^{2+} cycling proteins was analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The data were expressed in means \pm SD and submitted to test "t" of Student, with level of relevant of 5%. The result of the SBP was that the animals of the Ob group had not been hypertensive. The Ob group presented FBW, %CF, LV and bigger RV than animals C. Notwithstanding, when LV and RV

were normalized by the FBW, the results were similar between the groups. The profile glucose and the leptin and insulin levels were raised to the Ob group in relation to animals C. The study of the expression gene of Ca^{2+} cycling proteins showed that the obesity promotes increase of the levels of RNAm of the Serca2a, RyR and PLB. However, the levels of RNAm of canal L, the NCX and the CSQ2 had been similar between the groups. Conclusion, the obesity causes increase of the expression gene of proteins of the sarcoplasmic reticulum, Serca2a, RyR and PLB, involved in the homeostasis of myocardium intracellular calcium.

Keywords: obesity, high fat diet, heart, calcium cycling.

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal, representando um problema de abrangência mundial que afeta principalmente países industrializados.⁽¹⁻³⁾ Atualmente mais de um bilhão de pessoas apresentam sobrepeso, sendo que, mais de 30% desta população é obesa.⁽⁴⁾ No Brasil, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística,⁽⁵⁾ aproximadamente 40 milhões de pessoas têm sobrepeso e, deste grupo, 10,5 milhões são obesos. A pesquisa relata ainda, que 35% da população adulta brasileira se tornará obesa em 2025, refletindo-se em consequências econômicas para a saúde pública.

A etiologia da obesidade é multifatorial, sendo que a associação de fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais contribui para o aumento do peso corporal. O comportamento adquirido pela moderna sociedade industrializada, envolvendo o sedentarismo, os hábitos alimentares inadequados ou a combinação de ambos tem levado ao aumento da prevalência da obesidade.⁽⁶⁻⁸⁾

A obesidade é um fator de risco para muitas complicações médicas, como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, doenças cardiovasculares, respiratórias, digestivas, osteoarticulares, renais, psicológicas, ginecológicas, obstétrica e estados pró-trombóticos e inflamatórios,^(4,9,10) as quais estão associadas com prejuízo da qualidade de vida e aumento da mortalidade.⁽¹¹⁾

O tecido adiposo deixou de ser considerado apenas um depósito passivo dos estoques de triacilglicerol e fonte de ácidos graxos livres, mas um ativo órgão endócrino e parácrino, com múltiplas funções, que secreta diferentes adipocinas.⁽¹²⁾ Estas proteínas, leptina, adiponectina, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 6 (IL-6), resistina, angiotensinogênio e inibidor do ativador de plasminogênio (PAI-1) participam de diferentes

processos, como metabolismo de lipídeos e glicose, regulação da ingestão alimentar, do balanço energético, do tônus vascular e da ação da insulina.⁽¹²⁻¹⁴⁾ O aumento da leptina e insulina acarreta maior ativação do sistema nervoso simpático.⁽⁶⁾

Pesquisas clínicas mostram que o excesso de gordura acarreta diversas anormalidades cardíacas, as quais se relacionam com a duração e intensidade da obesidade.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ Estudos em seres humanos mostram que a obesidade, na presença^(15,19-23) ou ausência de comorbidades^(3,16-18,24-28) como hipertensão arterial, intolerância à glicose e dislipidemia, promove alterações morfológicas, hemodinâmicas, e funcionais cardíacas. Diferentes autores mostraram que a obesidade acarreta remodelação excêntrica^(15-17,19-21,24,26-28) ou concêntrica do ventrículo esquerdo,⁽¹⁹⁾ aumento da frequência cardíaca, do volume total sangüíneo, do retorno venoso, do débito cardíaco, modificações da reatividade vascular^(15-17,19-21,24,26-28), e disfunção diastólica ventricular esquerda.^(3,19,20,22,24,25,27,28) A avaliação da função sistólica apresenta resultados controversos. Assim, enquanto alguns autores encontraram o desempenho preservado,^(3,21,25,28) outros constataram aumento^(24,27) ou diminuição da função sistólica.^(16-18,20)

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para estudar a relação obesidade e função cardiovascular. Estudos em modelos genéticos com ratos *Zucker*⁽²⁹⁻³¹⁾ e camundongos deficientes de leptina *Lep/Lep (ob/ob)*⁽³²⁻³⁵⁾ geralmente apresentam disfunção do ventrículo esquerdo.⁽²⁹⁻³⁵⁾ Entretanto, por estes animais não apresentarem anormalidades exibidas em humanos obesos, o modelo de obesidade por dieta hipercalórica tem sido utilizado para a análise da função cardíaca.⁽³⁶⁻⁴³⁾ Assim, autores utilizando ratos submetidos à dieta hipercalórica de 7 a 14 semanas constataram que o desempenho cardíaco pode estar preservado,⁽³⁶⁻⁴⁰⁾ aumento⁽⁴¹⁾ ou diminuído.^(42,43)

Os mecanismos responsáveis pelas alterações do desempenho cardíaco em modelos de obesidade genética ou por dieta não estão estabelecidos. Assim, acúmulo de colágeno

intersticial miocárdico,^(36,44,45) lipotoxicidade,^(31,33,41) apoptose,⁽³⁸⁾ alteração na via β -adrenérgica^(43,46) e no trânsito de cálcio intracelular^(30,35,42,46) têm sido sugeridos como fatores responsáveis pelas anormalidades cardíacas.

O trânsito de cálcio (Ca^{2+}) intracelular é um dos principais mecanismos reguladores do ciclo de contração e relaxamento cardíaco.⁽⁴⁷⁾ Enquanto a rápida elevação do Ca^{2+} citosólico induz a contração, sua diminuição provoca o relaxamento. A contração cardíaca inicia-se com a abertura dos canais do tipo L sarcolemal (Canal L), e o conseqüente influxo de Ca^{2+} desencadeia liberação de grande quantidade de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) pelos receptores rianodina (RyR). 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 responsividade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . O relaxamento inicia-se quando a concentração intracelular de Ca^{2+} é reduzida, principalmente, pela recaptção do Ca^{2+} pela ATPase de Ca^{2+} do RS (SERCA2). A função da SERCA2 é regulada pela fosfolambam (PLB) que, em seu estado fosforilado, permite a recaptura do Ca^{2+} pela SERCA2.⁽⁴⁷⁾ O cálcio captado pelo RS é armazenado em altas concentrações em proteínas de estoque, como a calsequestrina (CSQ2), antes de ser novamente liberado pelo RyR. Outras proteínas, como o trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) e a bomba de Ca^{2+} do sarcolema de participam da regulação do efluxo de Ca^{2+} miocárdico. Desta forma, a atividade de diferentes canais e bombas localizados no sarcolema e no RS regulam o trânsito de Ca^{2+} intracelular, modulam a contratilidade e o relaxamento do miocárdio (Figura 1).⁽⁴⁷⁾

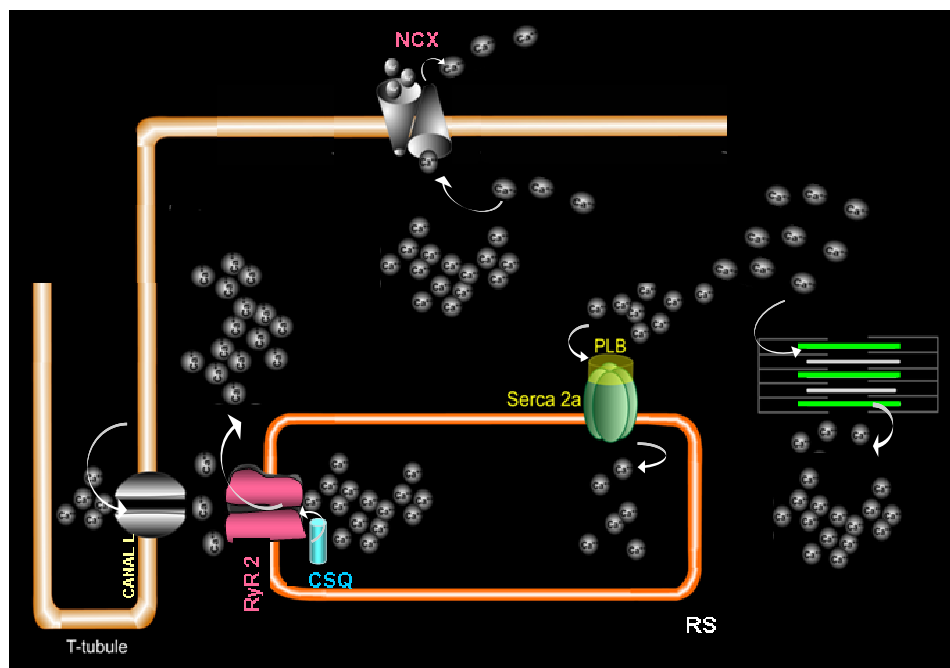


Figura 1. Representação esquemática da mobilização de Ca^{2+} durante a contração e o relaxamento miocárdico. Serca 2a: ATPase de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático; PLB: fosfolambam; RyR: receptor rianodina; CSQ: calsequestrina; NCX: trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$; Canal L: canal lento de Ca^{2+} . Modificado de Aline Villa Nova Bacurau, 2006.

