

Resistência à Obesidade Promove Disfunção Contrátil Leve Associada com Trânsito Ca^{+2} Intracelular

Obesity Resistance Promotes Mild Contractile Dysfunction Associated with Intracellular Ca^{2+} Handling

Felipe Gonçalves dos Santos de Sá¹, Ana Paula Lima-Leopoldo¹, Bruno Barcellos Jacobsen¹, Artur Junio Togneri Ferron¹, Wagner Muller Estevam¹, Dijon Henrique Salomé Campos², Edson Castardeli¹, Márcia Regina Holanda da Cunha¹, Antonio Carlos Cicogna², André Soares Leopoldo¹

Centro de Educação Física e Desportos – Departamento de Desportos – Universidade Federal do Espírito Santo¹, Vitória, ES; Departamento de Clínica Médica – Faculdade de Medicina – Universidade Estadual Paulista², Botucatu, São Paulo – Brasil

Resumo

Fundamento: A obesidade induzida por dieta é frequentemente utilizada para demonstração de disfunção cardíaca. No entanto, alguns ratos, como humanos, são suscetíveis ao desenvolvimento de um fenótipo de obesidade, enquanto outros são resistentes.

Objetivo: Avaliar a relação entre resistência à obesidade e função cardíaca e o impacto da resistência à obesidade no trânsito de cálcio.

Métodos: Ratos Wistar machos com trinta dias de idade foram distribuídos em dois grupos com 54 animais cada: controle (C; dieta padrão) e obesos (quatro dietas palatáveis hiperlipídicas) por 15 semanas. Após o protocolo experimental, os ratos alimentados por dietas hiperlipídicas foram classificados de acordo com o índice de adiposidade e subdivididos em propensos à obesidade (PO) e resistentes à obesidade (RO). Foram avaliados o perfil nutricional, comorbidades e remodelação cardíaca. A função cardíaca foi avaliada pelo estudo do músculo papilar isolado em condições basais e após manobras inotrópicas.

Resultados: As dietas hiperlipídicas promoveram aumento na gordura corporal e no índice de adiposidade em ratos PO comparados com ratos C e RO. Os perfis de glicose, lipídios e pressão arterial permaneceram inalterados em ratos RO. Além disso, os ratos RO apresentaram peso total do coração e dos ventrículos direito e esquerdo mais baixos do que ratos PO, mas semelhantes aos ratos C. Os músculos cardíacos de todos os ratos apresentaram dados semelhantes na condição basal, mas a resposta miocárdica a um estímulo de contração pós-pausa estava comprometida em ratos PO e RO em comparação aos ratos C.

Conclusão: A resistência à obesidade promoveu alterações específicas na fase de contração, sem alterar a fase de relaxamento. Esta anormalidade leve pode estar relacionada com o trânsito intracelular de Ca^{+2} . (Arq Bras Cardiol. 2015; 105(6):588-596)

Palavras-chave: Resistência à Obesidade; Dieta Hiperlipídica; Função Cardíaca; Trânsito de Cálcio; Ratos.

Abstract

Background: Diet-induced obesity is frequently used to demonstrate cardiac dysfunction. However, some rats, like humans, are susceptible to developing an obesity phenotype, whereas others are resistant to that.

Objective: To evaluate the association between obesity resistance and cardiac function, and the impact of obesity resistance on calcium handling.

Methods: Thirty-day-old male Wistar rats were distributed into two groups, each with 54 animals: control (C; standard diet) and obese (four palatable high-fat diets) for 15 weeks. After the experimental protocol, rats consuming the high-fat diets were classified according to the adiposity index and subdivided into obesity-prone (OP) and obesity-resistant (OR). Nutritional profile, comorbidities, and cardiac remodeling were evaluated. Cardiac function was assessed by papillary muscle evaluation at baseline and after inotropic maneuvers.

Results: The high-fat diets promoted increase in body fat and adiposity index in OP rats compared with C and OR rats. Glucose, lipid, and blood pressure profiles remained unchanged in OR rats. In addition, the total heart weight and the weight of the left and right ventricles in OR rats were lower than those in OP rats, but similar to those in C rats. Baseline cardiac muscle data were similar in all rats, but myocardial responsiveness to a post-rest contraction stimulus was compromised in OP and OR rats compared with C rats.

Conclusion: Obesity resistance promoted specific changes in the contraction phase without changes in the relaxation phase. This mild abnormality may be related to intracellular Ca^{2+} handling. (Arq Bras Cardiol. 2015; 105(6):588-596)

Keywords: Obesity-Resistance; High-Fat Diet; Cardiac Function; Ca^{2+} Handling; Rats.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: André Soares Leopoldo •

Avenida Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras. CEP 29075-910, Vitória, ES – Brasil

E-mail: andresoaresleopoldo@gmail.com, andre.leopoldo@ufes.br

Artigo recebido em 11/05/15; revisado em 19/05/15; aceito em 28/07/15.

DOI: 10.5935/abc.20150134

Introdução

A obesidade é caracterizada por um excesso de massa adiposa influenciado por fatores genéticos e ambientais¹⁻³. Esta doença multifatorial é um fator de risco independente para distúrbios cardiovasculares como hipertensão arterial, arteriosclerose e doença coronariana^{1,4}.

A elucidação dos mecanismos envolvidos na disfunção cardíaca induzida pela obesidade requer a utilização de modelos adequados induzidos por dieta^{4,5-9}. No entanto, sabe-se que os ratos, como os humanos, mostram susceptibilidades diferentes para desenvolver obesidade induzida por dieta, sendo possível identificar subgrupos que desenvolvem obesidade e outros que mantêm um fenótipo magro apesar de uma alta ingestão calórica. Este subgrupo de ratos que não se tornam obesos mesmo quando alimentados com uma dieta hiperlipídica são categorizados como ratos resistentes à obesidade (RO)¹⁰⁻¹². Estes RO apresentam menor ganho de peso corporal (PC) e menores depósitos de gordura do que os ratos propensos à obesidade (PO) apesar de ingestão semelhante de energia^{10,13}. Resistência à obesidade reflete a habilidade de perceber com acurácia o balanço energético e responder ao consumo energético aumentado com respostas adaptativas que se opõem à de ganho de peso¹⁴.

