

## Perfis Cardíaco, Metabólico e Molecular de Ratos Sedentários no Momento Inicial da Obesidade

*Cardiac, Metabolic and Molecular Profiles of Sedentary Rats in the Initial Moment of Obesity*

Bruno Barcellos Jacobsen,<sup>1</sup> Ana Paula Lima Leopoldo,<sup>1</sup> Jóctan Pimentel Cordeiro,<sup>1</sup> Dijon Henrique Salomé de Campos,<sup>2</sup> André Ferreira do Nascimento,<sup>3</sup> Mário Mateus Sugizaki,<sup>3</sup> Antônio Carlos Cicogna,<sup>2</sup> Carlos Roberto Padovani,<sup>2</sup> André Soares Leopoldo<sup>1</sup>

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES),<sup>1</sup> Vitória, ES; Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina - UNESP,<sup>2</sup> Botucatu, SP; Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT),<sup>3</sup> SINOP, MT - Brasil

### Resumo

**Fundamentos:** Diferentes tipos de dietas hiperlipídicas e/ou hipercalóricas têm sido usados para induzir obesidade em roedores. No entanto, poucos estudos relataram os efeitos da obesidade induzida por dieta hiperlipídica em sua fase inicial sobre a remodelação cardíaca funcional e estrutural.

**Objetivo:** Caracterizar o momento inicial da obesidade e investigar parâmetros metabólicos e cardíacos. Além disso, analisar o papel do trânsito de  $\text{Ca}^{2+}$  em curtos períodos de exposição à obesidade.

**Métodos:** Ratos Wistar com idade de 30 dias foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n = 19 em cada grupo): controle (C, dieta padrão) e dieta hiperlipídica (HL, dieta rica em gordura insaturada). O momento inicial da obesidade foi definido por medidas semanais do peso corporal, complementadas pelo índice de adiposidade (IA). A remodelação cardíaca foi avaliada por análise morfológica, histológica, ecocardiográfica e funcional dos músculos papilares. Proteínas envolvidas no trânsito de  $\text{Ca}^{2+}$  foram determinadas por Western Blot.

**Resultados:** O momento inicial da obesidade ocorreu na terceira semana. Em comparação aos ratos C, os animais HL apresentaram maior peso corporal final (4%), gordura corporal (20%), IA (14,5%), níveis de insulina (39,7%), leptina (62,4%) e lipoproteína de baixa densidade (15,5%), mas não apresentaram alterações na pressão sistólica. A avaliação ecocardiográfica não mostrou alterações nos parâmetros cardíacos. No grupo HL, observou-se um aumento no  $+dT/dt$  (C:  $52,6 \pm 9,0$  g/mm<sup>2</sup>/s e HL:  $68,0 \pm 17,0$  g/mm<sup>2</sup>/s;  $p < 0,05$ ) muscular. Além disso, não houve alterações na expressão cardíaca de proteínas envolvidas no trânsito de  $\text{Ca}^{2+}$ .

**Conclusão:** O momento inicial da obesidade promove alterações nos perfis hormonais e lipídicos sem causar danos cardíacos ou mudanças no trânsito de  $\text{Ca}^{2+}$ . (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(5):432-439)

**Palavras-chave:** Ratos; Obesidade; Dieta Hiperlipídica; Função cardíaca; Cálcio; Adiposidade.

### Abstract

**Background:** Different types of high-fat and/or high-energy diets have been used to induce obesity in rodents. However, few studies have reported on the effects observed at the initial stage of obesity induced by high-fat feeding on cardiac functional and structural remodelling.

**Objective:** To characterize the initial moment of obesity and investigate both metabolic and cardiac parameters. In addition, the role of  $\text{Ca}^{2+}$  handling in short-term exposure to obesity was verified.

**Methods:** Thirty-day-old male Wistar rats were randomized into two groups (n = 19 each): control (C; standard diet) and high-fat diet (HF, unsaturated high-fat diet). The initial moment of obesity was defined by weekly measurement of body weight (BW) complemented by adiposity index (AI). Cardiac remodelling was assessed by morphological, histological, echocardiographic and papillary muscle analysis.  $\text{Ca}^{2+}$  handling proteins were determined by Western Blot.

**Results:** The initial moment of obesity occurred at the 3<sup>rd</sup> week. Compared with C rats, the HF rats had higher final BW (4%), body fat (20%), AI (14.5%), insulin levels (39.7%), leptin (62.4%) and low-density lipoprotein cholesterol (15.5%) but did not exhibit alterations in systolic blood pressure. Echocardiographic evaluation did not show alterations in cardiac parameters. In the HF group, muscles were observed to increase their  $+dT/dt$  (C:  $52.6 \pm 9.0$  g/mm<sup>2</sup>/s and HF:  $68.0 \pm 17.0$  g/mm<sup>2</sup>/s;  $p < 0.05$ ). In addition, there were changes in the cardiac expression of  $\text{Ca}^{2+}$  handling proteins.

**Conclusion:** The initial moment of obesity promotes alterations to hormonal and lipid profiles without cardiac damage or changes in  $\text{Ca}^{2+}$  handling. (Arq Bras Cardiol. 2017; 109(5):432-439)

**Keywords:** Rats; Obesity; Diet, High-Fat; Cardiac function; Calcium; Adiposity.

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

Correspondência: André Soares Leopoldo •

Avenida Fernando Ferrari, 514, CEP 29075-410, Goiabeiras, Vitória, ES - Brasil

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

Artigo recebido em 21/11/2016, revisado em 28/04/2017, aceito em 28/04/2017

DOI: 10.5935/abc.20170151

## Introdução

A obesidade é considerada uma importante síndrome do século XXI que alcançou proporções epidêmicas em todo o mundo nas últimas décadas.<sup>1,2</sup> De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o número de pessoas com sobrepeso ultrapassou um bilhão de pessoas, sendo que mais de 30% dessa população é obesa.<sup>3</sup> A obesidade é uma doença complexa e, enquanto alguns autores sugeriram que fatores genéticos contribuam para seu desenvolvimento,<sup>4</sup> a maioria dos estudos enfatizam que as principais causas da obesidade são os chamados fatores exógenos, particularmente o consumo e a alta disponibilidade de alimentos palatáveis, e a falta de exercícios físicos.<sup>2,5</sup>