A relação entre obesidade e o trânsito de Ca^{2+} intracelular tem sido estudada por meio de técnicas de biologia molecular, as quais tornam possível o entendimento dos mecanismos responsáveis pelas alterações no desempenho miocárdico. Os raros estudos que avaliaram as proteínas envolvidas na homeostase intracelular de Ca^{2+} miocárdico em modelos experimentais de obesidade, genéticos^(31,35,46) ou por dieta hipercalórica,^(42,48) apresentaram resultados divergentes. Enquanto alguns autores utilizando ratos geneticamente obesos, *Zucker* e *lep/lep (ob/ob)*, observaram que os níveis de expressão gênica e protéica da Serca 2a estavam preservados^(31,35), Minhas et al⁽⁴⁶⁾ verificaram em ratos *ob/ob* elevação da expressão protéica da Serca 2a. Por outro lado, Relling et al⁽⁴²⁾ avaliando a expressão das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio na obesidade dietética, verificaram que ratos *Sprague-Dawley* alimentados com dieta hipercalórica por 12 semanas apresentaram aumento da expressão protéica da Serca 2a e do PLB. Entretanto, Philip-Couderc et al⁽⁴⁸⁾ observaram

diminuição da expressão gênica da Serca 2a e do PLB⁽⁴⁸⁾ em cães obesos alimentados por 9 semanas de dieta hipercalórica.

Em razão da carência de estudos relacionando obesidade por dieta hipercalórica e as proteínas do trânsito de cálcio intracelular miocárdico, neste estudo foi avaliado a expressão do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio no miocárdio de ratos obesos.

2- OBJETIVO

O objetivo deste foi analisar a expressão gênica das proteínas do sarcolema, canal L e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, e do retículo sarcoplasmático, ATPase de cálcio, receptor rianodina, fosfolambam e calsequestrina, envolvidas na regulação do cálcio intracelular miocárdico de ratos obesos.

3.1-Animais e Protocolo Experimental

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

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; n=20) e obeso (Ob; n=20). Os animais C receberam ração comercial *Labina* (Purina, Paulínia, SP, Brasil) e os Ob ciclos de cinco dietas hipercalóricas, padronizadas neste laboratório,⁽⁴⁹⁾ que se sucediam de forma rotativa, semanalmente, por um período de 15 semanas. A rotatividade das dietas teve como finalidade alterar a palatabilidade e, conseqüentemente aumentar a ingestão alimentar e o ganho de peso. Ambos os grupos receberam água *ad libitum*. 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, em ambiente com temperatura controlada de 24 °C e submetidos a ciclos de iluminação de 12 horas.

3.1.1 - Critério 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. 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 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 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 final 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.

3.2 - Composição das dietas padrão e hipercalórica

As dietas experimentais seguiram as especificações do guia “Nutrient requirements of the laboratory rat” para ratos de laboratório.⁽⁵⁰⁾ As dietas hipercalóricas, 1, 2, 4, e 5 foram constituídas de uma mistura de pó de ração comercial *Labina*, alimentos industrializados e suplementação de proteínas, vitaminas e minerais. 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 foi composta pela dieta padrão, e a água oferecida aos animais foi acrescida de sacarose na

concentração de 300 gramas por litro. Os ingredientes utilizados no preparo das dietas estão apresentados nos Quadros 1- 5.

O estudo bromatológico para a análise da composição nutricional das dietas, padrão e hipercalóricas, foi realizado no Laboratório de Melhoramento e Nutrição Animal da Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp – Botucatu, e está apresentado no Quadro 6.⁽⁵¹⁾

Quadro 1- Ingredientes 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 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 da dieta 3

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

Quadro 4- Ingredientes 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 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

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

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).

3.3 - 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).^(42,52) A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor calórico de cada dieta (g x kcal).⁽⁵³⁾

3.4 - Pressão arterial sistólica final

Após decorridas 15 semanas do 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 da cauda 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 ao

transdutor de pulso. 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.⁽⁵⁴⁾

3.5-Teste oral de tolerância à glicose

Com a finalidade de mostrar que o modelo de obesidade induz alterações no perfil glicêmico,^(53,55) 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.^(52,53) 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).

3.6 - Análises hormonais

Para caracterizar o modelo de obesidade foram realizadas as dosagens dos hormônios leptina e insulina. Ao término do tratamento, os animais foram submetidos a jejum de 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 a -80 °C. As concentrações de leptina e insulina plasmática foram determinadas pelo método ELISA^(38,56) com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devics, USA), utilizando-se kits específicos (Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA).

3.7 - Análise da gordura corporal

A análise da gordura na carcaça dos animais foi realizada com a finalidade de quantificar a gordura corporal. Após os animais serem anestesiados (pentobarbital sódico, 50 mg/kg, intraperitoneal), decapitados e toracotomizados, descartaram-se as vísceras restando apenas a carcaça. Esta foi armazenada e seca à 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.⁽⁵⁷⁾

3.8 - Análise morfológica

As variáveis morfológicas para caracterizar os animais foram: peso corpóreo 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).

3.9 - 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 da Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Após toracotomia mediana, 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. 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.⁽⁵⁸⁾ As áreas seccionais (AS; µm²), utilizadas como indicador do tamanho celular, foram obtidas em 7 animais de cada grupo.

3.10 - Determinação dos níveis do ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) das proteínas reguladoras do trânsito de Ca²⁺ no miocárdio

Os valores da expressão gênica das proteínas canal L, trocador Na⁺/Ca²⁺, receptor rianodina, Serca2a, fosfolambam e calsequestrina foram estimadas em triplicata pelo método semi-quantitativo de transcrição reversa seguido da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). A RT-PCR é uma técnica de biologia molecular utilizada para avaliar de forma semi-quantitativa a expressão de genes por meio dos níveis dos RNAm específicos.⁽⁵⁹⁾

3.10.1 - Extração do ácido ribonucléico (RNA)

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em Freezer a - 80 °C. A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax[®] T25 Basic, Wilmington, NC, USA) após adição de 1 ml de TRIzol[®] (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tecido. O TRIzol[®], solução

monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, tem como finalidade manter a integridade do RNA durante a lise celular que ocorre no processo de homogeneização.⁽⁶⁰⁾

A amostra homogeneizada foi transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada à temperatura ambiente durante 5 minutos, para permitir a completa dissociação do complexo núcleo-protéico. Em seguida, adicionou-se clorofórmio (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,2 ml/1ml TRIzol[®]; a amostra foi agitada, manualmente, com vigor por 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany), a 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. Este processo separou a amostra em três fases: a) uma inferior, de fenol-clorofórmio e de coloração rosada, contendo DNA; b) uma interfase branca com proteínas; e c) uma fase superior, aquosa, incolor, contendo RNA.

A porção de RNA foi transferida para um tubo de 1,5 mL; a seguir, adicionou-se álcool isopropílico (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,5 ml/1ml de TRIzol[®]; a amostra foi, então, agitada manualmente 10 vezes por inversão, incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos a 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado de RNA é visualizado como um gel esbranquiçado e semitransparente (*pellet*). Este foi lavado com álcool etílico 75% (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 1mL/1mL de TRIzol[®] e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4 °C. Após o álcool etílico ser descartado, o *pellet* foi seco por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de RNA foi diluído em 30 µL de água ultrapura e incubado por 10 minutos a 60 °C em banho-maria (Fanem mod 100, São Paulo, Brasil); este procedimento tinha como finalidade inativar a possível presença de RNase.