Poucos estudos têm avaliado a correlação entre resistência à obesidade e função cardíaca e os mecanismos pelos quais a resistência à obesidade pode promover disfunção miocárdica ainda não são bem compreendidos. Carroll e cols.⁴ não identificaram qualquer anormalidade cardíaca em animais RO após 12 semanas. Por outro lado, Louis e cols.⁸ mostraram que ratos RO alimentados com uma dieta hiperlipídica por 17 semanas manifestaram disfunção cardíaca, refletida por um tempo significativamente maior de relaxamento isovolumétrico. Vários fatores têm sido propostos como contribuintes para a disfunção cardíaca em modelos de obesidade, entre eles mudanças no trânsito de cálcio (Ca^{+2})^{5,9,15}. No entanto, não é claro se as mudanças no trânsito de Ca^{+2} desempenham um papel crítico no desenvolvimento da disfunção miocárdica induzido pela resistência à obesidade.

Considerando a falta de informações sobre a função cardíaca e os mecanismos subjacentes ao envolvimento do trânsito de Ca^{+2} na resistência à obesidade, este estudo foi elaborado para testar a hipótese de que a resistência à obesidade não promove disfunção miocárdica ou prejudica o trânsito de Ca^{+2} em modelos de obesidade.

Métodos

Animais e Protocolo Experimental

Ratos Wistar machos com trinta dias de idade foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: controle (C, n = 54) e obeso (Ob, n = 54). O grupo C foi alimentado com uma dieta padrão (RC Focus 1765) e o grupo Ob foi exposto alternadamente a quatro dietas hiperlipídicas palatáveis (RC Focus 2413, 2414, 2415, and 2416; Agrocetes, Rio Claro, Brasil) como descrito anteriormente⁵. O tamanho da

amostra foi baseado em estudos anteriores realizados em nosso laboratório^{6,16-18}.

O PC foi registrado semanalmente após início do protocolo experimental. A obesidade foi baseada no ganho de PC e começou a se estabelecer na semana 3, como determinado previamente¹⁶. A partir desse momento, os ratos C e Ob foram mantidos em suas respectivas dietas por mais 15 semanas consecutivas.

Cuidados dos Animais

Os animais foram mantidos em um ambiente controlado com ar puro, ciclos de 12 horas de claro/escuro com início às 6h00 da manhã, temperatura mantida a $23 \pm 3^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 5\%$. Todos os procedimentos e experimentos foram realizados em conformidade com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *National Research Council* (1996), e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (UNESP, Botucatu, SP, Brasil), sob o número 1036.

Perfil Nutricional

O consumo alimentar, ingestão calórica (IC), eficiência alimentar (EA) e PC foram registrados semanalmente como descrito previamente⁵. Quinze semanas após a obesidade ter se desenvolvido, os animais foram anestesiados com injeção de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (0,5 mg/kg). Os animais foram então decapitados e toracotomizados e os depósitos de gordura foram dissecados e pesados. O índice de adiposidade foi calculado a partir da seguinte fórmula: $(\text{gordura corporal total}/\text{PC final}) \times 100$. A gordura corporal foi determinada pela somatória de cada depósito de gordura de acordo com a fórmula: $\text{Gordura corporal} = \text{gordura epididimal} + \text{gordura retroperitoneal} + \text{gordura visceral}$ ¹⁶.

Determinação da Obesidade e Resistência à Obesidade

Um critério baseado no índice de adiposidade foi utilizado para determinar a ocorrência de obesidade e resistência à obesidade, de acordo com vários autores^{4,11,19}. Após 15 semanas, os ratos alimentados com dietas hiperlipídicas foram classificados com base em seus índices de adiposidade. Dessa forma, neste estudo, ratos alimentados com dieta hiperlipídica que exibiram os maiores índices de adiposidade foram referidos como PO (n = 35), enquanto que aqueles que exibiram menores índices de adiposidade foram designados como RO (n = 19). Os ratos que não apresentaram o comportamento normal do grupo C quando alimentados com uma dieta padrão não foram mais utilizados (n = 15).

Pressão Arterial Sistólica (PAS)

Uma semana antes dos ratos serem eutanasiados, a PAS foi medida na cauda dos animais com um pletismógrafo de cauda. Os animais foram aquecidos em uma caixa de madeira a 40°C por 4 minutos para induzir vasodilatação arterial na cauda. Um sensor acoplado a um eletro-esfigmomanômetro ligado a um computador foi colocado na cauda e a PAS foi então medida com o uso de um programa específico (Biopac Systems Inc., CA, EUA).

Tolerância à Glicose e Índice de Resistência Insulínica (HOMA-IR)

Os experimentos foram realizados nos ratos C (n = 34), PO (n = 31) e RO (n = 13) após 15 semanas de tratamento. Após 4–6 horas de jejum, uma amostra de sangue foi coletada da ponta da cauda. O nível de glicemia (condição basal) de cada animal foi determinado imediatamente com um glicosímetro portátil (Accu-Chek Advantage; Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN). Posteriormente, uma injeção de solução de glicose dissolvida em água foi administrada intraperitonealmente (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA), e os níveis de glicose no sangue foram medidos após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos²⁰. O índice HOMA-IR reflete o grau de resistência à insulina e foi calculado com a seguinte fórmula: $HOMA-IR = [glicemia \text{ de jejum (mmol/l)} \times \text{insulinemia de jejum (mU/ml)}] / 22.5$.

Perfil Metabólico

Ao final do período experimental, os animais foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, e em seguida anestesiados com uma injeção intramuscular de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (0,5 mg/kg) e eutanasiados por decapitação. Foram colhidas amostras de sangue e o soro foi separado por centrifugação a 3.000 X g durante 15 minutos a 4°C e armazenado a -80°C até análise posterior. O soro foi utilizado para análise dos níveis de glicose, triglicerídeos (TG), colesterol total (Col-T), colesterol da lipoproteína de alta densidade (HDL), *colesterol da lipoproteína de baixa densidade* (LDL), insulina e leptina. Glicose, TG, Col-T, HDL e LDL foram medidos com um sistema de análise enzimática automático (Biochemical analyzer BS-200, Mindray, China). Os níveis de leptina e insulina foram determinados pelo método de ensaio de imunoadsorção por ligação enzimática (ELISA) com uso de kits comerciais (Linco Research Inc., St. Louis, MO, USA).

