



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

Carol Cristina Vagula de Almeida Silva

**Papel da suplementação com licopeno sobre o
remodelamento cardíaco induzido por dieta: modelo
experimental de obesidade em ratos**

Dissertação apresentada
à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual
Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Câmpus
de Botucatu, como pré-
requisito para obtenção
do título de Mestre em
Fisiopatologia em Clínica
Médica

Orientadora: Profa. Adjunta Ana Lúcia dos Anjos Ferreira
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Moreto

**Botucatu
2019**

Carol Cristina Vagula de Almeida Silva

Papel da suplementação com licopeno sobre o
remodelamento cardíaco induzido por dieta: modelo
experimental de obesidade em ratos

Dissertação apresentada
à Faculdade de
Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu,
como pré-requisito para
obtenção do título de
Mestre em Fisiopatologia
em Clínica Médica

Orientadora: Profa. Adjunta Ana Lucia dos Anjos Ferreira
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Moreto

Botucatu
2019

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

Silva, Carol Cristina Vagula de Almeida.

Papel da suplementação com licopeno sobre o remodelamento cardíaco induzido por dieta : modelo experimental de obesidade em ratos / Carol Cristina Vagula de Almeida Silva. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Ana Lúcia dos Anjos Ferreira

Coorientador: Fernando Moreto

Capes: 40101100

1. Obesidade. 2. Licopeno. 3. Remodelação ventricular. 4. Inflamação. 5. Metaloproteinase 2 da matriz.

Palavras-chave: Inflamação; Licopeno; Metaloproteinase 2; Obesidade; Remodelamento cardíaco.

Dedicatória

Aos meus pais

Que se sacrificam e abdicam de tantas coisas pelo meu futuro e de meus irmãos, que tanto fizeram, e ainda fazem, por mim e pela realização dos meus sonhos. Amo vocês infinitamente!

Aos meus irmãos

Os melhores presentes que nossos pais poderiam me dar, amo vocês, e não há distância que mude isso.

À minha avó Amélia e aos meus tios Caetano, Antônio, Maria Lúcia, Paulo e Ângela

Vocês, juntamente com meus pais, foram essenciais para que eu pudesse estar aqui hoje!

“Até aqui nos sustentou o Senhor!”

1 Samuel 7:12

Agradecimentos especiais

*À minha orientadora, Professora Adjunta **Ana Lucia Anjos Ferreira**, exemplo de profissional e ser humano, pela oportunidade e todos os ensinamentos. Sua fibra e energia me inspiram! Minha eterna gratidão!*

*Ao meu coorientador, Professor Dr **Fernando Moreto**, por todo suporte oferecido, ensinamentos e momentos compartilhados! Muito obrigada!*

*À Professora Dra **Camila Renata Correa**, por todos os ensinamentos, auxílio e momentos compartilhados! Muito obrigada!*

*À professora Dra **Bertha Polegato Furlan**, por ter aberto as portas do laboratório de Nutrição e remodelamento cardíaco para a realização das análises. Obrigada!*

*À professora **Dra Silméia Bazan**, pela disponibilidade, simpatia e paciência na realização do ecocardiograma.*

*À professora Dra **Ana Cláudia Nakamue**, minha orientadora de iniciação científica, por ter me apresentado à professora Ana Lúcia, e o maravilhoso e apaixonante universo dos antioxidantes e estresse oxidativo.*

Agradecimientos

Esta pesquisa é resultado do trabalho em conjunto, cooperação e amizade de muitas pessoas.

*Ao melhor casal, Fabi e Artur, não sei o que seria de mim sem vocês!
Um presente da pós-graduação que quero levar para a vida toda! Obrigada pela amizade, ensinamentos, apoio, risada, caronas e por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório! Gratidão eterna!*

*Artur, você é um irmão que a pós-graduação me deu!
Obrigada pela paciência em explicar a mesma coisa um milhão de vezes de formas diferentes, por todas as reuniões de cardio, pelos esporros e pelas águas em mim jogadas. Minha dívida com você é impagável!*

À todos os colegas do laboratório redox e inflamação: Mariane, Luciana, Ana Paula, Jéssica, Heloysa, Juliana, Janaína, Fabiana e Pedro.

À Dani Dantas, do laboratório de Remodelação cardíaca e Nutrição, que de uma parceria para realização de análises nasceu uma bonita amizade!

Aos funcionários da UNIPLEX.

À toda minha família, em especial meus pais, irmãos e minha avó, pelas inúmeras e constantes palavras de apoio e incentivo, por terem sido fundamentais na formação do meu caráter e integridade, pelos ensinamentos de vida, por acreditarem em mim e compreenderem os momentos em que estive ausente. Não há palavras para expressar tamanha gratidão!

Ao meu namorado, Alexandre (Dino), por todo carinho, apoio, compreensão, palavras de incentivo, otimismo, ajudas com inglês, aulas de estatística madrugada a dentro, todas as longas conversas sobre ciência (seja sobre bioquímica e cardiologia ou ecologia e carcinologia) e pelos momentos de esperança que pensa, junto comigo, no nosso futuro. Te amo!

A todos meus amigos de longe, porém nunca distantes, que sempre estiveram na torcida, e aos amigos que fiz em Botucatu, obrigada por compreenderem esta fase da minha vida. Muitas vezes fui ausente, mas sempre com vocês em meu coração.

A Deus, por ser meu sustento, por todo carinho, amor e cuidado, e sempre me mostrar que Seus planos são maiores e melhores que os meus!

Ao CNPq pelo financiamento.

Lista de tabelas

Tabela 1. Composição das dietas padrão (Controle) e dieta com alto teor de carboidrato simples e gordura (CHO).....	33
Tabela 2. Avaliação do efeito da dieta no perfil nutricional em 20 semanas.....	41
Tabela 3. Avaliação do efeito da dieta rica em carboidrato no perfil glicídico em 20 semanas.....	41
Tabela 4. Avaliação morfológica ecocardiográfica na 20ª semana	42
Tabela 5. Avaliação funcional ecocardiográfica em 20 semanas	43
Tabela 6. Efeito da dieta e da suplementação com licopeno no perfil nutricional em 30 semanas	45
Tabela 7. Efeito da dieta e da suplementação com licopeno no perfil glicídico em 30 semanas.....	45
Tabela 8. Avaliação morfológica ecocardiográfica em 30 semanas.....	46
Tabela 9. Avaliação funcional ecocardiográfica em 30 semanas	47
Tabela 10. Biodisponibilidade do all- <i>trans</i> licopeno no plasma e no coração.....	49

Lista de figuras

Figura 1. Citocinas inflamatórias cardíacas.....	48
Figura 2. Citocinas inflamatórias no tecido adiposo..	48
Figura 3. Gel Metaloproteinase-2.....	49
Figura 4. Atividade da Metaloproteinase-2 ..	49

Sumário

Resumo.....	17
Abstract	19
Introdução	21
Hipótese.....	25
Objetivo.....	27
Objetivos específicos	29
Metodologia	31
Resultados 20 semanas.....	40
Resultados 30 semanas.....	44
Discussão.....	50
Conclusão	56
Referências	58
Anexo	65

Resumo

Resumo

Silva, CCVA. Papel da suplementação com licopeno sobre o remodelamento cardíaco induzido por dieta: modelo experimental de obesidade em ratos. 67 fls. Mestrado. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina, Botucatu, SP, Brasil 2019.

Introdução: A obesidade é uma doença metabólico-nutricional comum em países industrializados, com impacto financeiro na saúde pública. A interface entre hiperadiposidade e inflamação é bem conhecida. Evidências mostram que mediadores inflamatórios e metaloproteinase-2 estão relacionados ao remodelamento cardíaco. Várias estratégias terapêuticas têm sido testadas, como o uso de compostos bioativos. Nenhum estudo abordou o efeito do licopeno sobre o remodelamento cardíaco induzido associado a obesidade.

Objetivo: O objetivo geral do presente estudo foi verificar o efeito da suplementação com licopeno sobre o remodelamento cardíaco em ratos com obesidade induzida por dieta hipercalórica com alto teor de carboidrato.

Metodologia: Ratos Wistar machos, 200g (n=40), foram randomizados em dois grupos com diferentes tratamentos dietéticos *ad libitum*: dieta padrão (C, n=20) ou dieta obesogênica (CHO, n=20) por 20 semanas. O grupo C recebeu dieta padrão + água. Com o objetivo de induzir obesidade¹, o grupo CHO recebeu dieta com alto teor de carboidrato simples e gordura + água acrescida de sacarose 25% (total de carboidratos: 78%, total de gordura: 16,54%). Após a 20ª semana, foi iniciada a suplementação com licopeno (10mg/kg de peso/dia) ou veículo (óleo de milho) por 10 semanas via gavagem. Assim, após a 20ª semana, os grupos foram subdivididos da seguinte maneira: grupo Controle (C, n=10); Controle+licopeno (C + Ly, n=10); Carboidrato (CHO, n=10) e Carboidrato+licopeno (CHO + Ly, n=10). Na 20ª e 30ª semana, os animais foram submetidos à aferição da pressão arterial sistólica (PAS) e avaliação ecocardiográfica morfológica e funcional. Ao final do experimento (30ª semana), os animais foram eutanasiados sob profunda anestesia (tiopental 120 mg/kg de m.c. via IP) e decaptados para obtenção de amostras de sangue e de coração. Foram estudados também: índice de adiposidade; ingestão calórica, ingestão total de ração, ingestão de líquidos, ganho de peso, eficiência alimentar, resistência à insulina, marcadores bioquímicos, citocinas inflamatórias no coração e no tecido adiposo, atividade de metaloproteinase-2, biodisponibilidade do licopeno no coração, avaliação ecocardiográfica.

Resultados: Na 20ª semana foram detectadas alterações características de remodelamento cardíaco patológico, resistência à insulina, e hipertensão nos animais do grupo CHO. Na 30ª semana foi detectado aumento do índice de adiposidade e as alterações já detectadas na 20ª (remodelamento cardíaco patológico, a resistência à insulina e hipertensão) nos animais do grupo CHO (vs. C). Além disso foi verificado que o grupo CHO (vs. C) apresentou aumento da inflamação no coração e no tecido adiposo, maior ativação de metaloproteinase-2 no coração. A suplementação com licopeno nos animais do grupo CHO+Ly (vs. CHO) foi capaz de melhorar a resistência à insulina e resistência à insulina, além de atenuar remodelamento, inflamação, ativação de metaloproteinase-2 no coração.

Conclusão: A dieta foi capaz de promover obesidade, remodelamento cardíaco patológico, resistência à insulina, hipertensão, inflamação cardíaca e no tecido adiposo, e maior ativação de metaloproteinase-2 no coração. A suplementação com licopeno foi capaz de melhorar alterações associadas a obesidade, como insulina, resistência à insulina, e remodelamento, inflamação, ativação de metaloproteinase-2 no coração. Esses dados sugerem que o licopeno pode corresponder a uma nova estratégia terapêutica coadjuvante no tratamento das alterações associadas a obesidade.

Palavras-chave: Obesidade, remodelamento cardíaco, licopeno, metaloproteinase-2, inflamação.