Diferentes tipos de dietas hiperlipídicas (HL) e/ou hipercalóricas são utilizadas para induzir a obesidade e simular, em roedores, a síndrome metabólica que ocorre em humanos.<sup>6-11</sup> No entanto, poucos estudos investigaram o estágio inicial da obesidade induzida por uma dieta rica em gorduras. Pesquisadores observaram o momento inicial da obesidade em animais alimentados por uma dieta HL após 4 semanas de tratamento.<sup>12-15</sup> Contudo, não foram apresentados parâmetros moleculares e cardíacos nesse estágio inicial.

Estudos mostraram que o excesso de gordura causa anormalidades cardiovasculares que se correlacionam com a duração e a intensidade da obesidade tanto em modelos com humanos como em modelos com animais.<sup>16-20</sup> Assim, torna-se necessário identificar a duração e a intensidade dos danos no período inicial da doença. Além disso, é importante verificar os mecanismos envolvidos nesse processo, uma vez que estudos mostraram que distúrbios no trânsito de  $Ca^{2+}$  podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de disfunção cardíaca em modelos de obesidade induzidos por uma dieta HL.

Devido à ausência de estudos, nosso objetivo foi caracterizar o momento inicial da obesidade e investigar tantos parâmetros metabólicos como cardíacos em ratos obesos. Além disso, avaliamos o papel do trânsito de  $Ca^{2+}$  em curtos períodos de exposição à obesidade.

## Métodos

### Cuidado dos animais

Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*) publicado pelo Instituto Nacional de Saúde dos EUA (*U.S. National Institutes of Health*) e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP, Botucatu, SP, Brasil) (número -PE-5/2009).

Ratos Wistar com idade de 30 dias foram distribuídos em dois grupos – controle (C, n = 19) e dieta HL (n = 19). O grupo C recebeu uma dieta padrão contendo 12,3% de sua energia de gordura, 57,9% de carboidratos, e 29,8% de proteína. O grupo HL recebeu quatro dietas (RC Focus 2413, 2414, 2415, e 2416) que se diferiram quanto ao sabor, mas não quanto ao teor de micro e macronutrientes. As dietas HLs continham 49,2% de sua energia em gordura, 28% em carboidratos, e 21,9% em proteína, como descrito anteriormente.<sup>17</sup> Todos os ratos foram mantidos em gaiolas

individuais em um ambiente de ar limpo e temperatura e umidade controladas  $-23 \pm 3^\circ\text{C}$ , em um ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acessas às 6h da manhã) e umidade relativa de  $60 \pm 5\%$ . Após o início do protocolo experimental, o consumo alimentar (CA), a Ingestão calórica (IC), a eficiência alimentar (EA) e o peso corporal (PC) foram analisados semanalmente. A IC correspondeu ao consumo alimentar médio semanal multiplicado pelo valor energético (kcal) da dieta. A EA (%) é a habilidade de converter o IC em PC, determinada pela média do ganho de peso (g) dividido pela ingestão energética total (Kcal)  $\times 100$ .

### Caracterização do momento inicial da obesidade

Após o início do protocolo experimental, o peso corporal (PC) foi registrado uma vez por semana para caracterizar o momento inicial da obesidade. Quando os grupos C e HL apresentaram diferença significativa no PC, os animais foram anestesiados por injeção intraperitoneal de cetamina (50 mg/kg) e xilazina (0.5 mg/kg), decapitados e toracotomizados, e o tecido adiposo dissecado e pesado. O momento inicial da obesidade foi definido por medidas de PC (g) registrados semanalmente, complementadas pelo índice de adiposidade (IA) *post-mortem* utilizando a fórmula:  $IA = [\text{gordura corporal (GC)} / \text{PC}] \times 100$ . A GC (g) foi medida pela soma dos seguintes constituintes do tecido adiposo: gordura epididimal + gordura retroperitoneal + gordura visceral.

### Pressão sistólica

A pressão sistólica da cauda do rato foi medida uma semana anterior à eutanásia utilizando-se um pletismógrafo de cauda. Os animais foram mantidos em uma caixa de madeira a  $40^\circ\text{C}$  por 4 minutos para vasodilatação da artéria da cauda, e em seguida transferidos para um suporte cilíndrico de ferro. Um sensor foi colocado na região proximal da cauda e acoplado a um esfigmomanômetro eletrônico (*Narco BioSystem, International Biomedical Inc, TX, EUA*). O esfigmomanômetro eletrônico foi conectado a um computador, e a PAS medida usando-se o programa Biopac software (Biopac Systems Inc., CA, EUA).

### Teste de tolerância à insulina (TTI)

As amostras de sangue foram coletadas da extremidade da cauda em condição basal e após administração intraperitoneal de insulina regular (Novolin® R, Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) a uma dose de 1,5 UI/kg de peso corporal.<sup>21</sup> As amostras de sangue para dosagem de glicose foram coletadas em 0 (basal), 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. Os níveis de glicose foram determinados usando um glicosímetro manual (Accu-Chek Advantage; Roche Diagnostics Co., Indianápolis, EUA). A resistência insulínica foi determinada a partir da área sob a curva (AUC; 0-30 minutos) para glicose.