Análise Morfológica

Os ratos foram eutanasiados por toracotomia, e os corações, ventrículos e tibia foram separados, dissecados, pesados e medidos. A remodelação cardíaca foi determinada através da análise do peso do coração e dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD), e suas correlações com o comprimento da tibia.

Músculo Papilar Isolado

Para avaliar as propriedades intrínsecas contráteis e mecânicas do coração, o procedimento de isolamento papilar foi empregado como previamente descrito⁵. Este experimento foi realizado em ratos C (n = 36), PO (n = 35) e RO (n = 18). Os músculos papilares também foram avaliados na condição basal de 2,5 mM Ca^{+2} e após as manobras inotrópicas de aumento na concentração extracelular de Ca^{+2} e potencial pós-pausa (PPP) como descrito anteriormente⁵.

Análise Estatística

Todas as análises foram realizadas com o software SigmaStat 3.5 (SYSTAT Software Inc., San Jose, CA, USA). A distribuição das variáveis foi avaliada com o teste de Shapiro-Wilk e os

resultados foram relatados como médias \pm desvios-padrão. Comparações entre os grupos foram realizadas com ANOVA unifatorial para amostras independentes e teste *post hoc* de Tukey. ANOVA bifatorial para medidas repetidas foi utilizada para avaliar a tolerância à glicose e o trânsito de Ca^{+2} miocárdico. O nível de significância foi determinado em 5% ($\alpha = 0,05$).

Resultados

Características Gerais dos Grupos Experimentais

Não houve diferença no PC inicial entre os grupos (Tabela 1). A dieta hiperlipídica promoveu um aumento substancial na gordura corporal e no índice de adiposidade em ratos PO comparado com ratos C e RO. Especificamente, em comparação aos ratos C e RO, os ratos PO apresentaram respectivamente teor de gordura corporal 86,4% e 78,8% maior e índices de adiposidade 66,9% e 60,5%, mais elevados. Além disso, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, bem como o PC final foram maiores em ratos PO comparados com ratos C ou RO. Apesar da maior quantidade de energia na dieta hiperlipídica, a ingestão calórica foi semelhante entre os grupos devido a um consumo alimentar reduzido pelos ratos PO e RO em relação aos ratos C. Além disso, a EA foi maior no grupo PO em comparação ao grupo C. Embora os valores de EA tenham sido semelhantes em ratos PO e RO, este parâmetro mostrou um resultado inferior sem significância estatística em ratos RO quando comparados com ratos PO ($p = 0,077$).

Glicose, Insulina, HOMA-IR e Perfil Metabólico

Não houve diferenças estatísticas nos níveis de glicose e insulina entre os grupos (Figura 1 – A e B). No entanto, o perfil de glicose e o índice HOMA-IR foram significativamente afetados pela exposição à obesidade (Figura 1 – C e D). Os ratos PO apresentaram níveis mais altos de glicose nos tempos de 60, 90 e 120 minutos em comparação aos ratos C (Figura 1 – C). Além disso, não houve diferença estatística no perfil de glicose entre ratos C e RO (Figura 1 – C). A área sob a curva (AUC) para a glicose foi superior em ratos PO em relação aos ratos C (Tabela 2). Além disso, o índice HOMA-IR foi maior em ratos PO do que em ratos C e RO (Figura 1 – D). HDL, LDL, Col-T e PAS não foram significativamente diferentes entre os grupos (Tabela 2). No entanto, os níveis de TG foram maiores em ratos PO do que em ratos C. Além disso, os ratos PO exibiram níveis mais elevados de leptina quando comparados com ratos C e RO (Tabela 2).

Características Morfológicas

As características morfológicas dos ratos estão exibidas na Figura 2 (A – F). O peso absoluto do coração e o peso do VE, assim como suas correlações com o comprimento da tibia foram significativamente mais elevados em ratos PO comparados com ratos C e RO (Figura 2 – A, B, D e E). Além disso, os ratos PO mostraram maior peso de VD e correlação com o comprimento da tibia do que ratos C (Figura 2 – C e F). É interessante ressaltar que os comprimentos tibiais foram semelhantes entre os grupos.

Tabela 1 – Características dos grupos experimentais

Variáveis	Grupos		
	C (n = 39)	PO (n = 35)	RO (n = 19)
PCI (g)	150 ± 12	152 ± 11	152 ± 10
PCF (g)	486 ± 34	545 ± 46 [#]	492 ± 41
Ganho de peso (g)	336 ± 31	393 ± 44 [#]	340 ± 40
Gordura epididimal (g)	7,33 ± 1,72	12,9 ± 3,7 [#]	7,31 ± 1,94
Gordura retroperitoneal (g)	8,74 ± 2,09	17,8 ± 6,2 [#]	9,84 ± 2,58
Gordura visceral (g)	5,95 ± 1,34	10,6 ± 3,7 [#]	6,00 ± 1,21
Gordura corporal (g)	22,2 ± 4,1	41,3 ± 12,8 [#]	23,1 ± 4,3
Índice de adiposidade (%)	4,51 ± 0,73	7,53 ± 1,99 [#]	4,69 ± 0,67
CA (g/dia)	26,6 ± 1,9	22,4 ± 2,8 [*]	20,8 ± 3,0 [§]
IC (kcal/dia)	78,4 ± 5,7	81,6 ± 10,1	75,9 ± 10,9
EA (%)	2,40 ± 0,24	2,85 ± 0,50 [*]	2,59 ± 0,48

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão; n: Número de animais; C: Controle; PO: Propensos à obesidade; RO: Resistentes à obesidade; PCI: Peso corporal inicial; PCF: Peso corporal final; CA: Consumo alimentar; IC: Ingestão de calorías; EA: Eficiência alimentar; ^{*} C versus PO; ^p < 0,05; [§] C versus RO; ^p < 0,05; [#] PO versus RO, ^p < 0,05; ANOVA unifatorial para amostras independentes e teste post hoc de Tukey.

