UNESP- Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Clínica Médica
Laboratório Experimental da Clínica Médica

*Influência do tempo de exposição à obesidade
sobre a expressão gênica e protéica do sistema
regulador do trânsito de cálcio miocárdico*

Ana Paula Lima Leopoldo

BOTUCATU

2010

unesp

**UNESP- Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”**

Faculdade de Medicina de Botucatu
Departamento de Clínica Médica
Laboratório Experimental da Clínica Médica

*Influência do tempo de exposição à obesidade
sobre a expressão gênica e protéica do sistema
regulador do trânsito de cálcio miocárdico*

Ana Paula Lima Leopoldo

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Campus de Botucatu, para obtenção
do título de Doutor em Fisiopatologia
em Clínica Médica “Ciências da Saúde”

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum

BOTUCATU

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Leopoldo, Ana Paula Lima.

Influência do tempo de exposição à obesidade sobre a expressão gênica e protéica do sistema regulador do trânsito de cálcio miocárdico / Ana Paula Lima Leopoldo. – Botucatu, 2010

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna

Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Patrícia Chakur Brum

Assunto CAPES: 40101002

1. Coração - Fisiopatologia. 2. Obesidade - Fisiopatologia. 3. Hormônios tireoidianos.

Palavras-chave: coração; dieta hiperlipídica; hormônio tireoidiano; obesidade; trânsito de Ca⁺²

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida,

À toda minha família

Que soube compreender todos os momentos em que estive ausente,
obrigada pelos constantes incentivos e torcida pelo meu futuro.
Vocês são essenciais!

Aos meus Pais

Significado de devoção e coragem, com o exemplo deles, aprendi
que tudo é possível com força de vontade e pensamento positivo, e,
sobretudo, a importância da dignidade e do caráter. Amor eterno!

Ao meu marido, André,

Pelo privilégio de ter você ao meu lado, *sempre* carinhoso, otimista
e compreensivo até nos momentos mais difíceis. Pelos momentos
de esperança que pensa, junto comigo, no nosso futuro. Amo você!

Há três coisas fundamentais para a felicidade:

*alguma coisa para fazer,
alguém para amar e
algo para esperar.*

Joseph Addison

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, *Prof. Dr. Antonio Carlos Cicogna*, pela oportunidade, credibilidade e por ter me ensinado que ciência não se faz em poucas horas, mas sim em investigação científica baseada na observação e experimentação, com perseverança e muita dedicação.

Minha eterna gratidão!

Ao *Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani*, por compartilhar de forma exemplar seus conhecimentos. Obrigada por sempre acreditar em nosso aprendizado e por estimular a busca de oportunidades científicas e de vida.

À *Profa. Dra. Célia Regina Nogueira*, por ter estruturado e disponibilizado o laboratório de biologia molecular acreditando, sempre, no trabalho baseado em cooperação. Obrigada pela sua compreensão, acessibilidade e, principalmente, amizade.

À *Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva*, pela constante prontidão em nos receber em seu laboratório, tanto para utilização quanto para o esclarecimento das dúvidas. Obrigada pela sua estima e consideração.

À *Profa. Dra. Patrícia Chakur Brum*, por sempre me receber com carinho e atenção em seu laboratório. Obrigada pela oportunidade de aprendizagem e pelo privilégio de sua orientação.

À *Profa. Dra. Alessandra Medeiros*, por todo auxílio e paciência no meu aprendizado de Western Blot. Obrigada pela amizade e por ter partilhado comigo seus conhecimentos.

Ao amigo, *Prof Dr. Mario Mateus Sugizaki*, por todo apoio, amizade e incentivo durante todos esses anos de pós-graduação. Você é co-responsável por essa conquista.

Muito obrigada!

*O saber é uma atitude de espírito que se forma
lentamente ao contato dos que sabem.*

Anísio Teixeira

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa é resultado do trabalho em conjunto, cooperação e amizade de muitas pessoas. Muito obrigada a todos aqueles cujo apoio e amizade fizeram a diferença. O trabalho foi grande, mas, pela presença de pessoas inestimáveis como vocês, foi permeado de alegrias e muitas risadas.

*Ter amigos é não estar só.
Ter amigos é poder partilhar
segredos, lágrimas e sorrisos.*

Aos amigos do grupo do Professor Cicogna, que compartilharam das mesmas dificuldades e expectativas: *André Nascimento, Dijon, Silvio, Danielle, Carlos, Paulinha, Adriana, Albano, Carolina, Loreta e Olga*. Obrigada por toda colaboração no desenvolvimento deste trabalho, convivência e amizade.

Aos amigos do laboratório e da pós-graduação: *Renata (Fia), Lidiane (Suflê), Fabiana (Fafa), Francieli (Paina), Marcelo (Russo), Ricardo (Clone), Paula (Tata), Aline (Morango), Cristiana, Sandro (BG), Maria Tereza (T3), Marcos (Meleca), Paula Schmidt, Rosangela, Juliana (Ju), Paulo (Chucky), Camila Bonomo, Daniele, Camila, Natasha, Fernanda, Miriane e Regiane*. Obrigada pela fundamental contribuição de me fazerem rir, mesmo quando a vontade era de chorar.

Um agradecimento especial e carinhoso aos amigos e funcionários do Laboratório Experimental da Clínica Médica, *José Carlos Georgete, Mário Bruno, Elenize, Camila, Corina, Sueli Clara, Sueli Garcia, Vitor, José Aparecido, De Lalla, Rogério e Ângelo*. Obrigada pela convivência, cooperação e apoio imensuráveis durante esta etapa da minha vida.

À *Sandra Fábio*, pelo companheirismo, pelos constantes ensinamentos das fórmulas e cálculos e pela importante contribuição na dosagem bioquímica deste trabalho. Obrigada por tornar o dia-a-dia do laboratório mais descontraído.

Aos professores *Dr Katashi Okoshi* e *Dra Marina Politi Okoshi* por toda colaboração, atenção e estima nestes anos de pós-graduação.

Aos professores *Dra Célia Regina Nogueira* e *Dr. Leonardo Antonio Mamede Zornoff* pelas críticas e sugestões durante o exame de qualificação, que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos atenciosos e prestativos amigos e funcionários da pós-graduação: *Regina Célia Spadin, Nathanael Pinheiro Salles, Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Andrea Paula Longo Devidé, e Lílian Cristina Nadal Bianchi Nunes*. Obrigada pelo carinho com que vocês nos recebem e auxiliam em todos os momentos.

Aos atenciosos e prestativos amigos e funcionários do departamento de Clínica Médica: *Ana Maria Mengue, Alexandre Luís Loureiro, Renato Borges Pereira, Elisangela Aparecida da Silva, Laura Andrade Câmara e Bruno José Fajiolli*. Obrigada pelo auxílio, disponibilidade e atenção durante estes anos de pós-graduação.

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

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

“Os caminhos surgem na medida em que os percorremos.”

Werner Sprenger

RESUMO

Atualmente mais de um bilhão de pessoas apresentam sobrepeso, sendo que, mais de 30% desta população é obesa. Diversas alterações estruturais e funcionais do coração em humanos tem sido frequentemente associadas com a obesidade. Modelos experimentais, por dieta hiperlipídica, têm sido utilizados para estudar a relação obesidade e coração. O trânsito de cálcio miocárdico tem sido extensivamente estudado em diversos modelos experimentais e frequentemente relacionado com disfunção cardíaca. Entretanto, a literatura mostra escassez de estudos que avaliaram a relação entre o tempo de exposição à obesidade por dieta hiperlipídica, o RNAm e as proteínas envolvidas na homeostase de Ca^{+2} miocárdico. Além disso, pesquisas relatam a influência dos hormônios tireoidianos nestas proteínas, podendo acarretar alterações na contração e relaxamento cardíaco. O objetivo principal desse estudo foi testar a hipótese que o aumento no tempo de exposição à obesidade acarreta diminuição na expressão e/ou fosforilação das proteínas e dos respectivos níveis de RNAm relacionados com o trânsito de Ca^{+2} miocárdico. Este estudo teve como objetivo secundário constatar se a diminuição na expressão gênica foi acompanhada de redução dos níveis hormonais tireoidianos. Os períodos de dieta hiperlipídica, utilizados nesse estudo, foram eficientes em promover obesidade, desde que o índice de adiposidade utilizado para caracterizar os animais como obesos foi 79,5%, 82% e 69,5% maior do que os respectivos controles, após 15, 30 e 45 semanas. O tempo de exposição à dieta hiperlipídica não promoveu alterações na gordura corporal total entre os grupos obesos; este resultado indica que, neste trabalho, não houve aumento na intensidade da obesidade ao longo do tempo. Neste estudo foram visualizadas algumas comorbidades frequentemente associadas com a obesidade experimental, como intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e dislipidemia; entretanto, não houve alterações no comportamento da pressão arterial sistólica final. A obesidade promoveu aumento nos níveis séricos de TSH ao longo do tempo e diminuição dos níveis de T4 acompanhado de elevação das concentrações séricas de T3. Os resultados da estrutura do coração *post mortem* mostraram que a obesidade acarretou aumento do coração, VD e do AT nos três momentos, apesar da não significância estatística no peso do coração na 45ª semana ($p=0,052$); além disso, houve remodelação do VE nos momentos 15 e 30 semanas. Contudo, a análise da área seccional transversa do miócito mostrou aumento apenas na 30ª semana de obesidade. Embora a obesidade tenha alterado os níveis de RNAm do CANAL L e RyR, entre os grupos controle e obeso e ao longo do tempo, este comportamento não foi visualizado na expressão protéica de CANAL L. Neste estudo, enquanto a obesidade

na 15^a e 45^a semana, acarretou diminuição dos níveis de RNAm da SERCA, do NCX e da CSQ em relação aos respectivos controles, na 30^a semana de obesidade ocorreu elevação dos níveis de SERCA, NCX e da CSQ em relação ao C₃₀. Entretanto, esta alteração no RNAm não foi acompanhada de alterações na expressão protéica de SERCA e CSQ. Os níveis de RNAm de PLB foram diminuídos após 15 semanas de obesidade e elevados na 30^a semana entre os grupos. Os níveis protéicos de PLB, PLB thr17 e a razão PLB thr17/PLB não sofreram alterações decorrente da obesidade. O principal achado deste estudo é que a obesidade, após 15 e 30 semanas, acarretou diminuição nos níveis de pPLB ser16. A análise de correlação mostrou que não ocorreu associação significativa entre os níveis de T3 e o RNAm das proteínas do trânsito de Ca⁺². Um fato importante, visualizado neste estudo, foi a divergência de comportamento entre os níveis de RNAm e a expressão protéica. Enquanto os RNAm variaram na dependência do tratamento e tempo experimental, as proteínas mostraram comportamento igual entre os grupos e os momentos. Diante destes resultados podemos concluir, que o tempo de exposição à obesidade promove diferentes respostas na expressão de RNAm e modifica apenas a proteína PLB fosforilada na serina 16. Os níveis hormonais tireoidianos não influenciam a expressão gênica das proteínas do trânsito de Ca²⁺ miocárdico.

Palavras-chave: obesidade, dieta hiperlipídica, coração, hormônio tireoidiano, trânsito de Ca²⁺

ABSTRACT

Currently, greater than one billion people are overweight and 30% of the population is obese. Several structural and functional changes of the heart have often been associated with human obesity. Experimental models for high-fat diets have been used to study the relationship between obesity and the heart. Myocardial calcium (Ca^{2+}) handling has been extensively studied in several experimental models and has often been shown to be related to cardiac dysfunction. However, few studies have evaluated the relationship between the duration of exposure to obesity and a high-fat diet, and mRNA and proteins involved in homeostasis of myocardial Ca^{2+} . Some studies have reported the influence of thyroid hormones on these proteins, which may cause changes in cardiac contraction and relaxation. The main objective of the current study was to test the hypothesis that the increased duration of exposure to obesity leads to a reduction in the expression and/or phosphorylation of proteins and mRNA levels related to myocardial Ca^{2+} handling. This study had, as additional objective, to verify if the decrease in mRNA expression was accompanied by a reduction in thyroid hormone levels. The periods of exposure to a high-fat diet used in this study were effective in promoting obesity since the adiposity index used to characterize animals as obese was 79.5%, 82%, and 69.5% higher than controls after 15, 30, and 45 weeks, respectively. The duration of exposure to a high-fat diet did not change the total body fat between the obese groups. This result indicates that there was not an increase in the intensity of obesity over time. In this study, some co-morbidities often associated with experimental obesity existed, such as glucose intolerance, insulin resistance, hyperinsulinemia, hyperleptinemia, and dyslipidemia; however, the co-morbidities were not associated with changes in systolic blood pressure. Obesity promoted an increase in serum TSH over time and a decrease in T4 levels accompanied by elevated serum concentrations of T3. The cardiac structure results *post-death* showed that obesity caused an increase in the heart, and right ventricular and atrium weights at the 3 evaluation times, although the change in heart weight at 45 weeks was not statistically significant ($p = 0.052$). In addition, there was left ventricular remodeling at 15 and 30 weeks. However, the analysis of the cross-sectional area of myocytes showed an increase in obesity at 30 weeks. Although obesity altered the mRNA levels of the ryanodine receptor (RyR) and L-type Ca^{2+} channels between obese and control groups over time, this change was not shown in the protein expression of L-type Ca^{2+} channels. While obesity at the 15th and 45th weeks resulted in a reduction of mRNA levels of Ca^{2+} ATP-ase of sarcoplasmic reticulum (SERCA), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX), and calsequestrin (CSQ) in relation to respective controls, in the

30th week of obesity the mRNA levels of SERCA, NCX, and CSQ were higher than C₃₀. However, the change in mRNA was not accompanied by changes in SERCA and CSQ protein expression. The mRNA levels of phospholamban (PLB) were decreased after 15 weeks of obesity and elevated at 30 weeks between the groups. The protein levels of PLB, PLB phosphorylation at threonine-17 (pPLB thr17), and the ratio between pPLB thr17 and PLB was not changed due to obesity. The main finding of this study was that obesity, after 15 and 30 weeks, resulted in decreased levels of PLB phosphorylation at serine-16 (pPPLB ser16). The correlation analysis showed that there was no significant association between the levels of T3 mRNA and protein of myocardial Ca²⁺ handling. An important fact observed in this study was the difference in behavior between the levels of mRNA and protein expression. While the mRNA varied depending on the experimental treatment and time of exposure, the proteins were equal among the groups and times of exposure of obesity. In conclusion, the time of exposure to obesity promotes different responses in mRNA expression and modifies only the pPPLB ser16. Thyroid hormone levels do not influence the expression of mRNA and proteins of myocardial Ca²⁺ handling.

Keywords: obesity, high-fat diet, heart, thyroid hormone, Ca²⁺ handling

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Composição dos macro e micronutrientes das rações (%).....	29
Quadro 2- Ensaios utilizados na PCR em tempo real.....	40
Quadro 3- Perfil de aminoácidos das rações (%).....	151
Quadro 4- Perfil de carboidratos das rações (%).....	152
Quadro 5- Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%).....	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução semanal do peso corporal dos animais controle e obeso.....	46
Figura 2. Pressão arterial sistólica final dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	50
Figura 3. Teste de tolerância à glicose dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	51
Figura 4. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	51
Figura 5. Índice HOMA-IR dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	52
Figura 6. Níveis séricos de insulina e leptina dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	52
Figura 7. Níveis séricos de TSH dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	53
Figura 8. Níveis séricos de T4 dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	53
Figura 9. Níveis séricos de T3 dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	54
Figura 10. Secções transversas de fragmentos do VE dos grupos controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	56
Figura 11. Secções transversas subendocárdicas do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	56
Figura 12. Expressão gênica de CANAL L e RyR no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	57
Figura 13. Expressão gênica de SERCA, PLB, NCX e CSQ no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	57
Figura 14. Expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ, CANAL L e a razão SERCA/PLB no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento..	58
Figura 15. Expressão protéica de pPLB thr 17, pPLB ser16 e as razões pPLB thr17/PLB e pPLB ser16/PLB no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento.....	59

Figura 16. Pressão arterial sistólica final dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	63
Figura 17. Teste de tolerância à glicose dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	64
Figura 18. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	64
Figura 19. Índice HOMA-IR dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	65
Figura 20. Níveis séricos de insulina e leptina dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	66
Figura 21. Níveis séricos de TSH dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	66
Figura 22. Níveis séricos de T4 dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	67
Figura 23. Níveis séricos de T3 dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	67
Figura 24. Secções transversas de fragmentos do VE dos grupos controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	70
Figura 25. Secções transversas subendocárdicas do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	70
Figura 26. Expressão gênica de CANAL L e RyR no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	71
Figura 27. Expressão gênica de SERCA, PLB, NCX e CSQ no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	71
Figura 28. Expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ, CANAL L e a razão SERCA/PLB no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento..	72
Figura 29. Expressão protéica de pPLB thr 17, pPLB ser16 e as razões pPLB thr17/PLB e pPLB ser16/PLB no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento.....	73
Figura 30. Pressão arterial sistólica final dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	77
Figura 31. Teste de tolerância à glicose dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	78

Figura 32. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	78
Figura 33. Índice HOMA-IR dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	79
Figura 34. Níveis séricos de insulina e leptina dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	80
Figura 35. Níveis séricos de TSH dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	80
Figura 36. Níveis séricos de T4 dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	81
Figura 37. Níveis séricos de T3 dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	81
Figura 38. Secções transversas de fragmentos do VE dos grupos controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	84
Figura 39. Secções transversas subendocárdicas do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	84
Figura 40. Expressão gênica de CANAL L e RyR no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	85
Figura 41. Expressão gênica de SERCA, PLB, NCX e CSQ no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	85
Figura 42. Expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ, CANAL L e a razão SERCA/PLB no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento..	86
Figura 43. Expressão protéica de pPLB thr 17, pPLB ser16 e as razões pPLB thr17/PLB e pPLB ser16/PLB no miocárdio dos animais controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento.....	87
Figura 44. Pressão arterial sistólica final dos animais controle e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	93
Figura 45. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	94
Figura 46. Índice HOMA-IR dos animais controle e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	95
Figura 47. Níveis séricos de insulina dos animais controle e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	96

Figura 48. Níveis séricos de leptina dos animais controle e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	96
Figura 49. Níveis séricos de TSH dos animais controle e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	98
Figura 50. Níveis séricos de T4 dos animais controle e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	98
Figura 51. Níveis séricos de T3 dos animais controle e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	99
Figura 52. Área seccional transversa dos miócitos (AST) realizada em fragmentos do ventrículo esquerdo de animais controle e obeso submetidos a 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	103
Figura 53. Expressão gênica de SERCA, PLB, RyR, CANAL L, NCX e CSQ normalizados pela β -actina no miocárdio dos animais controles e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	104
Figura 54. Expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ CANAL L e razão SERCA/PLB normalizados pela β -actina no miocárdio dos animais controles e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	107
Figura 55. Expressão protéica de pPLB Ser16, pPLB Thr17 e as razões pPLB Ser16/PLB e pPLB Thr17/PLB normalizados pela β -actina no miocárdio dos animais controles e obeso submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento.....	108
Figura 56. Resumo das vias de sinalização da insulina.....	115
Figura 57. Resumo da via de atuação da leptina.....	120
Figura 58. Resumo das vias de sinalização hipertrófica em cardiomiócitos.....	123
Figura 59. Resumo da cascata de ativação β -adrenérgica em cardiomiócitos.....	126
Figura 60. Fatores envolvidos na sinalização transcricional.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Perfil nutricional no momento inicial de obesidade.....	47
Tabela 2.	Perfil nutricional após 15 semanas.....	49
Tabela 3.	Estrutura macroscópica cardíaca <i>post mortem</i> após 15 semanas.....	55
Tabela 4.	Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático após 15 semanas.....	60
Tabela 5.	Perfil nutricional após 30 semanas.....	62
Tabela 6.	Estrutura macroscópica cardíaca <i>post mortem</i> após 30 semanas.....	69
Tabela 7.	Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático após 30 semanas.....	74
Tabela 8.	Perfil nutricional após 45 semanas	76
Tabela 9.	Estrutura macroscópica cardíaca <i>post mortem</i> após 45 semanas.....	83
Tabela 10.	Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático após 45 semanas	88
Tabela 11.	Perfil nutricional após 15, 30 e 45 semanas	91
Tabela 12.	Estrutura macroscópica cardíaca <i>post mortem</i> após 15, 30 e 45 semanas.....	101
Tabela 13.	Medida de associação linear de Pearson entre os níveis de T3 e expressão gênica após 15, 30 e 45 semanas.....	105
Tabela 14.	Teor de água nos tecidos cardíacos, pulmonar e hepático após 15, 30 e 45 semanas.	109

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1. Animais.....	28
2.2. Protocolo experimental.....	28
2.2.1. Composição das rações padrão e hiperlipídica.....	29
2.3. Avaliação nutricional dos animais.....	30
2.4. Caracterização da obesidade.....	31
2.5. Determinação do momento inicial de obesidade.....	31
2.6. Constituição dos grupos controle e obeso.....	31
2.7. Obesidade e comorbidades.....	32
2.7.1. Hipertensão arterial sistêmica.....	32
2.7.2. Intolerância à glicose.....	33
2.7.3. Resistência sistêmica à insulina.....	33
2.7.4. Dislipidemias e Hiperglicemia.....	34
2.7.5. Hiperinsulinemia e Hiperleptinemia.....	34
2.8. Dosagem dos hormônios tireoidianos.....	34
2.9. Caracterização da remodelação cardíaca.....	35
2.9.1. Estrutura do coração <i>post mortem</i>	35
2.9.2. Área seccional transversa do miócito.....	35
2.9.3. Expressão do RNAm miocárdico.....	36
2.9.3.1. Extração do RNA.....	37
2.9.3.2. Transcrição reversa do RNA (RT).....	38

2.9.3.3. PCR em tempo real.....	39
2.9.4. Expressão de proteínas miocárdicas.....	40
2.9.4.1. Extração das proteínas miocárdicas.....	41
2.9.4.2. Eletroforese em gel.....	41
2.9.4.3. Transferência e identificação das proteínas.....	42
2.9.4.3.1. Anticorpos primários utilizados.....	43
2.9.4.3.2. Anticorpo de normalização.....	43
2.9.4.3.3. Anticorpos secundários utilizados.....	44
2.9.4.4. Quantificação das proteínas.....	44
2.10. Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático.....	44
2.11. Análise Estatística.....	44
3. RESULTADOS.....	46
3.1. Caracterização do momento inicial de obesidade	46
3.2. Obesidade 15 semanas.....	48
3.2.1. Composição dos grupos controle e obeso.....	48
3.2.2. Perfil nutricional.....	48
3.2.3. Pressão arterial sistólica.....	50
3.2.4. Teste de tolerância à glicose.....	50
3.2.5. Índice de resistência à insulina.....	51
3.2.6. Análise sérica dos hormônios insulina e leptina.....	52
3.2.7. Análise sérica dos hormônios tireoidianos.....	53
3.2.8. Estrutura do coração <i>post mortem</i>	54
3.2.8.1. Análise macroscópica.....	54

3.2.8.2. Análise microscópica.....	56
3.2.9. Expressão de RNAm miocárdico.....	57
3.2.10. Expressão das proteínas miocárdicas.....	58
3.2.11. Determinação do teor de água nos tecido cardíaco, pulmonar e hepático.....	59
3.3. Obesidade 30 semanas.....	61
3.3.1. Composição dos grupos controle e obeso.....	61
3.3.2. Perfil nutricional.....	61
3.3.3. Pressão arterial sistólica.....	63
3.3.4. Teste de tolerância à glicose.....	63
3.3.5. Índice de resistência à insulina.....	64
3.3.6. Análise sérica dos hormônios insulina e leptina.....	64
3.3.7. Análise sérica dos hormônios tireoidianos.....	66
3.3.8. Estrutura do coração <i>post mortem</i>	68
3.3.8.1. Análise macroscópica.....	68
3.3.8.2. Análise microscópica.....	70
3.3.9. Expressão de RNAm miocárdico.....	71
3.3.10. Expressão das proteínas miocárdicas.....	72
3.3.11. Determinação do teor de água nos tecido cardíaco, pulmonar e hepático.....	73
3.4. Obesidade 45 semanas.....	75
3.4.1. Composição dos grupos controle e obeso.....	75
3.4.2. Perfil nutricional.....	75
3.4.3. Pressão arterial sistólica.....	77
3.4.4. Teste de tolerância à glicose.....	77

3.4.5. Índice de resistência à insulina.....	79
3.4.6. Análise sérica dos hormônios insulina e leptina.....	79
3.4.7. Análise sérica dos hormônios tireoidianos.....	80
3.4.8. Estrutura do coração <i>post mortem</i>	82
3.4.8.1. Análise macroscópica.....	82
3.4.8.2. Análise microscópica.....	83
3.4.9. Expressão de RNAm miocárdico.....	84
3.4.10. Expressão das proteínas miocárdicas.....	86
3.4.11. Determinação do teor de água nos tecido cardíaco, pulmonar e hepático.....	87
3.5. Comparação entre os grupos controles e obesos após 15, 30 e 45 semanas.....	89
3.5.1. Composição dos grupos controle e obeso.....	89
3.5.2. Perfil nutricional.....	89
3.5.3. Pressão arterial sistólica.....	92
3.5.4. Teste de tolerância à glicose.....	93
3.5.5. Índice de resistência à insulina.....	94
3.5.6. Análise sérica dos hormônios insulina e leptina.....	95
3.5.7. Análise sérica dos hormônios tireoidianos.....	97
3.5.8. Estrutura do coração <i>post mortem</i>	99
3.5.8.1. Análise macroscópica.....	99
3.5.8.2. Análise microscópica.....	102
3.5.9. Expressão de RNAm miocárdico.....	103
3.5.10. Expressão das proteínas miocárdicas.....	105
3.5.11. Determinação do teor de água nos tecido cardíaco, pulmonar e hepático.....	108

4. DISCUSSÃO.....	110
4.1- Momento inicial da obesidade.....	110
4.2. Constituição dos grupos controle e obeso.....	110
4.3. Perfil nutricional.....	111
4.4. Comorbidades.....	113
4.5. Hormônios tireoidianos e obesidade.....	119
4.6. Remodelação cardíaca.....	120
4.6.1. Estrutura do coração <i>post mortem</i>	120
4.6.2. Expressão de RNAm e proteínas miocárdicas.....	123
5. CONCLUSÃO.....	130
6. REFERÊNCIAS.....	131
7. ANEXOS.....	150
7.1. Perfil das rações.....	150
7.2. Curvas das dosagens dos hormônios tireoidianos.....	154
7.2.1. Curva da dosagem de T3.....	154
7.2.2. Curva da dosagem de T4.....	155
7.2.3. Curva da dosagem de TSH.....	155
7.3. Amplificação de PCR em tempo real.....	156
7.3.1. Curvas de amplificação dos grupos controle e obeso 15 semanas	156
7.3.2. Curvas de amplificação dos grupos controle e obeso 30 semanas.....	157
7.3.3. Curvas de amplificação dos grupos controle e obeso 45 semanas.....	158
7.4. Dificuldades na técnica de Western Blot.....	159

1- INTRODUÇÃO

A obesidade é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal,⁽¹⁾ representando um problema de abrangência mundial que afeta principalmente países industrializados.⁽²⁻⁴⁾ Atualmente mais de um bilhão de pessoas apresentam sobrepeso, sendo que, mais de 30% desta população é obesa.⁽⁵⁾ No Brasil, segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística,⁽⁶⁾ aproximadamente 40 milhões de pessoas têm sobrepeso e, deste grupo, 10,5 milhões são obesos. A pesquisa relata ainda, que 35% da população adulta brasileira se tornará obesa em 2025, refletindo-se em consequências econômicas para a saúde pública. Esta prevalência coloca o Brasil com número de internações hospitalares, devido ao excesso de peso, semelhante a dos países desenvolvidos, sendo 6,8% do total dos casos referente a homens e 9,3% a mulheres, o que equivale a 3,02% e 5,83%, respectivamente, dos custos totais de hospitalização.⁽⁷⁾

A etiologia da obesidade é multifatorial, sendo que a associação dos fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais contribui para o aumento do peso corporal. O comportamento adquirido pela moderna sociedade industrializada, envolvendo o sedentarismo, os hábitos alimentares inadequados ou a combinação de ambos têm levado ao aumento da prevalência da obesidade.⁽⁸⁻¹⁰⁾

A obesidade é fator de risco para muitas comorbidades, como diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, doenças cardiovasculares, respiratórias, digestivas, osteoarticulares, renais crônicas, inflamatórias e psicológicas,^(5,11,12) as quais, estão associadas com prejuízo da qualidade de vida e mortalidade.

