

## Disfunção Miocárdica e Alterações no Trânsito de Cálcio Intracelular em Ratos Obesos

*Myocardial Dysfunction and Abnormalities in Intracellular Calcium Handling in Obese Rats*

Ana Paula Lima-Leopoldo<sup>1</sup>, André S. Leopoldo<sup>1,2</sup>, Mário M. Sugizaki<sup>3</sup>, Alessandro Bruno<sup>2</sup>, André F. Nascimento<sup>2</sup>, Renata A. M. Luvizotto<sup>2</sup>, Silvio A. Oliveira Junior<sup>4</sup>, Edson Castardeli<sup>1</sup>, Carlos R. Padovani<sup>3</sup>, Antonio C. Cicogna<sup>2</sup>

Departamento de Desportos, Centro de Educação Física e Desportos, UFES - Universidade Federal do Espírito Santo<sup>1</sup>, Vitória, ES; Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"<sup>2</sup>, Botucatu, SP; Instituto de Ciências da Saúde, UFMT - Universidade Federal de Mato Grosso<sup>3</sup>, Sinop, MT; Departamento de Fisioterapia, UFMS - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul<sup>4</sup>, Campo Grande, MS; Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho"<sup>5</sup>, Botucatu, SP - Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Vários mecanismos têm sido propostos como contribuintes para a disfunção cardíaca em modelos de obesidade, tais como alterações nas proteínas do trânsito de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) e nos receptores beta-adrenérgicos. Todavia, o papel desses fatores no desenvolvimento da disfunção miocárdica induzida pela obesidade ainda não está claro.

**Objetivo:** Este estudo pretende investigar se a obesidade induzida por um ciclo de dieta hipercalórica resulta em disfunção cardíaca. Além disso, foi avaliado se essa alteração funcional em ratos obesos está relacionada com o prejuízo do trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  e do sistema beta-adrenérgico.

**Métodos:** Dois grupos de ratos Wistar machos com 30 dias de idade, foram alimentados com ração padrão (C) e um ciclo de cinco dietas hipercalóricas (Ob) por 15 semanas. A obesidade foi definida pelo aumento da porcentagem de gordura corporal dos ratos. A função cardíaca foi avaliada mediante análise isolada do músculo papilar do ventrículo esquerdo em condições basais e após manobras inotrópicas e lusitrópicas.

**Resultados:** Em comparação com o grupo controle, os ratos obesos apresentaram aumento da gordura corporal e intolerância a glicose. Os músculos dos ratos obesos desenvolveram valores basais semelhantes; entretanto, as respostas miocárdicas ao potencial pós-pausa e aumento de  $\text{Ca}^{+2}$  extracelular foram comprometidas. Não houve alterações na função cardíaca entre os grupos após a estimulação beta-adrenérgica.

**Conclusão:** A obesidade promove disfunção cardíaca relacionada com alterações no trânsito de  $\text{Ca}^{+2}$  intracelular. Esse prejuízo funcional é provavelmente ocasionado pela redução da atividade da bomba de  $\text{Ca}^{+2}$  do retículo sarcoplasmático (SERCA2a) via  $\text{Ca}^{+2}$  calmodulina-quinase. (Arq Bras Cardiol 2011; 97(3) : 232-240)

**Palavras-chave:** Disfunção miocárdica, ratos, obesidade, elevação de cálcio, receptores beta-adrenérgicos.

### Abstract

**Background:** Several mechanisms have been proposed to contribute to cardiac dysfunction in obesity models, such as alterations in calcium ( $\text{Ca}^{+2}$ ) handling proteins and  $\beta$ -adrenergic receptors. Nevertheless, the role of these factors in the development of myocardial dysfunction induced by obesity is still not clear.

**Objective:** The purpose of this study was to investigate whether obesity induced by hypercaloric diets results in cardiac dysfunction. Furthermore, it was evaluated whether this functional abnormality in obese rats is related to abnormal  $\text{Ca}^{+2}$  handling and the  $\beta$ -adrenoceptor system.

**Methods:** Male 30-day-old Wistar rats were fed with standard food (C) and a cycle of five hypercaloric diets (Ob) for 15 weeks. Obesity was defined as increases in body fat percentage in rats. Cardiac function was evaluated by isolated analysis of the left ventricle papillary muscle under basal conditions and after inotropic and lusitropic maneuvers.

**Results:** Compared with the control group, the obese rats had increased body fat and glucose intolerance. The muscles of obese rats developed similar baseline data, but the myocardial responsiveness to post-rest contraction stimulus and increased extracellular  $\text{Ca}^{+2}$  were compromised. There were no changes in cardiac function between groups after  $\beta$ -adrenergic stimulation.

**Conclusion:** Obesity promotes cardiac dysfunction related to changes in intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  handling. This functional damage is probably caused by reduced cardiac sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{+2}$  ATPase (SERCA2) activation via  $\text{Ca}^{+2}$  calmodulin kinase. (Arq Bras Cardiol 2011; 97(3) : 232-240)

**Keywords:** Myocardial dysfunction; rats; obesity; calcium elevation; receptors, adrenergic, beta.

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

Correspondência: André Soares Leopoldo •

Distrito de Rubião Júnior s/n - Distrito de Rubião Júnior - 18600-000 - Botucatu, SP - Brasil  
E-mail: andresoaresleopoldo@gmail.com, leopoldo@fmb.unesp.br

Artigo recebido em 09/12/10, revisado recebido em 03/01/11, aceito em 03/01/11.

## Introdução

A obesidade pode ser definida como uma doença metabólica crônica caracterizada pelo excesso de gordura, que compromete indivíduos saudáveis<sup>1</sup>. Está associada a várias comorbidades e tem sido reconhecida como um fator de risco independente para diversas doenças cardiovasculares<sup>2-4</sup>.

Pesquisas anteriores relacionando a função cardíaca e obesidade induzida por dieta apresentam resultados controversos. Ratos submetidos a dieta hipercalórica por 8 a 14 semanas revelaram, por meio de ecocardiograma<sup>5,6</sup> e miócito isolado<sup>7</sup> que a obesidade não alterou a função cardíaca. No entanto, Ouwens e cols.<sup>8</sup> mostraram que os músculos papilares de ratos submetidos a dieta hipercalórica por sete semanas apresentaram maior força contrátil basal e uma recuperação prejudicada após o aumento da carga de trabalho. Além disso, outros pesquisadores encontraram prejuízo da contração cardíaca em corações isolados<sup>9</sup>, músculos papilares<sup>10</sup> e cardiomiócitos<sup>11</sup> de coelhos e ratos obesos, respectivamente.

Poucos estudos avaliaram a relação entre o trânsito de  $Ca^{+2}$ , o sistema beta-adrenérgico e a função miocárdica em animais obesos<sup>11,12</sup>. Ren e cols.<sup>12</sup> verificaram depressão do estado funcional no miocárdio de ratos geneticamente obesos após o uso de manobras inotrópicas. Portanto, não está claro se mecanismos similares ocorrem com modelos humanos e animais de obesidade induzida por dieta.