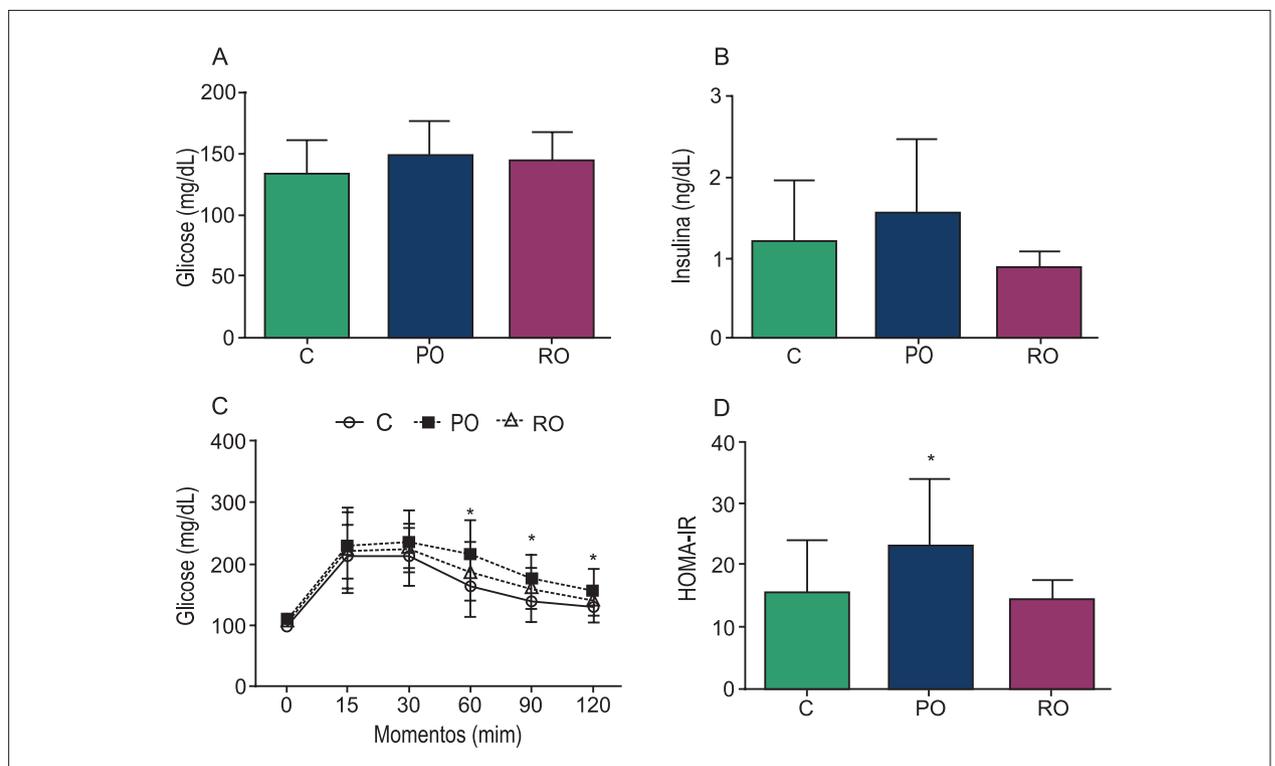


Figura 1 – Perfis hormonais e comorbidades; n = número de animais. A: Glicemia; B: Insulinemia; C: Níveis de glicemia após sobrecarga oral de glicose; D: Modelo homeostático para avaliar resistência insulínica (HOMA-IR) em ratos controle (C, círculos brancos; n = 34), propensos à obesidade (PO, quadrados pretos; n = 31) e resistentes à obesidade (RO, triângulos brancos; n = 13). Os valores são expressos como média ± desvio-padrão ^{*} C versus PO; ^p < 0,05.

Tabela 2 – Pressão arterial sistólica e perfis bioquímicos e hormonais

Variáveis	Grupos		
	C (n = 34)	PO (n = 31)	RO (n = 13)
AUC (mg/dL/min)	19823 ± 4166	23718 ± 4172*	21713 ± 3887
PAS (mmHg)	128 ± 8	132 ± 11	131 ± 11
Colesterol (mg/dL)	59,8 ± 14,0	67,2 ± 14,0	63,7 ± 9,1
Triglicerídeos (mg/dL)	54,6 ± 14,0	74,0 ± 26,2*	62,4 ± 25,7
HDL (mg/dL)	36,2 ± 22,0	38,9 ± 19,5	40,5 ± 19,3
LDL (mg/dL)	25,5 ± 10,1	28,4 ± 13,4	27,6 ± 14,1
Leptina (ng/mL) §	3,45 ± 5,47	6,70 ± 14,30**	3,25 ± 4,66

Os valores estão expressos como média ± desvio-padrão; n: Número de animais; C: Controle; PO: Propensos à obesidade; RO: Resistentes à obesidade; AUC: Área sob a curva para a glicose; PAS: Pressão arterial sistólica; HDL: Colesterol da lipoproteína de alta densidade; LDL: Colesterol da lipoproteína de baixa densidade; § Os valores estão expressos em mediana ± intervalo semi-interquartil; * C versus PO, p < 0,05; #PO versus RO, p < 0,05; ANOVA unifatorial para amostras independentes e teste post hoc de Tukey; §Kruskal-Wallis ANOVA unifatorial e teste post hoc de Dunn.