O tecido adiposo deixou de ser conceituado apenas como depósito passivo dos estoques de triacilglicerol, sendo atualmente considerado um órgão com múltiplas funções, secretando elevado número de mediadores que participam de diversos processos, como a

oxidação dos lipídeos e glicose, regulação da ingestão alimentar, controle do balanço energético e ação da insulina, entre outros.⁽¹³⁻¹⁵⁾

A obesidade frequentemente tem sido associada com alterações estruturais e funcionais do coração em humanos.^(12,16-26) As diversas alterações cardíacas comumente observadas na obesidade, como remodelação excêntrica^(12,16-19) ou concêntrica do ventrículo esquerdo,⁽²⁰⁾ modificações hemodinâmicas, como aumento da frequência cardíaca, do volume total sanguíneo, do débito cardíaco e da resistência vascular periférica^(12,16-22) e funcionais sistólica e diastólica,⁽²³⁻²⁶⁾ podem ser precursoras da insuficiência cardíaca. Pesquisas recentes mostram que a hipertrofia cardíaca está diretamente relacionada com o aumento do índice de massa corporal (IMC) e das gorduras visceral e epicárdica.^(16,27) Desta forma, assumi-se que um longo estado de obesidade eventualmente levará à insuficiência cardíaca.⁽¹⁹⁾

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para estudar a relação obesidade e coração. Modelos genéticos, como ratos *Zucker* e camundongos deficientes de leptina *Lep/Lep* (*ob/ob*) geralmente apresentam disfunção cardíaca.⁽²⁸⁻³⁴⁾ Entretanto, estes animais podem não apresentar algumas anormalidades exibidas em humanos obesos, como hiperinsulinemia, hiperglicemia, hipertensão arterial e hipertrofia cardíaca.^(35,36) A administração de uma dieta rica em gordura para roedores representa uma alternativa em modelos experimentais, uma vez que, reproduz muitas características da obesidade humana.^(37,38) Desta forma, a obesidade induzida por dieta hiperlipídica torna-se uma ferramenta fundamental na avaliação das possíveis alterações cardíacas resultantes do excesso de tecido adiposo. Trabalhos mostram que a obesidade, induzida por dietas hiperlipídicas, apresentam resultados discordantes em relação à disfunção cardíaca. Enquanto pesquisas mostraram que ratos obesos por dieta hiperlipídica, durante 12 e 15 semanas, apresentaram disfunção contrátil,⁽³⁹⁻⁴¹⁾ outros investigadores têm mostrado que a obesidade, por dieta hiperlipídica, durante um período de 11 e 12 semanas, não apresenta alterações na função

cardíaca.^(38,42) A discrepância nos resultados encontrados poderia ser devido às diferentes técnicas utilizadas, assim como, o fato de que estes autores não avaliaram a intensidade e a duração da obesidade. Embora as alterações na função cardíaca, experimental e humana, ocorram com elevação do tecido adiposo, os mecanismos responsáveis por estas modificações não estão estabelecidos. Muitos fatores têm sido sugeridos como responsáveis pelas possíveis anormalidades cardíacas em modelos de obesidade, entre eles, as proteínas reguladoras do trânsito de cálcio (Ca^{+2}) miocárdico.⁽³⁹⁾

O trânsito de Ca^{+2} representa um dos principais mecanismos reguladores do ciclo de contração e relaxamento cardíaco.⁽⁴³⁾ Enquanto a rápida elevação da concentração de Ca^{+2} citosólico induz a contração, sua diminuição provoca o relaxamento. A contração cardíaca inicia-se com a despolarização das células cardíacas pelo potencial de ação, abertura dos canais de Ca^{+2} do tipo L (CANAL L) e influxo de Ca^{+2} através destes canais.⁽⁴⁴⁾ O conseqüente influxo de Ca^{+2} desencadeia liberação de grande quantidade de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (RS) pelos receptores rianodina (RyR).⁽⁴²⁾ O aumento do Ca^{+2} citosólico possibilita a ligação desse íon com a troponina C (TnC) e, a conseqüente interação actina-miosina. A intensidade da contração depende da quantidade e da responsividade dos miofilamentos ao Ca^{+2} . O relaxamento inicia-se quando a concentração intracelular de Ca^{+2} é reduzida, principalmente, pela recaptção do Ca^{+2} pela ATPase de Ca^{+2} do RS (SERCA). A função da SERCA é regulada pela fosfolambam (PLB) que, em seu estado fosforilado, na serina 16 (pPLB ser16) via adenosina monofosfato cíclico (AMPc), ou na treonina 17 (pPLB thr17) via quinase dependente de cálcio, calmodulina, permite a recaptura do Ca^{+2} pela SERCA para dentro do RS.⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾ A calsequestrina (CSQ) proteína do lúmen do RS tem a função de estoque de Ca^{+2} . Assim, o Ca^{+2} recapturado pela SERCA para dentro do RS é armazenado pela CSQ, devido à sua capacidade de ligação aos íons Ca^{+2} , tornando-o disponível para a próxima liberação pelos RyR. Outra proteína, importante na regulação do

efluxo de Ca^{+2} celular é o trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$ (NCX), que, utiliza o gradiente de Na^{+} transmembrana para catalisar a extrusão do Ca^{+2} . Desta forma, a quantidade e/ou atividade de diferentes proteínas, localizadas no sarcolema e no RS, regulam o trânsito de Ca^{+2} celular, modulando a contração e o relaxamento do miocárdio.^(43,44) As alterações no trânsito de Ca^{+2} intracelular podem ser decorrentes de prejuízo na expressão, função ou regulação das proteínas, ocasionados por modificações nos mecanismos de transcrição, tradução e/ou pós-traducional.

O trânsito de Ca^{+2} miocárdico tem sido extensivamente estudado em diversos modelos experimentais e frequentemente relacionado com disfunção cardíaca.⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾ Em modelos com desenvolvimento de insuficiência cardíaca, a redução da expressão da SERCA foi observada por diversos autores;⁽⁵¹⁻⁵³⁾ em contrapartida, há relatos do aumento compensatório dos níveis de NCX.^(53,54) A expressão de PLB tem resultados controversos, sendo encontrado preservada, diminuída ou aumentada na insuficiência cardíaca experimental.^(51,52,54,55) Entretanto, a literatura mostra escassez de estudos que avaliaram a relação entre a obesidade por dieta hiperlipídica, o RNAm e as proteínas envolvidas na homeostase de Ca^{+2} miocárdico. Pesquisa com cães,⁽⁵⁶⁾ alimentados com dieta hiperlipídica por 6 semanas, verificou níveis semelhantes de RNAm e protéicos da RyR; contudo, a expressão protéica de RyR fosforilada foi elevada no grupo alimentado com dieta rica em gordura. Outros investigadores,⁽⁵⁷⁾ também utilizando cães, alimentados por 9 semanas com dieta hiperlipídica, observaram diminuição da expressão de RNAm da SERCA e do PLB no miocárdio. Relling *et al*⁽³⁹⁾ utilizando ratos submetidos à dieta hiperlipídica, por 12 semanas, mostraram que a obesidade, não acompanhada de comorbidades, promoveu aumento da expressão protéica da SERCA e da PLB e diminuição dos níveis de PLB fosforilado. Em pesquisa recente em nosso laboratório, Lima-Leopoldo *et al*⁽⁵⁸⁾ observaram que a obesidade, induzida por um ciclo de dietas hiperlipídicas em ratos *Wistar* durante 15 semanas, acrescida de solução de água com açúcar, aumentou os níveis de

RNAm da SERCA, da RyR e da PLB. A divergência nos resultados acima pode ser atribuída aos diferentes períodos, dietas e unidades experimentais.

Diversos trabalhos têm indicado a participação dos hormônios tireoidianos como moduladores da transcrição gênica das proteínas reguladoras do trânsito de Ca^{+2} no miocárdio.⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ A ação genômica do triiodotironina (T3) é mediada pela ligação aos seus receptores nucleares, regulando a expressão de genes por meio de interações com seqüências específicas do DNA. Os receptores ligados ao T3, em combinação com o recrutamento de proteínas coativadoras, levam à ativação da transcrição.⁽⁶²⁾ A literatura relata que os hormônios tireoidianos podem atuar positivamente na expressão protéica da SERCA, RyR e canal L; e, negativamente, no PLB e NCX.⁽⁶¹⁾ Assim, a influência dos hormônios tireoidianos nas proteínas responsáveis pela homeostase de Ca^{+2} pode acarretar alterações na contração e relaxamento cardíaco.⁽⁶³⁾ No entanto, os estudos da função tireoidiana na obesidade apresentam resultados inconsistentes sendo descritos variavelmente, como normal, elevada, ou diminuída em indivíduos obesos.⁽⁶⁴⁻⁷⁰⁾

Além da carência de estudos que relacionam obesidade, RNAm e as respectivas proteínas reguladoras do trânsito de Ca^{+2} intracelular, não foram encontrados na literatura pesquisas que avaliaram a influência do tempo de exposição à obesidade sobre essas variáveis. Trabalhos longitudinais em humanos mostraram uma associação da duração da obesidade com as diversas anormalidades cardíacas;⁽⁷¹⁻⁷³⁾ entretanto, estudos clínicos que avaliam a influência da obesidade apresentam limitações éticas. Por esta razão, a experimentação animal é essencial na avaliação da relação entre o tempo de exposição à obesidade e os fatores envolvidos na regulação cardíaca, como as proteínas do trânsito de Ca^{+2} miocárdico.

O objetivo principal desse estudo foi testar a hipótese que o aumento no tempo de exposição à obesidade acarreta diminuição na expressão e/ou fosforilação das proteínas

relacionadas com o trânsito de Ca^{+2} miocárdico. A hipótese, que há redução das proteínas e dos respectivos níveis de RNAm, foi baseada em estudos clínicos que mostraram uma relação entre a duração da obesidade e a presença de disfunção cardíaca,^(19,71-73) que, como referido anteriormente, pode ser causada por alterações nas proteínas do trânsito de cálcio miocárdico.⁽³⁹⁾ Além disso, este estudo teve como objetivo secundário constatar se a diminuição na expressão gênica foi acompanhada de redução dos níveis hormonais tireoidianos.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais

No presente estudo foram utilizados 110 ratos *Wistar* machos, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento da Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, São Paulo, Brasil. Os animais foram mantidos no biotério de origem sob as seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de *Pinus* esterilizada, temperatura ambiente ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade controlada ($55 \pm 5^{\circ}\text{C}$) e ciclos de iluminação de 12 horas. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*” publicado pelo U.S. National Institutes of Health⁽⁷⁴⁾ e aprovados pela Comissão de Ética Experimental em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

2.2- Protocolo Experimental

Os ratos foram randomizados em dois grupos: tratados com dietas normocalórica (DN, n= 55) ou hipercalórica (DH, n= 55). Os ratos DN receberam ração padrão para roedores (RC Focus 1765, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil) e os DH um ciclo de quatro rações hiperlipídicas (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil), por períodos de 15, 30 e 45 semanas. As rações hiperlipídicas foram alternadas a cada 24 horas. Os ratos DN e DH receberam 50 g de ração e após 24 horas a quantidade não ingerida foi mensurada. A oferta de água foi *ad libitum*.

As rações idealizadas no Laboratório Experimental de Músculo Papilar Isolado do Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp, foram adaptadas a partir de modelo dietético utilizado anteriormente pelo grupo.⁽⁷⁵⁾

2.2.1- Composição das rações padrão e hiperlipídica

A ração padrão RC Focus 1765 foi composta pelos seguintes ingredientes: fosfato bicálcico, óleo de soja degomado, cloreto de sódio, milho moído, aditivo antioxidante, farelo de soja, farelo de trigo, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, suplemento mineral e vitamínico. As quatro rações hiperlipídicas RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416 apresentaram a mesma composição nutricional, com exceção dos aditivos flavorizantes, queijo, bacon, chocolate ou baunilha, respectivamente; as rações foram constituídas de cloreto de sódio, caseína, soro de leite em pó, concentrado protéico de soja, milho integral moído, farinha de bolacha, fosfato bicálcico, carbonato de cálcio, óleo de milho, aditivos emulsificante e antioxidante, suplemento mineral e vitamínico.

A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hiperlipídica, mensurada pela empresa Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil, está apresentada no Quadro 1.

Quadro 1- Composição dos macro e micronutrientes das rações (%)

Componentes	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Vitaminas e Minerais	11,3	12,1
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Calorias (Kcal/g)	2,95	3,65
% Calorias da proteína	29,8	21,9
% Calorias do carboidrato	57,9	28,9
% Calorias da gordura	12,3	49,2

2.3- Avaliação nutricional dos animais

O perfil nutricional foi determinado pela análise de ingestão calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal, índice de adiposidade, lipídios, glicemia e proteína sérica. A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal (g) multiplicada pelo valor energético de cada ração (kcal). Com a finalidade de analisar a capacidade do animal converter a energia consumida em peso corporal, foi calculada a eficiência alimentar (EA), dividindo-se o ganho total de peso corporal dos animais (g) pela energia total ingerida (kcal). O peso corporal dos animais foi aferido semanalmente, utilizando-se uma balança digital Mettler® modelo Spider 2 (Toledo do Brasil Indústria de Balanças Ltda, São Bernardo do Campo, SP, Brasil). A quantidade de gordura corporal total foi determinada pela somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral. O índice de adiposidade foi calculado dividindo-se a gordura corporal total (g) pelo peso corporal final (g), multiplicado por 100.⁽⁷⁶⁾ Para análise do perfil glicêmico, lipídico e protéico, os ratos foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg/IP, Cristália® Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, São Paulo, Brasil) e eutanasiados por decapitação. A seguir, as amostras de sangue foram coletadas em tubos *Falcon*, centrifugadas a 3000rpm por 10 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburg, Germany) e armazenadas em freezer à -80°C (Thermo Fisher Scientific LLC, Asheville, NC, USA). As concentrações séricas de glicose, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteínas de alta e baixa densidade foram determinadas utilizando-se kits específicos (CELM®, Barueri, São Paulo, Brasil) e analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Technicon, RA-XT™ System, Global Medical Instrumentation, Minnessota, USA). Os níveis de ácidos graxos não-esterificados (NEFA) foram avaliados utilizando kit colorimétrico (WAKO NEFA-C, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) pelo método de Johnson & Peters.⁽⁷⁷⁾

2.4- Caracterização da obesidade

A obesidade nos animais ao final dos períodos de 15, 30 e 45 semanas de tratamento foi determinada utilizando-se o índice de adiposidade. Diversos estudos têm utilizado este índice como ferramenta para avaliar a quantidade de gordura corporal em roedores.^(38,42) Este método de baixo custo é facilmente realizado, pois permite avaliar os depósitos de gordura corporal de maneira precisa e consistente.

2.5- Determinação do momento inicial da obesidade

O momento do início da obesidade foi determinado aferindo-se semanalmente o peso corporal dos animais. Na terceira semana de tratamento, observou-se aumento significativo do peso corporal no grupo DH em relação ao DN. Com a finalidade de verificar se a diferença do peso corporal entre os grupos era resultante do maior índice de adiposidade nos ratos DH, foram eutanasiados 19 animais de cada grupo para determinação da quantidade de gordura corporal. Como o grupo DH apresentou índice de adiposidade estatisticamente maior do que o DN, a terceira semana de tratamento foi considerada como o *início da obesidade* no grupo DH.

2.6- Constituição dos grupos controle e obeso

Após 15, 30 e 45 semanas do início da obesidade, os grupos de animais que receberam ração padrão e hiperlipídica foram denominados como Controle (C) e Obeso (Ob), respectivamente, e alocados em seis sub-grupos: C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅.

Na experimentação biológica, em especial estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada uma homogeneidade de resposta. Neste sentido, os ratos submetidos à ração padrão e hiperlipídica poderiam apresentar, em maior ou menor escala, características comuns, como, por exemplo, o índice

de adiposidade. Estudo publicado previamente⁽⁷⁸⁾ mostrou que este fato pode conduzir a um erro de classificação, ou seja, animais submetidos à ração padrão poderiam ser classificados como controle, quando na realidade, exibem características de animais obesos, ou vice versa. Por essa razão, tornou-se necessário estabelecer um critério que separasse os animais em dois grupos distintos de acordo com o índice de adiposidade. Com essa finalidade, foi construído um intervalo de 95% de confiança (IC) para a média do índice de adiposidade dos ratos controle e obeso. Foi adotado como ponto de separação (PS) entre os grupos, o ponto médio entre o limite superior do C₁₅ e o limite inferior do Ob₁₅; a partir deste ponto foram excluídos do grupo C₁₅ os animais com índice de adiposidade acima do PS e do grupo Ob₁₅ os animais com índice de adiposidade abaixo do PS. O mesmo procedimento foi realizado para os grupos C₃₀; Ob₃₀; C₄₅ e Ob₄₅.

Representação esquemática do critério utilizado para composição dos grupos controle e obeso

2.7- Obesidade e comorbidades

As alterações no perfil cardiovascular, metabólico e hormonal, como hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia^(38,39,79-84) que podem estar frequentemente associadas à obesidade, foram avaliadas em todos os sub-grupos.

2.7.1- Hipertensão arterial sistêmica

Como os animais obesos podem apresentar hipertensão arterial sistêmica,^(80,85,86) foi mensurada a pressão arterial sistólica (PAS). A PAS foi aferida indiretamente por

plestimografia de cauda, utilizando-se electro-sphygmomanometer, Narco Bio-System[®], modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc, USA); este método não permite avaliar a pressão arterial diastólica. Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal, os ratos foram previamente aquecidos, à temperatura de 40°C por 5 minutos, em uma caixa de madeira (50 x 40 cm) forrada com maravalha de Pinus autoclavada. Após o aquecimento foi acoplado o sensor e o manguito em torno da cauda do animal; o manguito foi insuflado até atingir pressão de 200 mmHg e, posteriormente, desinsuflado. As pulsações arteriais foram registradas em polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, USA).

2.7.2- Intolerância à glicose

Como os animais obesos podem apresentar níveis glicêmicos normais em condições basais, foi analisado o perfil glicêmico após uma sobrecarga de glicose. A partir deste teste é possível constatar se os ratos obesos desenvolveram intolerância à glicose, isto é, apresentaram níveis de glicemia elevados em relação ao grupo C após a sobrecarga de glicose. As coletas de sangue, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal após um período de jejum de 6 horas e após a administração intraperitoneal de glicose 25% (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, USA), equivalente a 2 g/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0, considerado condição basal, e após 15, 30, 60, 90 e 120 minutos da infusão da glicose. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda, SP, Brasil). A intolerância à glicose foi avaliada pelo perfil da curva e área glicêmica.

2.7.3- Resistência sistêmica à insulina

Como os animais obesos podem apresentar resistência à ação da insulina,^(38,39,81,83,84) calculamos o índice HOMA-IR (homeostatic model assessment), que baseia-se nas

concentrações de glicose e insulina de jejum. O cálculo foi realizado pela seguinte fórmula: concentração de insulina ($\mu\text{U/mL}$) multiplicada pelos níveis glicêmicos (mM/L) dividida por 22,5.⁽⁸⁷⁾

2.7.4- Dislipidemias e Hiperglicemia

Como os animais obesos podem apresentar alterações do perfil lipídico e glicêmico,^(38,80,81) foram avaliadas as concentrações séricas de glicose, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteínas de alta e baixa densidade e ácidos graxos não-esterificados (NEFA). A metodologia utilizada foi descrita no item 2.3, referente à avaliação nutricional dos animais.

2.7.5 - Hiperinsulinemia e Hiperleptinemia

Como os animais obesos podem apresentar hiperinsulinemia e hiperleptinemia,^(81-83,88) foram analisados os níveis séricos destes hormônios. As concentrações hormonais foram determinadas pelo método de ELISA utilizando-se kits específicos (Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.8- Dosagem dos hormônios tireoidianos

Como os animais os animais obesos podem apresentar alterações hormonais tireoidianas⁽⁶⁴⁻⁷⁰⁾ e que estas podem influenciar a expressão das proteínas reguladoras do trânsito de cálcio miocárdico⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ foram dosadas as concentrações séricas totais de hormônio estimulante da tireóide (TSH), tiroxina (T4) e triiodotironina (T3). A dosagem sérica foi realizada pela empresa Genese Produtos Diagnósticos (São Paulo, SP, Brasil) com a

tecnologia Luminex Corporation's xMAP™, por reação de imunoensaio multiplex, Lincoplex kits (Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA).

2.9- Caracterização da remodelação cardíaca

Como a obesidade pode acarretar remodelação cardíaca,^(12,16-19) o coração foi analisado por meio de estudos estruturais e moleculares. A estrutura foi avaliada *post mortem* por análises macroscópicas e microscópicas. A avaliação molecular do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) e das proteínas miocárdicas relacionadas com o trânsito de cálcio, objetivo desse trabalho, foi realizada, respectivamente, pelas técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e *Western Blot*. Os métodos utilizados no estudo na para análise da remodelação cardíaca estão descritos abaixo.

2.9.1- Estrutura do coração *post mortem*

As análises estruturais, macro e microscópica *post mortem*, permitem identificar a presença de remodelação cardíaca a nível atrial e ventricular. A remodelação a nível macroscópico, que identifica a presença ou ausência de hipertrofia, foi determinada pela análise dos seguintes parâmetros: peso total do coração, do átrio, dos ventrículos esquerdo e direito, e das respectivas relações com o PCF e comprimento da tíbia. A remodelação do VE a nível microscópico foi avaliada pela mensuração da área seccional transversa do miócito (AST; μm^2), de acordo com metodologia descrita abaixo.