### Avaliação ecocardiográfica

Uma semana anterior à eutanásia, realizou-se avaliação ecocardiográfica por meio de umecardiógrafo disponível comercialmente (Philips HDI-5000), e as variáveis estruturais do ventrículo esquerdo (VE) foram analisadas conforme descrito anteriormente.<sup>22</sup>

### Perfil metabólico e hormonal

As amostras de sangue foram coletadas, e o soro separado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos a 4°C. Foram analisados os níveis de glicose, colesterol total (CT), lipoproteína de alta densidade (HDL), lipoproteína de baixa densidade (LDL), e dos hormônios insulina e leptina. Os níveis de glicose, CT, HDL e LDL foram medidos por um sistema automático de análise enzimática (*Biochemical analyzer BS-200*, Mindray, China). Os níveis de leptina e de insulina foram determinados pelo método de imunoabsorção enzimática (ELISA), usando-se kits comerciais (*Linco Research Inc.*, St. Louis, MO, EUA).

### Análise morfológica e histológica

Após o momento inicial da obesidade, foram registrados o peso do coração, a razão peso do coração/peso corporal final, área seccional transversa do músculo papilar e fração de colágeno de cada grupo.

### Estudo funcional do músculo papilar isolado

Os músculos papilares isolados do VE foram avaliados conforme descrito anteriormente.<sup>17</sup> Os músculos papilares foram avaliados em condição basal ( $\text{Ca}^{2+}$  a 2,5 mM), na Contração pós-pausa (CPP) e após elevação da concentração extracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . A CPP foi estudada a uma concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de 0,5 mM, na qual o estímulo foi interrompido por 10, 30 e 60 segundos antes de se reiniciar a estimulação. As respostas inotrópicas foram registradas 5 minutos após adição de cada dose extra de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (0,5; 1,0; 1,5; 2,0, e 2,5 mM) à solução do banho.

### Western Blot

O tecido do VE (C; n = 6; HL; n = 6) foi analisado por *Western Blot* para quantificar a expressão de canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L, fosfolamban (PLB) e  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) como descrito anteriormente.<sup>20</sup> Foram obtidos anticorpos específicos contra SERCA2 (ABR, Affinity BioReagents, CO, EUA; MA3-910, 1:2,500), PLB (ABR, Affinity BioReagents, CO, EUA; MA3-922, 1:500) e canal de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo L alfa 1C (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; C4980, 1:200). A ligação do anticorpo primário foi detectada com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (coelho ou camundongo, dependendo da proteína). A quantificação dos blots foi realizada pelo programa Scion Image (Scion com base nas imagens do *National Institutes of Health*). As bandas-alvo foram normalizadas à expressão de  $\beta$ -actina utilizando-se um anticorpo (SC81178; 1:1000) obtido da Santa Cruz Biotechnology (CA, EUA).

### Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa Sigma Stat 3.5 (SYSTAT Software Inc., San Jose, CA, EUA). A distribuição das variáveis foi avaliada quanto à normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (DP). Comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste t de *Student* para amostras independentes e análise de variância (ANOVA) com dois fatores para medidas repetidas. O nível de significância considerado foi de 5%.

O tamanho amostral foi estimado a partir da equação  $n = [(Z1-\alpha/2 + Z1-\beta) \times r/\Delta]^2$ , em que “n” é o tamanho da amostra, Z é o z-score,  $\alpha$  é o nível de significância bicaudal (0,05; erro tipo I),  $\beta$  é o poder estatístico (80%; erro tipo II), r é o DP e  $\Delta$  é a mínima diferença entre os grupos.<sup>23</sup> O tamanho da amostra necessário para detectar diferença significativa entre os grupos era de 10 ratos por grupo. No entanto, decidimos usar 19 animais por grupo para a maioria das análises.

### Resultados

O PC foi similar nas duas primeiras semanas de tratamento em ambos os grupos C e HL (dados não apresentados). Contudo, durante a terceira semana, o PC foi maior no grupo HL que no grupo C. Este momento foi caracterizado como o momento inicial da obesidade.

A Tabela 1 apresenta características gerais, comorbidades e resultados hormonais dos ratos C e HL após caracterização do momento inicial da obesidade (3 semanas). O peso corporal final e o ganho de peso foram maiores no grupo HL que no grupo C. A dieta HL promoveu um aumento substancial do tecido adiposo epididimal e visceral, e da GC. Entretanto, o PC inicial e o peso de gordura retroperitoneal não foram diferentes entre os grupos. O IA foi maior nos animais do grupo HL (14,5%) em comparação aos animais C. Em comparação ao grupo C, o grupo HL apresentou um consumo alimentar mais baixo, uma maior EA, mas uma IC similar. Os níveis de glicose, CT e HDL, e a PS foram similares entre os grupos. No entanto, a AUC para a glicose obtida no teste de tolerância à insulina, e os níveis de LDL, insulina e leptina foram significativamente maiores no grupo HL que no grupo C.

As análises morfológicas e histológicas são apresentadas na Figura 1. O peso do coração (Figura 1A), a razão coração/peso corporal final (Figura 1B), a área seccional transversa dos miócitos (Figura 1C), e a fração de colágeno do VE (Figura 1D) foram similares entre os grupos.