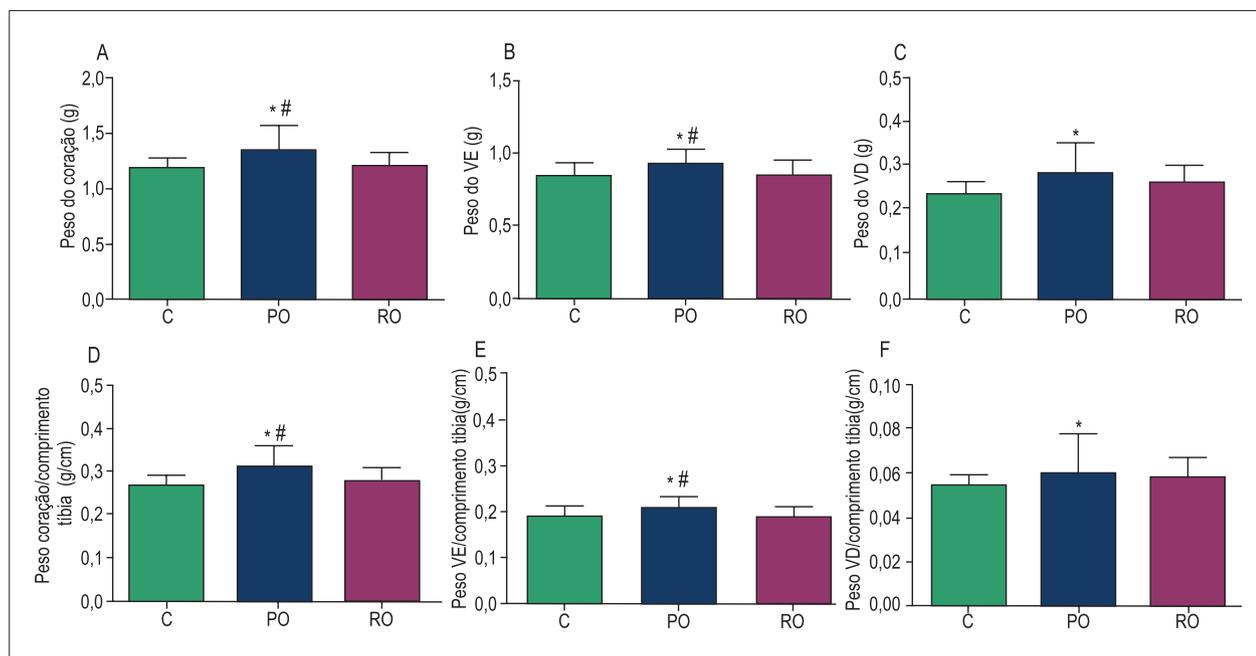


Figura 2 – Perfis morfológicos dos ratos controles (C, n = 39), propensos à obesidade (PO, n = 35) e resistentes à obesidade (RO, n = 19); n = número de animais. A: Peso do coração; B: Peso do ventrículo esquerdo (VE); C: Peso do ventrículo direito (VD); D: Peso do coração/comprimento da tibia; E: VE/comprimento da tibia; F: VD/comprimento da tibia. Os valores são expressos como média ± desvio-padrão. * C versus PO; p < 0,05; #PO versus RO, p < 0,05.

Tabela 3 – Dados de base da preparação muscular isolada

Variáveis	Grupos		
	C (n = 36)	PO (n = 35)	RO (n = 18)
TD (g/mm ²)	6,77 ± 1,68	6,10 ± 1,68	6,30 ± 1,37
TR (g/mm ²)	1,22 ± 0,44	1,03 ± 0,38	0,99 ± 0,27
+dT/dt (g/mm ² /s)	75,9 ± 18,8	70,6 ± 19,2	72,5 ± 16,2
-dT/dt (g/mm ² /s)	25,3 ± 5,3	24,9 ± 7,0	24,0 ± 5,2
AST (mm ²)	1,10 ± 0,25	1,14 ± 0,29	1,10 ± 0,35

Os valores estão expressos em média ± desvio-padrão; n: Número de animais; C: Controle; PO: Propensos à obesidade; RO: Resistentes à obesidade. Linha de base condição -2,5 mM [Ca²⁺]; TD: Tensão máxima desenvolvida normalizada pela área seccional transversa do músculo papilar; TR: Tensão de repouso normalizada pela área seccional transversa do músculo papilar; velocidade máxima de variação positiva (+ dT/dt) e negativa (-dT/dt) da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional transversa do músculo papilar; AST: Área de secção transversal; ANOVA unifatorial para amostras independentes e teste post hoc de Tukey.