Abstract

Silva, CCVA. Role of lycopene supplementation on diet-induced cardiac remodeling: experimental model of obesity in rats. 67 pages Master's degree, Paulista State University (Unesp), School of Medicine, Botucatu, SP, Brazil 2019.

Introduction: Obesity is a metabolic-nutritional disease common in industrialized countries, with financial impact on public health. The interface between hyperadiposity and inflammation is well known. Evidence shows that inflammatory mediators and metalloproteinase-2 are related to cardiac remodeling. Several therapeutic strategies have been tested, such as the use of bioactive compounds. No study has addressed the effect of lycopene on obesity-induced cardiac remodeling.

Objective: The general objective of the present study was to verify the effect of lycopene supplementation on cardiac remodeling in rats with obesity induced by high carbohydrate diet.

Methodology: Male Wistar rats, 200g (n=40), were randomized into two groups with different *ad libitum* dietary treatments: standard diet (C, n=20) or obesogenic diet (CHO, n=20) for 20 weeks. C received standard diet+water. Aiming to induce obesity, the CHO group received a diet with high simple carbohydrate and fat + water plus 25% sucrose (total carbohydrate: 78%, total fat: 16.54%). After the 20th week, supplementation with lycopene (10mg / kg weight / day) or vehicle (corn oil) were administered by gavage for 10 weeks. Thus, after the 20th week, the groups were subdivided as follows: Control group (C, n = 10); Control + lycopene (C+Ly, n = 10); Carbohydrate (CHO, n = 10) and Carbohydrate + lycopene (CHO+Ly, n=10). At week 20 and 30, the animals underwent systolic blood pressure (SBP), morphological and functional echocardiographic evaluation. At the end of the experiment (week 30), the animals were euthanized under deep anesthesia (thiopental 120 mg / kg m.c. via IP) and decapitated to obtain blood and heart samples. Adiposity index, caloric intake, weight gain, feed efficiency, insulin resistance, biochemical markers, inflammatory cytokines in the heart, metalloproteinase-2 activity, lycopene bioavailability in the heart, echocardiographic evaluation were also determined.

Results: At 20th week, pathological cardiac remodeling, insulin resistance, and hypertension were detected in the animals of the CHO group (vs. C). At 30th week was identified the changes described above, besides an increase in adiposity index (CHO vs. C). In addition, animals from CHO group (vs. C) exhibited an increased inflammation in the heart and adipose tissues, and an augmented cardiac metalloproteinase-2 activation. Lycopene supplementation in animals from CHO + Ly group (vs. CHO) was able to improve, insulin, insulin resistance, as well as

attenuating remodeling, inflammation, and activation of metalloproteinase-2 in the heart.

Conclusion: The diet was able to promote obesity, pathological cardiac remodeling, insulin resistance, hypertension, cardiac and adipose tissue inflammation, and increased the activation of metalloproteinase-2 in the heart. Lycopene supplementation was able to improve obesity-associated changes, such as insulin, insulin resistance, and remodeling, inflammation, and activation of metalloproteinase-2 in the heart. These data suggest that lycopene may correspond to a new ancillary therapeutic strategy in the treatment of obesity-associated changes.

Key-words: Obesity, cardiac remodeling, lycopene, metalloproteinase-2, inflammation.

Introdução

A obesidade, cuja prevalência tem crescido no Brasil e no mundo, atinge todas as faixas etárias e classes socioeconômicas² e representa a doença mais comum em países industrializados. Além disso, é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular³.

A doença cardiovascular figura como a enfermidade que despende os maiores gastos à saúde pública⁴. Estudos epidemiológicos realizados recentemente mostraram que o custo total da obesidade e doenças correlatas para o Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro são na ordem de 20 bilhões de reais por ano. Hospitalizações consomem aproximadamente 1,5 bilhão de reais, enquanto que os custos de serviços ambulatoriais chegam a somar cerca de 700 milhões de reais ao ano⁵. Paralelamente, o cenário futuro também é bastante preocupante, pois estimativas prevêem um aumento na prevalência de sobrepeso para 2030 [homens (89%); mulheres (85%)]⁶.

Dentre os fatores desencadeantes da obesidade destaca-se o excesso de nutrientes, o qual pode ser armazenado no adipócito ocasionando seu aumento e manifestando-se como um processo de (hipertrofia) e/ou ocasionando também aumento em seu número (hiperplasia)². Essa alteração na massa adiposa resulta na ativação das vias do fator de transcrição nuclear NF- κ B, aumentando a expressão de genes envolvidos na inflamação com maior liberação de citocinas como o Fator de necrose tumoral α (TNF- α) e Interleucina-6 (IL-6)^{2,8} e o fator migratório para macrófago-1 (MCP-1) o qual tem a função de recrutamento de macrófagos para o tecido². A inflamação tem sido apontada como o principal pilar patogênico da obesidade², estando bem estabelecida na literatura a interação entre hiperadiposidade e inflamação.

Desta maneira o quadro inflamatório crônico e de baixo grau presente em modelo de obesidade exerce papel importante no processo de remodelamento cardíaco, incluindo a hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE). Remodelamento cardíaco é o processo definido como variações moleculares, celulares e intersticiais cardíacas, que se manifestaram cli-

nicamente por alterações no tamanho, massa, geometria e função do coração¹⁵. O remodelamento tem o objetivo de manter, inicialmente, a função do coração. Entretanto, na fase crônica, pode ocorrer o comprometimento progressivo dessa capacidade funcional.¹⁴

É importante ressaltar que a inflamação tem mostrado ser uma marca registrada proeminente do remodelamento ventricular.⁹ Infiltração intersticial de células inflamatórias envolvendo macrófagos, linfócitos T, fibrose, níveis de expressão de citocinas, tais como interleucinas (IL)-6, IL-1 β e factor de necrose tumoral-alfa (TNF- α), e ativação de vias de sinalização inflamatórias, como o factor nuclear kappa B (NF- κ B) são todas características de um coração patologicamente hipertrofiado.^{10,11} Além disso, esses mediadores, principalmente o TNF- α , tem a capacidade de ativar metaloproteinasas da matriz extracelular em diversos modelos de agressão miocárdica¹².

As metaloproteinasas são enzimas proteolíticas zinco-dependentes, encontradas no interstício e produzidas por diversos tipos de células, principalmente fibroblastos, macrófagos, mastócitos, cardiomiócitos e células endoteliais. A Metaloproteinase-2 (MMP-2) é uma das MMPs mais importantes para o remodelamento cardíaco¹³. A ativação das metaloproteinasas pode ocorrer por aumento da inflamação, levando a quebra do colágeno intersticial e, conseqüentemente, remodelamento cardíaco patológico¹².

O interstício consiste principalmente (95%) de fibras de colágeno do tipo I e III. As principais funções desta rede incluem dentro outras, a regulação da apoptose, restauração de deformações patológicas, manutenção do alinhamento das estruturas e regulação da distensibilidade do músculo cardíaco, sendo sua integridade crucial para performance cardíaca adequada¹⁴.

Tendo em vista o grande impacto sócio econômico e as altas taxas de mortalidade ocasionados pelas doenças cardíacas, torna-se relevante a identificação de outras terapias coadjuvantes que auxiliem no tratamento do remodelamento cardíaco presente em modelo de obesidade¹⁴. Entre

esses fatores destacam-se a suplementação de compostos bioativos com capacidade anti-inflamatória, como o licopeno¹⁶⁻¹⁸.

O licopeno é um carotenoide e principal pigmento responsável pela coloração vermelha dos tomates maduros e produtos a base de tomate. É uma forma acíclica do betacaroteno sem atividade provitamina A, com estrutura química apolar, solúvel, portanto, em óleos. Como não é considerado um nutriente “essencial”, não há ingestão diária recomendada (IDR) de licopeno, mas acredita-se que entre 15 a 75mg sejam necessários para que este exerça seus efeitos.^{14,19,20}

O licopeno ingerido é incorporado nas micelas e absorvido na mucosa do intestino delgado por difusão passiva. Em humanos, a absorção do licopeno apresenta-se ao redor de 10 a 30% sendo o restante excretado. Diversos fatores influenciam sua biodisponibilidade, entre eles a idade, o tabaco, o álcool, o processamento térmico e suas formas isoméricas. As formas *cis* são consideradas mais biodisponíveis após o processamento térmico que a *trans*. Cerca de 80 a 90% do licopeno presente nos tomates encontram-se na forma *trans* e as concentrações séricas e tissulares deste composto encontram-se, em mais de 50%, na sua forma *cis*. Após a absorção, o licopeno é incorporado nos quilomicrons e transportado via sistema linfático até atingir a circulação sistêmica e o fígado. Este é então transportado por lipoproteínas no plasma para diferentes órgãos, inclusive o coração.²¹

Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que o licopeno atua como um potente agente anti-inflamatório, principalmente por modular a atividade de fatores transcricionais como NF- κ B.^{14,22,23}

A relação entre a utilização terapêutica do licopeno no tratamento da disfunção cardíaca tem sido examinada em vários estudos clínicos^{24,25} e experimentais.²⁶ Entretanto, para o nosso conhecimento, nenhum estudo abordou o efeito do licopeno sobre o remodelamento cardíaco associado à obesidade.

Hipótese

A indução de obesidade por dieta obesogênica (alto teor de carboidrato simples e gordura) está associada à disfunção cardíaca. Portanto, a obesidade resulta em várias alterações fisiopatológicas características da obesidade, como a presença de um cenário inflamatório crônico.

Considerando que a inflamação está relacionada com o desenvolvimento de remodelamento cardíaco, o presente estudo tem como hipótese que a suplementação com licopeno, administrado em animais com remodelamento cardíaco característico de modelo de obesidade, modula a resposta inflamatória, atenuando a progressão do remodelamento cardíaco.

Objetivo

O objetivo geral do presente estudo foi verificar o efeito da suplementação com licopeno sobre o remodelamento cardíaco em ratos com obesidade induzida por dieta obesogênica (alto teor de carboidrato simples e gordura).

Objetivos específicos

- 1) Avaliar características que contribuem para o risco cardiometabólico.
- 2) Verificar alterações ecocardiográficas presentes na obesidade.
- 3) Verificar a biodisponibilidade do licopeno no sangue e no coração.
- 4) Avaliar o efeito da dieta e da suplementação com licopeno nas variáveis ecocardiográficas (em dois momentos: antes e após o tratamento com licopeno).
- 5) Avaliar o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre parâmetros clínicos e laboratoriais (glicose, insulina, HOMA-IR).
- 6) Avaliar o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre as citocinas (TNF- α , IL-6 e MCP-1).
- 7) Avaliar o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre a atividade da metaloproteínase – 2.