2.9.2- Área seccional transversa do miócito

A análise da área seccional transversa do miócito foi realizada utilizando amostras do ventrículo esquerdo (VE). Após toracotomia mediana, o coração foi rapidamente removido e amostras da parede anterior do VE foram retiradas a 6 mm do ápice. Os fragmentos foram

colocados em solução de formol a 10% por 24 h.⁽⁸⁹⁾ As amostras foram submetidas a cortes histológicos de 5 µm de espessura e posteriormente processadas segundo a técnica de Reticulina de Gömori.⁽⁹⁰⁾ O fragmento foi imerso em permanganato de potássio 1%, ácido oxálico 3%, alúmen de ferro 1%, prata amoniacal, formol 10%, cloreto de ouro 0,2% e hiposulfito de sódio 2% e posteriormente corado pelo ácido púrico. A técnica de Reticulina de Gömori permitiu mensurar de forma mais precisa a área transversa do miócito do VE. O cálculo das áreas seccionais dos miócitos foi realizado mensurando-se 50 a 70 células por amostra. Os miócitos analisados, localizados na camada subendocárdica, apresentavam forma arredondada e núcleo centralizado. As áreas seccionais transversas dos miócitos (AST; µm²) foram utilizadas como indicador do tamanho celular, caracterizando presença ou ausência de hipertrofia cardíaca. Os cortes histológicos, realizados para a análise AST, foram ampliados 40 vezes com o auxílio de microscópio (Leica Mikroschopie & System GmbH, Wetzlar, Germany), que acoplado a uma câmera de vídeo envia imagens digitais a um computador dotado de programa de análise de imagens (Image Pro-plus, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA).

2.9.3- Expressão do RNAm miocárdico

A expressão do RNAm foi realizada pela técnica de PCR em tempo real.⁽⁹¹⁾ O método compreende as seguintes etapas: extração de RNA de amostras biológicas, conversão das moléculas de RNA em ácido desoxirribonucléico complementar (cDNA), amplificação de um segmento do cDNA a partir da reação em cadeia da polimerase e quantificação dos fragmentos amplificados. A possibilidade de monitorar, ao longo da reação, os ciclos de amplificação, confere maior precisão e reprodutibilidade à PCR em tempo real quando comparado com a PCR convencional.⁽⁹²⁾

Neste trabalho foi realizada expressão de RNAm das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio intracelular, ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático (SERCA), Fosfolambam (PLB), Receptor Rianodina (RyR), CANAL L, Calsequestrina (CSQ) e Trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). Além disso, foi analisada a expressão do gene constitutivo, β -actina. A metodologia utilizada está descrita abaixo.

2.9.3.1- Extração de RNA miocárdico

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C . A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax[®] T25 Basic, Wilmington, NC, USA) após adição de 1 ml de TRIzol[®] (Invitrogen Brasil, São Paulo) para cada 100 mg de tecido. O TRIzol[®], solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, tem como finalidade manter a integridade do RNA durante a lise celular que ocorre no processo de homogeneização.⁽⁹³⁾

A amostra homogeneizada foi transferida para um tubo de 1,5 mL e incubada à temperatura ambiente (24°C) durante 5 minutos. Em seguida, adicionou-se clorofórmio (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,2 ml/1ml TRIzol[®]; a amostra foi agitada, manualmente, com vigor por 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente. Após essa segunda incubação, o material foi centrifugado (Eppendorf Centrifuge 5804R, Hamburg, Germany), a $12.000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . Este processo separou a amostra homogeneizada de VE em três fases: a) uma inferior, de fenol-clorofórmio e de coloração rosada, contendo DNA; b) uma interfase branca com proteínas; e c) uma fase superior, aquosa, incolor, contendo RNA.

A porção de RNA foi transferida para um tubo de 1,5 mL; a seguir, adicionou-se álcool isopropílico (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 0,5 ml/1ml de TRIzol[®]; a amostra foi, então, agitada manualmente 10 vezes por inversão, incubada por 10

minutos à temperatura ambiente (24°C) e, posteriormente, centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o precipitado de RNA foi visualizado como um gel esbranquiçado e semitransparente, denominado *pellet*. Este foi lavado com álcool etílico 75% (Merck KGaA, Damstadt, Germany) na proporção de 1mL/1mL de TRIzol® e centrifugado a 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Após o álcool etílico ser descartado, o *pellet* foi seco por 10 minutos à temperatura ambiente. O sedimento de RNA foi diluído em 20 µL de água ultrapura e incubado por 10 minutos a 60°C em banho-maria (Fanem 100, São Paulo, Brasil); a finalidade deste procedimento foi inativar a possível presença de RNase.

A quantificação do RNA foi realizada com auxílio de um espectrofotômetro (GeneQuant™ RNA/DNA Calculator, Amersham Pharmacia Biotech, Cambridge, England) na absorbância de 260 nm. A pureza do RNA foi constatada pela razão das absorbâncias em 260/280 nm. As amostras cujas razões foram inferiores a 1,6 foram descartadas por apresentarem contaminação por proteínas. A concentração do RNA foi quantificada de acordo com a fórmula: $[RNA] = A_{260} \times 40 \times 70$. Posteriormente, para verificar a integridade do RNA, 1 µL do RNA das amostras quantificadas foram diluídas em 8 µL de água ultrapura e 1 µL de corante (Orange G, Acros Organics, New Jersey, USA), aplicadas em gel de agarose 1% (0,3 g agarose, 30 mL de TAE Buffer 1x, 3 µL de brometo de etídio) e submetidas a uma voltagem de 80 mV (Power Pac Basic™ Bio-Rad, Hercules, CA, USA) por 20 minutos. A integridade do RNA foi constatada pela visualização das bandas de RNA ribossômico, 28S e 18S, e ausência de rastros do RNA no gel. As amostras que se mostraram íntegras foram utilizadas como substrato para o processo de transcrição reversa.

2.9.3.2- Transcrição reversa do RNA (RT)

Transcrição reversa é um processo que converte as moléculas do RNA em ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA). As amostras do RNA do músculo cardíaco foram

submetidas à transcrição reversa utilizando-se o kit *SuperScript II First-Strand Synthesis System for RT-PCR*[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amostras utilizadas no experimento foram incubadas em um termociclador (Mastercycler[®] Gradient, Eppendorf, Hamburg, Germany). Inicialmente, uma mistura contendo 1000 ng/μL de RNA total, 1 μL de *dNTP mix* 10 mM, 1 μL de random hexamers 50 ng/μL e 7 μL de H₂O DEPC (dietil pirocarbonato) foi incubada durante 5 minutos a 65°C. A seguir, após adição de 9 μL de uma solução contendo, 2 μL de tampão RT 10x, 4 μL de MgCl₂ 25 mM, 2 μL de DTT 0,1 M e 1 μL de inibidor de RNase, *RNaseOUT*[®], a mistura foi incubada por 2 minutos a 25°C. Após o acréscimo de 1 μL da enzima *SuperScript II*[®], procedeu-se a nova incubação por 10, 50 e 15 minutos a 25°C, 42°C e 70°C, respectivamente. Após adição de 1 μL de RNase H, a solução foi incubada por 20 minutos a 37°C.

Para verificar a qualidade da transcrição reversa foi realizado um controle negativo, ou seja, uma amostra de RNA foi submetida à reação de RT, porém, a enzima *SuperScript II*[®] foi substituída por 1 μL de H₂O DEPC. O controle negativo, utilizado nas reações de PCR, foi confirmado pela ausência de amplificação de RNAm.

2.9.3.3- PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi realizada com ensaios específicos contendo sonda *TaqMan* MGB-FAM (Applied Biosystems, CA, USA). A identificação dos ensaios (primers) está apresentado no Quadro 2. O sistema *TaqMan* utiliza uma sonda fluorescente que permite a detecção de cópias do produto específico do RNAm, conforme seu acúmulo durante os ciclos da reação. A sonda é constituída por um corante *reporter* fluorescente na extremidade 5' e um corante *quencher* na extremidade 3'. Enquanto a sonda está intacta, a proximidade do *quencher* reduz a fluorescência emitida pelo corante *reporter* através da transferência de energia por ressonância de fluorescência. A sonda se anela a sequência e é clivada por meio

da atividade da nuclease 5' da Taq DNA polimerase. A clivagem da sonda separa o corante *reporter* do corante *quencher*, aumentando o sinal da fluorescência emitida pelo corante *reporter*. A fluorescência foi monitorada em tempo real com um aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems, CA, USA). As amostras foram normalizadas pelo controle interno β -actina e a quantificação da expressão realizada pelo método $\Delta\Delta CT$, conforme manual do fabricante (Applied Biosystems, CA, USA).

Quadro 2. Ensaios utilizados na PCR em tempo real

Gene	Ensaios
SERCA	Rn00568762_m1
PLB	Rn01434045_m1
RyR	Rn01470303_m1
NCX	Rn00570527_m1
CSQ	Rn00567508_m1
CANAL L	Rn00709287_m1
β-actina	Rn00667869_m1
SERCA: ATPase de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático; PLB: Fosfolambam; RyR: Receptor de Rianodina; NCX: Trocador Na^+ / Ca^{+2} ; CSQ: Calsequestrina.	

2.9.4- Expressão de proteínas miocárdicas

A expressão protéica foi realizada pela técnica de *Western Blot*, método frequentemente utilizado em pesquisas para detectar proteínas em um homogenato de tecido biológico.⁽⁹⁴⁾ O método compreende as seguintes etapas: extração de proteínas, eletroforese em gel, transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose, identificação das proteínas por anticorpos específicos e quantificação dos *blots* de polipetídeos.⁽⁹⁵⁾

Neste trabalho foi realizada a expressão das proteínas relacionadas com os com o trânsito de cálcio intracelular, ATPase de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático (SERCA), Fosfolambam (PLB), PLB fosforilado Ser16 (pPLB Ser16), PLB fosforilado Thr17 (pPLB Thr17), CANAL L e Calsequestrina (CSQ). Além disso, foi analisada a expressão da proteína de normalização, β -actina. A metodologia de *Western Blot* está descrita abaixo.

2.9.4.1- Extração das proteínas miocárdicas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C . A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra TurraxTM T25 Basic, Wilmington, USA) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, sucrose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e inibidor de protease (0,1mg/mL, Sigma, St. Louis, MO, USA). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C , com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburg, Germany) a 12000 rpm por 20 minutos a 4°C , e o sobrenadante transferido para tubos *eppendorfs* e armazenado em freezer -80°C . A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford,⁽⁹⁶⁾ utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) como padrão.

2.9.4.2- Eletroforese em gel

Após a quantificação da concentração protéica, as amostras cardíacas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e β -mercaptoetanol 200mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6,8, poliacrilamida 30%,

APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed). O gel de resolução apresentava uma concentração de 6 a 15%, dependente do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, *Kaleidoscope Prestained Standards* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), por um período variável de acordo com o tamanho da proteína, em média 1h30 minutos, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%).

2.9.4.3- Transferência e identificação das proteínas

As proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose utilizando-se sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) contendo tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). Após a transferência os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução bloqueadora a 0,5% de leite em pó desnatado Molico® (Nestlé Brasil, Araçatuba, SP, Brasil), dissolvido em tampão TBS-T (Tris 10mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente (24°C) sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T (Tris 10mM, pH 7,6, NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por 2 horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBS-T. A imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA).

Finalmente, as membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., USA), nos tempos padronizados para cada proteína cardíaca em análise.

2.9.4.3.1- Anticorpos primários utilizados

- *Ryanodine Receptor, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Phospho-RYR2 (ser2809), rabbit* (Badrilla, Leeds, West Yorkshire, UK). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:2000.
- *Serca2 ATPase, mouse IgG1* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1: 2500.
- *Phospholamban, mouse IgG2a* (ABR, Affinity BioReagents, Golden, CO, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 2 µg/ml.
- *Phospho-Phospholamban (ser16), rabbit* (Badrilla, Leeds, West Yorkshire, UK): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Phospho-Phospholamban (thr17), rabbit* (Badrilla, Leeds-UK): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:5000.
- *Exchanger Na⁺/Ca²⁺, mouse IgG2b* (Upstate, Lake Placid, NY, USA): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:2000.
- *Calcium Channel, Voltage Gated Alpha 1C, rabbit* (Chemicon International, Temecula, CA, USA). Concentração recomendada pelo fabricante, 1:100.

2.9.4.3.2- Anticorpo de normalização

- *β-Actin, mouse IgG1* (Santa Cruz Biotechnonology Inc, CA, USA): Concentração recomendada pelo fabricante, 1:200.

2.9.4.3.3- Anticorpos secundários

Os anticorpos secundários, anti-rabbit IgG-HRP SC2004 e anti-mouse IgG-HRP SC2005 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, USA), anti-anticorpos primários foram utilizados na titulação de 1:5000-1:10000.

2.9.4.4- Quantificação das proteínas

As análises quantitativas das bandas protéicas (*blots*) foram realizadas pelo programa *Scion Image* (Scion Corporation, Frederick, Maryland, EUA), *software* livre, disponível no endereço <http://www.scioncorp.com/>.

2.10- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

Em razão da obesidade poder acarretar aumento na volemia corporal dos ratos,⁽⁹⁷⁾ o que poderia promover acúmulo de líquido nos tecidos, foi realizada a avaliação do teor de água tecidual nas amostras de ventrículos esquerdo e direito, átrio, pulmão e fígado. Após a remoção do tecido a ser examinado, foi realizada a pesagem *in natura*. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa (Kamp Metalúrgica, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil), sob temperatura de $55 \pm 5^{\circ}\text{C}$, por um período de 48 horas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: $[(\text{PN} - \text{PS})/\text{PN}] \times 100\%$, onde PN representa o peso *in natura* e o PS o peso seco.

2.11- Análise Estatística

O perfil nutricional, as comorbidades associadas à obesidade e as análises da remodelação cardíaca de cada período de tratamento (15, 30 e 45 semanas) foram expressas por meio de medidas descritivas de posição e variabilidade e submetidas ao teste “*t*” de Student para amostras independentes.

A comparação do perfil glicêmico entre os grupos, visualizado tanto pelo teste de tolerância à insulina quanto pelo teste de tolerância à glicose, foi realizada pela análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.⁽⁹⁸⁾

A comparação dos seis grupos experimentais (C₁₅, Ob₁₅, C₃₀, Ob₃₀, C₄₅ e Ob₄₅) foi realizada pela técnica de análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni. A análise de associação entre as concentrações do hormônio tireoidiano e os níveis de expressão gênica foi determinada pelo teste de correlação linear de Pearson. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%. Os valores de *p* entre 0,055 e 0,15 foram evidenciados neste estudo.

3. RESULTADOS

Os resultados dos grupos, isoladamente, 15, 30 e 45 semanas são apresentados por capítulos apenas para facilitar a visualização dos dados; entretanto, o resultado conjunto dos três momentos de avaliação, apresentado após a exposição isolada, foi o objeto da discussão neste trabalho.

3.1- Caracterização do momento inicial de obesidade

O peso corporal foi semelhante nas duas primeiras semanas de tratamento em ambos os grupos C e Ob; entretanto, após a 3ª semana de tratamento, o peso corporal dos animais Ob foi significativamente maior que os C (Figura 1). Neste momento, o maior peso corporal dos Ob foi associado ao aumento do índice de adiposidade, caracterizando o momento inicial de obesidade (C_0 e Ob_0) (Figura 1; Tabela 1).

Figura 1. Evolução semanal do peso corporal dos animais controle (C_0 , $n=19$) e obeso (Ob_0 , $n=19$). Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. ANOVA para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p<0,05$ vs C_0 .

A Tabela 1 mostra o perfil nutricional e a pressão arterial dos animais C_0 e Ob_0 . O peso corporal final, o ganho de peso, os depósitos de gordura epididimal e visceral, a gordura corporal total, o índice de adiposidade foram maiores no Ob_0 do que no C_0 . Não houve

diferença significativa entre os grupos no depósito de gordura retroperitoneal e na pressão arterial sistólica final. Durante o período experimental, os animais Ob₀ ingeriram menor quantidade de ração que os C₀, porém, a eficiência alimentar foi maior nos animais Ob₀ do que no C₀. Não houve diferença estatística na ingestão calórica entre os grupos.

Tabela 1. Perfil nutricional no momento inicial de obesidade

Variáveis	Grupos	
	C ₀ (n=19)	Ob ₀ (n=19)
PCI (g)	148 ± 12	147 ± 12
PCF (g)	290 ± 18	302 ± 22*
Ganho de peso (g)	142 ± 15	155 ± 17*
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 total (g)	14 ± 3	17 ± 3*
Índice de adiposidade	4,9 ± 1,0	5,6 ± 0,9*
PAS (mmHg)	127 ± 8	131 ± 14
Ingestão alimentar (g/dia)	26 ± 2	22 ± 2*
Ingestão calórica (kcal/dia)	77 ± 5	80 ± 7
Eficiência alimentar (% kcal/g)	8,7 ± 0,6	9,2 ± 0,71*

Dados expressos em média ± desvio-padrão. PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; PAS: pressão arterial sistólica. Dados expressos em média ± desvio padrão. C₀: controle; Ob₀: obeso. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₀.

3.2- Obesidade 15 semanas

3.2.1– Composição dos grupos controle e obeso

Na 15^a semana de tratamento após o início da obesidade foram sorteados 12 animais de cada grupo. Após a aplicação do critério estabelecido para a composição dos grupos, nove animais do grupo controle (C₁₅; n=9) e oito animais do grupo obeso (Ob₁₅; n=8) permaneceram no estudo.

3.2.2- Perfil nutricional

A Tabela 2 mostra o perfil nutricional dos animais C₁₅ e Ob₁₅. O peso corporal inicial e final, o ganho de peso, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total, o índice de adiposidade e os níveis séricos de triglicérides, colesterol e proteína foram maiores no Ob₁₅ do que no C₁₅. Não houve diferença significativa na eficiência alimentar e nas demais dosagens séricas entre os grupos. Durante o período experimental, os animais Ob₁₅ ingeriram quantidade semelhante de ração, entretanto, a ingestão calórica foi maior nos animais Ob₁₅ em relação ao C₁₅.

Tabela 2. Perfil nutricional após 15 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₁₅ (n=9)	Ob ₁₅ (n=8)
PCI (g)	276 ± 18	314 ± 18*
PCF (g)	459 ± 18	568 ± 44*
Ganho de peso (g)	183 ± 21	254 ± 38*
Ingestão alimentar (g/dia)	25,4 ± 1,1	25,9 ± 2,1
Ingestão calórica (kcal/dia)	75,1 ± 3,1	94,6 ± 7,5*
Eficiência alimentar (%)	2,32 ± 0,24	2,55 ± 0,30
Gordura Epididimal (g)	7,1 ± 1,4	13,7 ± 4,1*
Gordura Retroperitoneal (g)	7,5 ± 1,6	19,3 ± 8,5*
Gordura Visceral (g)	5,5 ± 0,9	12,5 ± 4,8*
Gordura corporal total (g)	20 ± 3	46 ± 17*
Índice de Adiposidade (%)	4,38 ± 0,58	7,89 ± 2,37*
Glicose (mg/dL)	163 ± 22	176 ± 13
Triglicérides (mg/dL)	61 ± 11	80 ± 18*
Colesterol (mg/dL)	56 ± 9	74 ± 11*
HDL (mg/dL)	22 ± 3	26 ± 5
LDL (mg/dL)	14 ± 4	15 ± 4
Proteína (g/dL)	5,9 ± 0,3	6,3 ± 0,2*
NEFA (mmol/L)	0,44 ± 0,09	0,48 ± 0,11

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₁₅: controle; Ob₁₅: obeso; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; HDL: lipoproteína de alta intensidade; LDL: lipoproteína de baixa intensidade; NEFA: ácidos graxos não-esterificados. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₁₅.

3.2.3- Pressão arterial sistólica

A Figura 2 mostra o resultado da pressão arterial sistólica final realizado nos grupos C_{15} e Ob_{15} . Não houve diferença significativa na pressão arterial sistólica final entre os grupos; portanto, a obesidade durante 15 semanas não acarretou hipertensão arterial.

Figura 2. Pressão arterial sistólica final dos animais controle (C_{15} , $n=9$) e obeso (Ob_{15} , $n=8$) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

3.2.4- Teste de tolerância à glicose

As Figuras 3 e 4 mostram o resultado do teste de tolerância à glicose realizado nos grupos C_{15} e Ob_{15} . Os níveis glicêmicos foram semelhantes no momento basal entre os grupos. Após a administração intraperitoneal de glicose, a glicemia foi similar nos momentos 15 ($p=0,07$), 30 ($p=0,07$) e 120 minutos ($p=0,15$) entre os grupos; entretanto, o grupo Ob_{15} apresentou níveis glicêmicos elevados nos momentos 60 e 90 em relação ao C_{15} (Figura 3). A área glicêmica foi maior no grupo Ob_{15} em relação ao C_{15} (Figura 4).

Figura 3. Teste de tolerância à glicose dos animais controle (C₁₅, n=8) e obeso (Ob₁₅, n=8) obeso submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C₁₅.

Figura 4. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle (C₁₅, n=8) e obeso (Ob₁₅, n=8) obeso submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs C₁₅.

3.2.5- Índice de resistência à insulina

A Figura 5 mostra o resultado do índice HOMA-IR dos grupos C₁₅ e Ob₁₅. Os animais Ob₁₅ apresentaram maior índice HOMA-IR do que o C₁₅.

Figura 5. Índice HOMA-IR (resistência à insulina) dos animais controle (C_{15} , $n=8$) e obeso (Ob_{15} , $n=8$) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “ t ” de Student para amostras independentes. * $p<0,05$ vs C_{15} .

3.2.6- Análise sérica dos hormônios insulina e leptina

A Figura 6 mostra as dosagens de insulina e leptina dos ratos C_{15} e Ob_{15} . Após quinze semanas de obesidade os animais Ob_{15} apresentaram níveis séricos de insulina e leptina maiores que os C_{15} .

Figura 6. Níveis séricos de insulina e leptina dos animais controle (C_{15} , $n=8$) e obeso (Ob_{15} , $n=8$) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “ t ” de Student para amostras independentes. * $p<0,05$ vs C_{15} .

3.2.7- Análise sérica dos hormônios tireoidianos

As Figuras 7, 8 e 9 mostram as dosagens séricas dos hormônios tireoidianos TSH, T4 e T3 dos ratos C₁₅ e Ob₁₅. Após quinze semanas de obesidade os animais Ob₁₅ apresentaram níveis séricos de TSH menores que o C₁₅. Não houve diferença significativa entre os grupos nas dosagens de T4 e T3 (T3; $p=0,08$).

Figura 7. Níveis séricos de TSH dos animais controle (C₁₅, n=6) e obeso (Ob₁₅, n=6) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * $p<0,05$ vs C₁₅.

Figura 8. Níveis séricos de T4 dos animais controle (C₁₅, n=6) e obeso (Ob₁₅, n=6) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 9. Níveis séricos de T3 dos animais controle (C₁₅, n=6) e obeso (Ob₁₅, n=6) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

3.2.8- Estrutura do coração *post mortem*

3.2.8.1- Análise macroscópica

A Tabela 3 mostra a estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos ratos C₁₅ e Ob₁₅. Após 15 semanas de obesidade, os animais Ob₁₅ apresentaram aumento nos pesos do coração, dos ventrículos esquerdo e direito, do átrio e nas relações coração/tíbia, VE/tíbia, VD/tíbia e AT/tíbia em relação aos animais C₁₅. Não houve diferença significativa nas relações coração/PCF, VE/PCF, VD/PCF e AT/PCF e no comprimento da tíbia entre os dois grupos.

Tabela 3. Estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* após 15 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₁₅ (n=9)	Ob ₁₅ (n=8)
PCF (g)	459 ± 18	568 ± 44*
tíbia (cm)	4,38 ± 0,07	4,42 ± 0,07
Coração (g)	1,13 ± 0,11	1,35 ± 0,05*
VE (g)	0,80 ± 0,09	0,95 ± 0,05*
VD (g)	0,24 ± 0,02	0,29 ± 0,02*
AT (g)	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01*
Coração/PCF (mg/g)	2,46 ± 0,19	2,39 ± 0,24
VE/PCF (mg/g)	1,74 ± 0,17	1,69 ± 0,18
VD/PCF (mg/g)	0,52 ± 0,06	0,51 ± 0,05
AT/PCF (mg/g)	0,20 ± 0,02	0,19 ± 0,02
Coração/tíbia (g/cm)	0,26 ± 0,02	0,30 ± 0,02*
VE/tíbia (g/cm)	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,01*
VD/tíbia (g/cm)	0,055 ± 0,01	0,065 ± 0,01*
AT/tíbia (g/cm)	0,021 ± 0,003	0,025 ± 0,002*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₁₅: controle; Ob₁₅: obeso submetidos à 15 semanas de tratamento; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/PCF: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final; VD/PCF: relação do peso do ventrículo direito pelo peso corporal final; AT/PCF: relação do peso do átrio pelo peso corporal final. VE/tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia; VD/tíbia: relação do peso do ventrículo direito pelo comprimento da tíbia; AT/tíbia: relação do peso do átrio pelo comprimento da tíbia. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * *p*<0,05 vs C₁₅.