O RNA foi analisado com auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant[™] RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) pela sua absorvância em 260 nm. A pureza do RNA foi constatada pela razão das absorvâncias em 260/280 nm. As

amostras cujas razões foram inferiores a 1,6 foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas. A concentração do RNA foi quantificada de acordo com a relação:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \times 70$$

[RNA] = concentração de RNA ($\mu\text{g/ml}$)

A_{260} = Absorbância em densidade óptica em 260 nm

40 = fator de conversão (1 unidade de densidade óptica \approx 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA)

70 = fator de diluição

3.10.1.1 - Verificação da integridade do RNA por eletroforese

Amostras de 1 μL do RNA total foram diluídas em 8 μL de água ultrapura e 1 μL de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), aplicadas em gel de agarose 1% (0,3 g agarose, 30 mL de TAE Buffer 1x, 3 μL de brometo de etídio) e submetidas a uma voltagem de 60 mV (Power Pac Basic™ Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 20 minutos. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S e 18S, e ausência de rastros do RNA no gel. As amostras que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para a transcrição reversa.

3.10.2 - Transcrição reversa do RNA (RT)

Transcrição reversa é um processo que converte as moléculas do RNA em ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA). As amostras do RNA do músculo cardíaco foram submetidas à transcrição reversa pela ação da enzima *transcriptase reversa*, utilizando-se o kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR*® (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amostras utilizadas no experimento foram incubadas em um termociclador (Mastercycler® Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany). Inicialmente, uma mistura contendo 1000 ng/ μL de RNA total, 1 μL de *dNTP mix* 10 mM, 1 μL de random hexamers (50 ng/ μL) e 8 μL de

H₂O DEPC (dietil pirocarbonato) foi incubada durante 5 minutos a 65 °C. A seguir, após adição de 9 µL de uma solução contendo, 2 µL de tampão RT 10x, 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0,1 M e 1 µL de inibidor de RNase, *RNaseOUT*[®], a mistura foi incubada por 2 minutos a 25°C. Após o acréscimo de 1 µL da enzima *SuperScript II*[®], procedeu-se a nova incubação por 10, 50 e 15 minutos a 25 °C, 42 °C e 70 °C, respectivamente. Após adição 1 µL de RNase H a solução foi incubada por 20 minutos a 37 °C.

Para checar a qualidade da transcrição reversa, foram empregados dois métodos:

1) controle positivo: o kit utilizado contém um RNA transcrito a partir do gene da cloranfenicol acetiltransferase e *primers* controles A e B. Esses primers, na reação em cadeia da polimerase geram um produto de 500 pares de base (pb);

2) controle negativo: para comprovar a ausência de DNA genômico residual, uma amostra de RNA foi submetida à reação de RT, porém, a enzima *SuperScript II*[®] foi substituída por 1 µL de H₂O DEPC. Esse produto foi utilizado nas reações de PCR e a ausência de DNA genômico residual foi confirmada pela ausência de produtos de amplificação.

3.10.3 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR é uma técnica utilizada para se obter grandes quantidades de uma determinada seqüência-alvo do DNA. A seqüência-alvo a ser amplificada é identificada por *primers* que reconhecem parte desta seqüência no cDNA por complementaridade de bases. O DNA é formado por duas cadeias complementares associadas, formando uma dupla fita; portanto, são necessários 2 *primers*, *sense* e *antisense*, com capacidade de reconhecer a seqüência-alvo em cada uma das fitas. As hibridizações dos *primers* na seqüência-alvo marcam o local do início da síntese: o *sense* demarca a síntese no sentido 3'- 5' da cadeia de cDNA e o *antisense* no

sentido inverso. Na reação de PCR, a seqüência-alvo é amplificada em cópias pela ação da enzima *Taq DNA Polymerase*[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

Para a realização da reação de PCR, alíquotas de 1,5 µL de cDNA foram adicionadas a 23,5 µL de uma mistura contendo: 17,3 µL de água ultrapura, 2,5 µL de PCR *buffer* 10X, 1 µL de MgCl₂ 50 mM, 0,5 µL de dNTP mix 10 mM, 0,5 µL de *primer sense* 10 µM do gene alvo, 0,5 µL de *primer antisense* 10 µM do gene alvo, 0,5µL de *primer sense* 10 µM do gene constitutivo, 0,5µL de *primer antisense* 10 µM do gene constitutivo e 0,2 µL de *Taq-Polymerase*[®], sintetizados pela empresa de biotecnologia, Invitrogen, São Paulo, Brasil. A mistura foi incubada em um termociclador (Mastercycler[®] Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany) que de acordo com a variação das temperaturas de maneira pré-programada, realiza o seguinte ciclo:

1- Desnaturação: ocorre a aproximadamente (≈) 94 °C e visa romper as pontes de hidrogênio que conectam as duas fitas de cDNA;

2- Anelamento: nesta etapa os *primers* se anelam na seqüência-alvo do cDNA. A temperatura do anelamento foi ajustada para cada *primer* utilizado.

3- Extensão: a ≈ 72 °C, a enzima *Taq-Polymerase* se posiciona junto aos *primers* anelados e inicia duplicação da fitas de DNA, adicionando os nucleotídeos complementares às fitas-molde.

O processo foi repetido, de acordo com a padronização de cada gene, o suficiente para que se atingisse a fase exponencial da curva. A Figura 2 representa a curva de amplificação do gene alvo, canal L.

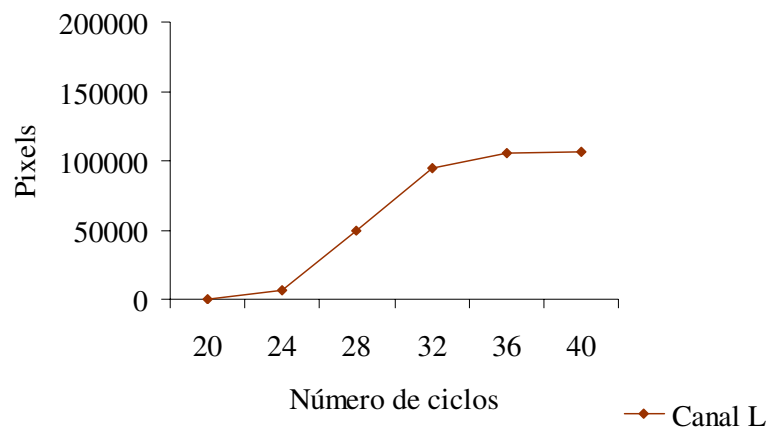


Figura 2- Representação das fases da curva de amplificação do Canal L, com os respectivos números de ciclos.

3.10.3.1 - Primers

Primers, oligonucleotídeos sintéticos, fornecidos sob a forma liofilizada, foram diluídos em água ultrapura para obtenção de uma solução estoque. No momento de sua utilização, os *primers* foram utilizados na concentração de 10 μM .

Tabela 1- Primers

Gene	Código ^a <i>GenBank</i>	Primers ^b	Referências
Serca 2a ^c	NM_017290	S 5' ATGAGATCACAGCTATGACTGGTG 3' AS 5' GCATTGCACATCTCTATGGTGACTAG 3'	Mirit <i>et al.</i> ⁽⁶¹⁾
PLB ^d	NM_023129	S 5' TACCTTACTCGCTCGGCTATC 3' AS 5' CAGAAGCATCACAATGATGCAG 3'	Mirit <i>et al.</i> ⁽⁶¹⁾
RyR 2 ^e	NM_023868	S 5' GAATCAGTGAGTTACTGGGCATGG 3' AS 5' CTGGTCTCTGAGTCTCCAAAAGC 3'	Coussin <i>et al.</i> ⁽⁶²⁾
CSQ ^f	NM_017131	S 5' GGCTTTGTGATGGTGGATTG 3' AS 5' TGCTCAAGTCAGGGTTGTCA 3'	#
NCX ^g	NM_019268	S 5' GGCAGAAACAGGAGGAAATG 3' AS 5' AGCGGACACAACACAGATGG 3'	#
Canac1c ^h	NM_012517	S 5' TCTGCTCTGCCTGACTCTGA 3' AS 5' GAGATACTCCACCCGTTCCA 3'	#
Ciclofilina ⁱ	NM_017101	S 5' ACGCCGCTGTCTCTTTTC 3' AS 5' TGCCTTCTTACCTTCC 3'	Alway <i>et al.</i> ⁽⁶³⁾

a) Código *GenBank*: número de acesso no banco de genes
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide> ;

b) *Primers*: seqüência de *primers* sintetizados;

c) Serca 2a: ATPase de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático;

d) PLB: fosfolambam;

e) RyR: receptor rianodina;

f) CSQ: calsequestrina;

g) NCX: trocador Na⁺/Ca²⁺;

h) Canac1c: canal lento de Ca²⁺;

i) Ciclofilina: gene constitutivo

#) *Primers* desenhados de acordo com banco de genes
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>