Metodologia

METODOLOGIA

Ratos Wistar machos, 200g (n=40), cálculo amostral realizado segundo Francisqueti, et al 2017¹, com 30 dias de idade, foram randomizados em dois grupos com diferentes tratamentos dietéticos *ad libitum*: dieta padrão + água (C, n=20) ou dieta obesogênica (alto teor de carboidrato simples e gordura + água acrescida de sacarose - 25% (total de carboidratos: 78%, total de gordura: 16, 54%) (CHO, n=20) por 20 semanas com o objetivo de induzir ao remodelamento cardíaco característico da obesidade¹. Após a confirmação do quadro de remodelamento cardíaco, foi iniciada a suplementação com licopeno (10mg/kg de peso/dia) ou veículo (óleo de milho) por 10 semanas via gavagem. Assim, após a 20ª semana, os grupos foram subdivididos da seguinte maneira: grupo Controle (C, n=10); Controle+licopeno (C + Ly, n=10); Carboidrato (CHO, n=10) e Carboidrato+licopeno (CHO + Ly, n=10). Na 20ª e 30ª semana, os animais foram submetidos à aferição da pressão arterial sistólica e avaliação ecocardiográfica morfológica e funcional²⁷. Ao final do experimento (30ª semana), os animais foram eutanasiados sob profunda anestesia (tiopental 120 mg/kg de m.c. via IP) e decaptados para obtenção de amostras de sangue e de coração (VE). Foram analisados também: índice de adiposidade; ingestão calórica, ingestão total de ração em gramas, ingestão de líquidos, ganho de peso, eficiência alimentar, resistência à insulina, marcadores bioquímicos, pressão arterial, biodisponibilidade do licopeno no coração, avaliação ecocardiográfica. Os animais foram mantidos no biotério, cada um em caixa separada para controle de consumo alimentar e hídrico individual semanal, em ambiente enriquecido com 2 folhas de papel toalha amassadas e 1 rolo de papelão com 10 centímetros de comprimento e 5 centímetros de diâmetros, que foram substituídos a cada troca de caixa, (temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade a $55 \pm 5\%$ e ciclos de 12h de iluminação), de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo “*U.S. National Institutes of*

Health”. O estudo foi desenvolvido conforme aprovação do comitê de ética em pesquisa experimental local (Certificado CEUA 1272/2018).

Composição das dietas

O modelo escolhido para o experimento foi uma dieta com alto teor de carboidratos simples e gordura (total de carboidrato: 78%, total de gordura: 16,54%) (CHO) (dieta = ração + 25% sacarose na água) adaptada^{1,28}, que utiliza também ratos Wistar machos. A composição das dietas usadas para o experimento é descrita na Tabela 1.

Tabela 1 Composição das dietas padrão (Controle) e dieta com alto teor de carboidrato simples e gordura (CHO)¹

Ingredientes	Controle	CHO
Farelo de soja (g/kg)	335	340
amido de milho (g/kg)	278	80
casca de soja (g/kg)	188,5	116,7
dextrina (g/kg)	146,5	20
açúcar refinado (g/kg)	-	80
frutose (g/kg)	-	180
óleo de soja (g/kg)	23	-
banha (g/kg)	-	154,3
minerais (g/kg)	25	25
sal (g/kg)	4	4
Composição de macronutrientes		
proteínas (g/kg)	200	180
carboidratos (g/kg)	600	535
gordura (g/kg)	40	165,4
fibras (g/kg)	90	61,2
cinzas (g/kg)	70	58,4
energia (kcal/g)	3,59	4,35

¹Aos animais do grupo CHO foi acrescido 25% de sacarose na água de beber.

Avaliação clínica e laboratorial dos animais

Caracterização nutricional.

A ingestão calórica (ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada dieta [g x kcal]) e eficiência alimentar (relação do ganho de massa corporal total dos animais em gramas pela energia

total ingerida em Kcal) dos animais foram registradas semanalmente. A ingestão de água e a associação água+sacarose foram aferidas semanalmente. Além da ingestão de dieta, o cálculo energético incluiu a ingestão de sacarose. Para caracterização de obesidade foram mensuradas massa (aferido semanalmente) e gordura corporal (somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral) com posterior cálculo do índice de adiposidade (relação da gordura corporal total pelo peso corporal final x 100).

Marcadores Bioquímicos

Na 20^a e na 30^a semana a glicose foi aferida com a utilização de glicosímetro Accu-chek® (Roche Diabetes Care®, São Paulo, Brasil) Após jejum (8 horas) e eutanásia, amostras de sangue foram coletadas com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na proporção de 0,1 mL para cada 5 mL de sangue, centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C e armazenadas em freezer à -80°C para aferição de concentrações plasmáticas de insulina e proteínas totais. As proteínas totais foram mensuradas por método enzimático colorimétrico utilizando kit comercial (BioClin®, Belo Horizonte, MG, Brasil), insulina por ensaio ELISA fluorescente colorimétrico utilizando kit comercial (EZRMI-13K | Rat/Mouse Insulin ELISA - Merck Millipore®Darmstadt, Germany), todos em equipamento bioquímico automatizado (BS-200 Mindray, China).

Pressão arterial sistólica (PAS)

A PAS foi aferida na 20^a e 30^a semanas pelo método indireto de plestimografia da cauda, utilizando-se esfigmomanômetro elétrico (NarcoBio-system® modelo 709-0610; International Biomedical, Inc, USA). Após o aquecimento, foi acoplado o sensor e o manguito em torno da cauda do animal. O manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinflado. As pulsações arteriais foram regis-

tradas em sistema de aquisição de dados computadorizado e os resultados foram a média de 3 registros.

Resistência à insulina

Para avaliação da resistência à insulina foi utilizado o índice HOMA-IR (HomeostasisModelAssessment – InsulinResistance) que, leva em consideração os valores séricos de glicose e insulina.²⁹

Avaliação ecocardiográfica

Na vigésima semana e um dia antes do final do protocolo experimental, Todos os animais foram avaliados in vivo por ecocardiograma transtorácico, utilizando um sistema Vivid S6 equipado com transdutor ultrassônico multifrequencial de 5,0 a 11,5 MHz (General Electric Medical Systems, Tirat Carmel, Israel). Todos os exames foram realizados pelo mesmo examinador e obtidos de acordo com o método de ponta recomendado pela Sociedade Americana de Ecocardiografia. Os ratos foram anestesiados levemente por injeção intraperitoneal com uma mistura de cetamina (50 mg / kg) e xilazina (1 mg / kg). Após barbear o peito, os animais foram colocados em decúbito esquerdo. Para implementar medidas estruturais do coração, as imagens foram obtidas no modo unidimensional (modo M), guiadas pelas imagens no modo bidimensional com o transdutor na posição paraesternal, eixo menor. A avaliação do ventrículo esquerdo (VE) foi realizada posicionando o cursor M-mode logo abaixo do plano da válvula mitral ao nível dos músculos papilares. As imagens da aorta e do átrio esquerdo foram obtidas através do posicionamento no modo M para planejar o nível da válvula aórtica.

Variáveis avaliadas para análise morfológica:

Diâmetro diastólico do VE (DDVE), diâmetro sistólico do VE (DSVE), espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP); espessura sistólica da parede posterior do VE (ESPP); espessura diastólica do septo interventricular (EDSIV), espessura sistólica do septo

interventricular (ESSIV), diâmetro da aorta (Ao), diâmetro do átrio esquerdo (AE), diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta (AE/Ao), diâmetro diastólico do VE corrigido pelo peso corporal (DDVE/PC), diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal (AE/PC), massa do ventrículo esquerdo (MassaVE), índice de massa do VE (Índ.MVE), espessura relativa do VE (Esp.rel.VE).

Variáveis avaliadas para análise funcional:

Frequência cardíaca (FC), volume diastólico final do VE (Vol.VED), volume sistólico final do VE (Vol.VES), volume sistólico (Vol.sist), débito cardíaco (DC), Índice cardíaco (Índice Card) ($DC \div \text{Área de superfície corpórea}$); Porcentagem de encurtamento endocárdico (%enc.endo), Porcentagem de encurtamento mesocárdico (%enc.meso), velocidade máxima de enchimento do VE no início da diástole (E mitral), indica desempenho diastólico do VE; pico máximo de velocidade de fluxo transmitral durante a contração atrial (A mitral), indica desempenho diastólico do VE; razão entre E e A (E/A), indica função diastólica do VE durante a diástole, velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP), tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV), tempo de desaceleração da onda E mitral (TDE), intervalo entre as ondas R (R-R) (Marcador de variabilidade da FC – diz respeito a função autonômica do SN); tempo de relaxamento isovolumétrico ajustado pela frequência cardíaca (TRIV/R-R), tempo entre o final de uma onda A e o início de uma onda E (Tei-a) (tempo entre diástoles); tempo de ejeção do VE (Tei-b), TEI index: Tei-a/Tei-b (índice de performance miocárdica), Fração de Ejeção (FE), Tempo de deslocamento da PP do VE no momento da sístole (S' lateral), tempo de deslocamento do SIV no momento da sístole (S' septal), S média: $(S \text{ lateral} + S \text{ septal})/2$, tempo de deslocamento da PP do VE durante a contração atrial (A' lateral), tempo de deslocamento do SIV durante a contração atrial (A' septal), A' média: $(A' \text{ lateral} + A' \text{ septal})/2$, tempo

de deslocamento da PP do VE no início da diástole (E' lateral), tempo de deslocamento do SIV no início da diástole (E' septal), E/E': razão onda E/E' média; E'/A': razão onda E' média/A' média.

Quantificação de citocinas

Concentração de TNF- α , IL-6 no coração e tecido adiposo e MCP-1 no coração foram quantificadas pelo método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando kits comerciais específicos (R&D SystemsR, Minneapolis, MN, USA). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de microplaca (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA).

Determinação da atividade da metaloproteinase- 2 miocárdica

A metaloproteinase 2 foi determinada pela técnica de Zimografia previamente relatada por Tyagi *et al*³⁰. Amostras do tecido cardíaco foram diluídas em tampão de lise (Tris 50mM, pH 7,4, NaCl 0.2M, Triton-X 0,1% e CaCl₂ 10mM). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C, com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para tubos eppendorfs e armazenados em freezer -80°C. A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford, utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão. Após a quantificação da concentração proteica, as amostras das proteínas foram diluídas em tampão (Tris 0,5M, pH 6,8, 100% de glicerol e 0,05% de azul de bromofenol) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, 33 USA). As amostras, contendo 20 μ g de proteínas, foram distribuídas em gel de SDS-poliacrilamida 8%, com 1% de gelatina. A corrida eletroforética foi efetuada a 100V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), aproximadamente 2 horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%) até o azul de bromofenol atingir o fundo do gel. O gel foi removido e lavado duas vezes de 30 minutos com Triton-X 100 e a seguir, lavado duas vezes de 5 minutos

com solução Tris 50mM, pH 8,4. O gel então, foi incubado a 37°C overnight em solução de ativação (Tris 50mM, pH 8,4 e CaCl₂ 5mM). A coloração do gel foi realizada com 0,5% de comassie blue, por 2h e a descoloração foi feita com solução de 30% de metanol e 10% ácido acético até o clareamento das bandas sobre fundo escuro. O processo de coloração e descoloração foi realizado em temperatura ambiente, em agitador. A seguir, o gel foi fotografado e a intensidade da ação gelatinolítica (bandas claras) analisada em analisador de imagem UV-UVF White Darkbox. As análises quantitativas das bandas proteicas (blots) foram realizadas pelo fotodocumentador Gel Logic 6000 Pro (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