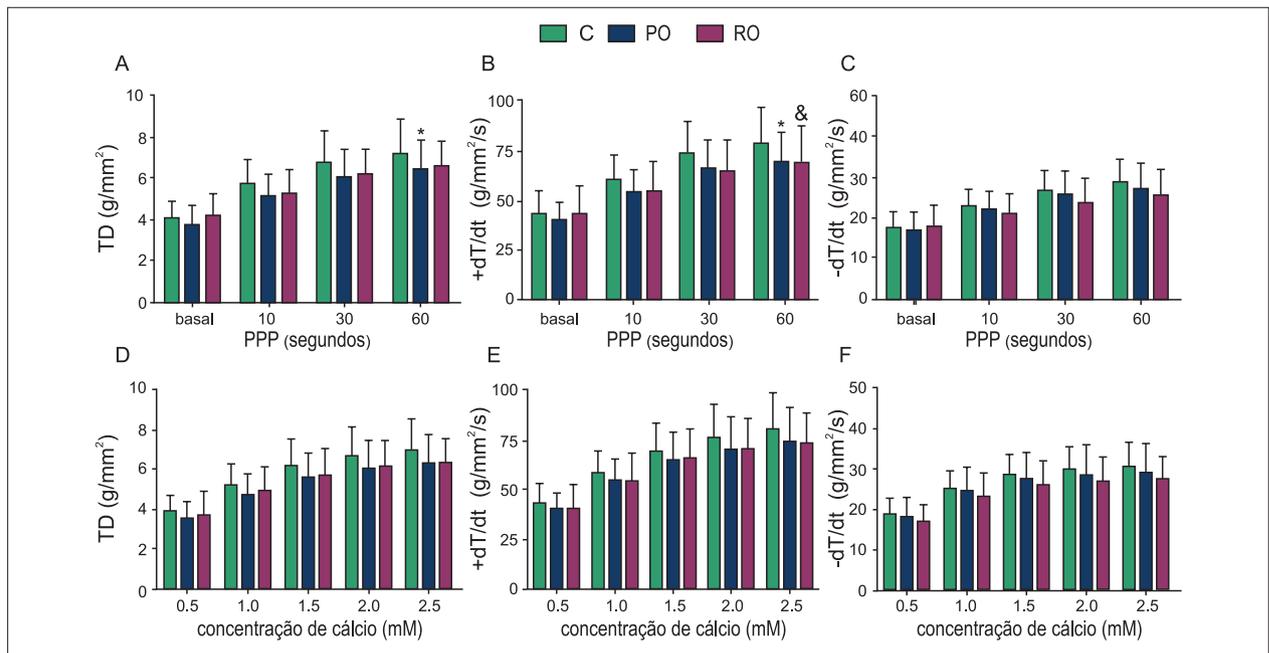


Figura 3 – Efeitos do potencial pós-pausa (PPP; A, B e C) e aumento na concentração de Ca^{2+} extracelular (D, E e F) no músculo papilar de ratos controle (C; $n = 36$), propensos à obesidade (PO; $n = 35$) e resistentes à obesidade (RO; $n = 18$). PPP basal: 0,5 mM $[Ca^{2+}]$. Os valores são expressos como média \pm desvio-padrão; $n =$ Número de animais. Tensão máxima desenvolvida (TD); velocidade máxima de variação positiva ($+dT/dt$) e negativa ($-dT/dt$) da tensão desenvolvida. *C versus PO; $p < 0,05$; & C versus RO; $p < 0,05$.

Análise da Função Miocárdica e Trânsito de Cálcio (Ca^{2+})

O desempenho da contração dos músculos papilares em condições basais (Ca^{2+} : 2,5 mM) foi semelhante para todos os parâmetros nos grupos C, PO e RO (Tabela 3). Após 60 segundos de PPP, a tensão máxima desenvolvida (TD) foi menor em ratos PO em comparação com ratos C (C: $7,2 \pm 1,7 g/mm^2$ versus PO: $6,4 \pm 1,4 g/mm^2$; Figura 3 – A). Embora este efeito tenha sido significativo apenas aos 60 segundos, o miocárdio de ratos PO também mostrou valores menores de TD em resposta ao PPP aos 30 segundos (C: $6,8 \pm 1,5 g/mm^2$ versus PO: $6,1 \pm 1,3 g/mm^2$; $p = 0,056$). O pico dos valores basais da velocidade máxima de variação positiva da tensão desenvolvida ($+dT/dt$) foi semelhante entre os ratos C, PO e RO quando submetidos à PPP aos 60 segundos, mas este parâmetro se mostrou reduzido em ratos PO e RO em comparação a ratos C (Figura 3 – B). Além disso, $+dT/dt$ em ratos PO e RO apresentou menores valores durante o PPP aos 30 segundos quando comparados com ratos C ($p = 0,075$ e $p = 0,076$, respectivamente), mas esses valores não foram significativamente diferentes entre os grupos (Figura 3 – B). A Figura 3 (D e E) mostra que a resistência à obesidade não afetou a TD e a $+dT/dt$ após o aumento na concentração extracelular de Ca^{2+} . Além disso, a obesidade e a resistência à obesidade não provocaram nenhum efeito significativo sobre a velocidade máxima de variação negativa da tensão desenvolvida ($-dT/dt$) na condição basal e após manobras nos grupos (Figura 3 - C e F).

Discussão

Apesar da obesidade e do sobrepeso serem cada vez mais generalizados, alguns indivíduos permanecem resistentes a

se tornarem obesos². Estudos anteriores mostraram que esta resistência à obesidade pode ser atribuída a mudanças na nutrição e padrões de adiposidade^{21,22}. A maioria dos seres humanos e animais que consomem dietas hiperlipídicas mostram um aumento no PC, com correspondente aumento nos níveis de adiposidade^{23,24}. Em comparação, alguns animais que são alimentados com dietas hiperlipídicas apresentam menor ganho de peso e adiposidade do que outros que são propensos à obesidade.

Poucos estudos têm avaliado e identificado as características cardíacas de ratos RO^{4,8,17}. Mesmo assim, a ocorrência de disfunção cardíaca e seus mecanismos são desconhecidos neste modelo animal. Curiosamente, há pouca informação disponível sobre a relação entre resistência à obesidade, função cardíaca e trânsito de Ca^{2+} . O achado mais importante do presente estudo foi que a resistência à obesidade promove disfunção miocárdica leve, e que este resultado se relacionou com dano na fase de contração. Acreditamos que este seja o primeiro estudo a relatar o papel do trânsito de Ca^{2+} no miocárdio de ratos RO.

Dietas hiperlipídicas têm sido utilizadas há décadas para caracterizar a obesidade e resistência à obesidade em roedores^{17,22,24,25}. Utilizando ratos machos alimentados com uma dieta hiperlipídica saturada por 20 semanas, estes estudos relataram que 42,5% e 40% dos ratos foram classificados como PO e RO, respectivamente. Além disso, Carroll e cols.⁴ encontraram que 12 semanas de uma dieta moderada em gorduras identificou 37,5% e 31,25% de ratos PO e RO, respectivamente. A dieta hiperlipídica utilizada no presente estudo foi suficientemente intensa e longa para promover obesidade em 64,8% dos ratos (PO), enquanto que 35,2% dos ratos não desenvolveram obesidade (RO).

A literatura revela que a resistência à obesidade é caracterizada por ganho de PC e adiposidade em um ritmo semelhante ou menor do que aquele em ratos alimentados com ração padrão^{12,13,26,27}. Os achados deste estudo mostram que os animais RO apresentaram PC final e depósitos de gordura significativamente menores em comparação aos do grupo PO, mas com características semelhantes às dos ratos C. Além disso, o índice de adiposidade foi 60,5% menor no grupo RO em comparação ao grupo PO. Esses resultados estão de acordo com os achados de vários outros estudos^{17,28}.

Estudos anteriores mostraram que a resistência à obesidade pode ocorrer devido a um aumento no gasto energético total, bem como a uma redução na ingesta alimentar^{11,13,21}. Joo e cols.²¹ observaram uma expressão aumentada de algumas enzimas termogênicas e expressão reduzida de enzimas lipogênicas nos tecidos adiposos de ratos RO alimentados com uma dieta hiperlipídica. A resistência à obesidade também mostrou supressão da lipogênese e aceleração da oxidação de ácidos graxos na gordura visceral¹³. Os autores sugeriram que estas características provavelmente contribuem para o fenótipo anti-obesidade em ratos. Além disso, Jackman e cols.¹⁴ demonstraram que para manter a homeostasia corporal, os animais RO tendem a diminuir sua ingesta alimentar e/ou a aumentar seu gasto de energia.