3.2.8.2- Análise microscópica

As Figuras 10 e 11 mostram a área seccional transversa do miócito realizadas no ventrículo esquerdo dos animais C₁₅ e Ob₁₅. Não houve diferença significativa na área seccional dos miócitos nos fragmentos do VE entre os dois grupos (Figura 10).

Figura 10. Secções transversas de fragmentos do VE dos grupos controle (C₁₅, n=9) e obeso (Ob₁₅, n=8) submetidos à 15 semanas de tratamento. Técnica de Reticulina de gömori 40X. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 11. Secções transversas subendocárdicas do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos controle e obeso submetidos à 15 semanas de tratamento; **A:** fragmento do VE do grupo C₁₅; **B:** fragmento do VE do grupo Ob₁₅; Técnica de Reticulina de Gömori 40X.

3.2.9- Expressão de RNAm miocárdico

As Figuras 12 e 13 ilustram a expressão do RNAm das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico, CANAL L, RyR, SERCA, PLB, NCX e CSQ nos animais C₁₅ e Ob₁₅. A expressão gênica do CANAL L, da SERCA, da PLB, do NCX e da CSQ foi diminuída no grupo Ob₁₅ em relação ao C₁₅. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas nos níveis de RNAm de RyR entre os grupos. Os níveis de RNAm da β -actina, dados não mostrados, foram semelhantes entre os grupos.

Figura 12. Expressão gênica de CANAL L e RyR no miocárdio dos animais controle (C₁₅, n=6) e obeso (Ob₁₅, n=6) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão Teste “t” de Student. * p<0,05 vs C₁₅.

Figura 13. Expressão gênica de SERCA, PLB, NCX e CSQ no miocárdio dos animais controle (C₁₅, n=6) e obeso (Ob₁₅, n=6) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “t” de Student. * p<0,05 vs C₁₅.

3.2.10- Expressão das proteínas miocárdicas

As Figuras 14 e 15 ilustram a expressão das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio intracelular nos animais C₁₅ e Ob₁₅. A Figura 14 mostra que os animais Ob₁₅ apresentaram níveis protéicos menores de PLB do que o C₁₅. Não houve diferença entre os grupos nos níveis protéicos de CANAL L, SERCA e na razão SERCA/PLB. Os animais Ob₁₅ apresentam níveis protéicos de pPLB Ser16 diminuídos em relação ao C₁₅. Entretanto, a obesidade promoveu aumento da razão entre pPLB Thr17 e PLB em relação ao C₁₅ (Figura 15). Não houve diferença na expressão de pPLB Thr 17 e na razão pPLB Ser16 e PLB entre os grupos.

Figura 14. Expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ, CANAL L e a razão SERCA/PLB no miocárdio dos animais controle (C₁₅, n=6) e obeso (Ob₁₅, n=6) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student. * p<0,05 vs C₁₅.

Figura 15. Expressão protéica de pPLB thr 17, pPLB ser16 e as razões pPLB thr17/PLB e pPLB ser16/PLB no miocárdio dos animais controle (C₁₅, n=6) e obeso (Ob₁₅, n=6) submetidos à 15 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± desvio padrão. * p<0,05 vs C₁₅. Teste “t” de Student.

3.2.11- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A Tabela 4 mostra a porcentagem de umidade dos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos ratos C₁₅ e Ob₁₅. Os animais Ob₁₅ apresentaram menor quantidade de água no fígado que os animais C₁₅. Entretanto, não houve diferença significativa no teor de água do VE, VD, AT e pulmão.

Tabela 4. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático após 15 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₁₅ (n=9)	Ob ₁₅ (n=8)
VE (%)	75,5 ± 0,8	75,2 ± 0,6
VD (%)	75,6 ± 1,0	75,3 ± 1,1
AT (%)	77,6 ± 1,1	77,7 ± 1,5
Pulmão (%)	77,4 ± 0,7	77,3 ± 0,6
Fígado (%)	68,0 ± 1,0	66,4 ± 1,0*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₁₅: controle; Ob₁₅ submetidos à 15 semanas de tratamento; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₁₅.

3.3- Obesidade 30 semanas

3.3.1– Composição dos grupos controle e obeso

Na 30^a semana de tratamento após o início da obesidade foram sorteados 12 animais de cada grupo. Após a aplicação do critério estabelecido para a composição dos grupos de 30 semanas, dez animais do grupo controle (C₃₀; n=10) e dez animais do grupo obeso (Ob₃₀; n=10) permaneceram no estudo.

3.3.2- Perfil nutricional

A Tabela 5 mostra o perfil nutricional dos animais C₃₀ e Ob₃₀. O peso corporal inicial e final, o ganho de peso, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total, o índice de adiposidade e os níveis de triglicérides foram maiores no Ob₃₀ em relação ao C₃₀. Não houve diferença significativa entre os grupos nas demais dosagens séricas. Durante o período experimental, ambos os grupos ingeriram quantidade semelhante de ração, entretanto, a ingestão calórica e a eficiência alimentar foram maiores nos animais Ob₃₀ do que no C₃₀.

Tabela 5. Perfil nutricional após 30 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₃₀ (n=10)	Ob ₃₀ (n=10)
PCI (g)	294 ± 12	315 ± 14*
PCF (g)	490 ± 33	608 ± 22*
Ganho de peso (g)	196 ± 23	293 ± 21*
Epididimal (g)	6,1 ± 2,5	12,0 ± 3,0*
Retroperitoneal (g)	8,5 ± 2,5	19,4 ± 4,3*
Visceral (g)	4,5 ± 1,6	12,0 ± 3,0*
Gordura total (g)	19 ± 5	43 ± 8*
Índice de Adiposidade (%)	3,9 ± 0,9	7,1 ± 1,3*
Ingestão alimentar (g/dia)	26,1 ± 1,7	25,9 ± 1,2
Ingestão calórica (kcal/dia)	77,0 ± 4,9	94,7 ± 4,2*
Eficiência alimentar (%)	1,21 ± 0,09	1,47 ± 0,12*
Glicose (mg/dL)	157 ± 15	172 ± 21
Triglicérides (mg/dL)	54 ± 9	93 ± 19*
Colesterol (mg/dL)	71 ± 9	73 ± 16
HDL (mg/dL)	25 ± 4	26 ± 4
LDL (mg/dL)	15 ± 3	14 ± 2
Proteína (g/dL)	6,4 ± 0,4	6,7 ± 0,5
NEFA (mmol/L)	0,42 ± 0,10	0,48 ± 0,11

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₃₀: controle; Ob₃₀: obeso submetidos à 30 semanas de tratamento; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; HDL: lipoproteína de alta intensidade; LDL: lipoproteína de baixa intensidade; NEFA: ácidos graxos não-esterificados. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₃₀.

3.3.3- Pressão arterial sistólica

A Figura 16 mostra o resultado da pressão arterial sistólica final realizado nos grupos C_{30} e Ob_{30} . Não houve diferença significativa na pressão arterial sistólica final entre os grupos, portanto, a obesidade durante 30 semanas não acarretou hipertensão arterial.

Figura 16. Pressão arterial sistólica final dos animais controle (C_{30} , $n=9$) e obeso (Ob_{30} , $n=8$) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “ t ” de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

3.3.4- Teste de tolerância à glicose

As Figuras 17 e 18 ilustram o resultado do teste de tolerância à glicose realizado nos grupos C_{30} e Ob_{30} . Os níveis glicêmicos basais foram semelhantes entre os grupos. Entretanto, após a administração intraperitoneal de glicose, a glicemia foi elevada no grupo Ob_{30} nos momentos 15, 30, 60, 90 e 120 em relação ao grupo C_{30} (Figura 17). A área glicêmica foi maior no grupo Ob_{30} em relação ao C_{30} (Figura 18).

Figura 17. Teste de tolerância à glicose dos animais controle (C₃₀, n=9) e obeso (Ob₃₀, n=9) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C₃₀.

Figura 18. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle (C₃₀, n=9) e obeso (Ob₃₀, n=9) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs C₃₀.

3.3.5- Índice de resistência à insulina

A Figura 19 mostra o resultado do índice HOMA-IR dos grupos C_{30} e Ob_{30} . Os animais Ob_{30} apresentaram maior índice HOMA-IR do que o C_{30} .

Figura 19. Índice HOMA-IR (resistência à insulina) dos animais controle (C_{30} , n=9) e obeso (Ob_{30} , n=9) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs C_{30} .

3.3.6- Análise sérica dos hormônios insulina e leptina

A Figura 20 ilustra as dosagens de insulina e leptina dos ratos C_{30} e Ob_{30} . Após 30 semanas de obesidade os animais Ob_{30} apresentaram níveis séricos de insulina e leptina maiores que os C_{30} .

Figura 20. Níveis séricos de insulina e leptina dos animais controle (C₃₀, n=8) e obeso (Ob₃₀, n=8) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₃₀.

3.3.7- Análise sérica dos hormônios tireoidianos

As Figuras 21, 22 e 23 mostram as dosagens séricas dos hormônios tireoidianos TSH, T4 e T3 dos ratos C₃₀ e Ob₃₀. Após 30 semanas de obesidade os animais Ob₃₀ apresentaram níveis séricos de T4 menores que o C₃₀. Não houve diferença significativa entre os grupos nas dosagens de T3 (p=0,12) e TSH (p=0,09).

Figura 21. Níveis séricos de TSH dos animais controle (C₃₀, n=6) e obeso (Ob₃₀, n=6) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. Não houve diferença entre os grupos.

Figura 22. Níveis séricos de T4 dos animais controle (C_{30} , $n=6$) e obeso (Ob_{30} , $n=6$) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “ t ” de Student para amostras independentes. * $p<0,05$ vs C_{30} .

Figura 23. Níveis séricos de T3 dos animais controle (C_{30} , $n=6$) e obeso (Ob_{30} , $n=6$) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “ t ” de Student para amostras independentes. Não houve diferença entre os grupos.

3.3.8- Estrutura do coração *post mortem*

3.3.8.1- Análise macroscópica

A Tabela 6 mostra a estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos ratos C₃₀ e Ob₃₀. Após 30 semanas de obesidade, os animais Ob₃₀ apresentaram maiores pesos do coração, dos ventrículos esquerdo e direito, do átrio e do comprimento da tíbia do que os animais C₃₀. As relações coração/PCF, VE/PCF e VD/PCF foram diminuídas nos animais Ob₃₀; entretanto, as relações coração/tíbia e AT/tíbia foram maiores no grupo Ob₃₀ em relação ao grupo C₃₀. Não houve diferença significativa no peso do pulmão e nas relações AT/PCF, VE/tíbia e VD/tíbia entre os grupos.

Tabela 6. Estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* após 30 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₃₀ (n=10)	Ob ₃₀ (n=10)
PCF (g)	490 ± 33	608 ± 22*
tíbia (cm)	4,42 ± 0,12	4,55 ± 0,11*
Coração (g)	1,14 ± 0,09	1,28 ± 0,11*
VE (g)	0,81 ± 0,07	0,90 ± 0,09*
VD (g)	0,25 ± 0,03	0,28 ± 0,03*
AT (g)	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01*
Coração/PCF (mg/g)	2,34 ± 0,19	2,11 ± 0,18*
VE/PCF (mg/g)	1,66 ± 0,18	1,49 ± 0,15*
VD/PCF (mg/g)	0,52 ± 0,04	0,46 ± 0,04*
AT/PCF (mg/g)	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,02
Coração/tíbia (g/cm)	0,26 ± 0,02	0,28 ± 0,03*
VE/tíbia (g/cm)	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02
VD/tíbia (g/cm)	0,057 ± 0,005	0,062 ± 0,006
AT/tíbia (g/cm)	0,018 ± 0,003	0,021 ± 0,003*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₃₀: controle; Ob₃₀: obeso submetidos à 30 semanas de tratamento; PCF: peso corporal final; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/PCF: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final; VD/PCF: relação do peso do ventrículo direito pelo peso corporal final; AT/PCF: relação do peso do átrio pelo peso corporal final. VE/tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia; VD/tíbia: relação do peso do ventrículo direito pelo comprimento da tíbia; AT/tíbia: relação do peso do átrio pelo comprimento da tíbia. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₃₀.

3.3.8.2- Análise microscópica

As Figuras 24 e 25 mostram a área seccional transversa do miócito realizadas no ventrículo esquerdo dos animais C₃₀ e Ob₃₀. Os animais Ob₃₀ apresentaram AST dos fragmentos do VE maior que o C₃₀. (Figura 24).

Figura 24. Secções transversas de fragmentos do VE dos grupos controle (C₃₀, n=7) e obeso (Ob₃₀, n=5) submetidos à 30 semanas de tratamento. Técnica de Reticulina de gömori 40X. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₃₀.

Figura 25. Secções transversas subendocárdicas do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos controle e obeso submetidos à 30 semanas de tratamento; **A:** fragmento do VE do grupo controle; **B:** fragmento do VE do grupo obeso; Técnica de Reticulina de Gömori 40X.

3.3.9- Expressão de RNAm miocárdico

As Figuras 26 e 27 ilustram a expressão do RNAm das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico, CANAL L, RyR, SERCA, PLB, NCX e CSQ nos animais C₃₀ e Ob₃₀. A expressão gênica do CANAL L, da RyR, da SERCA, da PLB, do NCX e da CSQ foram aumentadas no grupo Ob₃₀ em relação ao C₃₀. Os níveis de RNAm da β -actina, dados não mostrados no texto, foram semelhantes entre os grupos.

Figura 26. Expressão gênica de CANAL L e RyR no miocárdio dos animais controle (C₃₀, n=6) e obeso (Ob₃₀, n=6) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student. * $p < 0,05$ vs C₃₀.

Figura 27. Expressão gênica de SERCA, PLB, NCX e CSQ no miocárdio dos animais controle (C₃₀, n=6) e obeso (Ob₃₀, n=6) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student. * $p < 0,05$ vs C₃₀.

3.3.10- Expressão das proteínas miocárdicas

As Figuras 28 e 29 ilustram a expressão das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio intracelular miocárdico dos animais C_{30} e Ob_{30} . A Figura 28 mostra que a obesidade não promoveu alterações nos níveis protéicos do CANAL L, da SERCA, da PLB, da CSQ e na razão SERCA/PLB. Os animais Ob_{30} apresentam níveis protéicos de pPLB Ser16 e a razão pPLB Ser16/PLB diminuídos em relação ao C_{30} . Não foram observadas alterações de pPLB Thr17 e a razão pPLB Thr 17/PLB entre os grupos (Figura 29).

Figura 28. Expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ, CANAL L e a razão SERCA/PLB no miocárdio dos animais controle (C_{30} , $n=6$) e obeso (Ob_{30} , $n=6$) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “t” de Student. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 29. Expressão protéica de pPLB thr 17, pPLB ser16 e as razões pPLB thr17/PLB e pPLB ser16/PLB no miocárdio dos animais controle (C₃₀, n=6) e obeso (Ob₃₀, n=6) submetidos à 30 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student. * $p < 0,05$ vs C₃₀.

3.3.11- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A Tabela 7 mostra a porcentagem de umidade dos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático dos ratos C₃₀ e Ob₃₀. Não houve diferença significativa na quantidade de água no VE, VD, AT e pulmão. Entretanto, os animais Ob₃₀ apresentaram menor teor de água no fígado que os animais C₃₀.

Tabela 7. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático após 30 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₃₀ (n=10)	Ob ₃₀ (n=10)
VE (%)	75,6 ± 3,4	74,9 ± 0,7
VD (%)	76,0 ± 3,4	75,1 ± 0,9
AT (%)	76,1 ± 1,8	76,5 ± 1,9
Pulmão (%)	78,5 ± 0,9	78,3 ± 0,5
Fígado (%)	68,1 ± 0,8	66,2 ± 1,4*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₃₀: controle; Ob₃₀: obeso submetidos à 30 semanas de tratamento; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₃₀.

3.4- Obesidade 45 semanas

3.4.1– Composição dos grupos controle e obeso

Na 45^a semana de tratamento após o início da obesidade foram sorteados 12 animais de cada grupo. Após a aplicação do critério estabelecido para a composição dos grupos de 45 semanas, dez animais do grupo controle (C₄₅; n=10) e dez animais do grupo obeso (Ob₄₅; n=10) permaneceram no estudo.

3.4.2- Perfil nutricional

A Tabela 8 mostra o perfil nutricional dos animais C₄₅ e Ob₄₅. O peso corporal inicial e final, o ganho de peso, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores no Ob₄₅ do que no C₄₅. Não houve diferença significativa entre os grupos nas dosagens séricas de glicose, proteína e lipídeos; contudo, a dosagem de triglicérides apresentou um valor de $p=0,15$. Durante o período experimental, a ingestão alimentar e calórica, assim como, a eficiência alimentar foram maiores nos animais Ob₄₅ em relação C₄₅.

Tabela 8. Perfil nutricional após 45 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₄₅ (n=10)	Ob ₄₅ (n=10)
PCI (g)	282 ± 16	304 ± 21*
PCF (g)	513 ± 19	609 ± 37*
Ganho de peso (g)	231 ± 21	305 ± 25*
Epididimal (g)	6,27 ± 1,45	12,5 ± 2,5*
Retroperitoneal (g)	10,7 ± 1,6	20,7 ± 6,0*
Visceral (g)	6,72 ± 1,01	14,4 ± 2,8*
Gordura total (g)	23,7 ± 2,8	47,5 ± 7,9*
Índice de Adiposidade (%)	4,62 ± 0,51	7,79 ± 1,12*
Ingestão alimentar (g/dia)	26,4 ± 1,5	24,8 ± 1,6*
Ingestão calórica (kcal/dia)	77,9 ± 4,4	90,7 ± 5,8*
Eficiência alimentar (%)	0,99 ± 0,10	1,12 ± 0,08*
Glicose (mg/dL)	172 ± 27	168 ± 29
Triglicérides (mg/dL)	77 ± 15	91 ± 23
Colesterol (mg/dL)	78 ± 18	79 ± 10
HDL (mg/dL)	28 ± 3	29 ± 5
LDL (mg/dL)	21 ± 7	17 ± 4
Proteína (g/dL)	6,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2
NEFA (mmol/L)	0,49 ± 0,10	0,55 ± 0,07

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₄₅: controle; Ob₄₅: obeso submetidos à 45 semanas de tratamento; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; HDL: lipoproteína de alta intensidade; LDL: lipoproteína de baixa intensidade; NEFA: ácidos graxos não-esterificados. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₄₅.

3.4.3- Pressão arterial sistólica

A Figura 30 mostra o resultado da pressão arterial sistólica final realizado nos grupos C₄₅ e Ob₄₅. Não houve diferença significativa na pressão arterial sistólica final entre os grupos; portanto, a obesidade durante 45 semanas não acarretou hipertensão arterial.

Figura 30. Pressão arterial sistólica final dos animais controle (C₄₅, n=10) e obeso (Ob₄₅, n=10) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

3.4.4- Teste de tolerância à glicose

As Figuras 31 e 32 ilustram o resultado do teste de tolerância à glicose realizado nos grupos C₄₅ e Ob₄₅. Os níveis glicêmicos basais e os momentos 15 (p=0,07) e 60 (p=0,09) minutos após a administração de glicose foram semelhantes entre os grupos. Entretanto, a glicemia foi elevada no grupo Ob₄₅ nos momentos 30, 90 e 120 em relação ao grupo C₄₅ (Figura 31). A área glicêmica foi maior no grupo Ob₄₅ em relação ao C₄₅ (Figura 32).

Figura 31. Teste de tolerância à glicose dos animais controle (C₄₅, n=9) e obeso (Ob₄₅, n=8) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C₄₅.

Figura 32. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle (C₄₅, n=9) e obeso (Ob₄₅, n=8) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs C₄₅.

3.4.5- Índice de resistência à insulina

A Figura 33 mostra o resultado do índice HOMA-IR dos grupos C₄₅ e Ob₄₅. Os animais Ob₄₅ apresentaram maior índice HOMA-IR do que o C₄₅.

Figura 33. Índice HOMA-IR (resistência à insulina) dos animais controle (C₄₅, n=7) e obeso (Ob₄₅, n=8) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₄₅.

3.4.6- Análise sérica dos hormônios insulina e leptina

A Figura 34 ilustra as dosagens de insulina e leptina dos ratos C₄₅ e Ob₄₅. Após 45 semanas de obesidade os animais Ob₄₅ apresentaram níveis séricos de insulina e leptina maiores que os C₄₅.

Figura 34. Níveis séricos de insulina e leptina dos animais controle (C₄₅, n=7) e obeso (Ob₄₅, n=8) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. * $p < 0,05$ vs C₄₅.

3.4.7- Análise sérica dos hormônios tireoidianos

As Figuras 35, 36 e 37 mostram as dosagens séricas dos hormônios tireoidianos TSH, T4 e T3 dos ratos C₄₅ e Ob₄₅. Após 45 semanas, a obesidade não promoveu diferença significativa entre os grupos nas dosagens de TSH ($p=0,06$), T4 e T3 ($p=0,10$).

Figura 35. Níveis séricos de TSH dos animais controle (C₄₅, n=6) e obeso (Ob₄₅, n=6) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student para amostras independentes. Não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 36. Níveis séricos de T4 dos animais controle (C_{45} , $n=6$) e obeso (Ob_{30} , $n=6$) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “ t ” de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 37. Níveis séricos de T3 dos animais controle (C_{45} , $n=6$) e obeso (Ob_{45} , $n=6$) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “ t ” de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

3.4.8- Estrutura do coração *post mortem*

3.4.8.1- Análise macroscópica

A Tabela 9 mostra a estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos ratos C₄₅ e Ob₄₅. Após 45 semanas de obesidade, os animais Ob₄₅ apresentaram maior peso do coração, do átrio e do comprimento da tíbia do que os animais C₄₅. As relações coração/PCF e VE/PCF foram diminuídas nos animais Ob₄₅; entretanto, a relação AT/tíbia foi maior no grupo Ob₄₅ em relação ao grupo C₄₅. Não houve diferença significativa no peso do VD, VE e nas relações VD/PCF, AT/PCF, Coração/tíbia, VE/tíbia e VD/tíbia entre os grupos.

Tabela 9. Estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* após 45 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₄₅ (n=10)	Ob ₄₅ (n=10)
PCF (g)	513 ± 19	609 ± 37*
tíbia (cm)	4,55 ± 0,11	4,67 ± 0,13*
Coração (g)	1,19 ± 0,08	1,27 ± 0,07*
VE (g)	0,86 ± 0,05	0,90 ± 0,05
VD (g)	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,03
AT (g)	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,01*
Coração/PCF (mg/g)	2,32 ± 0,18	2,09 ± 0,16*
VE/PCF (mg/g)	1,68 ± 0,12	1,47 ± 0,13*
VD/PCF (mg/g)	0,48 ± 0,06	0,45 ± 0,06
AT/PCF (mg/g)	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,02
Coração/tíbia (g/cm)	0,26 ± 0,02	0,27 ± 0,02
VE/tíbia (g/cm)	0,19 ± 0,01	0,19 ± 0,01
VD/tíbia (g/cm)	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01
AT/tíbia (g/cm)	0,018 ± 0,003	0,021 ± 0,003*

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₄₅: controle; Ob₄₅: obeso submetidos à 45 semanas de tratamento; PCF: peso corporal final; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/PCF: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final; VD/PCF: relação do peso do ventrículo direito pelo peso corporal final; AT/PCF: relação do peso do átrio pelo peso corporal final. VE/tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia; VD/tíbia: relação do peso do ventrículo direito pelo comprimento da tíbia; AT/tíbia: relação do peso do átrio pelo comprimento da tíbia. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₄₅.

3.4.8.2- Análise microscópica

As Figuras 38 e 39 mostram a área seccional transversa do miócito realizadas no ventrículo esquerdo dos animais C₄₅ e Ob₄₅. Não houve diferença significativa na área seccional do miócito dos fragmentos do VE entre os dois grupos (Figura 38).

Figura 38. Secções transversas de fragmentos do VE dos grupos controle (C_{45} , $n=8$) e obeso (Ob_{45} , $n=6$) submetidos à 45 semanas de tratamento. Técnica de Reticulina de gömori 40X. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “ t ” de Student para amostras independentes. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 39. Secções transversas subendocárdicas do ventrículo esquerdo (VE) dos grupos controle e obeso submetidos à 45 semanas de tratamento; **A:** fragmento do VE do grupo controle; **B:** fragmento do VE do grupo obeso; Técnica de Reticulina de gömori 40X.

3.4.9- Expressão de RNAm miocárdico

As Figuras 40 e 41 ilustram a expressão do RNAm das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico, CANAL L, RyR, SERCA, PLB, NXC e CSQ nos animais C_{45} e Ob_{45} . Após 45 semanas, a obesidade promoveu diminuição do RNAm da SERCA, da CSQ e do NCX em relação ao C_{45} (Figuras 40 e 41). A obesidade não promoveu alterações na expressão gênica da PLB, do CANAL L ($p=0,11$) e da RyR. Os níveis de RNAm da β -actina, dados não mostrados, foram semelhantes entre os grupos.