É evidente que uma série de alterações na estrutura e função cardíaca ocorre com aumento do tecido adiposo. Entretanto, os mecanismos responsáveis por essas alterações não estão bem estabelecidos. Vários agentes têm sido propostos como contribuintes para a disfunção cardíaca em modelos de obesidade, tais como redução da sensibilidade do  $Ca^{+2}$  aos miofilamentos, assim como alterações nas proteínas do trânsito de  $Ca^{+2}$  e nos receptores beta-adrenérgicos<sup>11-14</sup>. Todavia, ainda não está claro se esses fatores desempenham um papel crucial no desenvolvimento de disfunção miocárdica induzida pela obesidade.

Considerando os dados divergentes, a proposta deste estudo foi obter informações adicionais acerca da influência da obesidade induzida por dieta hipercalórica sobre a função miocárdica. Além disso, o objetivo deste trabalho foi verificar a participação do trânsito de  $Ca^{+2}$  e do sistema beta-adrenérgico na função miocárdica de ratos obesos. Assim, a hipótese deste estudo foi que a obesidade provoca disfunção miocárdica por meio de alterações no trânsito de  $Ca^{+2}$  e no sistema beta-adrenérgico.

## Métodos

### Animais e protocolo experimental

Ratos Wistar machos, com 30 dias de idade, foram randomizados em dois grupos: controle (C, n = 8) e obeso (Ob, n = 8). Os animais C receberam dieta padrão *Labina* (Purina, Paulínia, SP, Brasil) e os Ob, ciclos de cinco dietas hipercalóricas que se sucediam de forma rotativa, semanalmente, conforme previamente descrito<sup>15</sup>. As dietas hipercalóricas fornecidas ao grupo Ob tinham maior número de calorias (dietas

hipercalóricas = 4,6 kcal/g versus dieta padrão = 3,5 kcal/g), em razão da maior quantidade de gordura. Na dieta hipercalórica 3, o aumento do valor calórico foi pela adição de sacarose na água (1,2 kcal/ml). Cada grupo foi alimentado com suas respectivas dietas por 15 semanas consecutivas. Os animais foram alojados em gaiolas individuais em um ambiente limpo, sob condições monitoradas de temperatura de  $23 \pm 3^\circ C$ , luminosidade (fases ciclo claro/escuro de 12 horas) e  $60\% \pm 5$  de umidade relativa. O consumo alimentar foi mensurado diariamente e o peso corporal, registrado semanalmente. A ingestão calórica semanal foi calculada pela média semanal do consumo alimentar multiplicada pelo valor calórico de cada dieta. A eficiência alimentar, capacidade de converter calorias consumidas em ganho de peso corporal, foi avaliada pela seguinte fórmula: ganho de peso corporal médio (g) dividido pelo consumo total de calorias. O peso corporal inicial e final (PCI e PCF, respectivamente), comprimento naso-anal, pesos dos ventrículos esquerdo (VE) e direito (PVD) e a área seccional transversa do músculo papilar (AST) foram registrados.

Todos os experimentos e os procedimentos foram realizados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo *National Research Council*<sup>16</sup> e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp, Botucatu, SP, Brasil).

### Pressão arterial sistólica (PAS)

Após 15 semanas de protocolo experimental, antes da eutanásia, a pressão arterial sistólica foi aferida por meio de pletismografia de cauda<sup>17</sup>, utilizando-se eletroesfigmomanômetro Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Austin, TX, USA).

### Teste oral de tolerância a glicose

No final do protocolo experimental, o teste oral de tolerância a glicose foi realizado. Os ratos foram mantidos em jejum por um período de 12 a 15 horas e as coletas sanguíneas foram realizadas na artéria caudal. O sangue foi coletado em condições basais e após administração de 3 g/kg de glicose por gavagem<sup>18</sup>. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, 60, 120, 180 e 240 minutos, e analisadas usando um glicosímetro (Accu-Check Go Kit; Roche Diagnostic Brasil Ltda., SP, Brasil).

### Análise da gordura corporal e Índice de Lee

Após os animais serem anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg IP), decapitados e toracotomizados, descartaram-se as vísceras, restando apenas a carcaça. A carcaça foi secada a  $100 \pm 5^\circ C$  durante 72 horas em estufa ventilada Fanem® (Fanem, Guarulhos, SP, Brasil). Após a secagem, a carcaça foi embrulhada em papel filtro e a gordura extraída em aparelho Extrator de Soxhlet (Corning Incorporated Life Sciences, Lowell, MA, USA). A porcentagem de gordura na carcaça foi determinada pela seguinte fórmula:  $PP - PSSG / PPr \times 100\%$ , onde PP = peso pós-secagem, PSSG = peso seco após extração da gordura, e PPr = peso pré-secagem<sup>19</sup>. O índice de Lee foi calculado:  $\sqrt[3]{\text{peso corporal (g)} / \text{comprimento naso-anal (cm)}}^{20}$ .

### Músculo papilar isolado

O desempenho mecânico foi avaliado pelo estudo do músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo (VE) conforme descrito previamente<sup>21,22</sup>. Em síntese, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg intraperitoneal) e submetidos à eutanásia. Os corações foram rapidamente removidos e mantidos em solução de Krebs-Henseleit previamente oxigenada a 28° C. Os músculos papilares dissecados do VE foram presos entre dois anéis de aço inoxidável e colocados verticalmente em uma câmara de vidro contendo solução de Krebs-Henseleit a 28° C, continuamente oxigenada com 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub>. A composição da solução de Krebs foi a seguinte: 118,5 mM NaCl; 4,69 mM KCl; 1,25 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,16 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,50 mM glicose; e 24,88 mM NaCO<sub>3</sub>. A extremidade inferior do anel foi acoplada a um transdutor de força 120T-20B (Kyowa, Tokyo, Japan) por um fio de aço (1/15,000), que atravessava uma fenda preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. A extremidade superior do anel foi conectada por um fino fio de aço a uma alavanca rígida, acima da qual existia um micrômetro montado para ajustar o comprimento de repouso do músculo. O músculo papilar foi acoplado entre dois eletrodos paralelos de platina e estimulados a uma frequência de 0,2 Hz (12 vezes por minuto), usando pulsos elétricos regulares de 5 ms de duração. A voltagem correspondia a 10% acima do valor mínimo necessário para provocar a resposta mecânica máxima do músculo.

Os músculos contraíam isotonicamente com uma carga leve por 60 minutos; a seguir, esses foram colocados em contração isométrica e estirados gradualmente até a tensão desenvolvida atingir seu valor máximo. Após um período de 5 minutos, nos quais as preparações foram submetidas a contrações isotônicas, os músculos foram colocados novamente em contração isométrica e o pico da curva comprimento-tensão ( $L_{max}$ ) foi cuidadosamente determinado. Um período de 15 minutos de contração isométrica em que o músculo permanecia estável foi imposto anteriormente ao período experimental e uma contração isométrica foi registrado.