A avaliação ecocardiográfica mostrou que os ratos HL não apresentaram diferença na frequência cardíaca (FC), diâmetro diastólico final do VE (DDVE), diâmetro sistólico final do VE (DSVE), espessura da parede posterior na diástole (EPPd), espessura relativa da parede (ERP), diâmetro do átrio esquerdo (AE), massa do VE, fração de encurtamento endocárdico (FE), FE mesocárdico, velocidade de encurtamento da parede posterior (VEPP), velocidade do fluxo transvalvar mitral correspondente à fase de enchimento inicial (onda-E), velocidade do fluxo transvalvar mitral correspondente à fase de enchimento tardia consequente à contração atrial (onda-A), razão da onda-E/onda-A (E/A mitral), tempo de desaceleração da onda-E (TDE) e tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) em comparação aos ratos C (Tabela 2). Entretanto, o grupo HL apresentou maior dimensão da aorta em comparação ao grupo C. Após 3 semanas, o tratamento não promoveu disfunção miocárdica na condição basal ou após estimulação com  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 2). Contudo, os resultados mostraram que durante a manobra de CPP, observou-se aumento na fase contrátil após 60 segundos no grupo HL em comparação ao grupo C, visualizado pela derivada positiva normalizada por área seccional transversa (+dT/dt) (C: 52,6  $\pm$  9,0 g/mm<sup>2</sup>/s e

Tabela 1 – Características gerais, comorbidades e hormônios

| Variáveis                   | Grupos            |                        |
|-----------------------------|-------------------|------------------------|
|                             | Controle (n = 19) | Hiperlipídico (n = 19) |
| Peso corporal inicial, g    | 148 ± 12          | 147 ± 12               |
| Peso corporal final, g      | 290 ± 18          | 302 ± 22*              |
| Ganho de peso, g            | 142 ± 10          | 155 ± 10*              |
| Epididimal, g               | 4,6 ± 0,8         | 5,6 ± 1,2*             |
| Retroperitoneal, g          | 5,4 ± 1,5         | 6,4 ± 1,7              |
| Visceral, g                 | 4,1 ± 1,0         | 4,9 ± 0,9*             |
| Gordura corporal, g         | 14,1 ± 3,0        | 16,9 ± 3,2*            |
| Índice de adiposidade, %    | 4,9 ± 1,0         | 5,6 ± 0,9*             |
| Glicose, mg/dL              | 182 ± 27          | 181 ± 21               |
| Área sob a curva, mg/dL/min | 2129 ± 193        | 2308 ± 218*            |
| Colesterol total, mg/dL     | 63,2 ± 10,4       | 68,3 ± 6,1             |
| HDL - colesterol, mg/dL     | 49,2 ± 7,7        | 52,9 ± 4,7             |
| LDL-colesterol, mg/dL       | 9,0 ± 1,7         | 10,4 ± 2,4*            |
| Pressão sistólica, mmHg     | 127 ± 8           | 131 ± 14               |
| Insulina, ng/mL             | 0,83 ± 0,16       | 1,16 ± 0,28*           |
| Leptina, ng/mL              | 2,34 ± 0,57       | 3,80 ± 1,26*           |

Valores em média ± DP; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; \*p < 0,05 vs. Controle. Teste t de Student para amostras independentes.

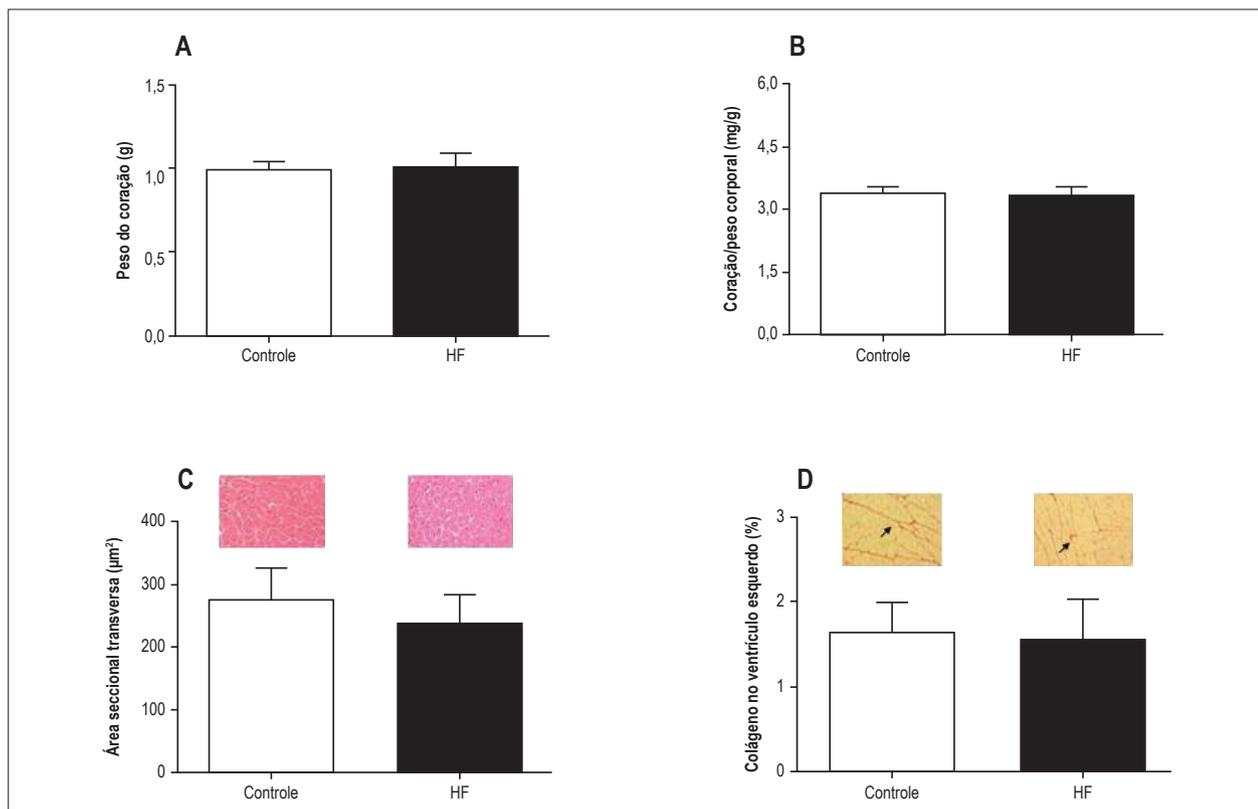


Figura 1 – Análise morfológica dos ratos controles (C) versus ratos que receberam dieta hiperlipídica (HL). A: peso do coração. B: razão coração/peso corporal final. C: área seccional transversa dos miócitos (aumento 40x); cortes transversais do ventrículo esquerdo corados com hematoxilina e eosina de ratos C e HL. D: fração de colágeno intersticial (aumento 20x) de ratos C e HL; seções do ventrículo esquerdo coradas em picosirius de ratos C e HL. Setas representam fração de volume de colágeno intersticial de C e HL. Dados apresentados em média ± DP. O teste t de Student foi usado para amostras independentes. Não há diferença entre os grupos.