Biodisponibilidade do licopeno

A presença de licopeno foi determinada no plasma e no coração segundo estudo prévio¹⁶. Para extração dos carotenóides, as amostras foram incubadas com padrão interno (equinenona), clorofórmio/metanol CHCl₃/CH₃OH (3mL; 2:1, v/v) e 500mL de salina 8,5 g/L. Após centrifugação a 3000 rpm durante 10 minutos o sobrenadante foi coletado e reservado. Hexano foi adicionado após a coleta do sobrenadante. As camadas clorofórmicas e hexânicas foram evaporadas sob nitrogênio e o resíduo ressuspensionado em 150mL de etanol, agitado e sonificado por 30 segundos. Alíquotas de 20µL da solução resultante foram injetadas no HPLC. O sistema HPLC utilizado (Waters 2996) realizou a detecção UV em comprimento de onda de 340 nm para retinóides e 450 nm para carotenóides. A fase móvel foi constituída de etanol/metiltetrbutil éter/água (83:15:2, v/v/v, 15 g/L com acetato de amônio em água, solvente A) e metanol/metiltretbutil éter/água (8:90:2, v/v/v, 10 g/L com acetato de amônio em água, solvente B). O fluxo foi de 1mL/min sendo: 1) 100% de solvente A por 2 min seguido por 6 min de gradiente linear com 70% de solvente A; 2) espera 3min depois 10 min gradiente linear com 45% solvente de A; 3) espera 2 min depois 10min de gradiente linear com 5% de solvente A; 4) espera 4 min depois 2min de gradiente linear voltando para 100% de solvente A. Para a quantificação dos cromatogramas foi realizada a comparação entre as relações área da substância/área do pa-

drão interno, obtidas na análise. Os valores das substâncias da solução padrão foram corrigidos por seus coeficientes de extinção molar. A mensuração foi realizada em HPLC alocado na Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada usando SigmaStat versão 2.0 (JandelScientific Software, San Rafael, CA, USA). Os dados paramétricos foram apresentados como média $\pm$ desvio-padrão e as comparações entre os grupos em 20 semanas foram realizadas por teste t de *student* e os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e interquartis (p25 e p75) e o teste utilizado foi o Mann-Whitney. Os resultados de 30 semanas foram analisados por análise de variância paramétrica (ANOVA) e complementado com o teste *post-hoc* de Bonferroni. Os dados não paramétricos foram apresentados como mediana e interquartis (p25 e p75) e o teste utilizado foi o Kruskal-Wallis, complementado pelo teste *post-hoc* de Dunn. As diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

Resultados 20 semanas

A ingestão da dieta hipercalórica com alto teor de carboidrato ocasionou um aumento significativo ganho de peso nos animais do grupo CHO, menor ingestão de ração em gramas pelo grupo CHO, não apresentou diferença significativa na ingestão calórica, proporcionou aumento da eficiência alimentar e da pressão arterial sistólica do grupo CHO (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação do efeito da dieta no perfil nutricional em 20 semanas

Variáveis	Grupos		
	C	CHO	p
Peso corporal inicial (g)	212 ± 19	204 ± 22	0.122
Peso corporal final (g)	463 ± 49	480 ± 66	0.193
Ganho de peso (g)	250 ± 40	275 ± 55*	0.027
Ingestão alimentar (g/dia)	27 ± 2	12 ± 1*	0.001
Ingestão calórica (kcal/dia)	97 ± 8	95 ± 10	0.185
Eficiência alimentar (% kcal por dia)	0,001 (0,0001-0,0001)	0,0013 (0,0012-0,0013)*	0.001
PAS (mmHg)	126 ± 6	139 ± 7*	0.001

Dados paramétricos expressos como média ± desvio padrão, não paramétricos apresentados como mediana e interquartis (p25 e p75) (n, 20 animais/grupo); grupos, Controle e Carboidrato; Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 20 semanas. PAS, Pressão arterial sistólica. Para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, foi utilizado Teste T de Student para dados paramétricos e para não paramétricos o Mann-Whitney.

No perfil glicídico o grupo CHO apresentou aumento significativo de insulina e HOMA-IR, glicose não apresentou diferença significativa entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação do efeito da dieta rica em carboidrato no perfil glicídico em 20 semanas

Variáveis	Grupos		
	C	CHO	p
Glicose (mg/dL)	127 ± 85	172 ± 72	0,085
Insulina (mg/dL)	4,98 ± 0,43	5,49 ± 0,41*	0,001
HOMA-IR	28 ± 21	42 ± 17*	0,039

Dados expressos como media ± desvio padrão (n, 20 animais/grupo); grupos, Controle e Carboidrato; Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 20 semanas. Teste T de Student foi usado para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C.

Nas variáveis morfológicas cardíacas observa-se que a dieta foi associada a diminuição do DDVE, DDVE/PC e aumento do DSVE, EDPP, EDSIV, AO, AE, AE/AO, DDVE/PC, AE/PC, Massa VE, Ind MVE, Esp rel VE (Tabela 4), variações sugestivas de remodelamento cardíaco.

Tabela 4. Avaliação morfológica ecocardiográfica na 20ª semana

Variáveis	Grupos		
	C	CHO	p
DDVE (mm)	7,10 ± 0,60	6,70 ± 0,50*	0,015
DSVE (mm)	3,00 ± 0,40	3,20 ± 0,50*	0,049
EDPP (mm)	1,50 ± 0,10	1,90 ± 0,10*	0,001
ESPP (mm)	3,10 ± 0,30	3,20 ± 0,20	0,490
EDSIV (mm)	1,50 ± 0,10	2,20 ± 0,30*	0,001
ESSIV (mm)	3,60 ± 0,26	3,67 ± 0,30	0,293
Ao (mm)	3,70 ± 0,20	3,90 ± 0,10*	0,001
AE (mm)	4,70 (4,60-4,80)	6,1 (5,8-6,7)	0,001
AE/Ao	1,80 ± 0,10	1,50 ± 0,10*	0,001
DDVE/PC	14,90 ± 1,40	13,90 ± 1,60*	0,001
AE/PC	9,90 ± 1,00	12,50 ± 1,50*	0,001
Massa VE	0,70 ± 0,10	1,00 ± 0,20*	0,001
Índice MVE	1,50 ± 0,20	2,10 ± 0,40*	0,001
Esp. Rel. VE	0,04 ± 0,03	0,57 ± 0,06*	0,001

Dados expressos como média ± desvio padrão e não paramétricos como mediana (p25-p75) (n, 20 animais/grupo); grupos, Controle e Carboidrato; Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato, 78%; gordura, 14,6%] por 20 semanas. Variáveis: DDVE: diâmetro diastólico do VE; DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; ESPP: espessura sistólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; ESSIV: espessura sistólica do septo interventricular; Ao: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/Ao: diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta; DDVE/PC: diâmetro diastólico do VE corrigido pelo peso corporal; AE/PC: diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal; MassaVE: massa do ventrículo esquerdo; Índice.MVE: índice de massa do VE; Esp.rel.VE: espessura relativa do VE; . Para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, foi utilizado Teste T de *Student* para dados paramétricos e para não paramétricos o Mann-Whitney.

Nas variáveis funcionais observa-se que a dieta foi associada a prejuízo sistólico e diastólico, observados pela diminuição de débito cardíaco, índice cardíaco, % de encurtamento do endocárdio, VEPP, Tei-b, Tei-a, Fração de ejeção, S lateral, S septal, S média, Vol. VED, E' lateral, E' média, E' septal e E'/A', e pelo aumento do VES, TRIV-ms, TRIV-RR, TDE-ms, A' média, DP, Tei index, A' lateral e E'/E'. (Tabela 5).

Tabela 5. Avaliação funcional ecocardiográfica em 20 semanas

Variáveis	Grupos		
	C	CHO	p
FC (bpm)	267 ± 55	278 ± 51	0,321
Vol. VED (mL)	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1*	0,011
Vol. VES (mL)	0,03 (0,02 - 0,03)	0,03 (0,02 - 0,04)	0,184
Vol. Sist.	0,3 ± 0,1	0,2 ± 0,1*	0,001
Débito cardíaco (mL)	89 ± 24	79 ± 23	0,073
Índice cardíaco	186 ± 51	162 ± 47*	0,033
% enc. endo.	57,6 ± 3,7	52,6 ± 5,8*	0,001
% enc. meso.	26 ± 3	24 ± 4	0,145
E mitral	77 ± 10	80 ± 9	0,106
A mitral	48 ± 12	50 ± 15	0,479
E/A	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,5	0,353
VEPP (mm/s)	58 ± 3	51 ± 6*	0,001
TRIV (ms)	22 (22-24)	23 (20-30)	0,189
TDE (ms)	45 ± 6	49 ± 9*	0,015
R-R (seg)	0,23 ± 0,05	0,22 ± 0,05	0,367
TRIV/R-R	46 (44-50)	49 (43-63)	0,075
Estresse sistólico	141 ± 19	146 ± 18	0,238
Tei-a (ms)	109 ± 10	105 ± 9	0,068
Tei-b (ms)	79 ± 10	70 ± 8*	0,001
Tei-index (ms)	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1*	0,001
Fração de ejeção	0,92 ± 0,02	0,88 ± 0,04*	0,001
S' lateral	5,6 ± 0,5	5,1 ± 0,4*	0,001
E' lateral	5,6 ± 0,9	4,2 ± 0,9*	0,001
A' lateral	3,6 (3,3-3,9)	4,6 (3,6-5,4)*	0,001
S' septal	5,6 ± 0,3	5,1 ± 0,4*	0,001
E' septal	6,2 ± 0,8	4,9 ± 0,9*	0,001
A' septal	4,2 ± 0,6	5,1 ± 1,5*	0,003
S' média	5,6 ± 0,3	5,1 ± 0,3*	0,001
E' média	5,9 ± 0,8	4,6 ± 0,8*	0,001
A' média	3,9 (3,6-4,2)	4,7(3,9-5,6)*	0,001
E/E'	13 ± 1	17 ± 3*	0,001
E'/A'	1,4 (1,5-1,6)	0,9 (0,7-1,4)*	0,001

Dados paramétricos expressos como média ± desvio padrão e não paramétricos como mediana (p25-p75) (n, 20 animais/grupo); grupos, Controle e Carboidrato; Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 20 semanas. Variáveis: FC: frequência cardíaca; Vol.VED: volume diastólico final do VE; Vol.VES: volume sistólico final do VE; Vol.sist.: volume sistólico; Déb.Card.: Débito cardíaco; Índice Card: Índice cardíaco; %enc.endo: Porcentagem de encurtamento endocárdico; %enc.meso: Porcentagem de encurtamento mesocárdico. E/A: razão entre E e A; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; R-R: intervalo entre as ondas R; TRIV/R-R: tempo de relaxamento isovolumétrico ajustado pela frequência cardíaca; Tei-a: tempo entre o final de uma onda A e o início de uma onda E; Tei-b: tempo de ejeção do VE; TEI index: Tei-a/Tei-b;; S média: (S lateral+ S septal)/2; E' média: (E' lateral+ E' septal)/2; A' média: (A' lateral + A' septal)/2; E/E': razão onda E/E' média E'/A': razão onda E' média/A' média; DP: duplo produto; Para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, foi utilizado Teste T de Student para dados paramétricos e para não paramétricos o Mann-Whitney