O comportamento dos músculos papilares foi avaliado em situação basal com concentração de cálcio ( $[Ca^{+2}]_o$ ) de 1,25 mM e após manobras inotrópicas: potencial pós-pausa (PPP), elevação da  $[Ca^{+2}]_o$  extracelular de 0,625 até 8,0 mM e durante estimulação beta-adrenérgica com 10<sup>-8</sup> até 10<sup>-6</sup> M de isoproterenol. O potencial pós-pausa foi estudado em  $[Ca^{+2}]_o$  extracelular de 1,25 mM, em que o estímulo foi cessado por 30 segundos antes do estímulo ser reiniciado. Durante o período de repouso no miocárdio dos ratos, o retículo sarcoplasmático (RS) acumula cálcio acima e além do que acumularia durante a estimulação regular, e a primeira batida após o intervalo de descanso (B1) é mais forte que o ritmo antes do intervalo de descanso (B0)<sup>23</sup>. O estudo do PPP pode fornecer algumas informações sobre a função do RS em uma preparação bioquimicamente intacta<sup>24</sup>. Depois do PPP, a resposta do músculo papilar, após elevação da  $[Ca^{+2}]_o$  extracelular, foi avaliada para testar seu efeito sobre a maquinaria contrátil<sup>25</sup>. Os parâmetros contráteis isométricos foram registrados 10 minutos após a adição de cada dose de cálcio extracelular (0,625 até 8,0

mM) na solução. Além disso, a estimulação do sistema beta-adrenérgico foi também estudada para testar a integridade do complexo beta-adrenérgico, a sensibilidade da troponina C e a absorção de cálcio pelo retículo sarcoplasmático<sup>25</sup>. A estimulação dos receptores adrenérgicos beta foi induzida usando concentrações cumulativas de isoproterenol (10<sup>-8</sup> a 10<sup>-6</sup> M) na presença da  $[Ca^{+2}]_o$  de 1,0 mM.

### Parâmetros mecânicos

Parâmetros mecânicos convencionais em  $L_{max}$  foram calculados em contração isométrica: tensão máxima desenvolvida normalizada pela área seccional transversa do músculo papilar (TD [g/mm<sup>2</sup>]), tensão de repouso normalizada pela área seccional transversa do músculo papilar (TR [g/mm<sup>2</sup>]), tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida (TPT [ms]), velocidade máxima de variação positiva (+dT/dt [g/mm<sup>2</sup>/s]) e negativa (-dT/dt [g/mm<sup>2</sup>/s]) da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional transversa do músculo papilar e tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo (TR<sub>50</sub> [ms]).

Os parâmetros usados para caracterizar o tamanho dos músculos papilares foram comprimento (mm), peso do músculo (mg) e área seccional transversa (AST [mm<sup>2</sup>]). Após o término de cada experimento, o comprimento do músculo em  $L_{max}$  foi mensurado com auxílio de um catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation, Chicago, IL, USA), e a porção do músculo entre os anéis de aço foi cortada, submetida a secagem com papel filtro e pesada. A AST foi calculada dividindo-se o peso do músculo pelo seu comprimento, assumindo uniformidade e uma gravidade específica de 1,0.

### Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas usando o teste "t" de Student para amostras independentes. O perfil glicêmico entre os grupos foi comparado pela análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas. Quando diferenças significantes foram encontradas (p < 0,05), o teste de comparações múltiplas de Bonferroni foi executado<sup>26</sup>. Todos os valores mecânicos das manobras foram expressos como percentuais médios em relação aos valores basais e calculados da seguinte forma:  $D = (M2-M1)/M1 \times 100$ , onde M1 foi o valor encontrado em situação basal e M2, o valor resultante após as manobras inotrópicas e lusinotrópicas. Os efeitos da elevação de cálcio extracelular e da concentração de isoproterenol foram analisados pela análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada pelo teste de comparações múltiplas de Tukey para as diferenças específicas. A comparação do PPP foi realizada usando o teste "t" de Student para amostras independentes. O nível de significância considerado foi de 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## Resultados

### Características gerais dos ratos

As características gerais dos ratos estão apresentadas na tabela 1. Após 15 semanas, não houve diferenças significativas

no peso corporal final (PCF), na razão peso corporal final pelo comprimento naso-anal, no índice de Lee, na pressão arterial sistólica (PAS), na ingestão calórica, no peso do ventrículos esquerdo (VE) e direito (VD) entre os ratos. Os ratos Ob ingeriram menos alimento do que os ratos controle, e a eficiência alimentar foi maior nos Ob comparada com a dos ratos controle, embora essas diferenças não tenham sido estatisticamente significativas ( $p = 0,06$ ). Além disso, o percentual de gordura corporal encontrado na carcaça foi significativamente maior (96,1%) nos ratos Ob. A intolerância a glicose, comorbidade associada à obesidade, foi observada neste estudo (fig. 1).

**Tabela 1 - Características gerais dos grupos experimentais**

	C (n = 8)	Ob (n = 8)
Peso corporal inicial (g)	114 ± 12	105 ± 14
Peso corporal final (g)	490 ± 67	531 ± 75
Peso corporal final/ comprimento naso-anal	18 ± 3	19 ± 3
Índice de Lee	289 ± 17	286 ± 17
Gordura corporal (%)	15 ± 3	29 ± 8*
Pressão arterial sistólica final (mmHg)	121 ± 17	124 ± 19
Consumo alimentar (g/dia)	26 ± 2	18 ± 2*
Ingestão calórica (kcal/dia)	90 ± 11	88 ± 8
Eficiência alimentar (%)	4,3 ± 0,2	5,0 ± 0,5
VE (g)	0,91 ± 0,08	0,95 ± 0,09
VD (g)	0,23 ± 0,04	0,24 ± 0,04

Valores em média ± desvio padrão. C - controle; Ob - obeso; n - número de animais por grupo; VE - peso do ventrículo esquerdo; VD - ventrículo direito; \*  $p < 0,05$  vs C; Teste "t" de Student para amostras independentes.

## Estudo funcional do músculo papilar

### Condições basais

Os valores basais de vários parâmetros foram obtidos das preparações dos músculos papilares isolados (tab. 2). O desempenho funcional dos músculos papilares em condições basais foi semelhante para todos os parâmetros (TD, TR, TPT, + dT/dt, -dT/dt e TR<sub>50</sub>) entre os dois grupos.