Tabela 2 – Dados da ecocardiografia

| Variáveis                | Grupos            |                        |
|--------------------------|-------------------|------------------------|
|                          | Controle (n = 10) | Hiperlipídico (n = 10) |
| Frequência cardíaca, bpm | 341 ± 40          | 316 ± 22               |
| DDVE, mm                 | 7,85 ± 0,53       | 7,98 ± 0,37            |
| DSVE, mm                 | 3,66 ± 0,63       | 3,70 ± 0,44            |
| EPP, mm                  | 1,47 ± 0,06       | 1,44 ± 0,07            |
| ERP                      | 0,19 ± 0,02       | 0,18 ± 0,01            |
| DA, mm                   | 3,39 ± 0,14       | 3,53 ± 0,13*           |
| Diâmetro do AE, mm       | 5,27 ± 0,32       | 5,39 ± 0,31            |
| Massa do VE, g           | 0,81 ± 0,06       | 0,83 ± 0,10            |
| FE endocárdico, %        | 53,6 ± 5,7        | 53,6 ± 4,5             |
| FE mesocárdico, %        | 33,0 ± 3,0        | 33,9 ± 3,7             |
| VEPP, mm/s               | 40,38 ± 5,49      | 38,79 ± 3,05           |
| Onda-E- (cm/s)           | 94,5 ± 13,6       | 87,4 ± 3,9             |
| Onda -A (cm/s)           | 67,4 ± 18,7       | 60,2 ± 4,7             |
| E/A mitral               | 1,4 ± 0,4         | 1,5 ± 0,2              |
| TDE, ms                  | 42,0 ± 4,8        | 43,8 ± 4,9             |
| TRIV, ms                 | 20,4 ± 3,1        | 20,1 ± 3,8             |

Dados apresentados em média ± desvio padrão. DDVE: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSVE: diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; EPPD: espessura da parede posterior na diástole; ERP: espessura relativa da parede; DA: dimensão da aorta; AE: átrio esquerdo; VE: ventrículo esquerdo; FE: fração de encurtamento endocárdico; VEPP: velocidade de encurtamento da parede posterior; onda-E: velocidade do fluxo transvalvar mitral correspondente à fase de enchimento inicial; onda-A: velocidade do fluxo transvalvar mitral correspondente à fase de enchimento tardia consequente à contração atrial; E/A mitral: razão onda-E/onda-A; TDE: tempo de desaceleração da onda-E; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico.

HL:  $68,0 \pm 17,0$  g/mm<sup>2</sup>/s;  $p < 0,05$ ) (Figura 2E). A Figura 3 (A-C) mostra que 3 semanas de dieta HL não alterou os níveis de proteína do canal Ca<sup>2+</sup> do tipo L, SERCA2a ou PLB.

## Discussão

A determinação do momento inicial da obesidade é essencial para controlar a duração dos protocolos experimentais, pois permite avaliar, com precisão, a influência da exposição à adiposidade e, conseqüentemente, da obesidade.<sup>16</sup> Interessante notar que há pouca informação disponível sobre esse processo bem como das conseqüências cardiovasculares.

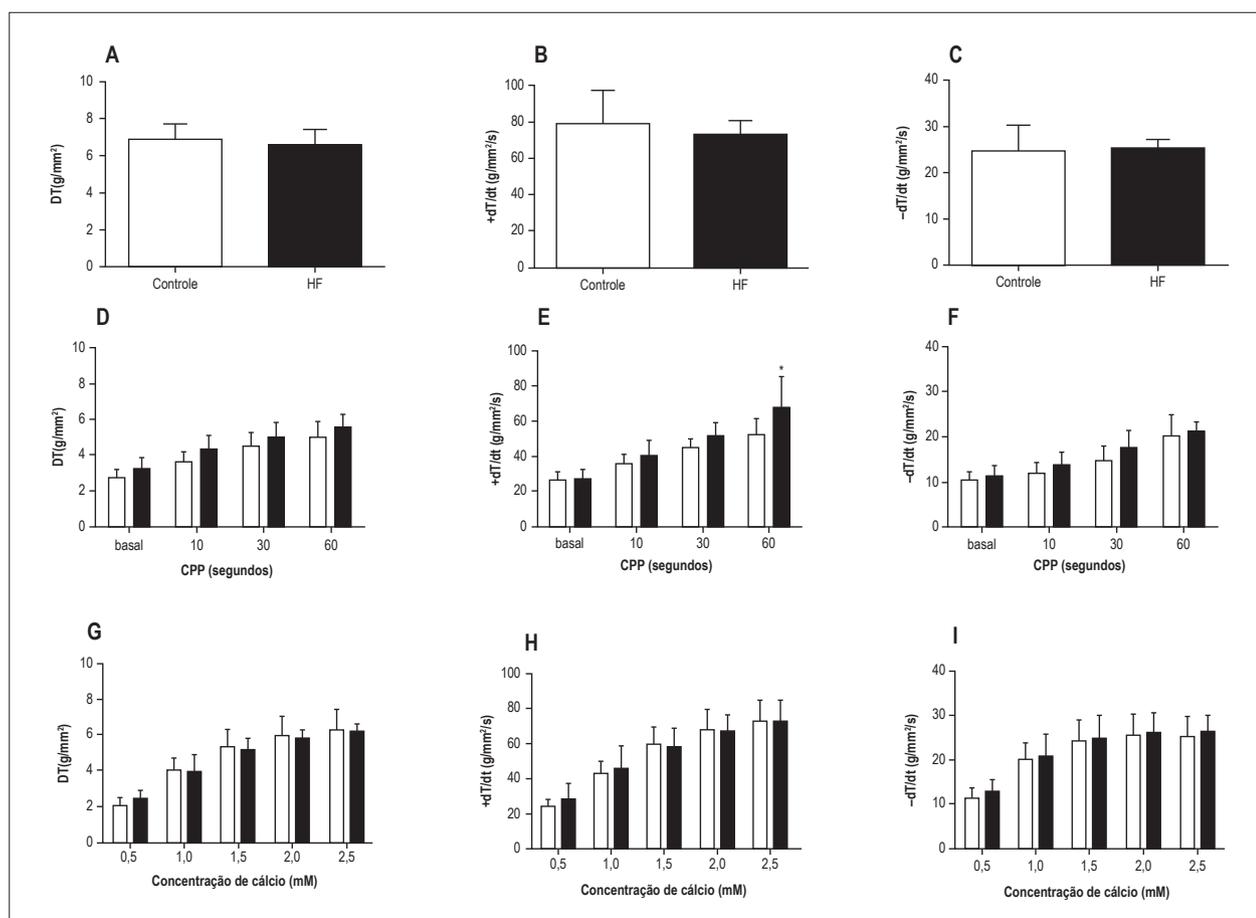
Alguns pesquisadores apresentaram características metabólicas, cardíacas e moleculares apenas no final do experimento,<sup>17,20,24</sup> o que limita a análise do início exato dos distúrbios causados pelo excesso de tecido adiposo e de sua intensidade. Uma pergunta que surge a partir do presente estudo é o porquê de estudos experimentais não haverem caracterizado o momento inicial da obesidade. Portanto, nosso principal achado foi a existência de alterações nos perfis metabólicos e lipídicos no momento inicial da obesidade, que não são acompanhadas por danos cardíacos ou alterações nas proteínas de transporte do Ca<sup>2+</sup>.