Resultados 30 semanas

Ao final das 30 semanas foi observado ausência de diferença entre os grupos em relação ao peso corpóreo, ingestão calórica total e eficiência alimentar. Além disso, foi verificado que os grupos CHO (CHO e CHO+Ly) apresentaram menor ingestão total de ração em relação aos grupos controles (C e C+Ly). Tais parâmetros também não foram influenciados pela suplementação com licopeno. O aumento da pressão arterial sistólica foi associado à dieta, mas não foi modificada pela suplementação com licopeno. O modelo de dieta adotado promoveu obesidade caracterizada pelo aumento do índice de adiposidade e depósitos de gordura (total, visceral, epididimal e retroperitoneal) em relação aos grupos controles. O índice de adiposidade e quantificação de depósitos de gorduras não foram modificados pela suplementação com licopeno na comparação dos grupos CHO vs CHO+Ly (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da dieta e da suplementação com licopeno no perfil nutricional em 30 semanas

Variáveis	Grupos				Efeito		
	C	C+Ly	CHO	CHO+Ly	Dieta	Tratamento	Interação
PCI (g)	207 ± 6	215 ± 6	212 ± 6	200 ± 7	0,465	0,761	0,150
PCF (g)	507 ± 21	514 ± 22	535 ± 21	536 ± 22	0,259	0,838	0,887
Ganho de peso (g)	320 ± 40	299 ± 42	344 ± 40	322 ± 40	0,568	0,608	0,998
Ingestão alimentar (g/dia)	22 ± 1	36 ± 1	14 ± 1*	15 ± 1,00	0,001	0,001	0,001
Ingestão calórica (kcal/dia)	69 ± 9	131 ± 10	121 ± 9*	119 ± 9	0,048	0,004	0,002
Eficiência alimentar (% kcal por dia)	0,0044 ± 0,0006	0,0027 ± 0,0006	0,0013 ± 0,0006*	0,0012 ± 0,0006	0,001	0,184	0,237
Epididimal (g)	7 ± 1	7 ± 1	13 ± 1*	13 ± 1	0,001	0,809	0,975
Retroperitoneal (g)	7 ± 1	9 ± 1	21 ± 1*	23 ± 1	0,001	0,303	0,813
Visceral (g)	4,8 ± 0,8	5,2 ± 0,9	9,2 ± 0,8*	10 ± 0,9	0,001	0,533	0,795
Gordura corporal total (g)	20 ± 3	21 ± 3	44 ± 3*	47 ± 3	0,001	0,513	0,850
Índice de adiposidade %	3,9 ± 0,4	4,3 ± 0,4	8,0 ± 0,4*	8,7 ± 0,4	0,001	0,222	0,715
PAS (mmHg)	121 ± 3	119 ± 4	137 ± 3*	146 ± 4	0,001	0,398	0,223

Dados expressos como média ± desvio padrão e não normais mediana (p25-p75) (n, 8 animais/grupo); grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato, 78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas. Peso corporal inicial (PCI), Peso corporal final (PCF), Pressão arterial sistólica (PAS). Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foram usados para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, #CHO+Ly vs CHO.

No perfil glicídico (Tabela 7) o grupo CHO apresentou aumento significativo de insulina e HOMA-IR. Glicose não apresentou diferença significativa entre os grupos. A suplementação com licopeno atenuou os níveis de insulina e HOMA-IR.

Tabela 7. Efeito da dieta e da suplementação com licopeno no perfil glicídico em 30 semanas

Variáveis	Grupos				Efeito		
	C	C+Ly	CHO	CHO+Ly	Dieta	Tratamento	Interação
Glicemia (mg/dL)	77 ± 4	90 ± 5	97 ± 4	105 ± 6	0,002	0,051	0,613
Insulina mg/dL	0,90 ± 0,20	1,30 ± 0,20	5,60 ± 0,20*	1,40 ± 2 [#]	0,001	0,001	0,001
HOMA-IR	0,15 ± 0,07	0,30 ± 0,08	1,37 ± 0,07*	0,29 ± 0,08 [#]	0,001	0,001	0,001

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão e não normais mediana (p25-p75) (n, 8 animais/grupo); grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas. Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foram usados para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, #CHO+Ly vs CHO.

As variáveis DDV e DDVE/PC apresentaram-se diminuídas e os parâmetros DSVE, EDPP, EDSIV, AO, AE, AE/AO, AE/PC, Massa VE, Ind MVE, Esp rel VE aumentados. A suplementação com licopeno foi associada diminuição de EDSIV, Massa do VE e da Espessura relativa do VE (Tabela 8), sugerindo proteção contra a hipertrofia associada à dieta.

Tabela 8 Avaliação morfológica ecocardiográfica em 30 semanas

Variáveis	Grupos				Efeito		
	C	C+Ly	CHO	CHO+Ly	Dieta	Tratamento	Interação
DDVE (mm)	7 $\pm$ 0,1	7 $\pm$ 0	7 $\pm$ 0,1*	7 $\pm$ 0	0,035	0,41	0,402
DSVE (mm)	2,75 $\pm$ 0,08	2,81 $\pm$ 0,10	3,21 $\pm$ 0,08*	2,77 $\pm$ 0,1#	0,032	0,048	0,012
EDPP (mm)	1,590 $\pm$ 0,03	1,560 $\pm$ 0,040	1,71 $\pm$ 0,04	1,61 $\pm$ 0,04	0,061	0,118	0,404
ESPP (mm)	3,23 $\pm$ 0,08	3,22 $\pm$ 0	3,16 $\pm$ 0,09	3,22 $\pm$ 0	0,697	0,773	0,697
EDSIV (mm)	1,72 $\pm$ 0,03	1,61 $\pm$ 0,04	1,93 $\pm$ 0,03*	1,67 $\pm$ 0,04#	0,012	0,001	0,028
ESSIV (mm)	3,57 $\pm$ 0,07	3,48 $\pm$ 0,09	3,60 $\pm$ 0,08	3,41 $\pm$ 0,09	0,83	0,125	0,597
AO (mm)	3,87 $\pm$ 0,05	3,9 $\pm$ 0,06	3,9 $\pm$ 0,06	3,86 $\pm$ 0,06	0,929	0,937	0,622
AE (mm)	4,97 $\pm$ 0,09	4,94 $\pm$ 0,11	5,03 $\pm$ 0,09	4,8 $\pm$ 0,11	0,587	0,758	0,092
AE/AO (mm)	1,23 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,02	1,29 $\pm$ 0,02	1,24 $\pm$ 0,02	0,543	0,772	0,154
DDVE/PC (mm)	14,2 $\pm$ 0,4	14,5 $\pm$ 0,5	12,5 $\pm$ 0,4*	13,1 $\pm$ 0,58	0,008	0,411	0,766
AE/PC (mm)	9,6 $\pm$ 0,4	10,1 $\pm$ 0,4	9,40 $\pm$ 0,4	9,1 $\pm$ 0,4	0,18	0,794	0,369
Massa VE	0,45 $\pm$ 0,01	0,44 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,01*	0,46 $\pm$ 0,1#	0,005	0,057	0,217
Índice de massa VE	1,5 $\pm$ 0,05	1,56 $\pm$ 0,06	1,58 $\pm$ 0,05	1,44 $\pm$ 0,06	0,563	0,385	0,16
Espessura rel. VE (mm)	0,45 $\pm$ 0,1	0,44 $\pm$ 0,01	0,51 $\pm$ 0,01*	0,46 $\pm$ 0,01#	0,005	0,057	0,217

Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão e não normais mediana (p25-p75) (n, 8 animais/grupo); grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas. Variáveis: DDVE: diâmetro diastólico do VE; DSVE: diâmetro sistólico do VE; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; ESPP: espessura sistólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo interventricular; ESSIV: espessura sistólica do septo interventricular; Ao: diâmetro da aorta; AE: diâmetro do átrio esquerdo; AE/Ao: diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo diâmetro da aorta; DDVE/PC: diâmetro diastólico do VE corrigido pelo peso corporal; AE/PC: diâmetro do átrio esquerdo corrigido pelo peso corporal; MassaVE: massa do ventrículo esquerdo; Índ.MVE: índice de massa do VE; Esp.rel.VE: espessura relativa do VE. Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foram usados para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, #CHO+Ly vs CHO.

As variáveis funcionais Vol.VED, Vol. Sistólico, débito cardíaco, % de encurtamento do endocárdio, % encurtamento do mesocárdio, Tei-b, Fração de ejeção e E' septal apresentaram-se diminuídas, e Vol, VES, índice cardíaco, E/E' e P.A. apresentaram-se aumentadas no grupo CHO quando comparadas ao grupo C ($p < 0,05$). A suplementação com licopeno foi capaz de melhorar Vol. VES, % de encurtamento do endocárdio, % encurtamento do mesocárdio, Fração de ejeção, E/E' e P.A. quando comparado ao grupo CHO ($p < 0,05$). (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação funcional ecocardiográfica em 30 semanas