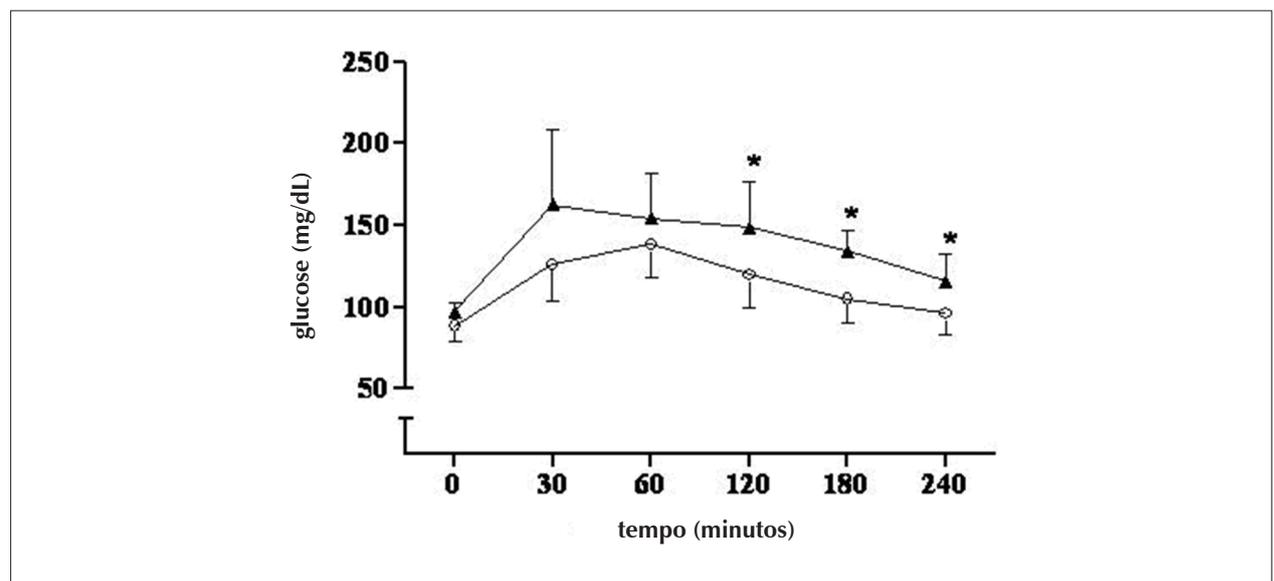
### Estimulação de cálcio extracelular

Os efeitos da elevação das concentrações de cálcio sobre a função dos músculos papilares estão sumarizados e ilustrados na figura 2. O aumento da  $[Ca^{+2}]_o$  de 0,625 para 8,0 mM

**Tabela 2 - Avaliação funcional do músculo papilar isolado em situação basal**

	C (n = 8)	Ob (n = 7)
TD (g/mm <sup>2</sup> )	4,87 ± 1,22	5,09 ± 1,00
TR (g/mm <sup>2</sup> )	1,04 ± 0,25	1,18 ± 0,29
TPT (ms)	157 ± 10	153 ± 8
+dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	53 ± 14	58 ± 11
-dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	18 ± 4	19 ± 4
TR <sub>50</sub> (ms)	172 ± 19	175 ± 22
Área seccional (mm <sup>2</sup> )	1,05 ± 0,22	0,88 ± 0,18

Valores em média ± desvio padrão; C - controle; Ob - obeso; n - número de animais por grupo; TD (g/mm<sup>2</sup>) - tensão máxima desenvolvida; TR (g/mm<sup>2</sup>) - tensão de repouso; TPT (ms) - tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; +dT/dt (g/mm<sup>2</sup>/s) - velocidade máxima de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt (g/mm<sup>2</sup>/s) - velocidade máxima de variação de decréscimo da tensão desenvolvida; TR<sub>50</sub> (ms) - tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo; Não houve diferenças estatísticas entre os grupos ( $p > 0,05$ ); Teste "t" de Student para amostras independentes.

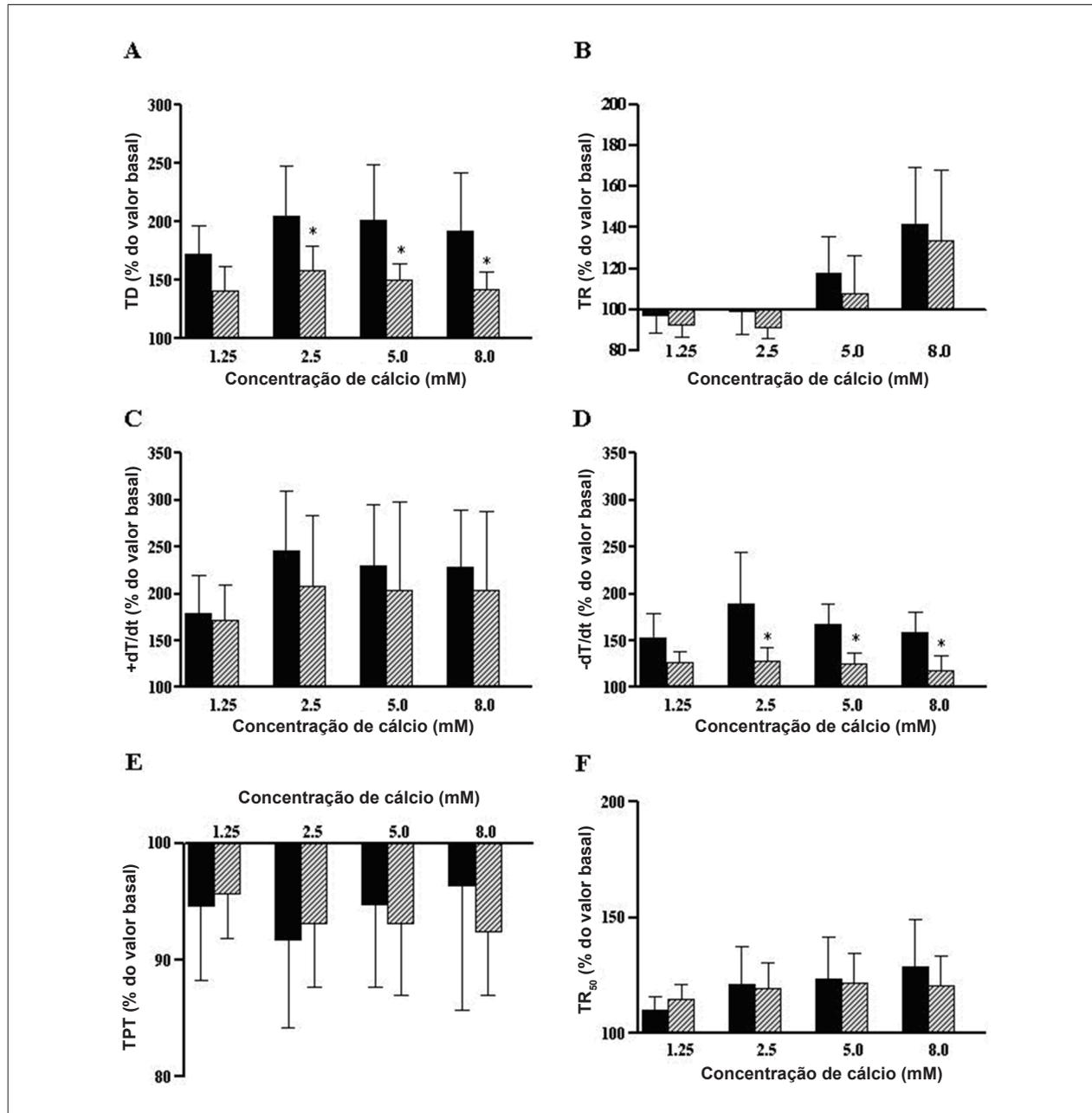


**Fig. 1 -** Níveis sanguíneos de glicose após uma sobrecarga oral de glicose em animais controles (círculo branco; n = 8) e obesos (triângulo preto; n = 8). Dados apresentados como média ± DP. \*  $p < 0,05$  versus controle. Análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes; teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