As dietas HLs são em geral aceitas como um método para gerar um modelo válido de obesidade em roedores. De acordo com os dados obtidos, nós desenvolvemos um modelo válido em roedores de obesidade induzida pela dieta com uso de gordura insaturada. Após três semanas,

os animais HL apresentaram maior ganho de peso (16%) e de gordura corporal (20%) que os animais C. Esses resultados estão de acordo com os relatados por vários autores.<sup>18-20,24</sup> Além disso, o modelo animal apresentou algumas características de síndrome metabólica, tais como obesidade central, intolerância à glicose e dislipidemia, mas sem alterações na PS, mostrando, assim, a obesidade e suas comorbidades. Por outro lado, estudos prévios mostraram várias comorbidades associadas com obesidade em curto prazo, tais como hipertensão e diabetes.<sup>25,26</sup>

O momento inicial da obesidade causou anormalidades metabólicas importantes, tais como aumento dos níveis de leptina (62,5%) e insulina (40%) no grupo HL. Segundo a literatura, a leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo, e tem uma relação direta com a quantidade de GC.<sup>27</sup> A relação entre os níveis de leptina e gordura mostra que a quantidade de leptina é aproximadamente 3 vezes maior que a de GC. Além disso, a leptina é capaz de ativar diretamente a produção de óxido nítrico via L-arginina, que é dependente da integridade endotelial<sup>27</sup> e pode ser um fator determinante na ausência de hipertensão. Ainda, foi observada hiperinsulinemia com danos na sensibilidade à insulina, uma vez que a AUC para a glicose foi maior no grupo HL que no grupo C.

O momento inicial da obesidade não causou remodelação cardíaca, segundo análises histológicas e ecocardiográficas. Dhanasekaran et al.<sup>28</sup> relataram que a resistência insulínica induzida pela obesidade com hiperinsulinemia associada



**Figura 2** – Condição basal (A, B e C), contração pós-pausa (CPP) (D, E e F) e efeitos da concentração crescente de Ca<sup>2+</sup> extracelular (G, H e I) nos músculos papilares de ratos controles (C) e de ratos que receberam dieta hiperlipídica (HL) (colunas brancas = C; colunas pretas = HL; n = 19 em cada condição). Tensão máxima normalizada por área seccional transversa (TD) [g/mm<sup>2</sup>], derivadas da tensão negativa (-dT/dt [g/mm<sup>2</sup>/s]) e positiva (+dT/dt [g/mm<sup>2</sup>/s]) normalizadas por área seccional transversa. Dados apresentados em média ± DP. \*p < 0,05 versus C. Teste t de Student para amostras independentes (A, B e C) e ANOVA com dois fatores para medidas repetidas (D, E, F, G, H e I); teste post-hoc de Student-Newman-Keuls