3.10.4 -Quantificação da PCR

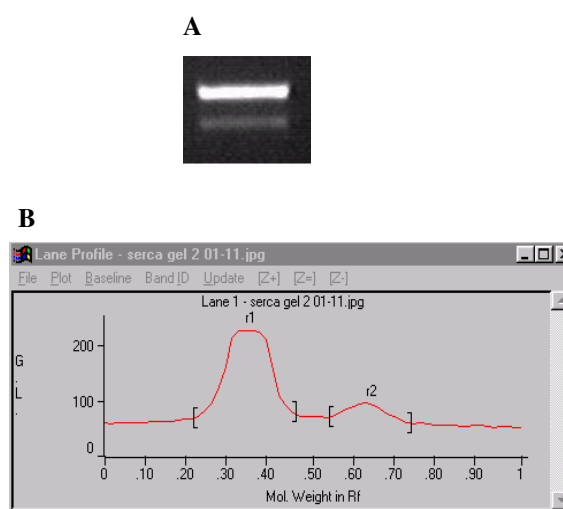
O produto da PCR foi quantificado utilizando-se a técnica de eletroforese. O material amplificado é aplicado em um gel de agarose 1% (0,3 g de agarose, 30 mL de TAE Buffer 1x e 3 µL de brometo de etídio). No primeiro poço aplicamos uma escala padrão de peso molecular, *Ladder 100 bp* (Invitrogen, São Paulo, Brasil), que é utilizado para identificação do tamanho das bandas de nossas amostras. Todas as amostras aplicadas no gel, inclusive o

Ladder foram misturadas a uma solução corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA) para visualização das bandas. Durante a eletroforese, o gel permaneceu imerso em tampão TAE 1x (Life Technologies Gibco URL, New York, USA) durante 25 minutos sob uma voltagem de 80 mV em cuba para eletroforese (Horizon[®] 58 Life Technologies Gibco URL, New York, USA).

A imagem do gel foi capturada com o auxílio do sistema Image Acquisition Analysis Software (Ultra-Violet Products Ltd, Upland, CA, USA). Este sistema consiste em um transiluminador de luz ultravioleta (Ultra-Violet Products Ltd, Upland, CA, USA), uma câmara escura acoplada a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a um computador dotado de programa de análise de imagens LabWorks[™] (Ultra-Violet Products Ltd, Upland, CA, USA). O transiluminador emite radiação UV sobre o gel, permitindo a visualização das bandas coradas com brometo de etídio (Invitrogen, São Paulo, Brasil). A imagem era armazenada no microcomputador para posterior quantificação. A quantificação foi feita por meio do programa LabWorks[™] (Ultra-Violet Products Ltd, Upland, CA, USA) onde a área das bandas era selecionada e a leitura feita pelo número de pixels.

Figura 3: Quantificação das bandas:

- A) Foto do corte de gel com bandas eletroforéticas do grupo controle: superior Serca 2a e inferior Ciclofilina
B) Plot de leitura das áreas das bandas, esquerda Serca 2a e direita Ciclofilina.



3.10.5 – Padronização dos primers utilizados na RT-PCR

Amostras do RNA total provenientes de ratos *Wistar* com a mesma idade dos usados no experimento foram utilizadas com a finalidade de padronizar a técnica RT-PCR.

Etapas da validação:

I. Determinação da temperatura ideal de anelamento para cada par de oligonucleotídeos iniciadores, *primers*, genes-específicos;

II. Determinação das fases da curva de amplificação dos genes alvo e constitutivo, testando vários números de ciclos na PCR;

III. Padronização da PCR duplex, ou seja, amplificação simultânea dos genes alvo e constitutivo, *housekeeper*. A ciclofilina foi o gene constitutivo utilizado como referência para a quantificação do gene alvo;

IV. Para evitar que a comparação entre os grupos experimentais seja influenciada, amostras dos grupos controle e obeso foram submetidas à corrida eletroforética no mesmo gel.

As figuras 4, 5 e 6 representam a padronização da temperatura de anelamento, do número de ciclos e da amplificação simultânea dos genes alvo e constitutivo, respectivamente.

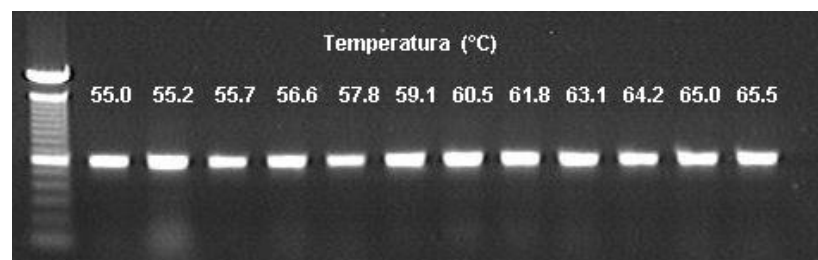


Figura 4: Gel em agarose (1%), determinação da temperatura ideal de anelamento do gene alvo, canal L.

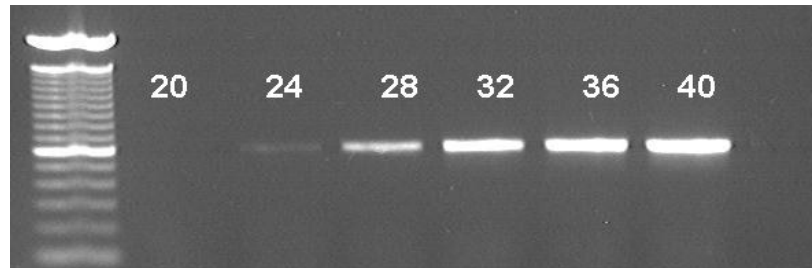


Figura 5: Gel em agarose (1%), determinação das fases de amplificação do gene alvo, canal L, teste do número de ciclos na PCR.

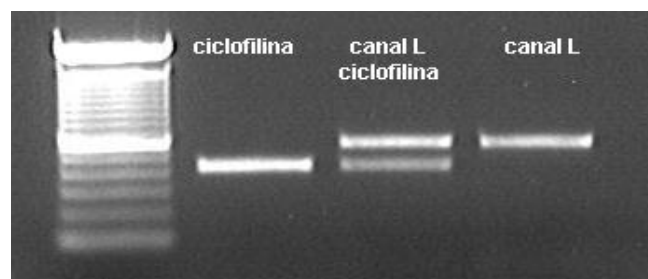


Figura 6: Gel em agarose (1%), amplificação simultânea dos genes alvo, canal L e constitutivo, ciclofilina.

Tabela 2- Padronização dos *primers*

Gene	TA ^a	Ciclos ^b	Produto ^c
Serca 2a ^d	57,5 °C	28	653 bp
PLB ^e	60 °C	35	140 bp
RyR 2 ^f	57,5 °C	28	635 bp
CSQ ^g	59,1 °C	24	640 bp
NCX ^h	55 °C	28	634 bp
Canal L ⁱ	57,8 °C	28	604 bp

a) TA: temperatura de anelamento dos *primers* com a seqüência-alvo;

b) Ciclos: número de ciclos realizados na amplificação;

c) Produto: tamanho da seqüência do cDNA amplificado, expresso em número de pares de bases (*bp*).

d) Serca 2a: ATPase de Ca²⁺ do retículo sarcoplasmático;

e) PLB: fosfolambam;

f) RyR: receptor rianodina;

g) CSQ: calsequestrina;

h) NCX: trocador Na⁺/Ca²⁺;

i) Canal L: canal lento de Ca²⁺.

3.11 - Análise estatística

As características gerais, nutricionais, hormonais, cardíacas e a expressão do RNAm foram apresentados em média \pm desvio padrão e submetidos ao teste “t” de Student para amostras independentes.⁽⁶⁴⁾ 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.⁽⁶⁵⁾ O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.⁽⁶⁴⁾

4.1- Composição dos grupos

A partir dos critérios de exclusão permaneceram no estudo dezesseis animais do grupo controle (C; n=16) e treze animais do grupo obeso (Ob; n=13). Em virtude do equipamento utilizado para a técnica de eletroforese possuir espaço apenas para 13 amostras, foram excluídos, por sorteio, três animais do grupo controle. Assim, foram utilizados no experimento treze animais do grupo controle (C; n=13) e treze animais do grupo obeso (Ob; n=13).