## Artigo Original

promoveu maior resposta da TD e da  $-dT/dt$  no grupo controle do que nos ratos obesos. Em concentrações de cálcio de 2,5 mM, 5,0 mM e 8,0 mM, o percentuais médios da TD em relação aos valores basais no grupo obeso foram  $59 \pm 20\%$ ,  $51 \pm 14\%$  e  $43 \pm 14\%$ , respectivamente, versus  $105 \pm 43\%$ ,  $101 \pm 47\%$  e  $92 \pm 50\%$ , respectivamente, no grupo controle. Na  $[Ca^{+2}]_0$  de 1,25 mM, o miocárdio do grupo obeso apresentou uma tendência a diminuir a TD em resposta ao cálcio extracelular ( $41 \pm 20\%$  versus  $72 \pm 24\%$ ,  $p = 0,09$ ).

O comprometimento do relaxamento nos ratos obesos foi constatado pela menor resposta da  $-dT/dt$  quando comparada ao grupo controle. Após o aumento da  $[Ca^{+2}]_0$  para 2,5 mM, 5,0 mM e 8,0 mM, as porcentagens médias da  $-dT/dt$  em relação aos valores basais no grupo obeso foram  $28 \pm 14\%$ ,  $25 \pm 13\%$  e  $18 \pm 15\%$ , respectivamente, versus  $88 \pm 55\%$ ,  $67\% \pm 22$  e  $59 \pm 21\%$ , respectivamente, no grupo controle. Semelhante à tendência observada para a TD, o comportamento mecânico tendeu a mostrar uma diminuição da  $-dT/dt$  em resposta ao cálcio



**Fig. 2 - Efeitos da elevação da concentração de cálcio extracelular (0,625 até 8,0 mM) nas respostas inotrópicas de miocárdios controles (barras pretas; n = 8) e obesos (barras cinza; n = 7). Concentração de cálcio basal (0,625 mM) representa 100%. A: TD - tensão máxima desenvolvida; B: TR tensão de repouso; C: +dT/dt - velocidade máxima de variação positiva da tensão desenvolvida; D: -dT/dt - velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; E: TPT - tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; F: TR<sub>50</sub> - tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo. Data são percentuais médios em relação ao valor basal ± DP; \* p < 0,05 versus grupo controle; Análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes; teste de comparações múltiplas de Tukey.**

extracelular na concentração de cálcio de 1,25 mM ( $27\% \pm 11$  versus  $53 \pm 26\%$ ,  $p = 0,06$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos para os outros parâmetros (TR, +dT/dt, TPT, TR<sub>50</sub>).

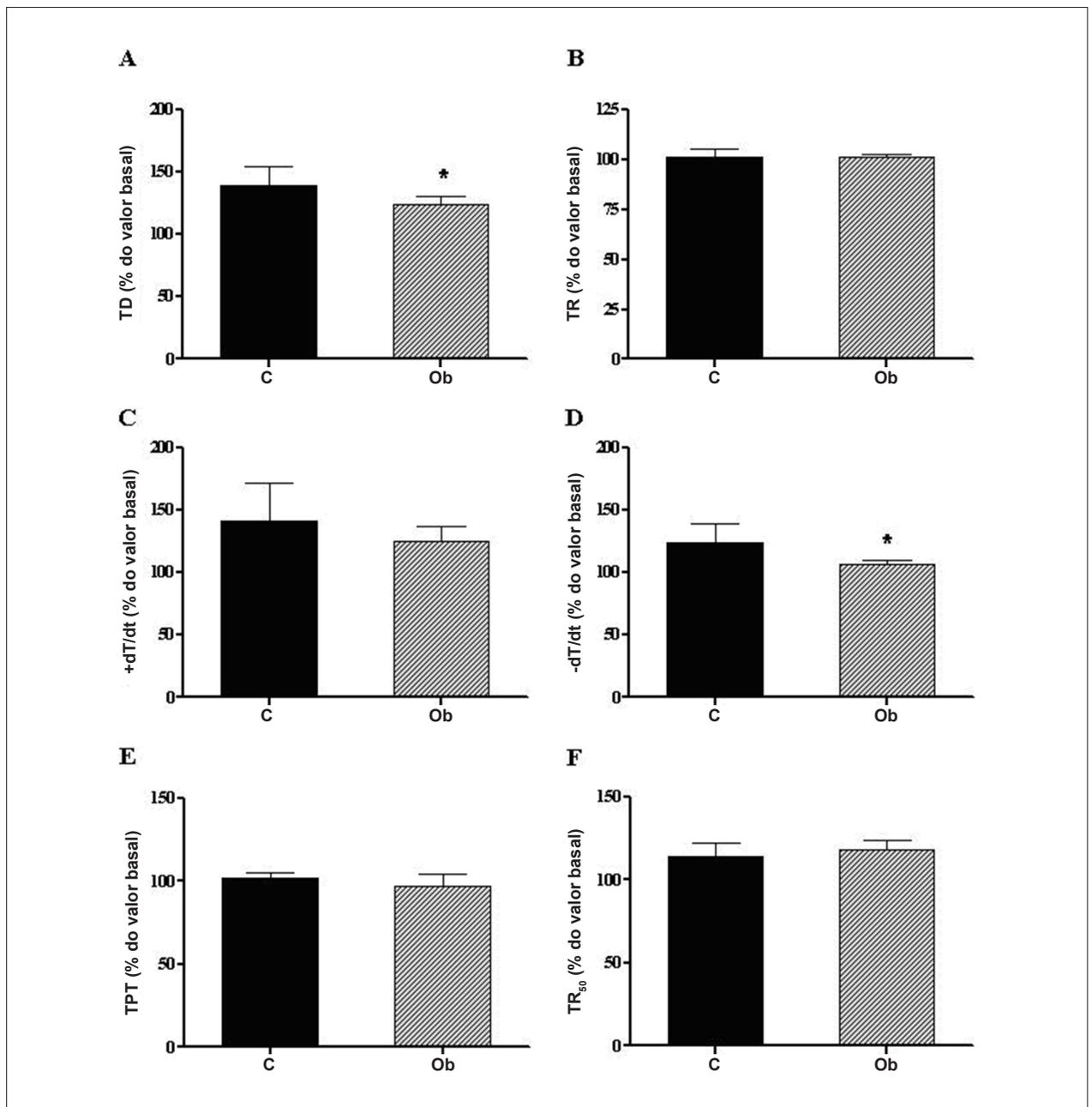
### Efeitos do potencial pós-pausa

Os resultados mostrados na figura 3 indicam que o PPP induziu uma maior resposta na TD e na -dT/dt do grupo controle do que dos ratos obesos. A TD e a -dT/dt foram significativamente diminuídas no miocárdio dos ratos obesos após 30 segundos de cessação do estímulo. O percentual

médio da DT em relação ao valor basal no grupo obeso foi  $24 \pm 7\%$  versus  $39 \pm 15\%$  no grupo controle. Nesse sentido (após o PPP), o percentual da -dT/dt em relação ao valor basal foi  $6 \pm 3\%$  no grupo obeso versus  $24 \pm 15\%$  no controle. Não foram observadas diferenças entre os dois grupos para os outros parâmetros (TR, +dT/dt, TPT, TR<sub>50</sub>).