Variáveis	Grupos				Efeito		
	C	C+Ly	CHO	CHO+Ly	Dieta	Tratamento	Interação
FC (bpm)	256 ± 13	266 ± 16	263 ± 14	262 ± 16	0,930	0,758	0,715
Vol. VED (mL)	0,35 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,30 ± 0,01*	0,33 ± 0,1	0,038	0,504	0,448
Vol. VES (mL)	0,021 ± 0	0,023 ± 0,002	0,034 ± 0,002*	0,022 ± 0,002 [#]	0,024	0,051	0,012
Vol. Sist.	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0	0,27 ± 0,01*	0,031 ± 0	0,014	0,318	0,234
Débito cardíaco	84 ± 4	83 ± 5	71 ± 4*	77 ± 5	0,048	0,738	0,420
Índice cardíaco	171 ± 9	171 ± 11	133 ± 9*	146 ± 11	0,005	0,543	0,520
% enc. endo.	61 ± 1	60 ± 1	52 ± 1*	59 ± 1 [#]	0,002	0,017	0,004
% enc. meso.	29 ± 1	28 ± 1	22 ± 1*	28 ± 1 [#]	0,03	0,132	0,076
E mitral	73 ± 1	72 ± 2	77 ± 2	73 ± 2	0,392	0,299	0,519
A mitral	48 ± 3	47 ± 4	50 ± 3	45 ± 4	0,934	0,505	0,668
E/A	1,500 ± 0,08	1,59 ± 0,1	1,62 ± 0,09	1,62 ± 0,09	0,402	0,549	0,781
VEPP (mm/s)	59 ± 1	61 ± 1	56 ± 1	59 ± 1	0,191	0,082	0,639
TRIV (ms)	25,4 ± 0,9	23,7 ± 1,1	24,1 ± 1	21,1 ± 1,1	0,099	0,044	0,569
TDE (ms)	46 ± 1	41 ± 1	49 ± 1	43 ± 1	0,145	0,004	0,745
R-R (seg)	0,2400 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,908	0,882	0,430
TRIV/R-R	52 ± 2	49 ± 3	50 ± 2	43 ± 3	0,215	0,122	0,495
Estresse sistólico	134 ± 6	132 ± 7	149 ± 6	158 ± 7	0,007	0,619	0,450
Tei-a (ms)	115 ± 2	117 ± 2	100 ± 2	111 ± 2	0,001	0,039	0,123
Tei-b (ms)	87 ± 2	93 ± 3	78 ± 2*	85 ± 3	0,011	0,046	0,987
Tei-index (ms)	0,33 ± 0,03	0,26 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,3 ± 0,03	0,952	0,392	0,210
Fração de ejeção	0,9400 ± 0,01	0,935 ± 0,009	0,886 ± 0,07	0,934 ± 0,009 [#]	0,002	0,017	0,003
S' lateral	5,8 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,7 ± 0,1	5,6 ± 0,1	0,438	0,611	0,952
E' lateral	5,1 ± 0,1	5,6 ± 0,1	4,9 ± 0,2	5,1 ± 0,2	0,62	0,634	0,507
A' lateral	4,2 ± 0,03	3,9 ± 0,4	4,5 ± 0,3	3,6 ± 0,4	0,979	0,136	0,421
S' septal	5,4 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	5,6 ± 0,1	0,503	0,546	0,438
E' septal	6 ± 0,1	6,3 ± 0,2	5,3 ± 0,1*	5,5 ± 0,2	0,001	0,227	0,998
A' septal	4,7 ± 0,3	4,6 ± 0,4	4,9 ± 0,4	4,4 ± 0,4	0,966	0,461	0,558
S' média	5,64 ± 0,08	5,68 ± 0,1	5,67 ± 0,09	5,63 ± 0,1	0,885	0,999	0,683
E' média	5,6 ± 0,1	5,7 ± 1	5,1 ± 0,1	5,3 ± 0,1	11	0,286	0,649
A' média	4,4 ± 0,3	4,3 ± 0,4	4,7 ± 0,3	4 ± 0,4	0,992	0,255	0,474
E/E'	13,2 ± 0,4	12,7 ± 0,5	15,3 ± 0,4*	13,7 ± 0,5 [#]	0,003	0,042	0,254
E'/A'	1,3 ± 0,07	1,34 ± 0,009	1,12 ± 0,07	1,37 ± 0,09	0,396	0,106	0,225

Dados expressos como média ± desvio padrão e não normais mediana (p25-p75) (n, 8 animais/grupo); grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato, 78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas. Variáveis: FC: frequência cardíaca; Vol.VED: volume diastólico final do VE; Vol.VES: volume sistólico final do VE; Vol.sist.: volume sistólico; Déb.Card.: Débito cardíaco; Índice Card: Índice cardíaco; %enc.endo: Porcentagem de encurtamento endocárdico; %enc.meso: Porcentagem de encurtamento mesocárdico. E/A: razão entre E e A; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior do VE; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E mitral; R-R: intervalo entre as ondas R; TRIV/R-R: tempo de relaxamento isovolumétrico ajustado pela frequência cardíaca; Tei-a: tempo entre o final de uma onda A e o início de uma onda E; Tei-b: tempo de ejeção do VE; TEI index: Tei-a/Tei-b; S média: (S lateral+ S septal)/2; E' média: (E' lateral+ E' septal)/2; A' média: (A' lateral + A' septal)/2; E/E': razão onda E/E' média E'/A': razão onda E' média/A' média; DP: duplo produto. Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foram usados para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, [#]CHO+Ly vs CHO.

A figura 1 apresenta o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre as citocinas inflamatórias no miocárdio. Os marcadores TNF- α , IL-6 e MCP-1 se apresentam elevados no grupo CHO quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$). A suplementação com licopeno ocasionou uma diminuição na concentração de citocinas no grupo CHO+Ly, quando comparado ao grupo CHO ($p < 0,05$).

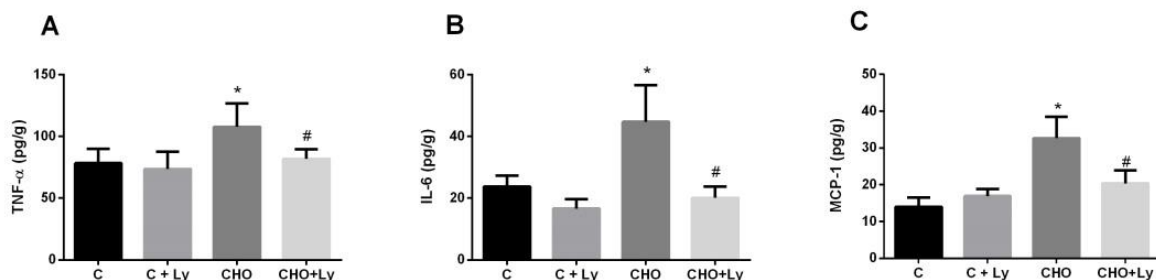


Figura 1. Citocinas inflamatórias cardíacas. TNF- α , Fator de Necrose Tumoral- α (1.A); IL-6, Interleucina – 6 (1.B); MCP-1, Proteína quimioatraente de monócitos 1 (1.C). Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n, 8 animais/grupo); grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas. Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foram usados para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, #CHO+Ly vs CHO.

A figura 2 apresenta o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre as citocinas inflamatórias no tecido adiposo. Os marcadores TNF- α , IL-6, que se apresentam elevados no grupo CHO quando comparado ao grupo C ($p < 0,05$). A suplementação com licopeno ocasionou uma diminuição na concentração de TNF- α no grupo CHO+Ly, quando comparado ao grupo CHO ($p < 0,05$).

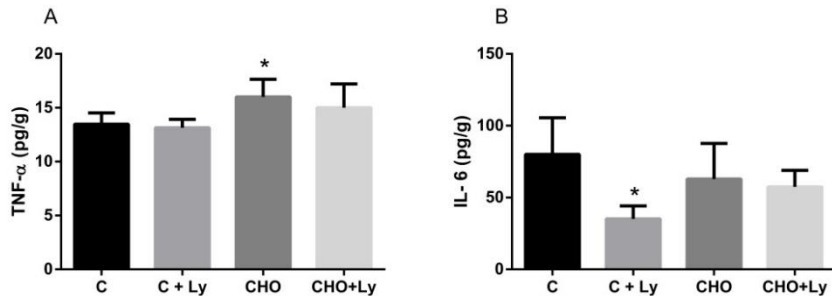


Figura 2 Citocinas inflamatórias no tecido adiposo. Fator de Necrose Tumoral- α (2.A); IL-6, Interleucina – 6 (2.B) Dados expressos como média $\pm$ desvio padrão (n, 8 animais/grupo); grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas. Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foram usados para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, #CHO+Ly vs CHO.

A figura 3 apresenta o efeito da dieta e da suplementação com licopeno sobre a atividade da Metaloproteinase – 2 (MMP-2), em sua forma ativa. Quando comparado ao grupo C, a MMP-2 apresentou-se elevada ($p < 0,05$). A suplementação com licopeno ocasionou uma diminuição na forma ativa no grupo CHO+Ly, quando comparado ao grupo CHO ($p < 0,05$).

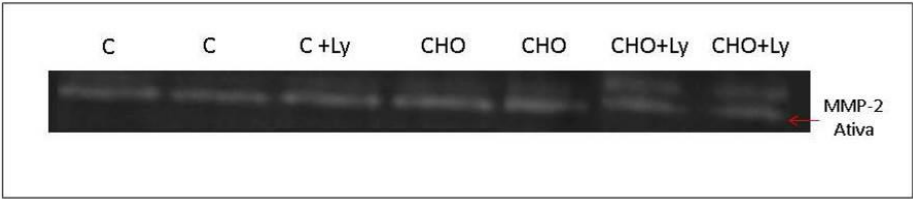


Figura 3. Gel Metaloproteinase-2. Grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas

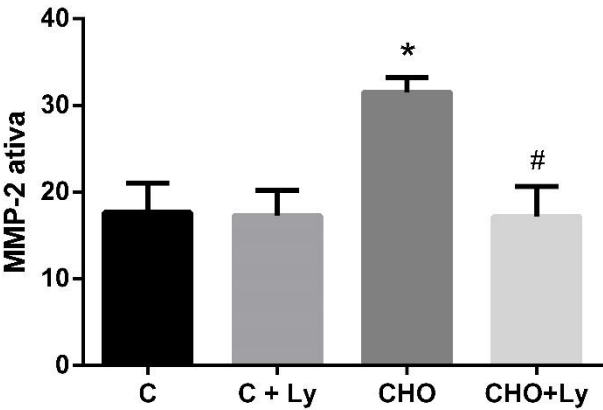


Figura 4. Metaloproteinase 2 ativa (MMP – 2 ativa). Dados expressos como media ± desvio padrão (n, 8 animais/grupo); grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas. Two-way ANOVA com post-hoc Tukey foram usados para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *CHO vs C, #CHO+Ly vs CHO.

A concentração de licopeno foi aferida no plasma e no coração. Foi detectada a presença de licopeno no plasma e no coração nos grupos C+Ly e CHO+Ly e, nos grupos C e CHO não foi detectado (Tabela 10).

Tabela 10. Biodisponibilidade do all- trans licopeno no plasma e no coração.

Amostra	C	C+Ly	CHO	CHO+Ly
Plasma (mg/dL)	Nd	3,6±0,5	Nd	6,8±2,3
Coração (ng/g de tecido)	Nd	4,8±2,3	Nd	2,4±0,3

Dados expressos como media±desvio padrão (n, 2 animais/grupo); grupos, C, Controle; C+Ly, Controle+Licopeno; CHO, Carboidrato; CHO+Ly, Carboidrato+Licopeno. Dieta, Controle [carboidrato, 60%; gordura 4%] ou Carboidrato [Carboidrato,78%; gordura, 14,6%] por 30 semanas; Suplementação, Licopeno 10 mg/(kg massa corpórea/dia) ou óleo de milho oralmente por 10 semanas. Nd, não detectado. Teste T de Student foi usado para comparar diferença entre os grupos ($p < 0,05$), *C+Ly vs CHO+Ly.

Discussão

A obesidade está relacionada com a inflamação², alterações metabólicas e remodelamento cardíaco²⁷. Frente a isso, o objetivo do presente estudo foi verificar o efeito da suplementação com licopeno sobre o remodelamento cardíaco em ratos com obesidade induzida por dieta obesogênica (hipercalórica com alto teor de carboidrato simples e gordura).

Em 30 semanas a obesidade foi confirmada pelo maior índice de adiposidade nos animais que receberam a dieta CHO (CHO e CHO+Ly), mesmo diante de um menor consumo na quantidade de ração e similar ingestão calórica. Estes achados são justificados pela maior densidade energética (por grama da ração) da dieta hipercalórica com alto teor de carboidrato³⁷, confirmada pela eficiência alimentar que tem sido utilizada para verificar a conversão de ingestão alimentar em ganho de peso corporal³⁷. A ingestão alimentar, o ganho de peso, índice de adiposidade e ingestão calórica não sofreram influência da suplementação com licopeno.