4.2- Características gerais e nutricionais

A Tabela 3 mostra as características gerais e nutricionais animais utilizados no experimento. O peso corporal inicial, a pressão arterial sistólica final e o consumo de água foi similar nos dois grupos. O peso corporal final dos animais obesos foi maior do que no grupo controle. Durante todo o período experimental, os animais obesos ingeriram menor quantidade de ração que o grupo C; entretanto, a ingestão calórica, a eficiência alimentar e o percentual de gordura da carcaça foram maiores nos animais Ob do que no grupo C.

Tabela 3. Características gerais e nutricionais

Variáveis	Grupos	
	C (n=13)	Ob (n=13)
PCI (g)	106 ± 10	111 ± 10
PCF (g)	439 ± 26	539 ± 52*
PA (mmHg)	107 ± 8	112 ± 10
IA (g/dia)	22,2 ± 1,2	16,4 ± 1,4*
CA (ml/dia)	40,9 ± 4,7	41,8 ± 3,7
IC (g x kcal/dia)	73,2 ± 3,8	85,2 ± 6,7*
EA (g/kcal)	0,043 ± 0,002	0,048 ± 0,003*
Gordura (%)	9 ± 1	17 ± 7*

Dados expressos em média ± desvio padrão; C: controle; OB: obeso; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; PA: pressão arterial sistólica final; IA: ingestão alimentar; CA: consumo de água; IC: ingestão calórica. EA: eficiência alimentar; Gordura (%): porcentagem de gordura na carcaça. * p<0,001 vs C. Teste “t” de Student para amostras independentes.

A Figura 7 mostra a evolução do peso corporal dos animais durante o experimento. O peso dos animais foi diferente entre os grupos a partir da 2ª semana de tratamento.

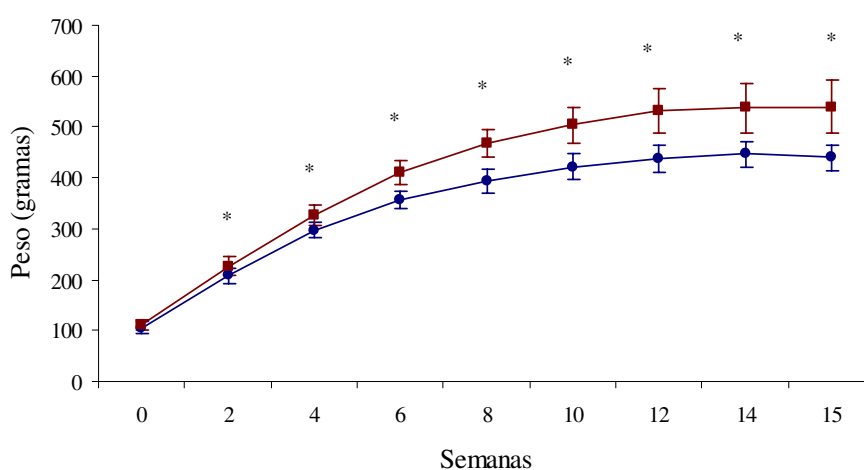


Figura 7- Evolução semanal do peso corporal dos animais controle (—●—C, n= 13) e obeso (—■— Ob, n= 13). Os dados estão expressos em média, limites superior e inferior do intervalo de 95% de confiança. * p<0,05 vs C. Análise de medidas repetidas para dois grupos independentes.

A Figura 8 mostra o teste oral de tolerância à glicose realizado ao final do experimento. O teste foi realizado após os animais permanecerem em jejum por 12 a 15 horas. O valor da glicemia basal foi maior no grupo obeso. Após gavagem com solução aquosa de glicose a 20%, observou-se que o grupo Ob apresentou valores glicêmicos elevados em relação ao grupo C, nos momentos 60, 120 e 180 minutos.

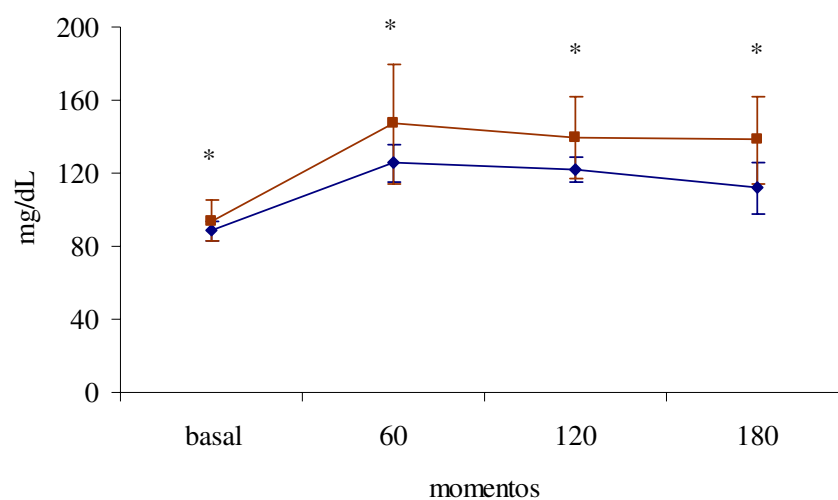


Figura 8- Perfil glicêmico dos animais controle (—●— C; n=13) e obeso (—■— Ob; n=13) submetidos ao teste oral de tolerância a glicose. Os dados estão expressos em média e desvio padrão, * $p < 0,05$ vs C. Análise de medidas repetidas em dois grupos independentes.

A Tabela 4 apresenta os níveis hormonais plasmáticos. Os hormônios leptina e insulina foram maiores nos animais obesos do que no grupo controle.

Tabela 4. Características hormonais

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

Dados expressos em média ± desvio padrão; C: controle; Ob: obeso; * $p < 0,001$ vs C. Teste “t” de Student para amostras independentes.

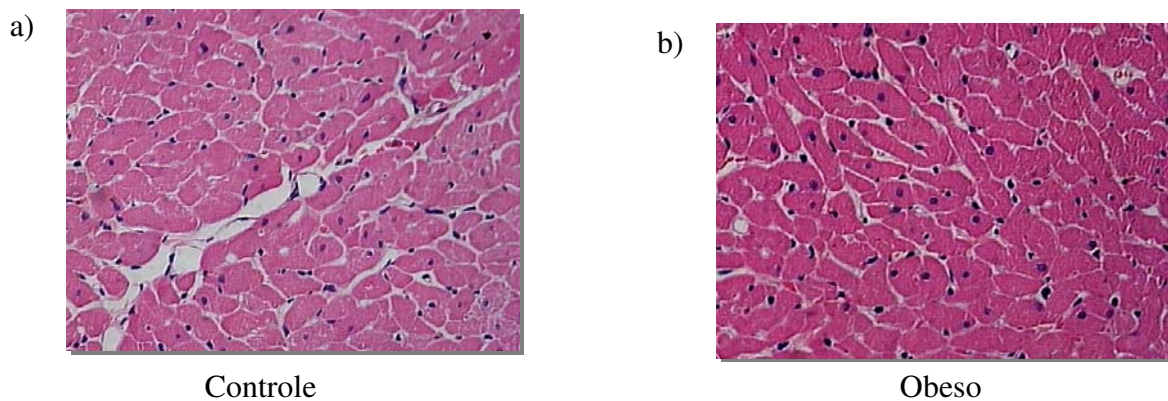
A Tabela 5 mostra as características cardíacas. Os animais do grupo Ob apresentaram pesos do ventrículo esquerdo e direito maiores do que os do grupo C; entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos na área seccional transversa do miócito e nas relações VE/PCF e VD/PCF.

Tabela 5. Características cardíacas

Variáveis	Grupos	
	C (n=13)	Ob (n=13)
VE (g)	0,85 ± 0,09	0,99 ± 0,09*
VD (g)	0,22 ± 0,03	0,28 ± 0,04*
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

Valores expressos em média \pm desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; VE/PCF: relação peso do ventrículo esquerdo e peso corporal final; VD/PCF: relação peso do ventrículo direito e peso corporal final, AST: área seccional transversa do miócito, #: 7 animais por grupo; * $p < 0,05$ vs C. Teste “t” de Student.

As figuras das áreas seccionais transversas dos animais controle e obeso estão representadas nas figuras 9a e 9b.



Figuras 9a e b- Análise histológica das áreas seccionais transversas dos miócitos dos animais controle e obeso. HE 200 X.