Figura 40. Expressão gênica de CANAL L e RyR no miocárdio dos animais controle (C₄₅, n=6) e obeso (Ob₄₅, n=6) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “t” de Student. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 41. Expressão gênica de SERCA, PLB, NCX e CSQ no miocárdio dos animais controle (C₄₅, n=6) e obeso (Ob₄₅, n=6) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ vs C₄₅. Teste “t” de Student.

3.4.10- Expressão de proteínas miocárdicas

As Figuras 42 e 43 ilustram a expressão das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio intracelular miocárdico dos grupos C₄₅ e Ob₄₅. As Figuras 42 e 43 mostram que a obesidade não promoveu alterações nos níveis protéicos do CANAL L, da SERCA, da PLB (p=0,10), da CSQ, da pPLB Ser16, pPLB Thr17 e as razões SERCA/PLB, pPLB Ser16/PLB e razão pPLB Thr17/PLB em relação ao C₄₅.

Figura 42. Expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ, CANAL L e a razão SERCA/PLB no miocárdio dos animais controle (C₄₅, n=6) e obeso (Ob₄₅, n=6) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste “t” de Student. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 43. Expressão protéica de pPLB thr 17, pPLB ser16 e as razões pPLB thr17/PLB e pPLB ser16/PLB no miocárdio dos animais animais controle (C₄₅, n=6) e obeso (Ob₄₅, n=6) submetidos à 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Teste “*t*” de Student. Não houve diferença estatística entre os grupos.

3.4.11- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A Tabela 10 mostra a porcentagem de umidade dos tecidos dos ratos C₄₅ e Ob₄₅. Após 45 semanas de tratamento, não houve diferença significativa no teor de água do VE, VD, AT, pulmão e fígado entre os grupos.

Tabela 10. Teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático após 45 semanas

Variáveis	Grupos	
	C ₄₅ (n=10)	Ob ₄₅ (n=10)
VE (%)	72,7 ± 2,8	75,1 ± 2,2
VD (%)	73,9 ± 3,2	74,8 ± 2,1
AT (%)	74,6 ± 4,4	76,6 ± 2,1
Pulmão (%)	77,3 ± 0,8	77,5 ± 0,9
Fígado (%)	67,5 ± 1,5	67,1 ± 0,7

Dados expressos em média ± desvio padrão. C₄₅: controle; Ob₄₅: obeso submetidos à 45 semanas de tratamento; VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito; AT: átrio. Teste “t” de Student para amostras independentes. * p<0,05 vs C₄₅.

3.5- Comparação entre os grupos controles e obesos após 15, 30 e 45 semanas de tratamento

3.5.1- Composição dos grupos controle e obeso

Os grupos 15, 30 e 45 semanas, após a aplicação do critério, foram constituídos, respectivamente, como referidos anteriormente de C₁₅, n=9, Ob₁₅, n=8, C₃₀, n=10, Ob₃₀, n=10, C₄₅, n=10 e Ob₄₅, n=10.

3.5.2- Perfil nutricional

A Tabela 11 mostra o perfil nutricional dos animais C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅. A comparação entre os três momentos, fixados os grupos, está descrita a seguir. O PCI, a ingestão alimentar e calórica, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal, visceral, a gordura corporal total, o índice de adiposidade, os valores séricos de glicose e de NEFA foram semelhantes entre os grupos controles nos três momentos. Entretanto, o PCF, o ganho de peso, a eficiência alimentar, triglicérides, colesterol, HDL, LDL e proteína foram diferentes entre os grupos controles ao longo do tempo. Enquanto a proteína foi maior no C₄₅ e C₃₀ em relação ao C₁₅, a eficiência alimentar diminuiu ao longo do tempo entre os animais controle (C₄₅ < C₃₀ < C₁₅). O PCF foi maior no C₄₅ em relação ao C₁₅, enquanto que o ganho de peso e o LDL foram maiores no C₄₅ em relação ao C₁₅ e o C₃₀. A dosagem sérica de triglicérides foi menor no C₃₀ em relação ao C₄₅; entretanto, o colesterol e o HDL foram elevados no C₄₅ em relação ao C₁₅.

O tempo de exposição à obesidade acarretou aumento no peso corporal final e no ganho de peso dos animais Ob₃₀ e Ob₄₅ em relação ao Ob₁₅. A duração da obesidade não foi capaz de promover alterações nos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, na gordura corporal total, no índice de adiposidade, na ingestão alimentar e no consumo calórico. Entretanto, a eficiência alimentar diminuiu ao longo do tempo (Ob₁₅ > Ob₃₀ > Ob₄₅).

O tempo de exposição à obesidade acarretou aumento dos níveis de proteínas no grupo Ob₃₀ em relação aos animais Ob₁₅. Não foram observadas alterações na glicose, no triglicérides, no colesterol, no HDL, no LDL, e NEFA entre os ratos obesos.

A comparação entre os dois grupos, fixados os momentos, mostra que o PCI, o PCF, o ganho de peso, a ingestão calórica, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores nos grupos Ob em relação aos respectivos controles nos três períodos de tratamento. A ingestão alimentar, a glicose, o HDL e o NEFA séricos não apresentaram diferença estatística entre os dois grupos nos três momentos. A eficiência alimentar e os níveis de triglicérides foram maiores no Ob do que no C nos momentos 15 e 30 semanas. A obesidade durante 15 semanas acarretou aumento nos níveis de colesterol e proteínas séricos, entretanto, os níveis de LDL foram diminuídos nos animais Ob₄₅ em relação ao C₄₅.

Tabela 11. Perfil nutricional após 15, 30 e 45 semanas

Variáveis	Grupos	Tratamento		
		15 sem	30 sem	45 sem
PCI (g)	C	276 ± 18 ^{Aa}	294 ± 12 ^{Aa}	282 ± 16 ^{Aa}
	Ob	314 ± 18 ^{Ab}	315 ± 14 ^{Ab}	304 ± 21 ^{Ab}
PCF (g)	C	459 ± 18 ^{Aa}	490 ± 33 ^{ABa}	513 ± 19 ^{Ba}
	Ob	568 ± 44 ^{Ab}	608 ± 22 ^{Bb}	609 ± 37 ^{Bb}
Ganho de Peso (g)	C	183 ± 21 ^{Aa}	196 ± 23 ^{Aa}	231 ± 21 ^{Ba}
	Ob	254 ± 38 ^{Ab}	293 ± 21 ^{Bb}	305 ± 25 ^{Bb}
Ingestão alimentar (g/dia)	C	25,4 ± 1,1 ^{Aa}	26,1 ± 1,7 ^{Aa}	26,4 ± 1,5 ^{Aa}
	Ob	25,9 ± 2,1 ^{Aa}	25,9 ± 1,2 ^{Aa}	24,8 ± 1,6 ^{Aa}
Ingestão Calórica (Kcal/dia)	C	75,1 ± 3,1 ^{Aa}	77,0 ± 4,9 ^{Aa}	77,9 ± 4,4 ^{Aa}
	Ob	94,6 ± 7,5 ^{Ab}	94,7 ± 4,2 ^{Ab}	90,7 ± 5,8 ^{Ab}
Eficiência alimentar (%)	C	2,3 ± 0,2 ^{Aa}	1,2 ± 0,1 ^{Ba}	1,0 ± 0,1 ^{Ca}
	Ob	2,6 ± 0,3 ^{Ab}	1,5 ± 0,1 ^{Bb}	1,1 ± 0,1 ^{Ca}
Epididimal (g)	C	7,1 ± 1,4 ^{Aa}	6,1 ± 2,5 ^{Aa}	6,3 ± 1,5 ^{Aa}
	Ob	13,7 ± 4,1 ^{Ab}	12,0 ± 3,0 ^{Ab}	12,5 ± 2,5 ^{Ab}
Retroperitoneal (g)	C	7,5 ± 1,6 ^{Aa}	8,5 ± 2,5 ^{Aa}	11 ± 2 ^{Aa}
	Ob	19,3 ± 8,5 ^{Ab}	19,4 ± 4,3 ^{Ab}	21 ± 6 ^{Ab}
Visceral (g)	C	5,5 ± 0,9 ^{Aa}	4,5 ± 1,6 ^{Aa}	6,7 ± 1,0 ^{Aa}
	Ob	12,5 ± 4,8 ^{Ab}	12,0 ± 3,0 ^{Ab}	14,4 ± 2,8 ^{Ab}
Gordura corporal total (g)	C	20 ± 3 ^{Aa}	19 ± 5 ^{Aa}	24 ± 3 ^{Aa}
	Ob	46 ± 17 ^{Ab}	43 ± 8 ^{Ab}	48 ± 8 ^{Ab}
Índice de Adiposidade (%)	C	4,4 ± 0,6 ^{Aa}	3,9 ± 0,9 ^{Aa}	4,6 ± 0,5 ^{Aa}
	Ob	7,9 ± 2,4 ^{Ab}	7,1 ± 1,3 ^{Ab}	7,8 ± 1,1 ^{Ab}

Tabela 11. Perfil nutricional após 15, 30 e 45 semanas “continua”

Glicose (mg/dl)	C	163 ± 22^{Aa}	157 ± 15^{Aa}	172 ± 27^{Aa}
	Ob	176 ± 13^{Aa}	172 ± 21^{Aa}	168 ± 29^{Aa}
Triglicérides (mg/dl)	C	61 ± 11^{ABa}	54 ± 9^{Aa}	77 ± 15^{Ba}
	Ob	80 ± 18^{Ab}	93 ± 19^{Ab}	91 ± 23^{Aa}
Colesterol (mg/dl)	C	56 ± 9^{Aa}	71 ± 9^{ABa}	78 ± 18^{Ba}
	Ob	74 ± 11^{Ab}	73 ± 16^{Aa}	79 ± 10^{Aa}
HDL (mg/dl)	C	22 ± 3^{Aa}	25 ± 4^{ABa}	28 ± 3^{Ba}
	Ob	26 ± 5^{Aa}	26 ± 4^{Aa}	29 ± 5^{Aa}
LDL (mg/dl)	C	14 ± 4^{Aa}	15 ± 3^{Aa}	21 ± 7^{Ba}
	Ob	15 ± 4^{Aa}	14 ± 2^{Aa}	17 ± 4^{Ab}
Proteína (g/dL)	C	$5,9 \pm 0,3^{Aa}$	$6,4 \pm 0,4^{Ba}$	$6,6 \pm 0,2^{Ba}$
	Ob	$6,3 \pm 0,2^{Ab}$	$6,7 \pm 0,5^{Ba}$	$6,7 \pm 0,2^{ABa}$
NEFA (mmol/L)	C	$0,44 \pm 0,09^{Aa}$	$0,42 \pm 0,10^{Aa}$	$0,49 \pm 0,10^{Aa}$
	Ob	$0,48 \pm 0,11^{Aa}$	$0,48 \pm 0,11^{Aa}$	$0,55 \pm 0,07^{Aa}$

Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. C: grupo controle submetido à dieta normocalórica por 15 (C; n= 9, 30 (C; n= 10) e 45 (C; n= 10) semanas de tratamento; Ob: grupo obeso submetido à dieta hipercalórica por 15 (Ob; n= 8), 30 (Ob; n= 10) e 45 (Ob; n= 10) semanas de tratamento; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final; HDL: lipoproteína de alta intensidade; LDL: lipoproteína de baixa intensidade; NEFA: ácidos graxos não-esterificados. Letra maiúscula indica comparação entre os momentos fixado o grupo; letra minúscula indica comparação entre os grupos fixado o momento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

3.5.3- Pressão arterial sistólica

A Figura 44 mostra o resultado da pressão arterial sistólica final realizado nos animais C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅. Os grupos controles e obesos não apresentaram diferença estatística intra e entre grupos em todos os momentos estudados.

Figura 44. Pressão arterial sistólica final dos animais controle (C₁₅, n= 9; C₃₀, n= 10; C₄₅, n= 10) e obeso (Ob₁₅, n= 8; Ob₃₀, n= 10; Ob₄₅, n=10) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos.

3.5.4- Teste de tolerância à glicose

A Figura 45 ilustra o resultado da área glicêmica do teste de tolerância à glicose realizado nos animais C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅. A área glicêmica foi maior nos grupos Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅ em relação aos seus respectivos grupos controles. O tempo de exposição não promoveu alteração na variável nos momentos estudados nos dois grupos.

Figura 45. Área glicêmica, obtida no teste de tolerância à glicose, dos animais controle (C₁₅, n= 8; C₃₀, n= 9; C₄₅, n= 9) e obeso (Ob₁₅, n= 8; Ob₃₀, n= 9; Ob₄₅, n= 8) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C.

3.5.5- Índice de resistência à insulina

A Figura 46 mostra o resultado do índice HOMA-IR nos grupos C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅. O índice HOMA-IR foi maior nos grupos Ob₁₅ e Ob₄₅ em relação aos seus respectivos grupos controles; entretanto, não foi possível mostrar diferença nesta variável entre os grupos Ob₃₀ e C₃₀ ($p = 0,054$). A duração da obesidade acarretou aumento do índice HOMA-IR nos animais Ob₄₅ em relação aos Ob₁₅ e Ob₃₀. Entretanto, não foram observadas alterações deste índice entre os grupos controle ao longo do tempo.

Figura 46. Índice HOMA-IR (resistência à insulina) dos animais controle (C₁₅, n= 8; C₃₀, n= 9; C₄₅, n= 7) e obeso (Ob₁₅, n= 8; Ob₃₀, n= 9; Ob₄₅, n= 8) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs intra-grupo.

3.5.6- Análise sérica dos hormônios insulina e leptina

A Figura 47 ilustra o resultado sérico de insulina realizado nos grupos C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅. A Figura 47 mostra que a insulina aumentou nos animais Ob₄₅ em relação ao Ob₁₅ e Ob₃₀. O mesmo comportamento foi visualizado nos animais controle ao longo do tempo. A comparação entre os grupos, fixados os momentos, mostra que os níveis de insulina sérica foram maiores nos grupos Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅ em relação aos respectivos controles.

A Figura 48 ilustra o resultado sérico de leptina realizado nos grupos C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅. O tempo de exposição à obesidade promoveu aumento da leptina nos grupos Ob₄₅ em relação ao Ob₁₅; entretanto não foi possível mostrar diferença estatística entre os grupos Ob₁₅ versus Ob₃₀ ($p=0,055$) e Ob₃₀ versus Ob₄₅ ($p=0,09$). Nos animais controles, o tempo não promoveu alterações nos níveis de leptina. Fixados os momentos, os níveis séricos de leptina foram maiores nos grupos obesos em relação aos respectivos grupos controles.

Figura 47. Níveis séricos de insulina dos animais controle (C₁₅, n= 8; C₃₀, n= 8; C₄₅, n= 7) e obeso (Ob₁₅, n= 8; Ob₃₀, n= 8; Ob₄₅, n= 8) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * p<0,05 vs C. # p< 0,05 vs intra-grupo.

Figura 48. Níveis séricos de leptina dos animais controle (C₁₅, n= 8; C₃₀, n= 8; C₄₅, n= 7) e obeso (Ob₁₅, n= 8; Ob₃₀, n= 8; Ob₄₅, n= 8) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * p<0,05 vs C. # p< 0,05 vs intra-grupo.

3.5.7- Análise sérica dos hormônios tireoidianos

As Figuras 49, 50 e 51 mostram as dosagens séricas dos hormônios tireoidianos TSH, T4 e T3 realizado nos grupos C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅. A Figura 49 mostra que duração da obesidade aumentou os níveis de TSH do grupo Ob₄₅ em relação ao Ob₁₅; entretanto, a elevação dos níveis de TSH não ocorreu de modo significativo entre os grupos Ob₃₀ e Ob₁₅ ($p=0,10$). Não houve diferença estatística nos níveis de TSH entre os grupos controles ao longo do tempo. Fixados os momentos, os níveis de TSH foram diminuídos no grupo Ob₁₅ em relação ao C₁₅; entretanto, houve aumento no TSH no grupo Ob₄₅ em relação C₄₅.

A Figura 50 mostra que os níveis de T4 foram menores nos animais Ob₄₅ do que os Ob₁₅. Não foi possível mostrar diferença estatística no T4 entre os grupos Ob₁₅ e Ob₃₀ ($p=0,06$). Os animais controle apresentaram níveis similares de T4 ao longo dos períodos de tratamento. A comparação entre os grupos controle e obeso, fixado o momento, mostra que não houve alterações nos níveis de T4 nos grupos Ob₁₅ e Ob₄₅ em relação aos respectivos controles; entretanto, não foi possível mostrar diferença estatística entre os animais Ob₃₀ e C₃₀ ($p=0,06$).

A Figura 51 ilustra que os animais Ob₄₅ apresentaram elevação dos níveis de T3 em relação ao grupo Ob₁₅. Além disso, não foi possível mostrar diferença estatística no T3 entre os grupos Ob₄₅ e Ob₃₀ ($p=0,06$). Nos grupos controles, houve diminuição do T3 no C₃₀ em relação ao C₁₅. Fixados os momentos, embora a análise estatística não tenha mostrado diferença nos valores de T3 entre os Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅ e os respectivos controles, o resultado deste teste apresentou os seguintes níveis de significância, $p=0,07$, $p=0,11$ e $p=0,06$, respectivamente.

Figura 49. Níveis séricos de TSH dos animais controle (C_{15} , C_{30} e C_{45}) e obeso (Ob_{15} , Ob_{30} e Ob_{45}) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. $n = 6$ animais por grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ vs C. # $p < 0,05$ vs intra-grupo.

Figura 50. Níveis séricos de T4 dos animais controle (C_{15} , C_{30} e C_{45}) e obeso (Ob_{15} , Ob_{30} e Ob_{45}) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. $n = 6$ animais por grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos. # $p < 0,05$ vs intra-grupo.

Figura 51. Níveis séricos de T3 dos animais controle (C_{15} , C_{30} e C_{45}) e obeso (Ob_{15} , Ob_{30} e Ob_{45}) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. $n = 6$ animais por grupo. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. Não houve diferença estatística entre os grupos. # $p < 0,05$ vs intra-grupo.

3.5.8- Estrutura do coração *post mortem*

3.5.8.1- Análise macroscópica

A Tabela 12 mostra a estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos ratos C_{15} , C_{30} , C_{45} , Ob_{15} , Ob_{30} , e Ob_{45} . A comparação entre os três momentos, fixados os grupos, está descrita a seguir. Os pesos do coração, VE, VD, átrio e as relações coração/PCF, VE/PCF, VD/PCF, coração/tíbia, VE/tíbia, VD/tíbia e AT/tíbia foram semelhantes entre os grupos controles nos três momentos. O comprimento da tíbia e a relação AT/PCF apresentaram comportamento diferente entre os grupos controles. Enquanto o comprimento da tíbia foi maior no grupo C_{45} do que os C_{15} e C_{30} , a relação AT/PCF foi diminuída nos animais C_{30} e C_{45} em relação ao C_{15} .

O tempo de exposição à obesidade mostrou alteração no comprimento da tíbia entre os animais obesos ($Ob_{15} < Ob_{30} < Ob_{45}$). A relação coração/PCF foi maior nos animais Ob_{15} do que os animais Ob_{30} e Ob_{45} ; entretanto, as relações VE/PCF, AT/PCF e AT/tíbia foram

diminuídas nos animais Ob₃₀ e Ob₄₅ versus o Ob₁₅. Houve diminuição nas relações VD/PCF, coração/tíbia e VE/tíbia entre os grupos Ob₁₅ e Ob₄₅ ($Ob_{45} < Ob_{15}$). O tempo de exposição à obesidade não promoveu alterações nos pesos do coração, VE, VD, AT e na relação VD/tíbia.

A comparação entre os dois grupos, fixados os momentos, mostra que o VD, AT e a relação AT/tíbia foram maiores nos grupos Ob em relação aos respectivos controles nos três períodos de tratamento. Os pesos do coração, do VE e as relações coração/tíbia e VE/tíbia foram maiores no Ob do que no C nos momentos 15 e 30 semanas. Enquanto a obesidade durante 30 e 45 semanas acarretou aumento no comprimento da tíbia, as relações coração/PCF e VE/PCF foram diminuídas nos mesmos períodos entre os grupos. A relação VD/tíbia foi maior nos animais Ob₁₅ do que o C₁₅, entretanto, obesidade durante 30 semanas promoveu diminuição na relação VD/PCF em relação C₃₀. Não houve diferença estatística entre os dois grupos nos três momentos na relação AT/PCF.

Tabela 12. Estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* após 15, 30 e 45 semanas

Variáveis	Grupos	Tratamento		
		15 sem	30 sem	45 sem
PCF (g)	C	459 ± 18 ^{Aa}	490 ± 33 ^{ABa}	513 ± 19 ^{Ba}
	Ob	568 ± 44 ^{Ab}	608 ± 22 ^{Bb}	609 ± 37 ^{Bb}
tíbia (cm)	C	4,38 ± 0,07 ^{Aa}	4,42 ± 0,12 ^{Aa}	4,55 ± 0,11 ^{Ba}
	Ob	4,42 ± 0,07 ^{Aa}	4,55 ± 0,11 ^{Bb}	4,67 ± 0,13 ^{Cb}
Coração (g)	C	1,13 ± 0,11 ^{Aa}	1,14 ± 0,09 ^{Aa}	1,19 ± 0,08 ^{Aa}
	Ob	1,35 ± 0,05 ^{Ab}	1,28 ± 0,11 ^{Ab}	1,27 ± 0,07 ^{Aa}
VE (g)	C	0,80 ± 0,09 ^{Aa}	0,81 ± 0,07 ^{Aa}	0,86 ± 0,05 ^{Aa}
	Ob	0,95 ± 0,05 ^{Ab}	0,90 ± 0,09 ^{Ab}	0,90 ± 0,05 ^{Aa}
VD (g)	C	0,24 ± 0,02 ^{Aa}	0,25 ± 0,03 ^{Aa}	0,25 ± 0,03 ^{Aa}
	Ob	0,29 ± 0,02 ^{Ab}	0,28 ± 0,03 ^{Ab}	0,27 ± 0,03 ^{Ab}
AT (g)	C	0,09 ± 0,01 ^{Aa}	0,08 ± 0,01 ^{Aa}	0,08 ± 0,02 ^{Aa}
	Ob	0,11 ± 0,01 ^{Ab}	0,10 ± 0,01 ^{Ab}	0,10 ± 0,01 ^{Ab}
Coração/PCF (mg/g)	C	2,46 ± 0,19 ^{Aa}	2,34 ± 0,19 ^{Aa}	2,32 ± 0,18 ^{Aa}
	Ob	2,39 ± 0,24 ^{Aa}	2,11 ± 0,18 ^{Bb}	2,09 ± 0,16 ^{Bb}
VE/PCF (mg/g)	C	1,74 ± 0,17 ^{Aa}	1,66 ± 0,18 ^{Aa}	1,68 ± 0,12 ^{Aa}
	Ob	1,69 ± 0,18 ^{Aa}	1,49 ± 0,15 ^{Bb}	1,47 ± 0,13 ^{Bb}
VD/PCF (mg/g)	C	0,52 ± 0,06 ^{Aa}	0,52 ± 0,04 ^{Aa}	0,48 ± 0,06 ^{Aa}
	Ob	0,51 ± 0,05 ^{Aa}	0,46 ± 0,04 ^{ABb}	0,45 ± 0,06 ^{Ba}
AT/PCF (mg/g)	C	0,20 ± 0,02 ^{Aa}	0,16 ± 0,02 ^{Ba}	0,16 ± 0,03 ^{Ba}
	Ob	0,19 ± 0,02 ^{Aa}	0,16 ± 0,02 ^{Ba}	0,16 ± 0,02 ^{Ba}
Coração/tíbia (g/cm)	C	0,26 ± 0,02 ^{Aa}	0,26 ± 0,02 ^{Aa}	0,26 ± 0,02 ^{Aa}
	Ob	0,30 ± 0,02 ^{Ab}	0,28 ± 0,03 ^{ABb}	0,27 ± 0,02 ^{Ba}

Tabela 12. Estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* após 15, 30 e 45 semanas “continua”

VE/tíbia (g/cm)	C	$0,18 \pm 0,02^{Aa}$	$0,18 \pm 0,02^{Aa}$	$0,19 \pm 0,01^{Aa}$
	Ob	$0,22 \pm 0,01^{Ab}$	$0,20 \pm 0,02^{ABb}$	$0,19 \pm 0,01^{Ba}$
VD/tíbia (g/cm)	C	$0,06 \pm 0,01^{Aa}$	$0,06 \pm 0,01^{Aa}$	$0,05 \pm 0,01^{Aa}$
	Ob	$0,07 \pm 0,01^{Ab}$	$0,06 \pm 0,01^{Aa}$	$0,06 \pm 0,01^{Aa}$
AT/tíbia (g/cm)	C	$0,021 \pm 0,003^{Aa}$	$0,018 \pm 0,003^{Aa}$	$0,018 \pm 0,003^{Aa}$
	Ob	$0,025 \pm 0,002^{Ab}$	$0,021 \pm 0,003^{Bb}$	$0,021 \pm 0,003^{Bb}$

Dados expressos em média $\pm$ desvio-padrão. C: grupo controle submetido à dieta normocalórica por 15 (C; n= 9), 30 (C; n= 10) e 45 (C; n= 10) semanas de tratamento; Ob: grupo obeso submetido à dieta hipercalórica por 15 (Ob; n= 8), 30 (Ob; n= 10) e 45 (Ob; n= 10) semanas de tratamento. PCF: peso corporal final; VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/PCF: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo peso corporal final; VD/PCF: relação do peso do ventrículo direito pelo peso corporal final; AT/PCF: relação do peso do átrio pelo peso corporal final. VE/tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia; VD/tíbia: relação do peso do ventrículo direito pelo comprimento da tíbia; AT/tíbia: relação do peso do átrio pelo comprimento da tíbia. Letra maiúscula indica comparação entre os momentos fixado o grupo; letra minúscula indica comparação entre os grupos fixado o momento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

3.5.8.2- Análise microscópica

A Figura 52 mostra os resultados da área seccional transversa do miócito realizadas no ventrículo esquerdo dos ratos C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅. O tempo de exposição à obesidade não influenciou a área seccional do miócito dos fragmentos do VE nos animais obesos. O mesmo comportamento foi visualizado nos animais controles. Na 30^a semana de tratamento, os animais obesos apresentaram elevação na área seccional do miócito dos fragmentos de VE em relação ao controle. Entretanto, os animais Ob₁₅ e Ob₄₅ apresentaram áreas seccionais semelhantes em relação aos respectivos controles.