Muitos experimentos têm demonstrado que os distúrbios induzidos em ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica se assemelham a comorbidades humanas causadas pela obesidade, tais como intolerância à glicose, resistência à insulina, hipertensão e dislipidemia^{4,18,28-30}. Nos modelos RO, têm ocorrido controvérsias sobre a presença de comorbidades^{10,31}. No presente estudo, não houve alterações normalmente associadas com obesidade em ratos RO, pois a dieta hiperlipídica não foi capaz de promover mudanças nos perfis de glicose, lipídios, insulina, leptina ou pressão arterial. Nossos dados corroboram os de outros estudos nos quais a elevação dessas variáveis e/ou presença de comorbidades também não foi identificada^{4,10,31}. É importante mencionar que Carroll e cols.⁴ encontraram um aumento no HOMA-IR em ratos RO em comparação com ratos C.

A análise morfológica indicou que a resistência à obesidade não induziu remodelamento cardíaco como visto na obesidade humana⁴. Ao invés disso, ratos RO apresentaram peso cardíaco total e de VE e VD inferior aos de ratos PO. Enquanto que a obesidade promoveu alterações nas estruturas cardíacas, como o aumento do peso do VE (9%) e VD (21%) em comparação aos ratos C, os ratos RO exibiram apenas um leve aumento de 8,1% no peso do VD, sem mudança significativa no peso do VE. Vários fatores têm sido implicados no desenvolvimento da hipertrofia ventricular em modelos de obesidade, incluindo insulina e leptina^{18,32,33}. Nossos resultados sugerem que a leptina e a insulina não aumentaram suficientemente para promover remodelação cardíaca em ratos RO.

O objetivo da presente investigação foi o de estudar as mudanças no desempenho do miocárdio no VE utilizando o método de análise do músculo papilar isolado. Várias investigações têm utilizado atualmente estas

manobras para identificar alterações nas fases de contração e relaxamento que podem não ser observadas em condições basais^{9,19,34,35}. Junto com a ausência de aumento de PC ou gordura nos ratos RO, a função cardíaca não se alterou significativamente após exposição a uma dieta hiperlipídica em condições basais. Todavia, a resposta miocárdica à PPP se mostrou comprometida com mudanças específicas na fase de contração, mas sem alterações na fase de relaxamento. Nossos dados discordam dos de Louis e cols.⁸ que demonstraram que ratos RO alimentados com uma dieta hiperlipídica por 17 semanas apresentaram disfunção cardíaca na fase de relaxamento. Apesar da ausência de disfunção cardíaca nas condições basais, a estimulação da PPP forneceu evidências de que o comprometimento da contração miocárdica visto em ratos RO estava relacionado a mudanças no trânsito intracelular de Ca^{+2} . No entanto, há poucos estudos que relataram um comprometimento do trânsito intracelular de Ca^{+2} levando à disfunção miocárdica em roedores RO. Em miócitos cardíacos, o Ca^{+2} desempenha um papel importante na performance cardíaca e nos processos fisiológicos^{15,36}. De acordo com Bögeholz e cols.³⁶, há três maneiras principais de modular a função contrátil de miofilamentos, (1) alteração da concentração citossólica de Ca^{+2} , (2) mudança mecânica na pré-tensão e (3) estimulação catecolaminérgica.

Uma possível explicação para o comprometimento da contração mediado por $+dT/dt$ em ratos RO pode estar relacionada à regulação negativa do sistema β -adrenérgico³⁷, a qual não foi observada neste estudo. A inotropia positiva em resposta à estimulação β envolve várias vias como a) fosforilação de canais de Ca^{+2} da membrana plasmática pela proteína quinase A aumentando a entrada de Ca^{+2} para o interior da célula, b) fosforilação de fosfolambam e receptor de rianodina (RyR), aumentando as reservas de Ca^{+2} e liberação de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático, respectivamente e c) aumento da velocidade de encurtamento da actomiosina, o que aumenta o ciclo de pontes cruzadas^{37,38}. Tem sido relatado que mudanças no sistema β -adrenérgico podem reduzir os canais de Ca^{+2} do tipo L e a atividade da RyR através da regulação dos seus estados de fosforilação em modelos de obesidade^{5,23,39,40}.

Conclusão

Em resumo, os resultados desta investigação demonstram que uma mudança leve na função miocárdica causada pela resistência à obesidade está relacionada a um comprometimento específico na contração sem alterações na fase de relaxamento. Futuros estudos são necessários para avaliar o dano ao trânsito intracelular de Ca^{+2} , bem como o sistema β -adrenérgico em modelos de roedores com RO.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado por bolsa da FAPES, ES, Brasil, processo n° 53618009/2011 Este manuscrito foi revisado e editado por nativos em inglês (BioMed Proofreading).

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Obtenção de financiamento: Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS; Obtenção de dados: Sá FGS, Jacobsen BB, Ferron AJT, Estevam WM, Campos DHS, Castardeli E; Análise e interpretação dos dados: Sá FGS, Jacobsen BB, Ferron AJT, Estevam WM, Campos DHS, Castardeli E, Cunha MRH; Redação do manuscrito: Sá FGS, Lima-Leopoldo AP, Cicogna AC, Leopoldo AS; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Lima-Leopoldo AP, Castardeli E, Cunha MRH, Cicogna AC, Leopoldo AS.