4.3 - Níveis de ácido ribonucléico mensageiro das proteínas reguladoras do trânsito de Ca^{2+} do sarcolema e do retículo sarcoplasmático miocárdico

As figuras 10 e 11 mostram os resultados obtidos da expressão gênica das proteínas do sarcolema, Canal L e trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Não houve diferença significativa entre os grupos controle e obeso.

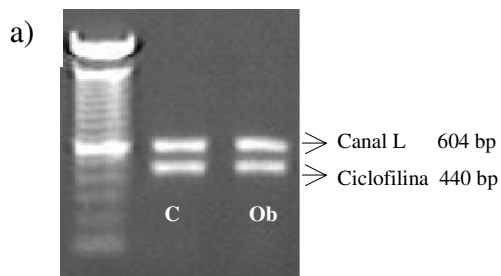


Figura 10a – Gel em agarose (1%), C; controle, Ob; obeso.

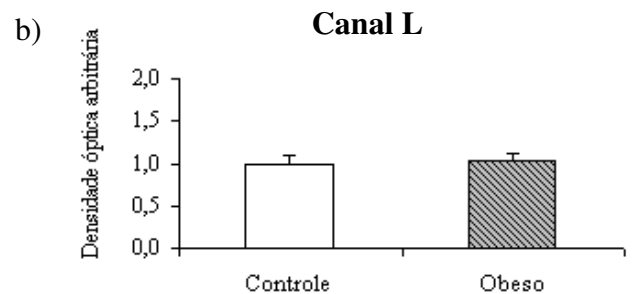


Figura 10b – Níveis de expressão de RNAm para Canal L no miocárdio dos animais controle (C; n=13) e obeso (Ob; n=13). Os dados estão expressos em média e desvio padrão, $p > 0,05$ vs C. Teste “t” de Student.

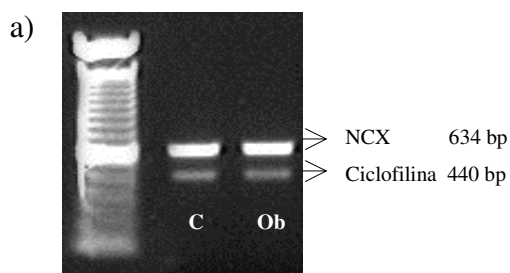


Figura 11a – Gel em agarose (1%), C; controle, Ob; obeso.

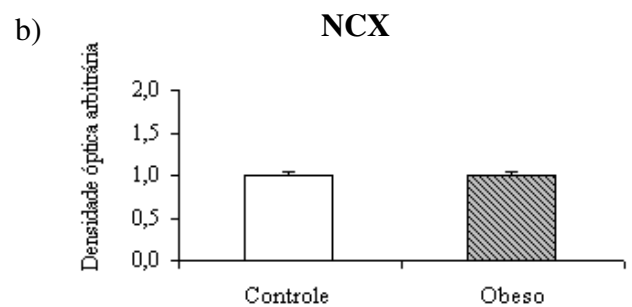


Figura 11b – Níveis de expressão de RNAm para NCX no miocárdio dos animais controle (C; n=13) e obeso (Ob; n=13). Os dados estão expressos em média e desvio padrão, $p > 0,05$ vs C. Teste “t” de Student.

As figuras 12, 13, 14 e 15 mostram os resultados obtidos da expressão gênica das proteínas do retículo sarcoplasmático, ATPase de Ca^{2+} (Serca 2a), receptor rianodina (RyR2),

fosfolambam (PLB) e calsequestrina (CSQ2). Enquanto as três primeiras variáveis, Serca 2a, RyR e PLB, foram significativamente mais elevadas nos animais obesos, o nível de expressão da CSQ2 foi similar nos dois grupos.

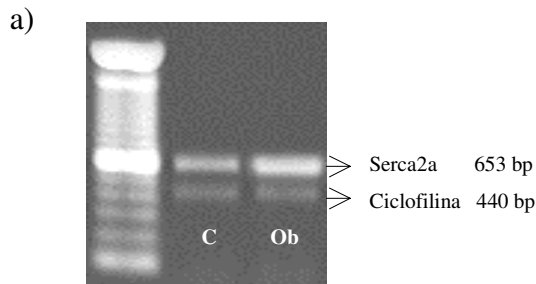


Figura 12a – Gel em agarose (1%), C; controle, Ob; obeso.

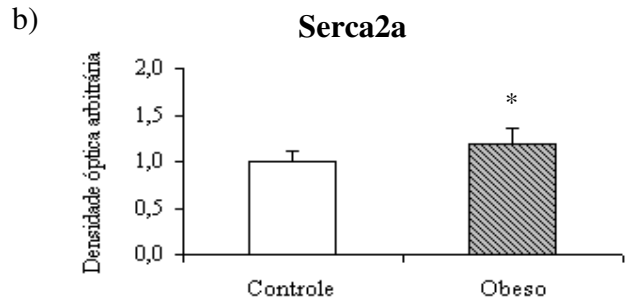


Figura 12b – Níveis de expressão de RNAm para Serca 2a no miocárdio dos animais controle (C; n=13) e obeso (OB; n=13). Os dados estão expressos em média e desvio padrão, * p<0,01 vs C. Teste “t” de Student.

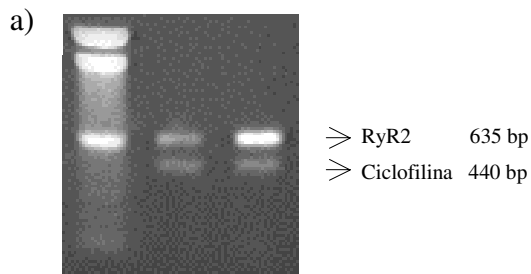


Figura 13a – Gel em agarose (1%), C; controle, Ob; obeso.

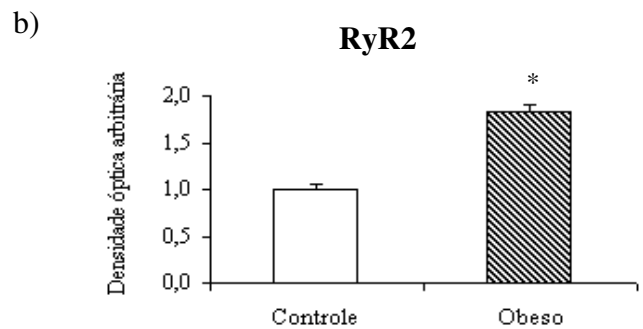


Figura 13b – Níveis de expressão de RNAm para rianodina no miocárdio dos animais controle (C; n=13) e obeso (OB; n=13). Os dados estão expressos em média e desvio padrão, * p<0,0001 vs C. Teste “t” de Student.

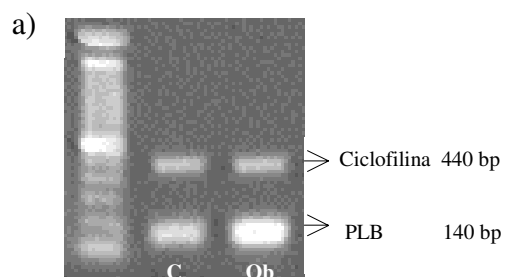


Figura 14a – Gel em agarose (1%), C; controle, Ob; obeso.

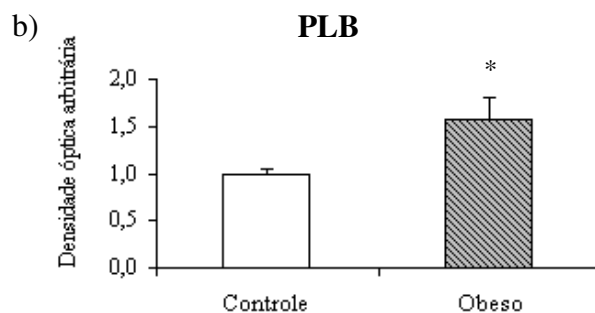


Figura 14b – Níveis de expressão de RNAm para fosfolambam no miocárdio dos animais controle (C; n=13) e obeso (OB; n=13). Os dados estão expressos em média e desvio padrão, * $p < 0,0001$ vs C. Teste “*t*” de Student.

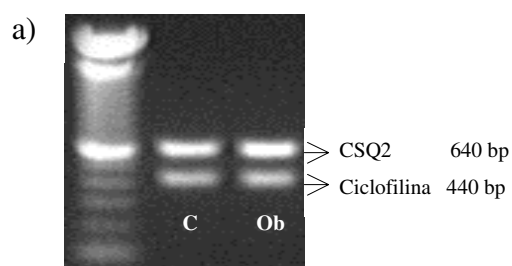


Figura 15a – Gel em agarose (1%), C; controle, Ob; obeso.