Figura 52. Área seccional transversa dos miócitos (AST) realizada em fragmentos do ventrículo esquerdo de animais controle ($C_{15}=9$; $C_{30}=7$; $C_{45}=8$) e obeso ($Ob_{15}=8$; $Ob_{30}=5$; $Ob_{45}=6$) submetidos a 15, 30 e 45 semanas de tratamento. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes e complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p<0,05$ vs C.

3.5.9- Expressão de RNAm miocárdico

A Figura 53 ilustra a expressão do RNAm das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio miocárdico, CANAL L, RyR, SERCA, PLB, NCX e CSQ dos ratos C_{15} , C_{30} , C_{45} , Ob_{15} , Ob_{30} e Ob_{45} . A comparação entre os três momentos, fixados os grupos, está descrita a seguir. O tempo de exposição à obesidade acarretou aumento dos níveis de RNAm do CANAL L, da RyR, da SERCA, da PLB, do NCX e da CSQ no grupo Ob_{30} em relação ao Ob_{15} e Ob_{45} . Além disso, os níveis de SERCA e PLB foram maiores no grupo Ob_{45} em relação ao Ob_{15} .

A comparação entre os dois grupos, fixados os momentos, mostra que os níveis de RNAm da SERCA, do NCX e da CSQ foram diminuídos no grupo Ob_{15} e Ob_{45} em relação aos respectivos controles, entretanto na 30ª semana de obesidade os níveis de SERCA, do NCX e da CSQ foram elevados em relação ao C_{30} . A PLB e o CANAL L apresentaram menores níveis de RNAm na 15ª semana de obesidade do que o C_{15} ; contudo, 30ª semana de obesidade houve aumento das duas variáveis versus C_{30} . Não foram observadas diferenças nos níveis de PLB e CANAL L entre os grupos na 45ª semana. A obesidade durante 30

semanas acarretou aumento no RNAm da RyR versus o C₃₀, entretanto, não houve diferença significativa na 15^a e 45^a semana entre os grupos.

Figura 53. Expressão gênica de SERCA, PLB, RyR, CANAL L, NCX e CSQ normalizados pela β-actina no miocárdio dos animais controles (C₁₅, C₃₀ e C₄₅) e obeso (Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. n= 6 animais por grupo. Os dados estão expressos em média ± desvio padrão relativos aos respectivos grupos controles. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * p<0,05 vs C. # p< 0,05 vs intra-grupo.

A Tabela 13 mostra os resultados da análise da associação linear de Pearson realizada em todos os animais deste estudo. Não foram observadas correlações significativas entre as concentrações de T3 e os níveis de RNAm de SERCA, PLB, RyR, NCX e CANAL L.

Tabela 13. Medida de associação linear de Pearson entre os níveis de T3 e expressão gênica

T3		
RNAm	Correlação Linear	Valor de p
SERCA	0,021	P=0,89
PLB	0,056	P=0,74
RyR	0,040	P=0,81
NCX	0,254	P=0,14
CANAL L	0,168	P=0,33

SERCA: ATPase de Ca^{+2} do retículo sarcoplasmático; PLB: Fosfolambam; RyR: Receptor de Rianodina; NCX: Trocador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{+2}$.

3.5.10- Expressão de proteínas miocárdicas

As Figuras 54 e 55 ilustram a expressão das proteínas relacionadas com o trânsito de cálcio intracelular miocárdico dos ratos C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅. A comparação entre os três momentos, fixados os grupos, está descrita a seguir.

As Figuras 54 e 55 mostram que não foram observadas diferenças significativas na expressão protéica de CANAL L, SERCA, PLB, CSQ, pPLB Thr17 e nas razões SERCA/PLB e pPLB Thr17/PLB entre os grupos obesos. Entretanto, o tempo de exposição à obesidade acarretou aumento nos níveis da pPLB Ser16 no grupo Ob₄₅ em relação ao Ob₁₅ e Ob₃₀. Além disso, houve aumento da razão pPLB Ser16/PLB entre os grupos obesos (Ob₄₅ > Ob₃₀).

A comparação entre os dois grupos, fixados os momentos, mostra que a obesidade durante 15 e 30 semanas promoveu diminuição nos níveis de pPLB Ser16 versus os

respectivos controles; entretanto, não houve diferença estatística da pPLB Ser16 entre os grupos na 45^a semana. A razão pPLB Ser16/PLB foi diminuída no grupo Ob₃₀ em relação ao respectivo controle, contudo a obesidade durante 15 e 45 semanas, não acarretou diferenças significativas nesta variável entre os grupos. A obesidade, após 15, 30 e 45 semanas, não promoveu alterações na expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ, CANAL L, PLB Thr17 e nas razões SERCA/PLB e PLB Thr17/PLB em relação aos respectivos controles.

Figura 54. Expressão protéica de SERCA, PLB, CSQ CANAL L e razão SERCA/PLB normalizados pela β -actina no miocárdio dos animais controles (C_{15} , C_{30} e C_{45}) e obeso (Ob_{15} , Ob_{30} e Ob_{45}) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. $n=6$ animais por grupo n . Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão relativos aos respectivos grupos controles. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * $p<0,05$ vs C. # $p<0,05$ vs intra-grupo.

Figura 55. Expressão protéica de pPLB Ser16, pPLB Thr17 e as razões pPLB Ser16/PLB e pPLB Thr17/PLB normalizados pela β-actina no miocárdio dos animais controles (C₁₅, C₃₀ e C₄₅) e obeso (Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅) submetidos à 15, 30 e 45 semanas de tratamento. n= 6 animais por grupo. Dados expressos em média ± desvio padrão relativos aos respectivos grupos controles. Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste *post-hoc* de Bonferroni. * p<0,05 vs C. # p< 0,05 vs intra-grupo.

3.5.11- Determinação do teor de água nos tecidos cardíaco, pulmonar e hepático

A Tabela 14 mostra a porcentagem de umidade dos tecidos dos ratos C₁₅, C₃₀, C₄₅, Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅. A comparação entre os três momentos, fixados os grupos, está descrita a seguir. O teor de água no VE, VD e fígado foram semelhantes entre os grupos controles nos três momentos. Entretanto, a porcentagem de água no átrio foi menor no C₄₅ em relação ao C₁₅. O teor de água no pulmão foi maior no C₃₀ em relação ao C₁₅ e C₄₅.

O tempo de exposição à obesidade acarretou aumento no teor de água do pulmão entre os grupos obesos ($Ob_{30} > Ob_{15}$). A duração da obesidade não foi capaz de promover mudanças na quantidade de água dos VE, VD, AT e fígado.

A comparação entre os dois grupos, fixados os momentos, mostra que o teor de água no fígado foi menor nos grupos Ob_{15} e Ob_{30} em relação aos respectivos controles. Entretanto, a obesidade durante 45 semanas não foi capaz de promover alterações no teor de água no fígado entre os grupos. As quantidades de água no VE, VD, átrio e pulmão foram similares entre os dois grupos nos três momentos de avaliação.

Tabela 14. Teor de água nos tecidos cardíacos, pulmonar e hepático após 15, 30 e 45 semanas

		Tratamento		
Variáveis	Grupos	15 sem	30 sem	45 sem
VE (%)	C	75,5 ± 0,8 ^{Aa}	75,6 ± 3,4 ^{Aa}	72,7 ± 2,8 ^{Aa}
	Ob	75,2 ± 0,6 ^{Aa}	74,9 ± 0,7 ^{Aa}	75,1 ± 2,2 ^{Aa}
VD (%)	C	75,6 ± 1,0 ^{Aa}	76,0 ± 3,4 ^{Aa}	73,9 ± 3,2 ^{Aa}
	Ob	75,3 ± 1,0 ^{Aa}	75,1 ± 0,9 ^{Aa}	74,8 ± 2,1 ^{Aa}
AT (%)	C	77,6 ± 1,1 ^{Aa}	76,1 ± 1,8 ^{ABa}	74,6 ± 4,4 ^{Ba}
	Ob	77,7 ± 1,5 ^{Aa}	76,5 ± 1,9 ^{Aa}	76,6 ± 2,1 ^{Aa}
Pulmão (%)	C	77,4 ± 0,7 ^{Aa}	78,5 ± 0,9 ^{Ba}	77,3 ± 0,8 ^{Aa}
	Ob	77,3 ± 0,6 ^{Aa}	78,3 ± 0,5 ^{Ba}	77,5 ± 0,9 ^{ABa}
Fígado (%)	C	68,0 ± 1,0 ^{Aa}	68,1 ± 0,8 ^{Aa}	67,5 ± 1,5 ^{Aa}
	Ob	66,4 ± 1,0 ^{Ab}	66,2 ± 1,4 ^{Ab}	67,1 ± 0,7 ^{Aa}

Dados expressos em média ± desvio-padrão. C: grupo controle submetido à dieta normocalórica por 15 (C; n= 9), 30 (C; n= 10) e 45 (C; n= 10) semanas de tratamento; Ob: grupo obeso submetido à dieta hipercalórica por 15 (Ob; n= 8), 30 (Ob; n= 10) e 45 (Ob; n= 10) semanas de tratamento. Letra maiúscula indica comparação entre os momentos fixado o grupo; letra minúscula indica comparação entre os grupos fixado o momento. Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Análise de variância (ANOVA) two way para grupos independentes, complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

4- DISCUSSÃO

Como referido anteriormente (pág. 46), a discussão foi realizada levando-se em consideração a análise conjunta dos três momentos de obesidade.

4.1- Momento inicial da obesidade

Os resultados obtidos mostraram que a dieta hiperlipídica promoveu obesidade a partir da 3ª semana de tratamento; o peso e a gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores nos animais Ob₀ em relação ao C₀. Os diversos modelos experimentais de obesidade não verificam o momento inicial da obesidade; estes trabalhos apenas mostram o momento em que a dieta acarreta diferença no peso corporal entre os grupos, não identificando se o aumento no peso corporal era acompanhado de elevação na gordura corporal e/ou índice de adiposidade.^(99,100) Portanto, a determinação do momento inicial permitiu avaliar com precisão a influência do tempo de exposição à obesidade.

4.2-Constituição dos grupos controle e obeso

Um aspecto importante que devemos destacar nesta pesquisa foi a aplicação de um critério de classificação dos grupos, de acordo com o índice de adiposidade, identificando os animais verdadeiramente controle e obeso. Na experimentação biológica, em especial estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada uma homogeneidade de resposta. Animais submetidos à diferentes dietas podem apresentar, em maior ou menor escala, características comuns de resposta, o que poderia não distinguir os grupos. Neste sentido, com a finalidade de diferenciar os grupos foi utilizado o critério de separação descrito na seção “Material e métodos”. O descarte dos animais pela ausência de adesão ao critério estabelecido foi, respectivamente, nos grupos controles (C₁₅= 25%; C₃₀= 17%; C₄₅= 17%) e obesos (Ob₁₅= 33%; Ob₃₀= 17%; Ob₄₅= 17%). Nascimento *et*

al⁽⁷⁸⁾ utilizando critério semelhante, a partir da mensuração da gordura na carcaça, verificaram resultados diversos dos encontrados neste estudo, desde que, ocorreram descartes inferiores a 20% nos grupos controle e obeso tratados durante 15 semanas.

4.3- Perfil nutricional

Os períodos de dieta hiperlipídica, utilizados nesse estudo, foram eficientes em promover obesidade, desde que o índice de adiposidade utilizado para caracterizar os animais como obesos, foi 79,5%, 82% e 69,5% maior do que seus respectivos controles, após 15, 30 e 45 semanas. O tempo de exposição à dieta hiperlipídica não promoveu alterações no índice de adiposidade entre os grupos; este resultado indica que, neste trabalho, não houve aumento na intensidade da obesidade ao longo do tempo. O mesmo comportamento foi visualizado nos animais controles. O índice de adiposidade tem sido utilizado frequentemente para classificar a obesidade em roedores.^(38,42,82,86,99,100)

Neste experimento, a dieta hiperlipídica também acarretou nos ratos obesos elevação no peso e na gordura corporal total. O peso dos animais obesos, após 15, 30 e 45 semanas, aumentou 23,7%, 24,1% e 18,7% em relação aos controles, respectivamente. O tempo de exposição à obesidade acarretou maior peso corporal final nos animais Ob₃₀ e Ob₄₅ em relação ao Ob₁₅. Neste estudo, a dieta hiperlipídica estabilizou o peso corporal após a 30ª semana de obesidade. O comportamento dos animais controles ao longo do tempo mostra que somente C₄₅ apresentou diferença estatística no peso corporal versus o C₁₅ (C₄₅ > C₁₅). Os dados deste experimento em relação ao peso corporal corroboram com Ghibaudi *et al*⁽¹⁰¹⁾ que visualizaram, em ratos alimentados com dieta hiperlipídica, durante 28 semanas, elevação de 23,4% no peso corporal em relação o controle. Entretanto, divergem de outros autores,^(86, 102,103) que utilizando dieta hiperlipídica, por 10, 16 e 17 semanas observaram aumento no peso corporal de 15,6%, 15,5%, e 35,6%, respectivamente, entre os grupos controle e obeso.

Outra pesquisa,⁽¹⁰⁴⁾ realizada com ratos Sprague-Dawley tratado também com dieta hiperlipídica durante 12 meses, mostrou que não houve diferença significativa no peso corporal.

Nascimento *et al*⁽⁷⁸⁾ e Woods *et al*⁽⁸³⁾ relataram que o peso corporal pode não ser um bom indicador de obesidade. Em nosso estudo, a gordura corporal total foi 130%, 126% e 100% maiores que os respectivos controles após 15, 30 e 45 semanas. Estes dados quando comparados com o peso corporal, indicam que esta variável pode, realmente, subestimar o grau de obesidade. Trabalho realizado com ratos *Wistar*,⁽³⁸⁾ alimentados com dieta hiperlipídica, por 12 semanas, mostrou elevação de 96,3% na quantidade de gordura corporal versus o grupo controle. Outro estudo⁽¹⁰¹⁾ verificou em ratos, após 28 semanas de dieta hiperlipídica, aumento de 137,5% na gordura corporal total em relação ao grupo dieta normolipídica.

A epidemia mundial de obesidade humana, geralmente, está associada ao maior consumo de dietas altamente energéticas e uma diminuição do gasto calórico.⁽¹⁰⁵⁾ Estudos mostraram que ratos tornam-se obesos quando são alimentados com uma dieta rica em gordura, e sugerem que a elevação da quantidade de gordura na dieta aumenta o consumo alimentar e energético.⁽⁸¹⁾ Pesquisas recentes mostraram que o consumo de dieta hiperlipídica promove menos saciedade e, conseqüentemente, maior ingestão alimentar.^(38,82) Nosso estudo mostrou que o consumo de dieta hiperlipídica acarretou maior ingestão calórica nos Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅ em relação aos C₁₅, C₃₀ e C₄₅, respectivamente, apesar dos animais obesos ingerirem a mesma quantidade de ração que os controles. Pesquisadores sugerem que a quantidade de lipídios na dieta é o principal fator pelo acúmulo de gordura nos animais obesos.⁽¹⁰⁶⁻¹⁰⁸⁾ Além disso, a literatura mostra que o maior consumo de gordura pode não ser acompanhado de elevação na sua oxidação, o que favorece maior depósito de tecido adiposo em animais alimentados com dietas hiperlipídicas.^(109,110)

A eficiência alimentar tem sido utilizada para verificar a conversão de ingestão alimentar em ganho de peso corporal.⁽³⁹⁾ Nossos resultados mostram que a eficiência alimentar foi maior nos Ob₁₅ e Ob₃₀ em relação aos respectivos controles; entretanto, não houve diferença entre os grupos Ob₄₅ e C₄₅. Os dados do presente estudo estão em concordância com diversas pesquisas que verificaram aumento da eficiência alimentar, em ratos submetidos à dieta hiperlipídica por 12 e 15 semanas de tratamento.⁽³⁷⁾ A ingestão alimentar e o consumo calórico não sofreram influências do tempo de exposição aos tratamentos; contudo, a eficiência alimentar diminuiu ao longo do tempo em ambos os grupos (Ob₁₅>Ob₃₀>Ob₄₅) (C₁₅>C₃₀>C₄₅). Este fato pode ser atribuído ao processo de envelhecimento, desde que, há diminuição da necessidade energética com a idade.⁽¹¹¹⁾ A causa deste declínio da necessidade energética tem sido atribuída à diminuição da massa magra e redução da taxa metabólica basal.⁽¹¹¹⁾

4.4- Comorbidades

Neste estudo foram visualizadas algumas comorbidades frequentemente associadas com a obesidade experimental,^(38,39,79-84) como intolerância à glicose, resistência à insulina, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e dislipidemias. O teste de tolerância à glicose mostrou que embora a glicemia basal fosse semelhante entre os grupos, após sobrecarga de glicose os animais obesos apresentaram áreas glicêmicas maiores nos grupos Ob₁₅, Ob₃₀, e Ob₄₅ em relação aos seus respectivos grupos controles, demonstrando que a obesidade promoveu intolerância à glicose. O tempo de exposição à obesidade não modificou a variável entre os momentos estudados. Além disso, a obesidade acarretou hiperinsulinemia, visualizada nos grupos Ob₁₅, Ob₃₀ e Ob₄₅. O índice HOMA-IR, frequentemente utilizado como indicador de resistência à insulina,⁽⁸⁷⁾ mostrou que a obesidade promoveu aumento deste parâmetro nos momentos 15 e 45 semanas e tendência à elevação no grupo Ob₃₀ (p=0,054). Portanto, os

dados de hiperinsulinemia e do HOMA-IR, mostram que a obesidade promoveu resistência à insulina, baseando-se no fato de que a euglicemia foi mantida à custa de elevação dos níveis de insulina. A obesidade ao longo do tempo promoveu hiperinsulinemia e, conseqüentemente, resistência insulínica, visualizada pelo HOMA-IR, de forma mais acentuada nos animais Ob₄₅. Os resultados deste estudo estão de acordo com pesquisas que observaram que uma dieta rica em gordura promove intolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina em períodos curtos^(81,112,113) e prolongados de obesidade.^(84,104,114)

A insulina exerce um papel central na regulação da glicose e atua de maneira coordenada em eventos celulares.⁽¹¹⁵⁾ Além disso, a insulina afeta o metabolismo de lipídeos, aumentando a síntese e atenuando a liberação de ácidos graxos das células adiposas.⁽¹¹⁶⁾ A resistência à ação da insulina ocorre quando os níveis circulantes normais deste hormônio são insuficientes para regular estes processos.⁽¹¹⁶⁾ Nesta condição, as células β do pâncreas tendem a secretar maiores quantidades de insulina, hiperinsulinemia, aumentando a captação de glicose, evitando a hiperglicemia.⁽¹¹⁷⁾ No entanto, esse aumento compensatório nos níveis de insulina podem não perdurar por prolongados períodos, o que acarretaria o desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2.⁽¹¹⁸⁾ A resistência à insulina pode estar associada às anormalidades no transportador da glicose 4 (GLUT4) ou da via de sinalização insulínica, responsável por desencadear a translocação do GLUT4. Na obesidade tem sido relatado que a resistência à insulina ocorre em nível de transporte de glicose, no músculo esquelético e no tecido adiposo. Concordando com esta afirmação, estudos mostram que a obesidade, associada à resistência insulínica, promoveu redução na expressão de GLUT4 no tecido adiposo.⁽¹¹⁹⁾ Klip *et al*⁽¹²⁰⁾ relataram também redução dos níveis de mRNA e protéicos de GLUT4 no tecido adiposo branco em vários modelos animais de obesidade. Dentro deste contexto, podemos inferir que a resistência insulínica na obesidade ocorre em nível de transporte de glicose, indicando que a via de sinalização da insulina estaria preservada.

Figura 56. Resumo das vias de sinalização da insulina. Adaptado de Carvalheira JBC 2002.⁽¹²¹⁾

Nesse estudo, os níveis séricos de leptina foram maiores nos grupos obesos em relação aos respectivos grupos controles ($Ob_{15} > C_{15}$, $Ob_{30} > C_{30}$ e $Ob_{45} > C_{45}$). O tempo de exposição à obesidade promoveu aumento da leptina nos grupos Ob_{45} em relação ao Ob_{15} ; entretanto não foi possível mostrar diferença estatística entre os grupos Ob_{15} versus Ob_{30} ($p=0,055$) e Ob_{30} versus Ob_{45} ($p=0,09$). Este hormônio é secretado pelo tecido adiposo e é um membro clássico das adipocinas que participam da sinalização hormonal do tecido adiposo. O efeito fisiológico primário da leptina é comunicar ao sistema nervoso central a quantidade elevada dos estoques energéticos, controlando o consumo alimentar e induzindo o gasto energético.⁽¹²²⁾ Diversos estudos mostram que os níveis de leptina se correlacionam com a quantidade de gordura corporal.^(122,123) Atualmente tem sido relatado que a obesidade, induzida por dietas hiperlipídicas, leva a um estado de resistência à leptina,^(122,124) Estudos sugerem que a resistência à leptina é decorrente da incapacidade da leptina atuar no hipotálamo, como resultado do prejuízo no transporte da barreira hemato-encefálica.^(125,126) Além disso, tem sido demonstrado que resistência à leptina também pode ser devido à alteração das vias de sinalização molecular da leptina, consequente a hiperleptinemia. A resistência à leptina eleva a ingestão alimentar devido a uma falha no mecanismo da saciedade, acarretando aumento da adiposidade.^(18,19,122) Os resultados do presente estudo sugerem que o papel da leptina no

controle da saciedade, à custa da hiperleptinemia, foi efetivo em todos os grupos, uma vez que, os animais obesos ingeriram a mesma quantidade de alimento que os respectivos grupos controles.

A dislipidemia observada na obesidade é caracterizada pelos níveis elevados de triglicérides (TG), LDL e ácidos graxos não-esterificados (NEFA) e diminuição dos níveis séricos de HDL.^(127,128) Entretanto, estas alterações não ocorreram em todos os momentos de avaliação neste trabalho. Os animais obesos apresentaram aumento dos níveis de TG em relação aos controles nos momentos 15 e 30 semanas; entretanto, não foi possível mostrar diferença estatística nos níveis de triglicérides entre os grupos após 45 semanas ($p=0,08$). Os dados de TG corroboram com pesquisas de outros autores, realizadas em curtos períodos, 12 e 16 semanas, que mostraram elevação dos níveis de TG.^(88,103) Entretanto, difere de estudos que não identificaram diferença nos níveis de TG durante 12 semanas de obesidade.^(38,39,129) Pesquisas mostraram que o aumento nos níveis de TG promovido pela dieta hiperlipídica pode ser consequente à elevada captação dos TG na forma de quilomicróns, e/ou, diminuição da absorção de TG pelos tecidos periféricos.⁽¹³⁰⁾ A redução da utilização de TG pelo músculo esquelético tem sido relacionada com a hiperleptinemia.^(131,132) Pesquisadores têm relatado que a leptina exerce uma regulação na sinalização da insulina via fosfatidil inositol 3 quinase (PI3-K). A leptina ativa o janus quinase 2 (JAK-2) que induz a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS), levando à ativação do PI3-K, o qual acarreta aumento de utilização da glicose.⁽¹³²⁾ Kamohara *et al*⁽¹³³⁾ demonstraram que a leptina administrada à camundongos acarretou aumento da utilização da glicose pelo tecido muscular. Além disso, estudo realizado em ratos com hiperleptinemia mostrou redução no conteúdo de TG no músculo esquelético, fígado e pâncreas, mostrando efeito anti-lipotóxico da leptina nestes tecidos.⁽¹³⁴⁾ Desta forma, podemos inferir que a elevação nas concentrações séricas de triglicérides nos grupos obesos, visualizada neste estudo, poderia ter sido ocasionada pela hiperleptinemia destes animais, que

possivelmente diminuiu a absorção de TG pelo músculo esquelético consequente ao aumento da absorção de glicose. Este fato corrobora com os níveis séricos glicêmicos inalterados nos grupos obesos. O tempo de exposição à obesidade não promoveu alteração nos níveis de TG nos três momentos de avaliação, mostrando que os mecanismos responsáveis pela homeostasia do TG não foi alterado pelo tempo que os animais ficaram expostos à obesidade.