Referências

1. Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev*. 2008;88(2):389-419.
2. Butcherick TA, Billington CJ, Kotz CM, Nixon JP. Orexin: pathways to obesity resistance? *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(4):357-64.
3. Choi JW, Wang X, Joo JI, Kim DH, Oh TS, Choi DK, et al. Plasma proteome analysis in diet-induced obesity-prone and obesity-resistant rats. *Proteomics*. 2010;10(24):4386-400. Erratum in: *Proteomics*. 2012;12(10):1717.
4. Carroll JF, Joabe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006;48(1):65-72.
5. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, do Nascimento AF, de Campos DH, Luvizotto Rde A, et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2a in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol*. 2011;226(11):2934-42.
6. Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, do Nascimento AF, Luvizotto Rde A, de Campos DH, et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol*. 2010;26(8):423-9.
7. Liu J, Lloyd SG. High-fat, low-carbohydrate diet alters myocardial oxidative stress and impairs recovery of cardiac function after ischemia and reperfusion in obese rats. *Nutr Res*. 2013;33(4):311-21.
8. Louis XL, Thandapilly SJ, MohanKumarSK, Yu L, Taylor CC, Zahradka P, et al. Treatment with low-dose resveratrol reverses cardiac impairment in obese prone but not in obese resistant rats. *J Nutr Biochem*. 2012;23(9):1163-9.
9. Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson CE, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*. 2006;24(3):549-61.
10. Tulipano G, Vergoni AV, Soldi D, Muller EE, Cocchi D. Characterization of the resistance to the anorectic and endocrine effects of leptin in obesity-prone and obesity-resistant rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol*. 2004;183(2):289-98.
11. Levin BE, Keeseey RE. Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 2):R412-9.
12. Madsen AN, Hansen G, Paulsen SJ, Lykkegaard K, Tang-Christensen M, Hansen HS, et al. Long-term characterization of the diet-induced obese and diet-resistant rat model: a polygenetic rat model mimicking the human obesity syndrome. *J Endocrinol*. 2010;206(3):287-96.
13. Akieda-Asai S, Koda S, Sugiyama M, Hasegawa K, Furuya M, Miyazato M, et al. Metabolic features of rats resistant to a high-fat diet. *Obes Res Clin Pract*. 2013;7(4):e243-50.
14. Jackman MR, MacLean PS, Bessesen DH. Energy expenditure in obesity-prone and obesity-resistant rats before and after the introduction of a high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299(4):R1097-105.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado por FAPES/ES.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Bruno Barcellos Jacobsen e Artur Junio Togneri Ferron pela Universidade Federal do Espírito Santo.

15. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
16. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, da Silva DC, do Nascimento AF, de Campos DH, Luvizotto RA, et al. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation at serine-16 without affecting calcium handling. *J Appl Physiol* (1985). 2014;117(6):669-78.
17. Oliveira Junior SA, Dal Pai-Silva M, Martinez PF, Campos DH, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, et al. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit*. 2010;16(7):BR208-17.
18. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DC, Nascimento AF, Campos DH, Luvizotto RA, et al. Influence of long-term obesity on myocardial gene expression. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(3):229-37.
19. Boustany-Kari CM, Gong M, Akers WS, Guo Z, Cassis LA. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)*. 2007;31(11):1652-9.
20. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. 2005;48(6):1229-37.
21. Joo JI, Oh TS, Kim DH, Choi DK, Wang X, Choi JW, et al. Differential expression of adipose tissue proteins between obesity-susceptible and -resistant rats fed a high-fat diet. *Proteomics*. 2011;11(8):1429-48.
22. Schrauwen P, Westterterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr*. 2000;84(4):417-27.
23. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)*. 2007;15(14):798-808.
24. Lin YC, Huang J, Kan H, Castranova V, Frisbee JC, Yu HG. Defective calcium inactivation causes long QT in obese insulin-resistant rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(4):H1013-22.
25. Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, Keeseey RE. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol*. 1997;273(2 Pt 2):R725-30.
26. Kus V, Prazak T, Brauner P, Hensler M, Kuda O, Flachs P, et al. Induction of muscle thermogenesis by high-fat diet in mice: association with obesity-resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(2):E356-67.
27. Paulino Nascimento A, Monte-Alto-Costa A. Both obesity-prone and obesity-resistant rats present delayed cutaneous wound healing. *Br J Nutr*. 2011;106(4):603-11.
28. Lauterio TJ, Bond JP, Ulman EA. Development and characterization of a purified diet to identify obesity-susceptible and resistant rat populations. *J Nutr*. 1994;124(11):2172-8.
29. Dobrian AD, Davies MJ, Prewitt RL, Lauterio TJ. Development of hypertension in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2000;35(4):1009-15.

Artigo Original

30. White PA, Cercato LM, Araújo JM, Souza LA, Soares AF, Barbosa AP, et al. [Model of high-fat diet-induced obesity associated to insulin resistance and glucose intolerance]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2013;57(5):339-45.
31. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2000;24(5):639-46.
32. Garcia JA, Incerpi EK. Factors and mechanisms involved in left ventricular hypertrophy and the anti-hypertrophic role of nitric oxide. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90(6):409-16.
33. Rajapurohitam V, Izaddoustdar F, Martinez-Abundis E, Karmazyn M. Leptin-induced cardiomyocyte hypertrophy reveals both calcium-dependent and calcium-independent/RhoA-dependent calcineurin activation and NFAT nuclear translocation. *Cell Signal*. 2012;24(12):2283-90.
34. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Sugizaki MM, Bruno A, Nascimento AF, Luvizotto RA, et al. Myocardial dysfunction and abnormalities in intracellular calcium handling in obese rats. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(3):232-40.
35. du Toit EF, Nabben M, Lochner A. A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol*. 2005;100(4):346-54.
36. Bögeholz N, Muszynski A, Pott C. The physiology of cardiac calcium handling. *Wien Med Wochenschr*. 2012;162(13-14):278-82.
37. Katz AM. Physiology of the heart. In: Katz AM. Heart failure. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 546-81.
38. Carroll JF. Post-beta-receptor defect in isolated hearts of obese-hypertensive rabbits. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1999;23(8):863-6.
39. Paulino E, Ferreira JC, Bechara LR, Tsutsui JM, Mathias W Jr, Lima FB, et al. Exercise training and caloric restriction prevent reduction in cardiac Ca²⁺-handling protein profile in obese rats. *Hypertension*. 2010;56(4):629-35.
40. Ullrich ND, Valdivia HH, Niggli E. PKA phosphorylation of cardiac ryanodine receptor modulates SR luminal Ca²⁺ sensitivity. *J Mol Cell Cardiol*. 2012;53(1):33-42.