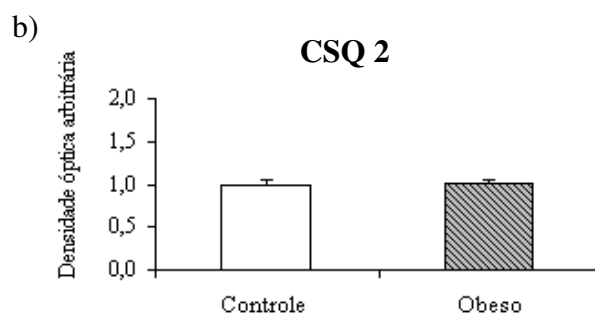


Figura 15b – Níveis de expressão de RNAm para calsequestrina no miocárdio dos animais controle (C; n=13) e obeso (OB; n=13). Os dados estão expressos em média e desvio padrão, $p > 0,05$ vs C. Teste “*t*” de Student.

Atualmente, os hábitos da moderna sociedade industrializada, como a alimentação inadequada e o sedentarismo, atingem também países em desenvolvimento como o Brasil, onde pode se observar transição nos padrões nutricionais, com redução da desnutrição e aumento da obesidade.^(66,67)

Nas últimas décadas, modelos experimentais de obesidade, como modificações genéticas e alterações alimentares, têm sido utilizados para o esclarecimento das complicações associadas à obesidade.⁽⁶⁸⁾ Embora animais geneticamente obesos sejam estudados, apenas 5% da obesidade humana é consequência de alteração genética.⁽⁶⁹⁾ Assim, muitos trabalhos têm sido realizados com modelos não genéticos de obesidade. Modelos experimentais exógenos, como a induzida por dieta hipercalórica, são os que mais se assemelham à obesidade humana e têm sido utilizados para o estudo das alterações moleculares, bioquímicas, morfológicas e funcionais.^(42,55,68)

A dieta hipercalórica oferece ao animal um maior aporte calórico, por meio de sobrecarga de carboidratos^(70,71) ou de gordura.^(55,57,68,71) O aumento na ingestão de gorduras induz o balanço lipídico positivo e, conseqüentemente, leva ao acúmulo de massa adiposa corporal.^(72,73) Assim, dentre os macronutrientes, os lipídios são os que apresentam maior densidade energética e maior capacidade de estoque no organismo.⁽⁶⁷⁾ O modelo experimental de obesidade proposto neste trabalho foi realizado por meio de ciclos de cinco dietas hipercalóricas oferecidas de forma rotativa, com a finalidade de aumentar a ingestão alimentar e, conseqüentemente, o ganho de peso corporal. As dietas foram oferecidas aos animais na forma de *pellets*, o que possibilitou aferir precisamente o consumo alimentar e manter a integridade dos nutrientes. As dietas eram isocalóricas, contendo em média 4,5 kcal/g, enquanto que a dieta padrão apresentava 3,3 kcal/g. O aumento de 35% no conteúdo energético foi proveniente da elevação da taxa de gordura. Este ciclo de dietas hipercalóricas,

segundo especificações do guia “Nutrient requirements of the laboratory rat”,⁽⁵⁰⁾ manteve a quantidade de proteína necessária, evitando assim, o prejuízo no crescimento e no desenvolvimento dos animais estudados.

Os resultados do experimento mostram que a dieta hipercalórica acarretou aumento no peso corporal final de 22,8% no animais obesos em relação ao grupo controle, sendo que a diferenciação do peso corporal entre os grupos foi observada a partir da segunda semana de indução da obesidade (Figura 7). Estes dados estão de acordo com pesquisas que verificaram que o período de 8 a 12 semanas de dieta hipercalórica promoveu maior peso corporal nos animais obesos.^(36,42,43,55,74) Alguns autores relatam que o peso corporal pode não ser um bom indicativo da quantidade de gordura e, portanto, analisam a quantidade da gordura na carcaça.⁽⁵⁷⁾ A análise da porcentagem de gordura corporal nos ratos deste experimento mostrou que os animais obesos tiveram um aumento de 89% em relação ao grupo controle. O resultado está em concordância com trabalhos que verificaram que a dieta hipercalórica aumenta o peso corporal às custas da elevação da gordura.^(56,61)

Embora as variáveis nutricionais deste estudo apontem que os animais obesos apresentaram menor ingestão alimentar, o maior ganho de peso nestes animais foi devido ao aumento do consumo de calorias. Alguns pesquisadores demonstraram que o desenvolvimento da obesidade é possível mesmo sem o aumento da quantidade de alimento ingerido, pois mudanças na composição da dieta como a elevação na quantidade de gordura, podem alterar a eficiência alimentar e, conseqüentemente, levar à obesidade.⁽⁴²⁾ Esta tem sido freqüentemente associada à hiperleptinemia.^(42,56,57) A leptina é uma proteína produzida pelo tecido adiposo e age no sistema nervoso aumentando a saciedade.^(6,75) A maioria das pessoas obesas tem níveis séricos proporcionais à sua massa adiposa^(76,77), sugerindo que nesses pacientes ocorre resistência à ação da leptina, conseqüente a “*down-regulation*” dos receptores nervosos centrais⁽⁷⁶⁾. Os animais obesos do presente estudo apresentaram valores

elevados de leptina em relação ao grupo controle. Estes dados estão de acordo com Relling et al 2006⁽⁴²⁾ que, estudando ratos obesos por 12 semanas de dieta hipercalórica, observaram aumento da leptina plasmática.

Os animais obesos deste experimento mostraram alterações metabólicas comumente observadas em indivíduos obesos, como resistência à insulina e hiperinsulinemia. A análise da taxa glicêmica, realizada pelo teste oral de tolerância à glicose, mostrou-se elevada no grupo obeso em relação aos animais controle. A maior glicemia de jejum e os elevados níveis glicêmicos após administração de glicose nos ratos obesos mostram que os animais apresentam menor captação de glicose pelas células devido à resistência à insulina.⁽⁷⁸⁾ Em resposta a esse fenômeno, há uma maior produção de insulina pelo pâncreas, e conseqüente hiperinsulinemia.⁽⁷⁸⁾

O presente estudo mostra que a obesidade não acarretou hipertrofia cardíaca e aumento na pressão arterial sistólica nos animais obesos. Os animais obesos apresentaram pesos do ventrículo esquerdo e direito maiores do que o grupo controle; entretanto, quando normalizados pelo peso corporal, os resultados foram similares entre os grupos. Este resultado foi confirmado pela análise morfométrica do miocárdio, que mostrou que a área seccional dos miócitos foi semelhante nos dois grupos. Estes dados estão de acordo com Carroll et al 2006⁽³⁷⁾ que, estudando ratos alimentados com dieta hipercalórica por 12 semanas, não encontraram hipertrofia cardíaca. A pressão arterial sistólica não aumentou nos ratos obesos. Este resultado, embora em concordância com Relling et al 2006,⁽⁴²⁾ divergem da maioria dos trabalhos que encontraram elevação da pressão arterial em animais obesos por dieta hipercalórica.^(36,74,79,80,81)

O estudo da expressão gênica das proteínas reguladoras do trânsito de Ca^{2+} do sarcolema e do retículo sarcoplasmático miocárdico, analisadas por RT-PCR, mostrou que o RNAm da ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático (Serca 2a), receptor rianodina (RyR)

e fosfolambam (PLB) aumentaram nos animais obesos em relação ao grupo controle. Entretanto, a obesidade não promoveu alteração nos níveis de RNAm do canal L, do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e da calsequestrina. Os raros estudos encontrados na literatura que relacionaram obesidade e expressão gênica das proteínas reguladoras do cálcio intracelular miocárdico, mostram resultados divergentes. Assim, enquanto pesquisa com ratos *Zucker* geneticamente obesos, verificou que a obesidade genética não acarreta alterações nos níveis de RNAm da Serca 2a,⁽³¹⁾ o estudo com cães obesos, por dieta hipercalórica, mostra diminuição da expressão gênica da Serca2a e do PLB.⁽⁴⁸⁾ Relling et al 2006,⁽⁴²⁾ avaliando a expressão das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio na obesidade dietética, por 12 semanas, observou aumento da expressão protéica da Serca 2a e do PLB.