### Estimulação com isoproterenol

Para todos os parâmetros avaliados, o miocárdio do grupo obeso não apresentou diferença na resposta à estimulação



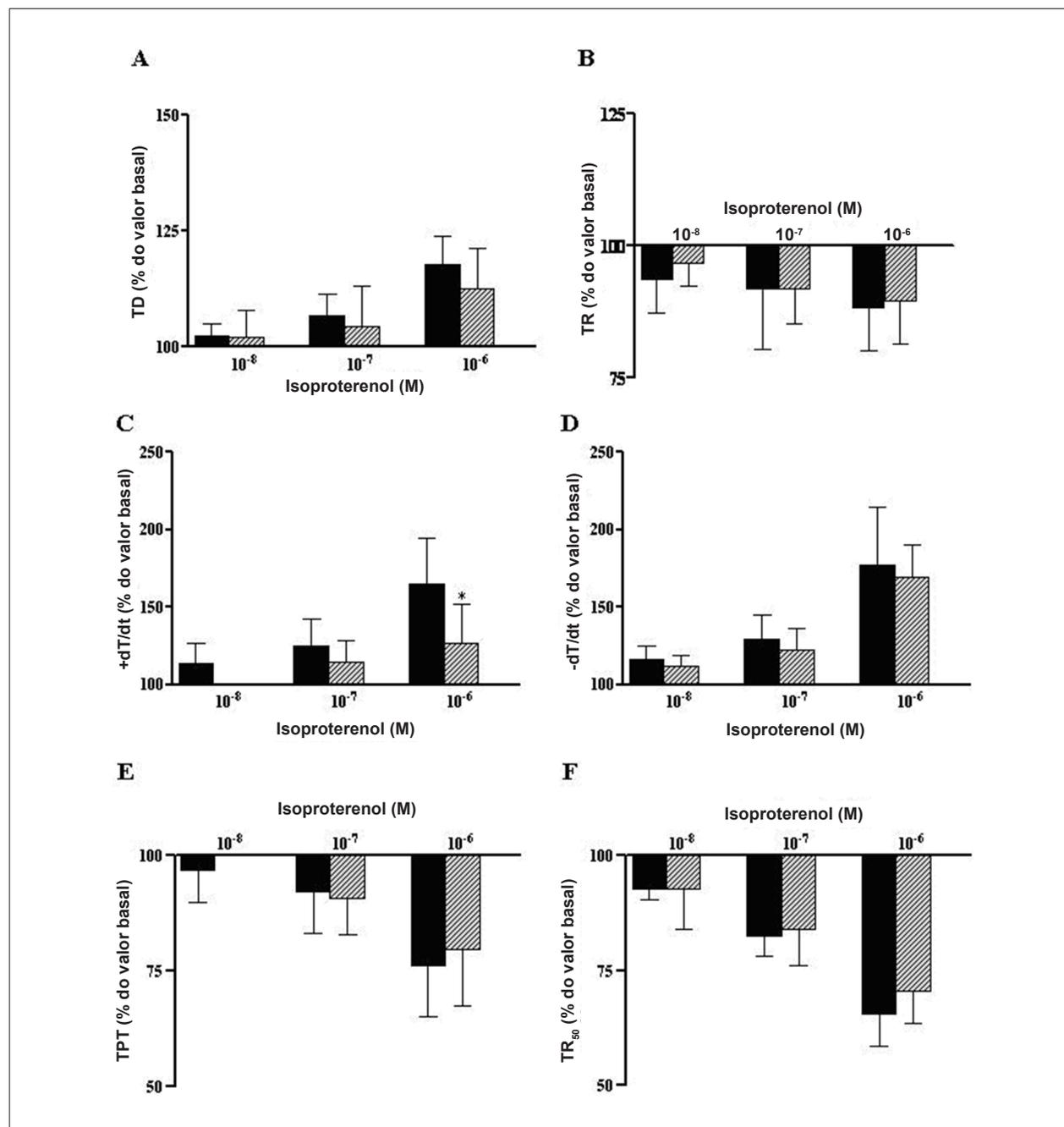
**Fig. 3** - Efeitos do potencial pós-pausa no miocárdio de coração de ratos controles ( $n = 8$ ) e obesos ( $n = 7$ ) após o estímulo ser cessado por 30 segundos. A: TD - tensão máxima desenvolvida; B: TR tensão de repouso; C: +dT/dt - velocidade máxima de variação positiva da tensão desenvolvida; D: -dT/dt - velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; E: TPT - tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; F: TR<sub>50</sub> - tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo. Data são percentuais médios em relação ao valor basal  $\pm$  DP; \*  $p < 0,05$  versus grupo controle; Teste "t" de Student para amostras independentes.

$\beta$ -adrenérgica em relação ao grupo controle (fig. 4). Foi observada uma resposta isolada na  $+dT/dt$  dos ratos obesos comparados com a dos ratos controle.

## Discussão

Este estudo investigou os efeitos da obesidade induzida por dieta sobre o desempenho funcional do miocárdio,

trânsito de  $Ca^{+2}$  intracelular e o sistema beta-adrenérgico. O principal achado deste estudo é que a obesidade promove disfunção cardíaca em razão de alterações no trânsito de  $Ca^{+2}$  intracelular, provavelmente pela redução da ativação  $Ca^{+2}$  ATPase (SERCA2) via  $Ca^{+2}$  calmodulina quinase. Embora não tenham ocorrido diferenças no peso corporal final entre os grupos, a dieta hipercalórica utilizado foi de intensidade e duração suficientes para promover a obesidade em ratos,



**Fig. 4** - Efeitos do aumento da concentração de isoproterenol ( $10^{-8}$  até  $10^{-6}$  M) sobre as respostas inotrópicas de miocárdios controles (barras pretas;  $n = 8$ ) e obesos (barras cinza;  $n = 7$ ). Concentração de cálcio basal (1,0 mM) representa 100%. A: TD - tensão máxima desenvolvida; B: TR - tensão de repouso; C:  $+dT/dt$  - velocidade máxima de variação positiva da tensão desenvolvida; D:  $-dT/dt$  - velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; E: TPT - tempo para atingir o pico da tensão desenvolvida; F:  $TR_{50}$  - tempo para a tensão desenvolvida decrescer 50% de seu valor máximo. Data são percentuais médios em relação ao valor basal  $\pm$  DP; \*  $p < 0,05$  versus grupo controle; Análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes; teste de comparações múltiplas de Tukey.

medida pela porcentagem de gordura corporal (tab. 1). O ganho de peso corporal (8,4%) foi acompanhado pelo maior aumento da gordura corporal total de 96,1% a mais que os ratos controles, descrevendo um modelo de obesidade induzida por dieta. O peso corporal isolado pode levar a falsas interpretações e, nesse caso, subestimar o verdadeiro grau de obesidade que se desenvolve em ratos obesos<sup>19,27</sup>. Esses resultados estão de acordo com vários estudos que induziram obesidade em ratos por meio de dietas hipercalóricas<sup>5,11,19,28,29</sup> e não observaram diferenças no peso corporal final<sup>6,8,30</sup>. Além disso, os animais Ob tiveram a presença de um comorbidade associada a obesidade, a intolerância a glicose.