Os resultados da 20ª e 30ª semana mostram comorbidades frequentemente associadas com a obesidade experimental, como a resistência à insulina e hipertensão arterial sistólica^{2,27}. O índice HOMA-IR, utilizado como indicador de resistência à insulina²⁷, somado aos dados de hiperinsulinemia mostram que a obesidade promoveu a resistência à insulina, desde que a normoglicemia foi mantida à custa de elevação dos níveis de insulina. Apesar de não alterar a hipertensão, a suplementação com licopeno normalizou os níveis de insulina e HOMA-IR atenuando a resistência à insulina (RI).

A RI se correlaciona intimamente com citocinas inflamatórias induzidas pela obesidade.³¹⁻³³ Muitas citocinas e mediadores inflamatórios, particularmente TNF- α , MCP-1, proteína C reativa (PCR) e interleucinas, estão regulados positivamente para RI.^{31,33,34} Animais deficientes em elementos inflamatórios, como o receptor TNF- α , são protegidos contra a RI.^{33,35,36} O próprio TNF- α prejudica a sinalização da insulina via fosforilação da serina do substrato receptor de insulina 1 (SRI-1) e reduz a expressão de GLUT-4, diminuindo assim a captação de glicose pelas células.³³ No entanto, uma maior sensibilidade à insulina é

acompanhada por uma inibição da via de sinalização IKK β (uma subunidade da I κ β quinase), um elemento-chave na inflamação dos tecidos.^{33,37,38} A via JNK também promove a fosforilação da serina em SR1-1 e, portanto, prejudica a sinalização da insulina. A ativação dessas vias pela inflamação contribuem para o desenvolvimento da RI.^{33,39}

A melhora da resistência à insulina observada no presente estudo pode em parte ser explicada pela propriedade anti-inflamatória do licopeno. De fato, prévios relatos já mostraram que a ação anti-inflamatória do licopeno pode estar envolvido no efeito benéfico no metabolismo da glicose.⁴⁰

Nossos dados de 20 semanas mostram que a dieta obeso foi associada à hipertensão e a alterações morfológicas e funcionais cardíacas características de remodelamento cardíaco, que constituem em mecanismo adaptativo do coração, em resposta ao aumento de sua atividade ou de sobrecarga funcional.⁴¹ Tal adaptação pode se dar tanto em resposta ao aumento da necessidade metabólica que impõe um aumento do débito cardíaco, condição fisiológica observada em resposta ao exercício físico. E também em resposta ao aumento de carga pressórica ou volume, condição observada como resposta adaptativa a condições patológicas como a hipertensão arterial⁴¹ verificada no presente estudo.

O resultado da sobrecarga de trabalho ao coração ocasionada pela hipertensão arterial traduz-se em um aumento de massa cardíaca devido ao crescimento dos miócitos e/ou do estroma conjuntivo, ocasionando a hipertrofia.^{42,43}

As hipertrofias podem ser consideradas como concêntricas e excêntricas.^{44,45} Nas hipertrofias concêntricas ocorre aumento de massa ventricular decorrente de aumento da espessura da parede e redução dos diâmetros cavitários. Tal condição surge em decorrência de um aumento de resistência à ejeção ou à sobrecarga de pressão^{41,42,45}. A redução dos diâmetros cavitários permite ao ventrículo desenvolver maior pressão.^{41,42,44,45} Nesse caso, a tensão ativa produzida pela maior massa ventricular é maior e, sendo menor o raio da cavidade, a pressão

resultante torna-se maior.^{41,46} Nas hipertrofias excêntricas ocorre um aumento de massa ventricular e da espessura da parede ventricular, mas com aumento dos diâmetros cavitários. Esta condição surge em decorrência de sobrecarga de volume.^{41,46}

O miocárdio interpreta essas sobrecargas de modo diferenciado, de tal forma que o resultado final nessas situações é bastante diferente, tanto em termos de mudanças na geometria ventricular quanto nas modificações bioquímicas produzidas nos componentes subcelulares, tais como as miofibrilas. A sobrecarga pressórica constitui um poderoso estímulo para a síntese proteica, onde o volume do miócito aumenta em consequência, principalmente, do aumento do diâmetro celular. Isso ocorre porque os novos sarcômeros são depositados em paralelo aos já existentes o que, conseqüentemente leva ao aumento do raio de cada miofibrila. Como resultado, o diâmetro dos miócitos onde este processo irá ocorrer também irá aumentar.^{41,46} Inicialmente, esse processo pode ser adaptativo para normalizar o estresse da parede e preservar o desempenho contrátil, mas com o tempo pode levar à descompensação e à insuficiência cardíaca.¹⁴

Dentre as vias conhecidas por gerar hipertrofia cardíaca, as citocinas pró-inflamatórias induzem tais alterações em modelos de sobrecarga de pressão por constrição da aorta⁹, falência cardíaca⁴⁷, isquemia⁴⁷, infarto agudo do miocárdio¹⁴, cardiomiopatia hipertrófica¹⁰ e exposição à fumaça de cigarro⁴⁸. Nosso modelo de obesidade mimetiza os achados decorrentes dos diferentes modelos com características mais agressivas.

O remodelamento cardíaco encontrado em 20 semanas foi mantido até o final do protocolo experimental no grupo CHO (vs C), enquanto que o licopeno foi capaz de impedir a progressão desde que controlou as variáveis ecocardiográficas EDSIV, Massa do VE e Espessura relativa da parede do VE

É importante ressaltar que a inflamação tem mostrado ser uma marca registrada proeminente do remodelamento ventricular.⁹ A IL-6 aumentada tem sido associada a hipertrofia cardíaca tanto *in vitro* como

in vivo.^{49,50} Também foi demonstrado que TNF- α e interferon gama promovem o remodelamento e insuficiência cardíaca.⁵¹ Infiltração intersticial de células inflamatórias envolvendo macrófagos, linfócitos T, fibrose, níveis elevados de expressão de citocinas (IL-6, IL-1 β e TNF- α), e ativação de vias de sinalização inflamatórias (fator nuclear kappa B, NF- κ B) correspondem a características de um coração patologicamente remodelado.^{10,11}

Além disso, foi demonstrado que a modulação de receptores e mediadores de células inflamatórias modifica o processo de remodelamento cardíaco.^{47,52,53} Alguns estudos já avaliaram a eficácia de anti-inflamatórios em atenuar o remodelamento cardíaco^{14,48}, mas até o momento não há relatos sobre a ação do licopeno em condição de remodelamento cardíaco induzido por obesidade.

Em 30 semanas a presença de inflamação cardíaca nos animais obesos foi constatada pelo aumento de TNF- α , IL-6 e MCP-1, enquanto a suplementação com licopeno foi capaz de reduzir tal aumento. A inflamação também esteve presente no tecido adiposo (TNF- α), contudo a suplementação com licopeno não foi capaz de atenuar o marcador. Esse fato mostra que a obesidade induzida por dieta obesa, pode influenciar diretamente a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo tecido cardíaco.

Marcotorchino e colaboradores⁵⁴ relataram o efeito anti-inflamatório do licopeno em macrófagos caracterizado por uma redução da expressão de TNF- α estimulada por LPS. O mecanismo molecular parece envolver as vias de sinalização JNK e NF- κ B⁵⁴. Em estudos realizados por nosso grupo, a suplementação de licopeno foi capaz de diminuir TNF- α nos rins de ratos obesos⁵⁵, diminuir os níveis de TNF- α , leptina, IL-6 no plasma e TNF- α , leptina, IL-6 e MCP-1 no tecido adiposo de animais obesos.²²

A expressão de citocinas inflamatórias também está relacionada com a ativação de metaloproteinases de matriz (MMP)¹³ que, possuem atividade colágenolítica, degradando as fibras colágenas cardíacas^{14,56}

responsáveis pela regulação da apoptose, restauração de deformações patológicas, manutenção do alinhamento das estruturas e regulação da distensibilidade do músculo cardíaco.⁵⁶

A ativação de metaloproteinases contribui para a cardiomiopatia por enfraquecimento da matriz colagenosa dos cardiomiócitos, ocasionando o remodelamento patológico^{12,56}. Destaca-se que a MMP-2 é uma das MMPs mais importantes para o desenvolvimento do remodelamento ventricular¹³.

A maior ativação de MMP-2 no grupo CHO (vs C) contribuiu para o remodelamento cardíaco patológico. A suplementação com licopeno, possivelmente devido a sua ação anti-inflamatória, promoveu a diminuição da ativação de MMP-2 no grupo CHO+Ly (vs CHO), consequentemente atenuando o remodelamento cardíaco induzido pela obesidade.

Em estudo onde realizou-se exclusão direcionada da MMP-2 houve atenuação da ruptura do ventrículo esquerdo e da remodelação pós-infarto⁵⁷. Estudos clínicos e experimentais tem mostrado que agentes farmacológicos diminuíram a ativação de MMP-2 e consequentemente melhoraram o remodelamento⁵⁸, tornando mais evidente a importância da MMP-2 no remodelamento cardíaco e de compostos que inibam sua ação, assim como o licopeno em nosso estudo.

Nossos resultados também corroboram o trabalho de Wang *et al*¹³, onde a suplementação com licopeno por 30 dias mostrou efeito cardioprotetor, sendo capaz de reverter o remodelamento cardíaco decorrente do infarto agudo do miocárdio.

Frente aos resultados obtidos pelo nosso trabalho, fica evidente que o licopeno é capaz de modular a inflamação ocasionada pela obesidade e atenuar o remodelamento cardíaco, apresentando-se como uma nova estratégia terapêutica coadjuvante no tratamento das alterações associadas à obesidade.

Conclusão

A ingestão de dieta hipercalórica (com alto teor de carboidrato simples e gordura) foi associada à obesidade, hipertensão, resistência à insulina, inflamação cardíaca e de tecido adiposo, aumento da ativação de metaloproteinase-2 no coração e remodelamento cardíaco patológico. A suplementação com licopeno foi capaz de atenuar a maioria dos resultados (com exceção de obesidade, hipertensão e inflamação tecido adiposo).

Nossos resultados comprovam o efeito cardioprotetor e anti-inflamatório do licopeno, apresentando-se como uma nova estratégia terapêutica coadjuvante no tratamento das alterações associadas à obesidade.