Os mecanismos responsáveis pela alteração da expressão do RNAm da Serca2, PLB e RYR, induzida pela obesidade neste trabalho, não estão estabelecidos. Como a maioria dos trabalhos com obesidade relatam aumento nos níveis de triiodotironina (T3),⁽⁸²⁾ e este hormônio está relacionado com a expressão da Serca2,^(83,84) é provável que a elevação de T3 seja responsável pelo aumento do RNAm da Serca2. Desde que não há relação entre expressão gênica do PLB e da RYR e os hormônios tireoidianos,⁽⁸⁵⁾ a elevação dos níveis de RNAm destas proteínas é devida a outros fatores, não identificados na literatura. Como a obesidade está associada ao aumento de insulina, leptina, citocinas, e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona e sistema nervoso simpático,^(6,12-14) e estes atuam em diferentes fatores transcricionais,⁽⁴⁷⁾ é provável que um ou mais destes fatores possam estar envolvidos na elevação da expressão gênica da RYR e do PLB.

Uma limitação deste estudo é que foi avaliado os níveis de RNAm e não das proteínas envolvidas no transporte de Ca^{2+} miocárdico. Proteínas são sintetizadas nos ribossomas a partir de sinalização molecular específica, o RNAm, transcrito diretamente da cadeia de ácido desoxirribonucléico (DNA).⁽⁸⁶⁾ Sequências de RNAm, que coordenam a síntese das proteínas,

podem ser a primeira alteração detectável no caso de modificação da expressão de proteínas. O aumento dos níveis de um determinado RNAm não implica, necessariamente, na elevação da taxa protéica.⁽⁸⁶⁾ Estudos posteriores serão necessários para quantificar as proteínas reguladoras do trânsito de cálcio no miocárdio de ratos obesos.

6- CONCLUSÃO

Em conclusão, a obesidade acarreta aumento da expressão gênica das proteínas do retículo sarcoplasmático, Serca 2a, RyR e PLB, e não altera os níveis de RNAm da CSQ2, do NCX e do canal L, envolvidas na homeostase do cálcio intracelular miocárdico.

7- 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-8.
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. 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.
7. Raman RP. Obesity and health risks. *J Am Coll Nutr* 2002; 21:134S-9S.
8. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2522-5.
9. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *Q J Med* 2006; 99:565-79.
10. 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.
11. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Alisson DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA* 2003; 289: 187-93.
12. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine* 2006; 29:81-90.
13. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89:2548-56.
14. 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.

* 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

15. Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of clinical syndrome. *Am J Med Sci* 2001; 321:225-36.
16. 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.
17. de Divitiis O, Fazio S, Petitto M, Maddalena G, Contaldo F, Mancini M. Obesity and cardiac function. *Circulation* 1981; 64:477-81.
18. 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.
19. 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.
20. Schmieder RE, Messerli FH. Obesity hypertension. *Med Clin of North Am* 1987; 71:991-1001.
21. 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.
22. 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.
23. Messerli FH. Cardiovascular effects of obesity and hypertension. *Lancet* 1982; 1:1165-8.
24. Berkalp B, Cesur V, Corapcioglu D, Erol C, Baskal N. Obesity and left ventricular diastolic dysfunction. *Int J Cardiol* 1995; 52:23-6.
25. 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.
26. Iacobellis G, Ribaldo 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.
27. Iacobellis G, Ribaldo MC, Leto G, Zappaterreno A, Vecci E, Di Mario U, et al. Influence of excess fat on cardiac morphology and function: Study in uncomplicated obesity. *Obes Res* 2002; 10:767-73.
28. 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.
29. 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.

30. 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.
31. 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.
32. Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Uj 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.
33. 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.
34. 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.
35. Li S-Y, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in *Lep/Lep* obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia* 2006; 49:1434-46.
36. 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.
37. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 2006; 48:65-72.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.

43. 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.
44. Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbits. *Am J Hypertens* 2005; 18:692-8.
45. 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.
46. 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.
47. 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.
48. Philip-Couderc P, Smih F, Hall JE, Pathak A, Roncalli J, Harmanecy R, et al. Kinetics analysis of cardiac transcriptome regulation during chronic high-fat diet in dogs. *Physiol Genomics* 2004; 19:32-40.
49. 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.
50. The National Academy of Sciences. *Nutrient requirements of the laboratory rat*. 4th ed. Washington; 1995.
51. Silva DJ, Queiroz AC. *Análise dos alimentos: métodos químicos e biológicos*. 2nd ed. Viçosa: UFV; 1990.
52. 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.
53. Borst SE, Conover CF. High-fat induces increased tissue expression of TNF- α . *Life Sci* 2005; 77:2156-65.
54. 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.
55. 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.
56. Dourmashkin JT, Chang G-Q, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes* 2005; 29:1368-78.
57. 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.

58. 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.
59. Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G. Semi-quantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proc Online* 2001; 3:19-25.
60. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.
61. Mirit E, Palmon A, Hasin Y, Horowitz M. Heat acclimation induces changes in cardiac mechanical performance: the role of thyroid hormone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1999; 276:R550-8.
62. Coussin F, Macrez N, Morel J, Mironneau J. Requirement of Ryanodine receptor subtypes 1 and 2 for Ca²⁺ release in vascular myocytes. *J Biol Chem* 2000; 275:9596-603.
63. Alway SE, Degens H, Lowe DA, Krishnamurthy G. Increased myogenic repressor Id mRNA and protein levels in hindlimb muscle of aged rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 282:R411-22.
64. Norman GR, Streiner DI. *Biostatistics: the bare essentials*. St. Louis: Mosby; 1994.
65. Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc* 1977; 72:469-78.
66. Monteiro CA, Mondini L, Souza ALM, Popkin BM. *The nutrition transition in Brazil*. Basingstoke 1995; 49:105-13.
67. World Health Organization. *Obesity-preventing and managing the global epidemic*. Geneva: WHO;1998. Report of WHO Consultation on Obesity.
68. Sclafani A, Springer D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiol Behav* 1976; 17:461-71.
69. Halpern A. *Obesidade*. São Paulo: Contexto; 1998.
70. Kanarek RB, Marks-Kayfman R. Developmental aspects of sucrose-induced obesity in rats. *Physiol Behav* 1979; 23:881-5.
71. Ramirez R, Lopez JM, Bedoya FJ, Goberna R. Effects of high-carbohydrate or high-fat diet on carbohydrate metabolism and insulin secretion in the normal rats. *Diabetes Res* 1990; 15:179-83.
72. Flatt JP. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. *Am J Clin Nutr* 1987; 45:296-306.
73. Flatt JP. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:952S-9S.
74. Carroll JF, Dwyer TM, Grady AW, Reinhart GA, Montani J-P, Cockrell K, et al. Hypertension, cardiac hypertrophy, and neurohumoral activity in a new animal model of obesity. *Am J Physiol* 1996; 271:H373-8.
75. Das M, Gabriely I, Barzilai N. Caloric restriction, body fat and ageing in experimental models. *Obesity Rev* 2004; 5:13-9.

76. Naggert J, Harris T, North M. The genetics of obesity. *Curr Opin Gen Dev* 1997; 7:398-404.
77. Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996; 334:292-5.
78. Cesaretti MLR, Kohlmann OJ. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2006; 50:190-7.
79. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol* 2004; 287:R943-9.
80. Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2001; 281:R547-52.
81. Barnes MJ, Lapanowski K, Conley A, Rafols JA, Catherine-Jen KL, Dunbar JC. High fat feeding is associated with increased blood pressure, sympathetic nerve activity and hypothalamic mu opioid receptors. *Brain Res Bull* 2003; 61:511-9.
82. Roti E, Minelli R, Salvi M. Thyroid hormone metabolism in obesity. *Int J Obes Relat Metab Dis* 2000; 24:S113-5.
83. Rohrer D, Dillmann WH. Thyroid hormone markedly increases the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase in the rat heart. *J Biol Chem* 1987; 263:6941-4.
84. Baker DL, Hashimoto K, Grupp IL, Reed T, Loukianov E, Grupp G, et al. Targeted overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase increases cardiac contractility in transgenic mouse hearts. *Circ Res* 1998; 83:1205-14.
85. Nagai R, Zarain-Herzeberg A, Brandl CJ, Fujii J, Tada M, MacLennan DH, et al. Regulation of myocardial Ca^{2+} ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:2966-70.
86. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. How cells read the genome: from DNA to protein. In: *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland; 2002. p. 299-374.