A obesidade acarretou alterações, pontuais, entre o grupo obeso e o respectivo controle no colesterol total, 15ª semana, e no LDL, 45ª semana. A diferença dos níveis de colesterol e LDL entre os grupos pode ser devido ao baixo nível de colesterol encontrado no grupo C₁₅ e aumento do LDL no grupo C₄₅, respectivamente. Desde que as concentrações séricas destes lipídeos foram semelhantes nos três momentos de obesidade, as diferenças encontradas entre os grupos foram devidas às alterações nos grupos controles. A composição da dieta hiperlipídica, utilizada neste estudo, é predominantemente de ácidos graxos insaturados. Estudos mostraram que a substituição da gordura saturada, na dieta, por insaturada reduz substancialmente os níveis de colesterol.^(135,136) Santos⁽¹³⁷⁾ enfatiza que a ingestão de ácidos graxos saturados está fortemente correlacionada com os níveis de colesterol. Os ácidos graxos saturados, na sua maioria, aumentam os níveis séricos das lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (LDL), desde que reduzem a síntese e atividade dos receptores LDL, por meio da diminuição da expressão de RNA mensageiro.^(138,139) Estudo realizado em humanos, mostrou que a redução de gordura saturada na dieta está relacionada ao aumento da expressão dos receptores de LDL, que correspondeu similarmente à redução dos níveis circulantes de LDL.⁽¹³⁹⁾ Portanto, a característica insaturada das dietas utilizadas em nosso estudo, seria responsável pela não alteração nos níveis séricos de colesterol e LDL.

A obesidade no presente estudo não acarretou diminuição de HDL em relação aos respectivos controles, característica comumente observada em animais obesos. Segundo Mahan *et al*,⁽¹⁴⁰⁾ os efeitos dos ácidos graxos monoinsaturados sobre HDL dependem do

conteúdo total destes ácidos na dieta; o aumento nos níveis acarreta uma discreta elevação do HDL. Assim, a ausência de alteração nos níveis de HDL entre os grupos pode ter ocorrido devido à composição da dieta hiperlipídica, com maior quantidade de ácidos graxos monoinsaturados, levando conseqüentemente, a uma estabilização ou aumento dos níveis de HDL. O tempo de exposição à obesidade não acarretou alteração nas concentrações séricas de HDL.

Os níveis séricos de NEFA foram semelhantes entre os grupos obesos e controles em todos os momentos avaliados. Além disso, o tempo de exposição aos tratamentos não promoveu alterações no NEFA em ambos os grupos. As concentrações de ácidos graxos não-esterificados ou ácidos graxos livres (AGL) são usadas para indicar a mobilização de gordura.⁽¹⁴¹⁾ Neste trabalho, o resultado dos níveis de NEFA sugere que a lipólise não sofreu alterações entre os grupos e ao longo do tempo de tratamento, provavelmente, resultante dos altos níveis de insulina sérica. A liberação de ácidos graxos dos adipócitos depende da taxa de lipólise regulada pela lipase hormônio-sensível.⁽¹⁴²⁾ A lipase hormônio sensível promove lipólise dos adipócitos acarretando aumento dos ácidos graxos livres na circulação; entretanto, os altos níveis de insulina, observados nesse estudo, poderia bloquear a atividade da lipase hormônio-sensível nos adipócitos, diminuindo a liberação de ácidos graxos.⁽¹²¹⁾ Apesar dos altos níveis de leptina, visualizada nos animais obesos, a ausência de alteração nas concentrações de NEFA, sugere que a ação da insulina superou os efeitos lipolíticos da leptina. Nossos resultados divergem da literatura que, geralmente, mostra níveis elevados de NEFA em ratos obesos.⁽⁸⁸⁾ Wilson *et al.*,⁽¹⁴³⁾ mostraram que dieta rica em gordura, em diferentes períodos, 8, 24 e 48 semanas, promove aumento das concentrações de NEFA; no entanto, este estudo não dosou as concentrações séricas de insulina.

A obesidade, assim como, o tempo de exposição não promoveram alterações no comportamento da pressão arterial sistólica final (PAS). Os mecanismos responsáveis pela

alteração da pressão arterial, incluem a hiperatividade do sistema nervoso simpático,⁽¹⁷⁾ aumento da atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA)^(56,72,73) e estresse oxidativo,⁽¹⁷⁾ os quais acarretam vasoconstrição periférica e aumento da reabsorção de sódio renal. A ausência de alteração na pressão arterial, provavelmente, reflete que a obesidade e o tempo de exposição não alteraram os fatores envolvidos no controle da pressão arterial. A literatura não mostra consistência nos resultados de hipertensão arterial na obesidade. Assim, enquanto alguns estudos não observaram alteração da PAS em animais obesos;^(38,39) outros pesquisadores relataram que a obesidade promoveu elevação dos níveis da PAS.^(102,103)

4.5- Hormônios tireoidianos e obesidade

Alterações nos níveis hormonais tireoidianos, hormônio estimulante da tireóide (TSH), tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) estão frequentemente associados com alteração na gordura corporal.^(64,144) Estudos mostram relação positiva entre as concentrações séricas de TSH e os níveis de leptina,^(65-67,145) indicando que os hormônios tireoidianos sofrem um processo de adaptação com o aumento da adiposidade corporal.⁽⁶⁶⁾ A alteração nas concentrações de TSH na obesidade é resultante do efeito da leptina no eixo hipotálamo-hipófise.⁽⁶⁶⁾ No rato, a leptina pode atuar diretamente sobre o hipotálamo através dos receptores de leptina, acarretando liberação de hormônio liberador de tireotrofina (TRH). Este se liga a receptores específicos na hipófise, induzindo a síntese de TSH. Nosso estudo mostrou que a obesidade promoveu aumento nos níveis séricos de TSH ao longo do tempo, provavelmente, ocasionado pelos altos níveis de leptina nos grupos obesos. O fato da ausência de alteração nos níveis de leptina e TSH no grupo controle ao longo do tempo corrobora com esta afirmação. Além disso, análise da associação, dados não apresentados, mostrou que os níveis de leptina dos animais obesos se correlacionam significativamente com os níveis séricos de TSH ($r=0,514$; $p<0,05$); entretanto, o controle não apresentou o mesmo comportamento ($r=-0,06$; $p=0,81$).

Estudos mostraram que a leptina também pode estimular a produção de T3, via conversão de T4 em T3.^(67,68,133) Em nosso estudo, a diminuição dos níveis de T4 ao longo do tempo de exposição à obesidade (Ob₁₅ vs Ob₄₅) foi acompanhada de elevação das concentrações séricas de T3 (Ob₄₅ vs Ob₁₅), possivelmente, também sob atuação conversora da leptina. Portanto, podemos inferir que a leptina, na obesidade, atua sobre a tireóide a nível central e periférico.

Figura 57. Resumo da via de atuação da leptina. Adaptado de Feldt-Rasmussen U 2007.⁽¹⁴⁶⁾

4.6- Remodelação cardíaca

4.6.1- Estrutura do coração *post mortem*

Os resultados do nosso estudo mostraram que os animais obesos em relação aos respectivos controles, quando analisados os pesos isolados das câmaras cardíacas, apresentaram remodelação do coração, VD e do AT nos três momentos, apesar da não significância estatística no peso do coração na 45ª semana ($p=0,052$); além disso, houve remodelação do VE nos momentos 15 e 30 semanas. A remodelação cardíaca pode também ser avaliada normalizando os pesos do coração e de seus componentes pelo peso corporal;⁽¹⁴⁷⁾ no entanto, o uso deste índice é controverso quando se comparam animais com exacerbada diferença nos pesos corporais. A ocorrência desse comportamento, entre o peso corporal dos

controles e obesos deste estudo, pode ter influenciado os resultados da normalização. Este fato pode ser constatado comparando-se o comportamento do peso isolado do AT, do VD, do VE e do coração e as respectivas normalizações pelo PCF. Enquanto, por exemplo, o peso do VE e do coração foram maiores nos grupos obesos versus os respectivos controles, na 15^a e 30^a semana, a obesidade promoveu diminuição das relações coração/PCF e VE/PCF nos mesmos momentos. Desta forma, os pesquisadores têm utilizado como alternativa, a normalização das câmaras cardíacas pelo comprimento da tíbia, uma vez que, a curva de crescimento da tíbia, foi independente da presença lesões patológicas e alterações no peso corporal do rato.⁽¹⁴⁸⁾ O uso deste índice acarretou respostas opostas em relação à normalização pelo PCF; enquanto, por exemplo, a relação coração/PCF foi diminuída no grupo Ob₁₅, a relação coração/tíbia foi aumentada no mesmo grupo e momento. A presença de remodelação, visualizada pela elevação da normalização do coração, VE e AT pelo comprimento da tíbia foi observada nos grupos obesos na 15^a e 30^a semana. Estes dados estão em concordância com pesquisas que afirmam que a hipertrofia ventricular é uma característica adaptativa da obesidade.⁽¹⁴⁹⁾ A análise conjunta dos resultados mostra que os animais na 45^a não apresentaram remodelação do VE e coração quando avaliados isoladamente e após normalização pela tíbia.

A análise da área seccional transversa do miócito (AST) também permite verificar a presença de remodelação cardíaca.⁽⁸⁹⁾ Este parâmetro mostrou semelhança de resultado em relação ao comportamento do VE, analisado isoladamente ou normalizado pela tíbia, nos momentos 30 e 45 semanas em relação aos respectivos controles. A ausência de alteração na AST após 15 semanas no grupo obeso é conflitante com o aumento do peso do VE isolado e após normalização pela tíbia. Este resultado sugere que possivelmente os animais Ob₁₅ desenvolveram, inicialmente, remodelação do tipo excêntrica. Após 30 semanas de obesidade o aumento do VE, acompanhado da AST poderia indicar a presença de remodelação concêntrica; entretanto, esta afirmação não encontra apoio em fatores que desencadeiam

hipertrofia concêntrica, como por exemplo, a hipertensão arterial. Apesar da normalização pelo comprimento da tíbia, PCF e AST serem utilizados como indicadores da presença ou ausência de hipertrofia, acreditamos que os métodos mais consistentes e adequados para avaliar o crescimento do coração são as medidas do comprimento e da espessura do miócito isolado e avaliação do volume nuclear.⁽¹⁵⁰⁾

De acordo com os resultados obtidos podemos inferir que as sobrecargas impostas pela obesidade foram mais efetivas no desencadeamento de hipertrofia cardíaca do VE na 15ª e 30ª semana de tratamento. Este processo mostra que após a 30ª semana houve estabilização da hipertrofia cardíaca, indicando que após esse período houve equilíbrio entre as demandas metabólicas corporais e o desempenho do coração.

A hipertrofia cardíaca ocorre como uma resposta adaptativa às variações pressóricas, volumétricas e/ou metabólicas.⁽¹⁵¹⁾ Na obesidade geralmente tem sido observado hipertrofia cardíaca do tipo excêntrica,^(21,26,152) a qual ocorre em resposta à uma sobrecarga de volume, acarretando aumento dos sarcômeros em série;⁽⁸⁹⁾ entretanto, também pode ocorrer remodelamento concêntrico, promovendo ampliação dos sarcômeros em paralelo, em virtude da sobrecarga pressórica. A literatura mostra que prolongados períodos de obesidade estão associados com hipertrofia excêntrica, e que poucos estudos reportam remodelação concêntrica do coração na ausência da sobrecarga pressórica.^(21,153) O estímulo para a remodelação cardíaca ocorre por agentes mecânicos e bioquímicos, estes, atuando em sinalizadores sarcolemiais, ativam fatores citosólicos que promovem a síntese protéica por meio da ativação de fatores transcricionais nucleares.^(154,155) Na obesidade há evidência de diversos preditores da remodelação cardiovascular, como leptina, angiotensina II, endotelina, catecolaminas e marcadores inflamatórios.^(13,14) Além destes, pesquisas mostram que a insulina pode exercer influência na hipertrofia cardíaca, estimulando a síntese protéica e inibindo a degradação protéica no coração.⁽¹⁵⁶⁻¹⁵⁸⁾ Nosso estudo mostrou que a obesidade acarretou

aumento nas concentrações séricas de insulina; este fato nos permite inferir que a hipersinsulinemia pode ter influenciado o processo de remodelação cardíaca, visualizado neste estudo na 15ª e 30ª semana. A insulina ativa o PI3-K, o qual leva ao recrutamento da proteína quinase AKT, também denominada proteína quinase B. Quando ativada, a AKT fosforila a proteína quinase mTOR, cuja ativação aumenta a síntese protéica, acarretando a hipertrofia cardíaca.^(121,159,160) Embora a estabilização da hipertrofia cardíaca, na 45ª semana nos animais obesos, possa ser atribuída ao equilíbrio entre as demandas metabólicas corporais e o desempenho do coração, a maior resistência à insulina, visualizada pelo índice de HOMA-IR neste animais, também pode estar relacionada ao processo de equilíbrio hipertrófico.

Figura 58. Resumo das vias de sinalização hipertrófica em cardiomiócitos. Adaptado de Garcia JAD 2008.⁽¹⁶¹⁾

4.6.2- Expressão de RNAm e proteínas miocárdicas

O presente estudo teve como objetivo principal avaliar a influência do tempo de exposição à obesidade sobre o RNAm e as respectivas proteínas relacionadas com o trânsito de Ca^{+2} miocárdico. No cardiomiócito, os íons Ca^{+2} participam ativamente das diversas funções intracelulares, dentre elas, o acoplamento excitação-contracção. Desde que, as proteínas relacionadas com o trânsito de Ca^{+2} miocárdico participam efetivamente na

liberação, recaptura e remoção do Ca^{+2} , as mesmas desempenham papel fundamental na regulação da função cardíaca.⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ Neste sentido, visualizações de alterações nos níveis de RNAm e, consequentemente, das proteínas poderiam contribuir, em projetos futuros, para o entendimento dos mecanismos envolvidos na disfunção cardíaca promovida pela obesidade.

A liberação dos íons Ca^{+2} responsáveis pelo início do ciclo contrátil do miocárdio, são mediados pelo CANAL L e RyR. Embora a obesidade tenha alterado os níveis de RNAm do CANAL L, entre os grupos controle e obeso e ao longo do tempo, este comportamento não foi visualizado na expressão protéica, que não se modificou com a obesidade. Semelhante ao CANAL L, a obesidade e o tempo de exposição também influenciaram a expressão gênica de RyR; entretanto, a expressão protéica do RyR em seu estado normal e fosforilado não será discutida, uma vez que, tivemos dificuldades técnicas na medida da sua expressão.

Os processos de recaptura, armazenamento e extrusão dos íons Ca^{+2} , responsáveis pelo relaxamento cardíaco, são principalmente mediados, no retículo sarcoplasmático, pela SERCA, PLB e CSQ, e no sarcolema pelo NCX. Neste estudo, enquanto a obesidade na 15ª e 45ª semana, acarretou diminuição dos níveis de RNAm da SERCA, do NCX e da CSQ em relação aos respectivos controles, na 30ª semana de obesidade ocorreu aumento dos níveis de SERCA, NCX e da CSQ em relação ao C₃₀. Entretanto, esta alteração no RNAm não foi acompanhada de alterações na expressão protéica de SERCA e CSQ em relação aos respectivos controles nos três momentos avaliados. A expressão protéica de NCX não será discutida devido à dificuldade na mensuração.

A atividade da SERCA é regulada pela PLB, que em seu estado desfosforilado, inibe a SERCA e consequentemente diminui a recaptura de íons Ca^{+2} para o retículo sarcoplasmático.⁽¹⁶²⁾ Enquanto os níveis de RNAm de PLB foram diminuídos após 15 semanas de obesidade em relação ao controle, na 30ª semana houve aumento do PLB entre os grupos. Em nosso estudo os níveis protéicos de PLB na obesidade não sofreram alterações

entre os grupos e ao longo do tempo. Entretanto, o fato da obesidade não promover alterações nos níveis protéicos de SERCA e PLB em relação ao grupo controle, não significaria que a recaptura dos íons Ca^{+2} para o retículo sarcoplasmático estaria normal. Neste sentido, foi necessário analisar a quantidade de PLB em seu estado fosforilado, na serina 16 (pPLB ser16), via adenosina monofosfato cíclico (AMPc), e na treonina 17 (pPLB thr17), via quinase dependente de cálcio, calmodulina quinase. A obesidade não promoveu alterações na expressão protéica de PLB thr17 e na razão PLB thr17/PLB em relação aos respectivos controles e ao longo do tempo. Entretanto, o principal achado deste estudo é que a obesidade, após 15 e 30 semanas, acarretou diminuição nos níveis de pPLB ser16. O tempo de exposição aumentou os níveis da pPLB ser16 no grupo Ob₄₅ em relação ao Ob₁₅ e Ob₃₀. Este resultado corrobora, parcialmente, com Relling *et al*⁽³⁹⁾ que utilizando ratos submetidos à dieta hiperlipídica, por 12 semanas, mostraram que a obesidade promoveu diminuição dos níveis de PLB fosforilado. A fosforilação da PLB na serina 16, via proteína quinase (PKA) dependente de AMPc devido à estimulação β -adrenérgica, aumenta o relaxamento cardíaco.⁽¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾ Segundo alguns pesquisadores, a interação das catecolaminas com o receptor adrenérgico, estimula os receptores β . A ocupação do receptor ativa a proteína G, que leva à dissociação de uma de suas subunidades, α , a qual interage de modo estimulatório com a enzima adenil ciclase (AC), que por sua vez converte adenosina trifosfato (ATP) em AMPc. Este liga-se à PKA, que acarreta fosforilação de diversas proteínas, promovendo aumento da liberação e recaptura do Ca^{+2} citosólico.^(166,167) De acordo com os resultados deste estudo, diminuição do pPLB ser16, podemos sugerir que, provavelmente, a obesidade acarretou prejuízo na via de sinalização adrenérgica cardíaca.

Figura 59. Resumo da cascata de ativação β-adrenérgica em cardiomiócitos. Adaptado de Bers DM 2001.⁽¹⁶⁸⁾

Corroborando com estes dados, diversos trabalhos têm frequentemente mostrado que o sistema β-adrenérgico está prejudicado na obesidade.^(169,170) Assim, pesquisadores, observaram que a resposta à estimulação β-adrenérgica e a afinidade aos receptores adrenérgicos estava diminuída em coelhos e ratos obesos, alimentados com dieta hiperlipídica por 12 e 30 semanas, respectivamente.^(169,170) Além disso, Hohl *et al*⁽¹⁷¹⁾ verificaram que a produção de AMPc estava prejudicada em ratos obesos. Dentro deste contexto, trabalhos futuros são necessários para avaliar a quantidade e atividade das proteínas responsáveis pela cascata de sinalização β-adrenérgica no miocárdio de ratos obesos. A normalização da pPLB ser16, na 45ª semana nos animais obesos, pode ser atribuída ao equilíbrio no processo de hipertrofia cardíaca nestes animais.

Como referido anteriormente na introdução, a literatura mostra escassez de estudos que avaliaram, em modelos experimentais, a relação entre a obesidade por dieta hiperlipídica, o RNAm e as proteínas envolvidas na homeostase intracelular de Ca^{+2} miocárdico. Os trabalhos encontrados são inconclusivos e realizados em curtos períodos de obesidade. Desta forma,

não encontramos dados na literatura que permitissem comparar e explicar os mecanismos responsáveis pelas alterações encontradas neste trabalho.

A análise dos dados da expressão de RNAm, referida anteriormente, mostra um aspecto interessante; o tempo de exposição à obesidade promoveu comportamento semelhante nos RNAm das proteínas envolvidas no trânsito de Ca^{+2} miocárdico. Como no processo de remodelação cardíaca diferentes estímulos externos, primeiro mensageiro, podem ativar diversos fatores transcricionais,⁽¹⁷²⁾ podemos inferir que o mesmo agente pode ter ativado diferentes fatores transcricionais, acarretando respostas similares de expressão gênica. A literatura relata que os hormônios tireoidianos podem atuar positivamente na expressão gênica da SERCA, RyR e CANAL L; e, negativamente, no PLB e NCX.⁽⁶¹⁾ Entretanto, a análise de correlação mostrou que não ocorreu associação significativa entre os níveis de T3 e o RNAm das proteínas do trânsito de Ca^{+2} . Desde que a obesidade está associada ao aumento de endotelina, angiotensina II, citocinas, entre outros,^(10,13-15) e estes atuam em diferentes fatores transcricionais, é provável que algum destes fatores possa estar envolvido nas alterações na expressão de RNAm das proteínas do trânsito de Ca^{+2} . Este fenômeno pode ser visualizado pela figura abaixo, que mostra uma interação entre os diversos fatores presentes ao longo do tempo de obesidade.

Figura 60. Fatores envolvidos na sinalização transcricional. Adaptado de Katz AM 2001.⁽¹⁷²⁾

A análise dos dados de RNAm e das proteínas, referida acima, mostra divergência de comportamento entre os níveis de RNAm e a expressão protéica. Enquanto os RNAm variaram na dependência do tratamento e tempo experimental, as proteínas mostraram comportamento igual entre os grupos e os momentos. Essa divergência, entre o RNAm e a proteína, pode ser atribuída ao processo de tradução celular. As proteínas são sintetizadas nos ribossomos a partir de sinalização molecular específica, o RNAm, transcrito diretamente da cadeia de ácido desoxirribonucléico (DNA).⁽¹⁷³⁾ O aumento dos níveis de um determinado RNAm não implica, necessariamente, na elevação da taxa protéica, pois, a eficiência do processo de tradução é regulada pela cauda Poli A do RNAm.^(173,174) O comprimento da cauda Poli A favorece o aumento da concentração local de ribossomos, o que facilita a maior

tradução de proteínas.⁽¹⁷⁴⁾ Portanto, as divergências entre as quantidades de RNAm e proteínas, nesse estudo, poderiam do comprimento da cauda Poli A. Além disso, a não manifestação da elevação protéica na obesidade pode ser atribuída ao discreto aumento no processo de hipertrofia cardíaca, que atingiu 19% no Ob₁₅ e 12% no Ob₃₀. Esse modesto remodelamento não implicaria em maior recrutamento dessas proteínas para a manutenção do desempenho cardíaco.

5- CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados obtidos neste trabalho, podemos apontar duas conclusões:

1. O tempo de exposição à obesidade promove diferentes respostas na expressão de RNAm e modifica apenas a proteína PLB fosforilada na serina 16. A diminuição na expressão de pPLB ser16 poderia sugerir que a obesidade altera a via de sinalização adrenérgica cardíaca.
2. Os níveis hormonais tireoidianos não influenciam a expressão gênica das proteínas do trânsito de Ca^{2+} miocárdico.

Trabalhos futuros são necessários para avaliar os mecanismos responsáveis pelas alterações na expressão gênica e na diminuição da fosforilação do PLB na serina 16 decorrentes da obesidade.

6- REFERÊNCIAS

1. Katch FI, Mcardle WD. Nutrição, Controle e Peso e Exercício. 3rd ed. Rio de Janeiro: Medsi, 1990.
2. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the Pathophysiology of Obesity-Associated Cardiovascular Disease. *Circulation* 2002;105(24):2923-8.
3. O' Brien PE, Dixon JB. The extent of the problem of obesity. *Am J Surg* 2002;184(6B):4S-8S.
4. Wong CY, O' Moore-Sullivan T, Leano R, Byrne N, Beller E, Marwick TH. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. *Circulation* 2004;110(19):3081-7.
5. World Health Organization. Obesity and Overweight. Geneva:WHO. [access 2009 Aug 20]. Available from: <http://www.who.int/en/>
6. BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2006.
7. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. São Paulo: Abeso. [acesso em 2009 Dez 02] Disponível em: <http://www.abeso.org.br>
8. Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2522-5.
9. Raman RP. Obesity and Healthy risks. *J Am Coll Nutr.* 2002;21(2):134S-9S.

10. Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(2):173-8.
11. Malnick SDH, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM*. 2006;99(9):565-79.
12. Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(5):968-76.
13. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine* 2006;29(1):81-90.
14. Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2548-56.
15. Mohamed-Ali V, Pinckney J, Coppack S. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1998;22(12):1145-58.
16. Iacobellis G, Ribaldo MC, Zappaterreno A, Iannucci CV, Di Mario U, Leonetti F. Adapted changes in left ventricular structure and function in severe uncomplicated obesity. *Obes Res*. 2004;12(10):1616-21.
17. Crisostomo LL, Araújo LMB, Câmara E, Carvalho C, Silva FA, Vieira M, et al. Comparison of left ventricular mass and function in obese versus nonobese women <40 years of age. *Am J Cardiol*. 1999;84(9):1127-9.
18. Koch R, Sharma AM. Obesity and cardiovascular hemodynamic function. *Curr Hypertens Rep*. 1999;(2):127-30.
19. Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in Obesity. *Physiol Rev*. 2008;88(2):389-419.