Referências

1. Francisqueti, F. V. *et al.* Effect of gamma-oryzanol as therapeutic agent to prevent cardiorenal metabolic syndrome in animals submitted to high sugar-fat diet. *Nutrients* **9**, (2017).
2. Francisqueti, F. V., Nascimento, A. F. & Correa, C. R. Obesidade, Inflamação e complicações metabólicas. *Nutrire* **40**, 81–89 (2015).
3. Gonzalez, A. B. *et al.* Body-Mass Index and Mortality among 1.46 Million White Adults. *N Engl J Med.* **363**, 2211–2219 (2010).
4. Siqueira, A. de S. E., Siqueira-Filho, A. G. de & Land, M. G. P. Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil. *Arq. Bras. Cardiol.* 39–46 (2017). doi:10.5935/abc.20170068
5. Bahia, L. *et al.* The costs of overweight and obesity-related diseases in the Brazilian public health system : cross-sectional study. 0–6 (2012).
6. Engin, A. The Definition and Prevalence of Obesity Metaboli Syndrome. *Obes. Lipotoxicity* **960**, (2017).
7. Section, C. Waist Circumference Adds to the Variance in Plasma C-Reactive Protein Levels in. **5**, 329–339 (2007).
8. Schäffler, A., Schölmerich, J. & Salzberger, B. Adipose tissue as an immunological organ: Toll-like receptors, C1q/TNFs and CTRPs. *Trends Immunol.* **28**, 393–399 (2007).
9. Yang, F. *et al.* Coronary artery remodeling in a model of left ventricular pressure overload is influenced by platelets and inflammatory cells. *PLoS One* **7**, (2012).
10. Kuusisto, J. *et al.* Low-grade inflammation and the phenotypic expression of myocardial fibrosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Heart* **98**, 1007–1013 (2012).
11. Erten, Y. *et al.* An association between inflammatory state and left ventricular hypertrophy in hemodialysis patients. *Ren. Fail.* **27**, 581–589 (2005).
12. Polegato, B. F. Mecanismos envolvidos na cardiotoxicidade aguda induzida pela doxorrubicina em ratos. (Faculdade de Medicina de

- Botucatu, 2011).
13. Wang, X. *et al.* Protective effect of lycopene on cardiac function and myocardial fibrosis after acute myocardial infarction in rats via the modulation of p38 and MMP-9. *J. Mol. Histol.* **45**, 113–120 (2014).
 14. Pereira, B. L. B. Influência da suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio. (2015).
 15. Schirone, L. *et al.* A Review of the Molecular Mechanisms Underlying the Development and Progression of Cardiac Remodeling. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 3920195 (2017).
 16. Ferreira, a L. *et al.* Tissue distribution of lycopene in ferrets and rats after lycopene supplementation. *J. Nutr.* **130**, 1256–1260 (2000).
 17. Ferreira, A. L. A. *et al.* Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **631**, 26–35 (2007).
 18. Azevedo, R. De *et al.* Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin , resistin and IL-6 in diet-induced obese rats British Journal of Nutrition. (2013). doi:10.1017/S0007114513001256
 19. Karppi, J., Laukkanen, J. A., Mäkitallio, T. H. & Kurl, S. Low serum lycopene and β -carotene increase risk of acute myocardial infarction in men. *Eur. J. Public Health* **22**, 835–840 (2012).
 20. Weisburger, J. H. Lycopene and Tomato Products in Health Promotion. *Exp. Biol. Med.* **227**, 924–927 (2017).
 21. Rao, A. V., Ray, M. R. & Rao, L. G. Lycopene. *Adv. Food Nutr. Res.* **51**, 99–164 (2006).
 22. Luvizotto, R. D. A. M. *et al.* Lycopene supplementation modulates plasma concentrations and epididymal adipose tissue mRNA of leptin, resistin and IL-6 in diet-induced obese rats. *Br. J. Nutr.* **110**, 1803–9 (2013).

23. Luvizotto, R., Nascimento, a., Miranda, N., Wang, X.-D. & Ferreira, a. Lycopene-rich tomato oleoresin modulates plasma adiponectin concentration and mRNA levels of adiponectin, SIRT1, and FoxO1 in adipose tissue of obese rats. *Hum. Exp. Toxicol.* (2015). doi:10.1177/0960327114551395
24. Engelhard, Y. N., Gazer, B., Paran, E. & Sheva, B. Natural antioxidants from tomato extract reduce blood pressure in patients with grade-1 hypertension : A double-blind , placebo-controlled pilot study. 1–6 (2005). doi:10.1016/j.ahj.2005.05.008
25. Kohlmeier, L. *et al.* Lycopene and myocardial infarction risk in the EURAMIC Study. *Am. J. Epidemiol.* **146**, 618–626 (1997).
26. Bansal, P. *et al.* Cardioprotective effect of lycopene in the experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury. 1–9 (2006). doi:10.1007/s11010-006-9141-7
27. Ferron, A. J. T. *et al.* Association between Cardiac Remodeling and Metabolic Alteration in an Experimental Model of Obesity Induced by Western Diet. *Nutrients* **10**, (2018).
28. Panchal, S. K. *et al.* High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **57**, 611–624 (2011).
29. Francisqueti, F. V. *et al.* Metabolic syndrome and inflammation in adipose tissue occur at different times in animals submitted to a high-sugar/fat diet. *J. Nutr. Sci.* 1–8 (2017). doi:10.1017/jns.2017.42
30. Tyagi, S. C., Matsubara, L. & Weber, K. T. Direct extraction and estimation of collagenase(s) activity by zymography in microquantities of rat myocardium and uterus. *Clin. Biochem.* **26**, 191–198 (1993).
31. Dandona, P., Aljada, A. & Bandyopadhyay, A. Inflammation the link between insulin resistance,. *Trends Immunol.* **25**, 4–7 (2004).
32. Xu, H. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J. Clin. Invest.*

- 112**, 1821–1830 (2003).
33. Yaribeygi, H., Farrokhi, F. R., Butler, A. E. & Sahebkar, A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J. Cell. Physiol.* **234**, 8152–8161 (2019).
34. Feinstein, R., Kanety, H., Papa, M. Z., Lunenfeld, B. & Karasik, A. Tumor necrosis factor- α suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. *J. Biol. Chem.* **268**, 26055–26058 (1993).
35. Uysal, K. T., Wiesbrock, S. M. & Hotamisligil, G. S. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF- α -mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* **139**, 4832–4838 (1998).
36. Ventre, J. *et al.* Targeted disruption of the tumor necrosis factor- α gene: Metabolic consequences in obese and nonobese mice. *Diabetes* **46**, 1526–1531 (1997).
37. Hundal, R. *et al.* Mechanism by which high-dose aspirin improves glucose metabolism in type 2 diabetes. **109**, 1321–1326 (2002).
38. Yuan, M. *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of I κ B β . *Science* (80-.). **293**, 1673–1677 (2001).
39. De Luca, C. & Olefsky, J. M. Inflammation and insulin resistance. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* **582**, 97–105 (2018).
40. Zeng, Z., He, W., Jia, Z. & Hao, S. Lycopene Improves Insulin Sensitivity through Inhibition of STAT3/Srebp-1c-Mediated Lipid Accumulation and Inflammation in Mice fed a High-Fat Diet. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **125**, 610–617 (2017).
41. Mill, J. G. & Vassallo, D. V. Hipertrofia cardíaca. **8**, 63–75 (2001).
42. Jalil, J. E. *et al.* Fibrillar collagen and myocardial stiffness in the intact hypertrophied rat left ventricle. *Circ. Res.* **64**, 1041–1050 (1989).
43. Weber, K. T. *et al.* Fibrillar collagen and remodeling of dilated

- canine left ventricle. *Circulation* **82**, 1387–1401 (1990).
44. Spotnitz, H. M. & Sonnenblick, E. H. Structural conditions in the hypertrophied and failing heart. *Am. J. Cardiol.* **32**, 398–406 (1973).
45. Weber, K. T. & Brilla, C. G. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium: Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* **83**, 1849–1865 (1991).
46. Anversa, P. & Loud, A. V. Left ventricular failure induced by myocardial. *Am. Physiol. Soc.* (1985).
47. Heymans, S. *et al.* Inflammation as a therapeutic target in heart failure? A scientific statement from the Translational Research Committee of the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *Eur. J. Heart Fail.* **11**, 119–129 (2009).
48. Minicucci, M. *et al.* A Pentoxifilina Atenua a Remodelação Cardíaca Induzida pela Exposição à Fumaça de Cigarros. 396–403 doi:10.5935/abc.20160057
49. Hilfiker-Kleiner, D. *et al.* Continuous glycoprotein-130-mediated signal transducer and activator of transcription-3 activation promotes inflammation, left ventricular rupture, and adverse outcome in subacute myocardial infarction. *Circulation* **122**, 145–155 (2010).
50. Hirota, H., Yoshida, K., Kishimoto, T. & Taga, T. Continuous activation of gp130, a signal-transducing receptor component for interleukin 6-related cytokines, causes myocardial hypertrophy in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 4862–4866 (1995).
51. Heymans, S. *et al.* Macrophage MicroRNA-155 promotes cardiac hypertrophy and failure. *Circulation* **128**, 1420–1432 (2013).
52. Velten, M. *et al.* Priming with synthetic oligonucleotides attenuates pressure overload-induced inflammation and cardiac hypertrophy in mice. *Cardiovasc. Res.* **96**, 422–432 (2012).
53. Melaku, S. L. & Desalegn, T. Molecular mediators, characterization of signaling pathways with descriptions of cellular

- distinctions in pathophysiology of cardiac hypertrophy and molecular changes underlying a transition to heart failure. *Int. J. Heal. allied Sci.* **8**, 1–24 (2019).
54. Marcotorchino, J. *et al.* Lycopene attenuates LPS-induced TNF- α secretion in macrophages and inflammatory markers in adipocytes exposed to macrophage-conditioned media. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 725–732 (2012).
55. Pierine, D. T. *et al.* Lycopene supplementation reduces TNF- α via RAGE in the kidney of obese rats. *Nutr. Diabetes* **4**, 1–6 (2014).
56. Jaoude, J. & Koh, Y. Matrix metalloproteinases in exercise and obesity. *Vasc. Health Risk Manag.* **12**, 287–295 (2016).
57. Bergman, M. R. *et al.* Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **292**, (2007).
58. Sakata, Y. *et al.* Activation of Matrix Metalloproteinases Precedes Left Ventricular Remodeling in Hypertensive Heart Failure Rats: Its Inhibition as a Primary Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor. *Circulation* **109**, 2143–2149 (2004).

Finis

ANEXO 1 – Certificado do comitê de ética em uso de animais

					
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA CAMPUS DE BOTUCATU FACULDADE DE MEDICINA		FACULDADE DE MEDICINA FMB		Comissão de Ética no Uso de Animais Criada através da Portaria DPM nº 611 de 13/12/2012	
CERTIFICADO Nº 1272/2018-CEUA					
Certificamos que a proposta intitulada: "Papel da suplementação com licopeno sobre o remodelamento cardíaco induzido por dieta: modelo experimental de obesidade em ratos." , conduzida pela Pesquisadora: Carol Cristina Vagula de Almeida Silva , Orientadora: Prof.ª Dr.ª Ana Lucia dos Anjos Ferreira , registrada com o nº 1272/2018, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião de 28 de junho de 2018.					
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica				
Vigência da autorização	30 de abril de 2020				
Espécie/Linhagem/Raça	Rato - Wistar				
Nº de animais	40				
Idade/Peso	30 dias / 80 gramas				
Sexo	Macho				
Origem	Biotério Central da UNESP - FMB				
Graziela Aparecida Berthani Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP		Prof. Adjunto Guilherme Antônio Moreira de Barros Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP			
Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.1600 e 3880.1609 E-mail: Secretaria.ceua@fmb.unesp.br					