A análise da morfologia cardíaca mostrou que a obesidade não alterou o peso dos VE e VD. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que não mostraram hipertrofia de miócitos em ratos obesos<sup>5,7</sup>, mas em discordância com outras publicações que demonstraram maior peso do VE e VD em ratos obesos<sup>11,29</sup>.

Um dos principais objetivos desta investigação foi estudar as mudanças no desempenho do miocárdio em uma preparação de músculo papilar isolado. A preparação isolada mede a capacidade do músculo cardíaco de desenvolver força e encurtar, independentemente de mudanças em cargas, frequência cardíaca e geometria da parede que podem modificar o desempenho mecânico do coração *in vivo*<sup>31</sup>. Além disso, as manobras inotrópicas e lusinotrópicas também foram utilizadas para estudar a função mecânica do músculo cardíaco, a fim de identificar alterações na contração e no relaxamento que não poderiam ser observadas em condições basais. Eles ajudam, ainda, na compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações funcionais do miocárdio. As manobras mais comumente utilizadas são: potencial pós-pausa, elevação de  $Ca^{+2}$  extracelular e estimulação beta-adrenérgica. No presente estudo, a avaliação da função dos músculos papilares mostrou que a obesidade não promoveu alterações em relação aos dados basais. Este resultado não é consistente com Relling e cols.<sup>11</sup>, que verificaram diminuição do pico de encurtamento e da velocidade máxima de encurtamento, assim como prolongamento da duração de encurtamento e relaxamento em cardiomiócitos de ratos obesos. Outros pesquisadores encontraram tensão desenvolvida reduzida em condições basais em músculos papilares de coelhos obesos<sup>10</sup>.

Neste estudo, o potencial pós-pausa e a elevação da concentração de  $Ca^{+2}$  extracelular promoveram uma menor resposta nos índices de função miocárdica na sístole (TD) e na diástole (-dT/dt) no grupo obeso. Os achados do PPP e da variação da concentração de cálcio extracelular sugerem que a obesidade promove disfunção dos canais regulatórios de  $Ca^{+2}$ . A resposta comprometida pode estar relacionada com alterações no trocador  $Na^{+}/Ca^{+2}$  (NCX), canais tipo-L do sarcolema, retículo sarcoplasmático (RS) e na sensibilidade dos miofilamentos ao  $Ca^{+2}$ <sup>32</sup>.

O potencial pós-pausa nos permitiu estudar aspectos da participação do RS no ciclo de contração-relaxamento do músculo cardíaco. No músculo ventricular dos ratos, o PPP é reconhecido como uma função composta de tempo de estímulo e re-estímulo dependente de  $Ca^{+2}$  dentro do RS<sup>33</sup>, combinado com um pequeno ganho celular de  $Ca^{+2}$  por meio da troca  $Na^{+}/Ca^{+2}$ <sup>34</sup>. A primeira contração é maior do que a contração do estado estacionário, quando estimulada após

intervalo de repouso<sup>35</sup>. Portanto, essa potencialização do PPP é altamente dependente do aumento da liberação de  $Ca^{+2}$  do retículo sarcoplasmático<sup>35-37</sup>.

Neste estudo, o PPP induziu uma resposta significativamente diminuída na -dT/dt e TD no miocárdio de ratos obesos (fig. 3). Os dados são consistentes com estudo prévio que mostrou menor resposta contrátil em ratos obesos Zucker após 60 segundos de cessação do estímulo<sup>12</sup>. Como -dT/dt é influenciada pela frequência de absorção de íons cálcio para o RS<sup>32</sup>, a menor recaptura de  $Ca^{+2}$  demonstrada pela -dT/dt nos ratos obesos sugere que a atividade SERCA2 foi deprimida. A diminuição da -dT/dt com altas concentrações de  $Ca^{+2}$  citosólico sugere que a ativação da SERCA2 via  $Ca^{+2}$  - calmodulina quinase pode estar deprimida pela obesidade. A redução significativa da tensão desenvolvida observada nos ratos obesos poderia ser resultante de estoques diminuídos de  $Ca^{+2}$  do RS e redução da liberação de  $Ca^{+2}$  por meio dos receptores rianodina. Além disso, não podemos rejeitar a hipótese de que a obesidade reduz a taxa de dissociação de  $Ca^{+2}$  pela troponina C. Outros estudos são necessários para esclarecer essa relação entre troponina C e afinidade ao cálcio.

A elevação de  $Ca^{+2}$  extracelular altera as fases de contração e relaxamento em razão do aumento da concentração de  $Ca^{+2}$  disponível no citosol, uma vez que essa interfere no funcionamento do canal tipo-L, NCX e RS<sup>32</sup>. A menor resposta à elevação de  $Ca^{+2}$  extracelular nos ratos obesos (fig. 2) pode estar relacionada a uma redução do influxo de  $Ca^{+2}$  por meio dos canais tipo-L e/ou alterações na função de RS, como verificado no PPP. Esses resultados estão de acordo com prévios estudos que observaram disfunção cardíaca e resposta deprimida à elevação de  $Ca^{+2}$  extracelular em miócitos<sup>11</sup> e músculos papilares<sup>12</sup> de ratos obesos. No entanto, outro estudo encontrou resposta elevada em razão do aumento de  $Ca^{+2}$  extracelular em ratos alimentados com dieta rica em gordura<sup>8</sup>.

O sistema beta-adrenérgico tem papel fundamental no desempenho cardíaco, desde que promova alterações no ciclo de  $Ca^{+2}$  intracelular. Essa alteração resulta da fosforilação via AMP cíclico, aumentando o influxo de  $Ca^{+2}$  por meio dos canais tipo L do sarcolema, a recaptura de  $Ca^{+2}$  pela SERCA2 e facilitando a dissociação de  $Ca^{+2}$  pela troponina-C. Alterações em um ou mais componentes da via beta-adrenérgica têm sido implicados na redução da resposta contrátil aos beta-agonistas<sup>38-40</sup>. Os dados da estimulação com isoproterenol revelam que o sistema beta-adrenérgico e a fosforilação do AMPc das proteínas relacionadas com o trânsito de  $Ca^{+2}$ , incluindo fosfolambam (PLB) e SERCA2, foram preservados nos ratos obesos. Esse resultado reforça a ideia de que a -dT/dt reduzida observada nos ratos obesos provavelmente ocorreu por diminuição da fosforilação do PLB via  $Ca^{+2}$  calmodulina quinase. Respostas cardíacas semelhantes à estimulação beta-adrenérgica foram observadas previamente em coelhos obesos<sup>9</sup>.