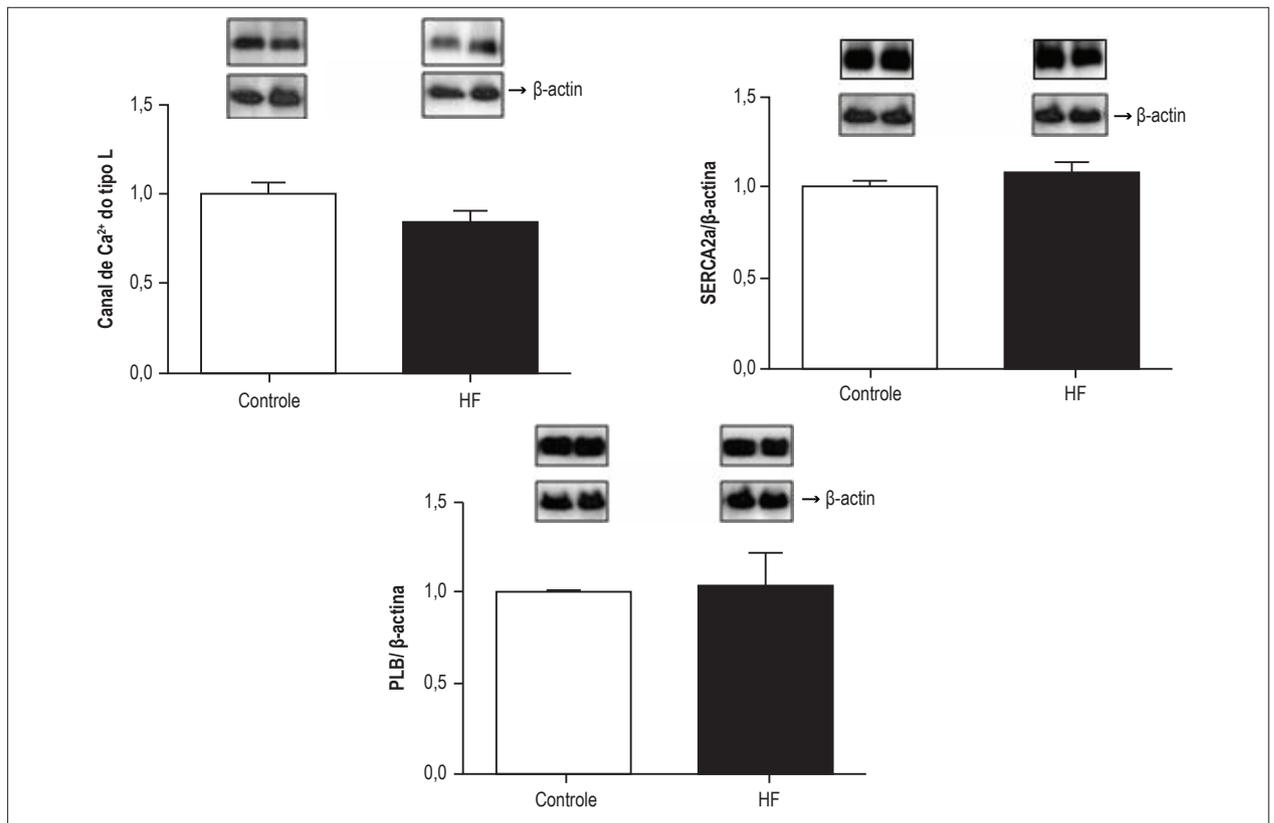
promoveu remodelação cardíaca por meio das propriedades anabólicas da insulina ou da atenuação da sinalização anti-apoptótica da via fosfatidilinositol 3'-quinase/proteína quinase B.<sup>29</sup> Estudos em camundongos com deficiência (funcional) de leptina sugeriram que a hipertrofia cardíaca desenvolvida em estados de hiperleptinemia crônica pode resultar da incapacidade de se converter os efeitos anti-hipertroficantes e/ou cardioprotetores da adipocina.<sup>29</sup>

No entanto, a obesidade ainda é considerada um fator de risco no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, apesar do chamado “paradoxo da obesidade”. Muitos modelos de obesidade com roedores têm mostrado adaptações cardiovasculares.<sup>12,15,24</sup> Ratos com obesidade induzida por dieta exibem alterações hemodinâmicas associadas à obesidade humana, mas não há evidência até o momento de que esses animais desenvolverão depressão cardíaca grave. No presente estudo, as análises ecocardiográficas e do músculo papilar mostraram que não houve alterações nos parâmetros cardíacos em nenhum dos grupos. A ausência de alterações funcionais pode ser devido à curta exposição a uma dieta HL.

De acordo com os resultados, a exposição à dieta HL em curto prazo promoveu alterações específicas na fase de contração após CPP, indicando ausência de alterações funcionais miocárdicas. Tal resultado poderia estar relacionado às mudanças no trânsito de cálcio; contudo, nossos resultados mostraram que não houve mudanças nos níveis de canais de Ca<sup>2+</sup> tipo L, PLB ou proteína do SERCA2a, sugerindo que as propriedades cinéticas do cálcio estão preservadas no início da obesidade. Ainda, as modificações translacionais que sabidamente afetam a atividade dessas proteínas, tais como fosforilação e glicosilação, não foram investigadas neste estudo.

#### Limitações do estudo

O estudo não investigou modificações pós-translacionais conhecidas por influenciarem a atividade de proteínas, tais como fosforilação e glicosilação, o que poderia contribuir para consolidar a ausência de alterações na expressão das proteínas envolvidas no transporte de cálcio intracelular no momento inicial da obesidade.



**Figura 3** – Expressão de proteína cardíaca por Western Blot. Dados apresentados em média  $\pm$  DP ( $n = 6$  em cada grupo); controle (C) e dieta hiperlipídica (HL); A: canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L; B: Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) e C: fosfolamban (PLB). Teste t de Student para amostras independentes.

## Conclusão

O momento inicial da obesidade promove alterações nos perfis hormonais e lipídicos sem causar danos cardíacos ou alterações no transporte de Ca<sup>2+</sup> em um modelo de obesidade induzida por dieta rica em gordura insaturada em ratos. Esses resultados podem ser relevantes à patologia humana e possibilitam a verificação e a prevenção dos distúrbios no período inicial da obesidade.

## Agradecimentos

Este artigo foi revisado e editado pela *American Journal Experts*.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Jacobsen BB, Cicogna AC, Leopoldo APL, Leopoldo AS; Obtenção de dados: Jacobsen BB, Cordeiro JP, Campos DHS, Nascimento AF, Sugizaki MM, Cicogna AC; Análise e interpretação dos dados e Revisão crítica

do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Jacobsen BB, Cordeiro JP, Campos DHS, Nascimento AF, Sugizaki MM, Cicogna AC, Padovani CR, Leopoldo APL, Leopoldo AS; Análise estatística: Cicogna AC, Padovani CR; Obtenção de financiamento: Cicogna AC, Leopoldo APL, Leopoldo AS; Redação do manuscrito: Jacobsen BB, Sugizaki MM, Cicogna AC, Padovani CR, Leopoldo APL, Leopoldo AS.

## Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPES e FAPESP.

## Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

## Referências

1. Mathew B, Patel SB, Reams GP, Freeman RH, Spear RM, Villarreal D. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. *Am J Med Sci.* 2007;334(1):23-30. doi: 10.1097/MAJ.0b013e3180959e4e.
2. O'Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg.* 2002;184(6B):4S-8. PMID: 12527343.
3. World Health Organization. (WHO). Obesity and overweight. Geneva. [Access 2016 Ago 07]. Available from: <http://www.who.int/en/>
4. Yeo GS, Lank EJ, Farooqi IS, Keogh J, Challis BC, O'Rahilly S. Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet.* 2003(5):12:561-74. PMID: 12588803.
5. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2522-5. doi: 10.1210/jc.2004-0288.
6. Sinitskaya N, Gourmelin S, Schuster-Klein C, Guardiola-Lemaitre B, P'Evét P, Challet E. Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity but not a prediabetic state in rats. *ClinSci (Lond).* 2007;113(10):417-25. doi: 10.1042/CS20070182.
7. Archer ZA, Rayner DV, Rozman J, Klingenspor M, Mercer JG. Normal distribution of body weight gain in male Sprague-Dawley rats fed a high-energy diet. *Obes Res.* 2003;11(11):1376-83. doi: 10.1038/oby.2003.186.
8. Axen KV, Axen K. Verylow-carbohydrate versus isocaloric high-carbohydrate diet in dietary obese rats. *Obesity (Silver Spring).* 2006;14(8):1344-52. doi: 10.1038/oby.2006.152.
9. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* 2006;36(3):485-501. doi: 10.1677/jme.1.01909.
10. Jang IS, Hwang DY, Chae KR, Lee JE, Kim YK, Kang TS, et al. Role of dietary fat type in the development of adiposity from dietary obesity-susceptible Sprague-Dawley rats. *Br J Nutr.* 2003;89(3):429-38. doi: 10.1079/BJN2002801.
11. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* 2003;133(4):1081-7. PMID: 12672923.
12. Levin BE, Richard D, Michel C, Servatius R. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000;279(4):R1357-64. PMID: 11004005.
13. Brandão BB, Souza LM, Trombetta BN, Pastre CM, Papoti M, Seraphim PM. Double effort test for evaluation of aerobic capacity of diet-induced obese rats. *Rev Bras Med Esporte.* 2013;19(3):214-8.
14. Yang SJ, Choi JM, Kim L, Park SE, Rhee EJ, Lee WY, et al. Nicotinamide improves glucose metabolism and affects the hepatic NAD sirtuin pathway in a rodent model of obesity and type 2 diabetes. *J Nutr Biochem.* 2014;25(1):66-72. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.09.004.
15. Zarzoso M, Mironov S, Guerrero-Serna G, Willis BC, Pandit SV. Ventricular remodeling in rabbits with sustained high-fat diet. *Acta Physiol (Oxf).* 2014;211(1):36-47. doi: 10.1111/apha.12185.
16. Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev.* 2008;88(2):389-419. doi: 10.1152/physrev.00017.2007.
17. 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. doi: 10.1002/jcp.22643.
18. Ren J, Zhu BH, Relling DP, Esberg LB, Ceylan-Isik AF. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(11):2417-23.
19. Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DC, Nascimento AF, Campos DH, Luvizotto Rde A, et al. Influence of long-term obesity on myocardial gene expression. *Arq Bras Cardiol.* 2013;100(3):229-37. PMID: 23598576.
20. 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 serine16 without affecting calcium handling. *J Appl Physiol (1985).* 2014;117(6):669-78. doi: 10.1152/jappphysiol.00088.2014.
21. Cao S, Li B, Yi X, Chang B, Zhu B, Lian Z, et al. Effect of exercise on AMPK signaling and downstream components to PI3K in rat with type 2 diabetes. *PLoS One.* 2012;7(12):e51709. doi: 10.1371/journal.pone.0051709.
22. Litwin SE, Katz SE, Weinberg EO, Lorell BH, Aurigemma GP, Douglas PS. Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy: Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. *Circulation.* 1995;91(10):2642-54. PMID: 7743628.
23. Medronho RA, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL. *Epidemiologia.* 2ª. ed. São Paulo: Atheneu; 2008.
24. 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. PMID: 20931095.
25. 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. PMID: 10775577.
26. Wensley I, Salaveria K, Bulmer AC, Donner DG, duToit EF. Myocardial structure, function and ischaemic tolerance in a rodent model of obesity with insulin resistance. *Exp Physiol.* 2013;98(11):1552-64. doi: 10.1113/expphysiol.2013.074948.
27. Kimura K, Tsuda K, Baba A, Kawabe T, Boh-oka S, Ibata M, et al. Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(2):745-9. doi: 10.1006/bbrc.2000.3005.
28. Dhanasekaran A, Gruenloh SK, Buonaccorsi JN, Zhang R, Gross GJ, Falck JR, et al. Multiple antiapoptotic targets of the PI3K/Akt survival pathway are activated by epoxy eicosatrienoic acids to protect cardiomyocytes from hypoxia/anoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294(2):H724-35. doi: 10.1152/ajpheart.00979.2007.
29. Leifheit-Nestler M, Wagner NM, Gogiraju R, Didié M, Konstantinides S, Hasenfuss G, et al. Importance of leptin signaling and signal transducer and activator of transcription-3 activation in mediating the cardiac hypertrophy associated with obesity. *J Transl Med.* 2013;11:170. doi: 10.1186/1479-5876-11-170.