## Conclusão

Esta investigação mostra que a obesidade promove disfunção miocárdica e essa alteração pode ser atribuída, possivelmente, à redução da captação de  $Ca^{+2}$  pela SERCA2 em razão de menor ativação via  $Ca^{+2}$  - calmodulina quinase. Outros estudos são necessários para confirmar esses dados.

### Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

### Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

### Vinculação Acadêmica

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

## Referências

- Lopaschuck GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res*. 2007;101(4):335-47.
- Hubert HB, Feinleib M, McNamara PM, Castelli WP. Obesity as an independent risk factor for cardiovascular disease: a 26-year follow-up of participants in the Framingham Study. *Circulation*. 1983;67(5):968-77.
- Gordon T, Kannel WB. Obesity and cardiovascular disease: the Framingham Study. *Clin Endocrinol Metab*. 1976;5(2):367-75.
- Björntorp P. Classification of obese patients and complications related to the distribution of surplus fat. *Am J Clin Nutr*. 1987;47(5 Suppl):1120-5.
- Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006;48(1):65-72.
- Okere IC, Chandler MP, Mcelfresh TA, Rennison JH, Sharov V, Sabbah HN, et al. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H38-44.
- Ricci E, Smallwood S, Chouabe C, Mertani HC, Raccurt M, Morel G, et al. Electrophysiological characterization of left ventricular myocytes from obese Sprague-Dawley rat. *Obesity*. 2006;14(5):778-86.
- 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.
- Carroll JF, Summers RL, Dzielak DJ, Cockrell K, Montani J-P, Mizelle HL. Diastolic compliance is reduced in obese rabbits. *Hypertension*. 1999;33(3):811-5.
- Carroll JF, Jones AE, Hester RL, Reinhart GA, Cockrell K, Mizelle HL. Reduced cardiac contractile responsiveness to isoproterenol in obese rabbits. *Hypertension*. 1997;30(6):1376-81.
- Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, et al. High-fat-diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*. 2006;24(3):549-61.
- Ren J, Walsh MF, Jefferson L, Natavio M, Lig KJ, Sowers JR, et al. Basal and ethanol-induced cardiac contractile response in lean and obese Zucker rat hearts. *J Biomed Sci*. 2000;7(5):390-400.
- Young ME, Guthrie PH, Razeghi P, Leighton B, Abbasi S, Patil S, et al. Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. *Diabetes*. 2002;51(8):2587-95.
- Strasheim D, Houslay MD, Milligan G. Regulation of cardiac adenylate cyclase activity in rodents models of obesity. *Biochem J*. 1992;283(Pt 1):203-8.
- Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008;52(6):968-74.
- Institute of Laboratory Animal Research, Commission on Life Sciences, National Research Council. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Washington, DC: National Academy Press; 1996.
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Frohlich ED. Validity of an indirect tail-cuff method for determining systolic arterial pressure in unanesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Lab Clin Med*. 1971;78(6):957-62.
- Borst SE, Conover CF. High-fat induces increased tissue expression of TNF- $\alpha$ . *Life Sci*. 2005;77(17):2156-65.
- Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'aleccio DA, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003;133(4):1081-7.
- Rogers P, Webb GP. Estimation of body fat in normal and obese mice. *Br J Nutr*. 1980;43(1):83-6.
- Cicogna AC, Padovani CR, Okoshi K, Aragon FF, Okoshi MP. Myocardial function during chronic food restriction in isolated hypertrophied cardiac muscle. *Am J Med Sci*. 2000;320(4):244-8.
- Gut AL, Okoshi MP, Padovani CR, Aragon FF, Cicogna AC. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to calcium cycling and beta-adrenergic system changes. *Nutr Res*. 2003;23(7):911-9.
- Hanouz JL, Riou B, Massias L, Lecarpentier Y, Coriat P. Interaction of halothane with alpha- and beta-adrenoceptor stimulations in rat myocardium. *Anesthesiology*. 1997;86(1):147-59.
- Prabhu SD, Azimi A, Frosto T. Nitric oxide effects on myocardial function and force-interval relations: regulation of twitch duration. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31(12):2077-85.
- David JS, Vivien B, Lecarpentier Y, Coriat P, Riou B. Interaction of protamine with  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor stimulations in rat myocardium. *Anesthesiology*. 2001;95(5):1226-33.
- Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc*. 1977;72:469-78.
- Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli ELB, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res*. 2008;41(3):253-9.
- Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;31(1-3):27-35.
- Fitzgerald SM, Henegar JR, Brands MW, Henegar LK, Hall JE. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001;281(2):R547-52.
- Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Li K. High-fat- and lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasma resistin and adiponectin levels. *Ann Nutr Metab*. 2006;50(6):499-505.
- Sugizaki MM, Carvalho RF, Aragon FF, Padovani CR, Okoshi K, Okoshi MP, et al. Myocardial dysfunction induced by food restriction is related to morphological damage in normotensive middle-age rats. *J Biomed Sci*. 2005;12(4):641-9.
- Opie LH, Bers DM. *Heart physiology: from cell to circulation*. In: Opie LH, editor. *Excitation-contraction coupling and calcium*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2004. p. 159-85.
- Orchard CH, Lakatta EG. Intracellular calcium transients and developed tension in rat heart muscle: a mechanism for the interval-strength relationship. *J Gen Physiol*. 1985;86(5):637-51.
- Shattock MJ, Bers DM. Rats vs. rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol*. 1989;256(4 Pt 1):C813-22.
- Allen DC, Jewell BR, Wood EH. Studies of the contractility of mammalian myocardium at low rates of stimulation. *J Physiol*. 1976;254(1):1-17.
- Bers DM. Ca influx and sarcoplasmic reticulum Ca release in cardiac muscle activation during postrest recovery. *Am J Physiol*. 1985;248(3 Pt 2):H366-81.
- Malecot CO, Katzung BG. Use-dependence of ryanodine effects on postrest contraction in ferret cardiac muscle. *Circ Res*. 1987;60(4):560-7.
- Hilal-Dandan R, Khairallah PA. Cyclic AMP in myocytes isolated from hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23(6):705-16.
- Ayobe MH, Tarazi RC. Beta-receptors and contractile reserve in left ventricular hypertrophy. *Hypertension*. 1983;5(2 Pt 2):1192-7.
- Atkins RL, Bing OHL, Dimauro PG, Conrad CH, Robinson KG, Brooks WW. Modulation of left and right ventricular  $\beta$ -adrenergic receptors from spontaneously hypertensive rats with left ventricular hypertrophy and failure. *Hypertension*. 1995;26(1):78-82.