20. Peterson LR, Waggoner AD, Schechtman KB, Meyer T, Gropler RJ, Barzilai B, et al. Alterations in left ventricular structure and functions in young healthy obese women. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(8):1399-404.
21. Alpert MA. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci*. 2001;321(4):225-36.
22. Morricone L, Malavazos AE, Coman C, Donati C, Hassan T, Caviezel F. Echocardiographic abnormalities in normotensive obese patients: relationship with visceral fat. *Obes Res*. 2002;10(6):489-98.
23. Berkalp B, Cesur V, Corapcioglu D, Erol C, Baskal N. Obesity and left ventricular diastolic dysfunction. *Int J Cardiol*. 1995;52(1):23-6.
24. Wong CY, O'Moore-Sullivan T, Leano R, Hukins C, Jenkins C, Marwick TH. Association of subclinical right ventricular dysfunction with obesity. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(3):611-6.
25. Alaud-din A, Meterissian S, Lisbona R, MacLean LD, Forse RA. Assessment of cardiac function in patients who were morbidly obese. *Surgery* 1990;108(4):809-18.
26. Pascual M, Pascual DA, Soria F, Vicente T, Hernández AM, Tébar FJ, et al. Effects of isolated obesity on systolic and diastolic left ventricular function. *Heart* 2003;89(10):1152-56.
27. Iacobellis G, Leonetti F. Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(11):6300-2.
28. Buchanan J, Mazumder PK, Hu P, Chakrabarti G, Roberts MW, Yun UJ, et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 2005;146(12):5341-9.

29. Christoffersen C, Bollano E, Lindegaard MLS, Bartels ED, Goetze JP, Andersen CB, et al. Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 2003;144(8):3483-90.
30. Dong F, Zhang X, Yang X, Esberg LB, Yang H, Zhang Z, et al. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient ob/ob obese mice. *J Endocrinol.* 2006;188(1):25-36.
31. Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia* 2006;49(6):1434-46.
32. Paradise NF, Pilati CF, Payne WR, Finkelstein JA. Left ventricular function of the isolated, genetically obese rat's heart. *Am J Physiol.* 1985;248(4 Pt 2):H438-44.
33. Ren J, Walsh MF, Jefferson L, Natavio M, Ilg KJ, Sowers JR, et al. Basal and ethanol-induced cardiac contractile response in lean and obese Zucker rat hearts. *J Biomed Sci.* 2000;7(5):390-400.
34. 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 rats heart. *Diabetes* 2002;51(8):2587-95.
35. Conti M, Renaud IM, Poirier B, Michel O, Belair M-F, Mandet C, et al. High levels of myocardial antioxidant defense in aging nondiabetic normotensive Zucker obese rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;286(4):R793-800.
36. Pawloski CM, Kanagy NL, Mortensen LH, Fink GD. Obese Zucker rats are normotensive on normal and increased sodium intake. *Hypertension* 1992;19(1):I90-5.
37. 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.

38. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension* 2006;48(1):65-72.
39. Relling DP, Esberg LB, Frang 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.
40. 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.
41. Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Martinez PF, Luvizotto RAM, et al. Cardiac remodeling in rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol.*, *in press*.
42. 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.
43. Opie LH. Myocardial contraction and relaxation. In: Opie LH. *The Heart. Physiology from cell to circulation*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.209-31.
44. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002;415(6868):198-205.
45. Fabiato A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983;245(1):C1-14.
46. Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2005;68(3):366-75.
47. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol*. 1994;476(2):279-93.

48. Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem.* 2007;45:523-37.
49. Kiss E, Ball NA, Kranias EG, Walsh RA. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular $\text{Ca}^{(2+)}$ ATPase protein levels. Effects on Ca^{2+} transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res.* 1995;77(4):759-64.
50. Tsutsui H, Ishibashi Y, Imanaka-Yoshida K, Yamamoto S, Yoshida T, Sugimachi M, et al. Alterations in sarcoplasmic reticulum calcium-storing proteins in pressure-overload cardiac hypertrophy. *Am J Physiol.* 1997;272(1 Pt 2):H168-75.
51. He HB, Yu F, Dai DZ, Dai Y. Down-regulation of FKBP12.6 and SERCA2a contributes to acute heart failure in septic shock and is related to an up-regulated endothelin signalling pathway. *J Pharm Pharmacol.* 2007;59(7):977-84.
52. Jiang MT, Lokuta AJ, Farrell EF, Wolff MR, Haworth RA, Valdivia HH. Abnormal Ca^{2+} release, but normal ryanodine receptors, in canine and human heart failure. *Circ Res.* 2002;91(11):1015-22.
53. Ito K, Yan X, Feng X, Manning WJ, Dillmann WH, Lorell BH. Transgenic expression of sarcoplasmic reticulum $\text{Ca}^{(2+)}$ atpase modifies the transition from hypertrophy to early heart failure. *Circ Res.* 2001;89(5):422-9.
54. Ito K, Yan X, Tajima M, Su Z, Barry WH, Lorell BH. Contractile reserve and intracellular calcium regulation in mouse myocytes from normal and hypertrophied failing hearts. *Circ Res.* 2000;87(7):588-95.
55. Kuo TH, Tsang W, Wang KK, Carlock L. Simultaneous reduction of the sarcolemmal and SR calcium ATPase activities and gene expression in cardiomyopathic hamster. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1138(4):343-9.

56. Dincer UD, Araiza A, Knudson JD, Shao CH, Bidasee KR, Tune JD. Dysfunction of cardiac ryanodine receptors in the metabolic syndrome. *J Moll Cell Cardiol.* 2006;41(1):108-14.
57. Philip-Couderc P, Smih F, Hall JE, Pathak A, Roncalli J, Harmancey R, et al. Kinetic analysis of cardiac transcriptome regulation during chronic high-fat diet in dogs. *Physiol Genomics.* 2004;19(1):32-40.
58. Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, et al. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca^{2+} handling. *Braz J Med Biol Res.* 2008;41(7):615-20.
59. Dillmann WH. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid* 2002;12(6):447-52.
60. Dillmann WH, Gloss BR. The role of thyroid hormone receptors in the heart. *Methods Mol Biol.* 2002;202:55-70.
61. Carr AN, Kranias EG. Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid* 2002;12(6):453-7.
62. Nunes MT. Hormônios tireoidianos: Mecanismo de ação e importância biológica. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003;47(6):639-43.
63. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev.* 2005;26(5):704-28.
64. Reinehr T, de Sousa G, Andler W. Hyperthyrotropinemia in obese children is reversible after weight loss and is not related to lipids. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3088-91.
65. Tagliaferri M, Berselli ME, Calo G, Minocci A, Savia G, Petroni ML, et al. Subclinical hypothyroidism in obese patients: relation to resting energy expenditure, serum leptin, body composition, and lipid profile. *Obes Res.* 2001;9(3):196-201.

66. Chomard P, Vernhes G, Autissier N, Debry G. Serum concentrations of total T4, T3, reverse T3 and free T4, T3 in moderately obese patients. *Hum Nutr Clin Nutr.* 1985;39(5):371-8.
67. Matzen LE, Kvetny J, Pedersen KK. TSH, thyroid hormones and nuclearbinding of T3 in mononuclear blood cells from obese and non-obese women. *Scand J Clin Lab Invest.* 1989;49(3):249-53.
68. Duntas L, Hauner H, Rosenthal J, Pfeiffer EF. Thyrotropin releasing hormone (TRH) immunoreactivity and thyroid function in obesity. *Int J Obes.* 1991;15(1):83-7.
69. Naslund E, Andersson I, Degerblad M, Kogner P, Kral JG, Rossner S, et al. Associations of leptin, insulin resistance and thyroid function with long-term weight loss in dieting obese men. *J Intern Med.* 2000;248(4):299-308.
70. Iacobellis G, Ribaudo MC, Zappaterreno A, Iannucci CV, Leonetti F. Relationship of thyroid function with body mass index, leptin, insulin sensitivity and adiponectin in euthyroid obese women. *Clin Endocrinol.* 2005;62(4):487-91.
71. Must A, Jacques PF, Dallal GE, Bajema CJ, Dietz WH. Long-term morbidity and mortality of overweight adolescents: a follow-up of the Harvard Growth Study 1922 to 1935. *N Engl J Med.* 1992;327(19):1350-5.
72. Srinivasan SR, Bao W, Wattigney WA, Berenson GS. Adolescent overweights associated with adult overweight and related multiple cardiovascular risk factors: The Bogalusa Study. *Metabolism* 1996;45(2):235-40.
73. Scaglione R, Dichiara MA, Indovina A, Lipari R, Ganguzza A, Parrinello G, et al. Left ventricular diastolic and systolic function in normotensive obese subjects: influence of degree and duration of obesity. *Eur Heart J.* 1992;13(6):738-42.
74. Committee on Care and Use of Laboratory Animals. *Guide for the care and use of laboratory animals.* Bethesda: National Institute of Health; 1985.

75. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira CR, et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2008;52(6):968-74.
76. Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 1996;34(3):389-98.
77. Johnson MM, Peters JP. Technical note: an improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma. *J Anim Sci*. 1993;71(3):753-6.
78. Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nogueira CR, Novelli EL, et al. Misclassification probability as obese or lean in hypercaloric and normocaloric diet. *Biol Res*. 2008;41(3):253-9.
79. 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.
80. 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.
81. 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.
82. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes*. 2005;29(11):1368-78.
83. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio DA, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003;133(4):1081-7.
84. Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*. 2009;52(6):1133-42.

85. Boustany CM, Bharadwaj K, Daugherty A, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(4):R943-9.
86. Smith AD, Brands MW, Wang MH, Dorrance AM. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Exp Biol Med*. 2006;231(3):282-7.
87. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985;28(7):412-9.
88. Naderali EK, Brown MJ, Pickavance LC, Wilding JP, Doyle PJ, Williams G. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. *Clin Sci*. 2001;101(5):499-506.
89. Matsubara LS, Matsubara BB, Okoshi MP, Cicogna AC, Janicki JS. Alterations in myocardial collagen content affect rat papillary muscle function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279(4):H1534-9.
90. Schwint OA, Labraga M, Cervino CO, Haffar M, Sequeiros PH, Marcos HJ. A modification of the staining technique of reticular fibres for image analysis of the cardiac collagen network. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13(4):213-20.
91. Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*. 2003;4(11):1120-8.
92. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005;29(3):151-9.
93. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-9.

94. Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca^{2+} handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics*. 2007;29(3):246-52.
95. De Tomasi LC, Bruno A, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Júnior SA, et al. Food restriction promotes downregulation of myocardial L-type Ca^{2+} channels. *Can J Physiol Pharmacol*. 2009;87(6):426-31.
96. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
97. Halpern A, Mancini MC. O tratamento da obesidade no paciente portador de hipertensão arterial. *Rev Bras Hipertens*. 2000;2:166-71.
98. Bayley BJR. Tables of the Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc*. 1977; 72:469-78.
99. Boustany CM, Brown DR, Randall DC, Cassis LA. AT_1 -receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;289(1):R181-6.
100. Levin BE, Triscari J, Sullivan AC. Altered sympathetic activity during development of diet-induced obesity in rat. *Am J Physiol*. 1983;244(3):R347-55.
101. Ghibaudi L, Cook J, Farley C, van Heek M, Hwa JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. *Obes Res*. 2002; 10(9):956-63.
102. 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.

103. 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.
104. da Silva AA, Kuo JJ, Tallam LS, Hall JE. Role of endothelin-1 in blood pressure regulation in a rat model of visceral obesity and hypertension. *Hypertension* 2004;43(2):383-7.
105. Astrup A, Buemann B, Western P, Toubro S, Raben A, Christensen NJ. Obesity as an adaptation to a high-fat diet: evidence from a cross-sectional study. *Am J Clin Nutr.* 1994;59(2):350-5.
106. Borst SE, Conover CF. High-fat induces increased tissue expression of TNF- α . *Life Sci.* 2005; 77(17):2156-65.
107. Flatt JP. Dietary fat, carbohydrate balance, and weight maintenance: effects of exercise. *Am J Clin Nutr.* 1987;45(1):296-306.
108. Flatt JP. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr.* 1995;61(4):952S-9S.
109. Tentolouris N, Pavlatos S, Kokkinos A, Perrea D, Pagoni S, Katsilambros N. Diet-induced thermogenesis and substrate oxidation are not different between lean and obese women after two different isocaloric meals, one rich in protein and one rich in fat. *Metabolism.* 2008;57(3):313-20.
110. Schrauwen P, Westerterp KR. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. *Br J Nutr.* 2000;84(4):417-27.
111. Passadore MD, Griggio MA, Nunes MT, Luz J. Effects of ageing on the energy balance of food-restricted rats. *Acta Physiol Scand.* 2004;181(2):193-8.

112. Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab.* 2004; 6:120-126.
113. Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Li K. High-fat- and Lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasm resistin and adiponectin levels. *Ann Nutr Metab* 2006; 50:499-505.
114. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2004; 53: S215-S219.
115. Haber EP, Curi R, Carvalho CRO, Carpinelli AR. Secreção de insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2001;45(3):219-27.
116. Pessin JE, Saltiel AR. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest.* 2000;106(2):165-9.
117. Jellinger PS. Metabolic consequences of hyperglycemia and insulin resistance. *Clin Cornerstone.* 2007;8(7):S30-42.
118. DeFronzo RA, Ferrannini E. Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDDM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 1991;14(3):173-94.
119. Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action--implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med.* 1999;341(4):248-57.
120. Klip A, Tsakiridis T, Marette A, Ortiz PA. Regulation of expression of glucose transporters by glucose: a review of studies in vivo and in cell cultures. *FASEB J.* 1994;8(1):43-53.

121. Carvalheira JBC, Zecchin HG, Saad MJA. Vias de sinalização da insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2002;46(4):419-25.
122. Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: cardiovascular consequences. *Circ Res.* 2007;101(6):545-59.
123. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, et al. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med.* 1995;1(11):1155-61.
124. Sahu A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. *Endocrinology* 2004;145(6):2613-20.
125. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burn P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest.* 1996;98(5):1101-6.
126. Burguera B, Couce ME, Long J, Lamsam J, Laakso K, Jensen MD, Parisi JE, Lloyd RV. The long form of the leptin receptor (OB-Rb) is widely expressed in the human brain. *Neuroendocrinology* 2000;71(3):187-95.
127. Reilly MP, Rader DJ. The metabolic syndrome: more than the sum of its parts? *Circulation.* 2003;108(13):1546-51.
128. Moller DE, Kaufman KD. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. *Annu Rev Med.* 2005;56:45-62.
129. Stark AH, Timar B, Madar Z. Adaptation of Sprague Dawley rats to long-term feeding of high fat or high fructose diets. *Eur J Nutr.* 2000;39(5):229-34.
130. Schaalán M, El-Abhar HS, Barakat M, El-Denshary ES. Westernized-like-diet-fed rats: effect on glucose homeostasis, lipid profile, and adipocyte hormones and their modulation by rosiglitazone and glimepiride. *J Diabetes Complications* 2009;23(3):199-208.

131. Ceddia RB. Direct metabolic regulation in skeletal muscle and fat tissue by leptin: implications for glucose and fatty acids homeostasis. *Int J Obes*. 2005;29(10):1175-83.
132. Ceddia RB, William WN Jr, Curi R. The response of skeletal muscle to leptin. *Front Biosci*. 2001;6:D90-7.
133. Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ. Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature* 1997;389(6649):374-7.
134. Shimabukuro M, Koyama K, Chen G, Wang MY, Trieu F, Lee Y, et al. Direct antidiabetic effect of leptin through triglyceride depletion of tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(9):4637-41.
135. Djoussé L, Pankow JS, Eckfeldt JH, Folsom AR, Hopkins PN, Province MA, et al. Relation between dietary linolenic acid and coronary artery disease in the National Heart, Lung, and Blood Institute Family Heart Study. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(5):612-9.
136. Dewailly EE, Blanchet C, Gingras S, Lemieux S, Sauvé L, Bergeron J, et al. Relations between n-3 fatty acid status and cardiovascular disease risk factors among Quebecers. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(5):603-11.
137. Santos TM. Lipídios. In: Dutra-de Oliveira JE, Marchini JS. *Ciências nutricionais*. São Paulo: Sarvier; 1998. p. 87-97.
138. Schaefer EJ. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am J Clin Nutr*. 2002;75(2):191-212.
139. Mustad VA, Etherton TD, Cooper AD, Mastro AM, Pearson TA, Jonnalagadda SS, et al. Reducing saturated fat intake is associated with increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women. *J Lipid Res*. 1997;38(3):459-68.
140. Mahan LK, Escott-Stump S. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9ª ed. São Paulo: Roca; 1998.

141. Holmes JH, Lambourne LJ. The relation between plasma free fatty acid concentration and the digestible energy intake of cattle. *Res Vet Sci.* 1970;11(1):27-36.
142. Birnbaum MJ. Lipolysis: more than just a lipase. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1011-2.
143. Wilson CR, Tran MK, Salazar KL, Young ME, Taegtmeyer H. Western diet, but not high fat diet, causes derangements of fatty acid metabolism and contractile dysfunction in the heart of Wistar rats. *Biochem J.* 2007;406(3):457-67.
144. Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol.* 2009. *in press*
145. Ruscica M, Dozio E, Gandini S, Gnocchi P, Devalle GG, Motta M, et al. Total, free and bound leptin and thyroid function in elderly women with different body weights. *Clin Endocrinol.* 2008;68(6):1002-8.
146. Feldt-Rasmussen U. Thyroid and leptin. *Thyroid* 2007;17(5):413-9.
147. Lu MC, Tzang BS, Kuo WW, Wu FL, Chen YS, Tsai CH, et al. More activated cardiac mitochondrial-dependent apoptotic pathway in obese Zucker rats. *Obesity* 2007;15(11):2634-42.
148. Yin FC, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol.* 1982;243(6):H941-7.
149. Rider OJ, Francis JM, Ali MK, Byrne J, Clarke K, Neubauer S, et al. Determinants of left ventricular mass in obesity; a cardiovascular magnetic resonance study. *J Cardiovasc Magn Reson.* 2009;11(1):9.
150. Murad N, Franco MF, Tucci PJF. Caracterização funcional da hipertrofia miocárdica induzida pelo isoproterenol e de sua regressão. *Arq Bras Cardiol.* 2001;77(1):51-8.

151. Skurk C, Izumiya Y, Maatz H, Razeghi P, Shiojima I, Sandri M, et al. The FOXO3a transcription factor regulates cardiac myocyte size downstream of AKT signaling. *J Biol Chem*. 2005;280(21):20814-23.
152. Iacobellis G, Ribaudo MC, Leto G, Zappaterreno A, Vecci E, Di Mario U, et al. Influence of excess fat on cardiac morphology and function: study in uncomplicated obesity. *Obes Res*. 2002;10(8):767-73.
153. Alpert MA, Lambert CR, Panayiotou H, Terry BE, Cohen MV, Massey CV, et al. Relation of duration of morbid obesity to left ventricular mass, systolic function, and diastolic filling, and effect of weight loss. *Am J Cardiol*. 1995;76(16):1194-7.
154. Okoshi K, Ribeiro HB, Okoshi MP, Matsubara BB, Gonçalves G, Barros R, et al. Improved systolic ventricular function with normal myocardial mechanics in compensated cardiac hypertrophy. *Jpn Heart J*. 2004;45(4):647-56.
155. Cicogna AC, Okoshi MP, Okoshi K. História natural da remodelação miocárdica: da agressão aos sintomas. *Rev Soc Cardiol. Estado de São Paulo* 2000;10:8-16.
156. Brownsey RW, Boone AN, Allard MF. Actions of insulin on the mammalian heart: metabolism, pathology and biochemical mechanisms. *Cardiovasc Res*. 1997;34(1):3-24.
157. McNulty PH, Jacob R, Deckelbaum LI, Young LH. Effect of hyperinsulinemia on myocardial aminoacid uptake in patients with coronary artery disease. *Metabolism*. 2000;49(10):1365-9.
158. Young LH, Dahl DM, Rauner D, Barrett EJ. Physiological hyperinsulinemia inhibits myocardial protein degradation in vivo in the canine heart. *Circ Res*. 1992;71(2):393-400.
159. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):403-13.

160. Kemi OJ, Ceci M, Wisloff U, Grimaldi S, Gallo P, Smith GL, et al. Activation or inactivation of cardiac Akt/mTOR signaling diverges physiological from pathological hypertrophy. *J Cell Physiol*. 2008;214(2):316-21.
161. Garcia JAD, Incerpi EK. Fatores e mecanismos envolvidos na hipertrofia ventricular esquerda e o papel anti-hipertrófico do óxido nítrico. *Arq Bras Cardiol*. 2008;90(6):443-50.
162. Watanabe A, Arai M, Yamazaki M, Koitabashi N, Wuytack F, Kurabayashi M. Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca^{2+} uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Cardiol*. 2004;37(3):691-8.
163. Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM. β -adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem*. 1983;258(1):464-71.
164. Lindemann JP, Watanabe AM. Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca^{2+} calmodulin-dependent mechanisms. *J Biol Chem*. 1985;260(7):4516-25.
165. Vittone L, Mundiña C, Chiappe de Cingolani G, Mattiazzi A. cAMP and calcium-dependent mechanisms of phospholamban phosphorylation in intact hearts. *Am J Physiol*. 1990;258(2):H318-25.
166. Zornoff LAM, Paiva SAR, Duarte DR, Spadaro J. Remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio: conceitos e implicações clínicas. *Arq Bras Cardiol*. 2009;92(2):157-64.
167. Brodde OE, Michel MC. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev*. 1999;51(4):651-90.
168. Bers DM. Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 2001.

169. Cabrol P, Galinier M, Fourcade J, Verwaerde P, Massabau P, Tran MA, et al. Functional decoupling of left ventricular beta-adrenoceptor in a canine model of obesity-hypertension. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 1998;91(8):1021-4.
170. 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.
171. Hohl CM, Hu B, Fertel RH, Russell JC, McCune SA, Altschuld RA. Effects of obesity and hypertension on ventricular myocytes: comparison of cells from adult SHHF/Mcc-*cp* and JCR:LA-*cp* rats. *Cardiovasc Res.* 1993;27(2):238-42.
172. Katz AM. Heart Failure. In: Katz AM. *Physiology of the heart.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p.546-581.
173. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. How cells read the genome: from DNA to protein. In: Alberts B. *Molecular biology of the cell.* 4th ed. New York:Garland;2002.p.299-374.
174. Seraphim PM, Nunes MT, Giannocco G, Machado UF. Age related obesity-induced shortening of GLUT4 mRNA poly(A) tail length in rat gastrocnemius skeletal muscle. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;276(1-2):80-7.

7. ANEXOS

7.1- Perfil das rações

Os perfis de aminoácidos, carboidratos e ácidos graxos, avaliados no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas do Departamento de Tecnologia - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil, estão apresentados nos Quadros 3, 4 e 5, respectivamente.

Quadro 3- Perfil de aminoácidos das rações (%)

Aminoácidos	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Ácido Aspártico	10,81	9,92
Ácido Glutâmico	20,12	18,99
Serina	5,23	5,06
Glicina	4,48	4,32
Histidina	2,50	2,43
Arginina	7,47	7,07
Treonina	3,38	4,01
Alanina	4,53	4,69
Prolina	5,93	5,80
Tirosina	3,34	3,48
Valina	5,05	5,33
Metionina	1,89	2,43
Cistina	1,63	1,85
Isoleucina	4,22	4,38
Leucina	7,78	7,96
Fenilalanina	5,01	5,01
Lisina	5,62	6,59
Triptofano	1,01	0,68

Quadro 4- Perfil de carboidratos das rações (%)

Carboidratos	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Raffinose	1,74	0,81
Maltose	1,07	1,60
Glicose Livre	0,82	1,63
Glicose	46,58	42,37
Frutose Livre	0,62	0,96
Frutose	20,93	16,46
Sacarose	8,83	11,57
Lactose	0,65	4,48
Fucose	0,17	0,15
Arabinose	5,55	6,78
Galactose	4,55	6,08
Xilose	5,47	4,27
Rhamnose	0,22	0,26
Manose	2,80	2,58

Quadro 5- Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%)

Ácidos graxos	Rações	
	Padrão	Hiperlipídica
Capróico (c6:0)	0,00	0,02
Caprílico (c8:0)	0,03	0,03
Cáprico (c10:0)	0,02	0,05
Láurico (c12:0)	0,33	0,25
Mirístico (c14:0)	0,30	0,33
Palmítico (c16:0)	16,56	15,09
Heptadecanóico (c17:0)	0,02	0,08
Estearico (c18:0)	3,90	4,36
Palmitoléico (c16:1)	0,06	0,15
Oléico (c18:1n9c)	27,96	37,94
Linoléico (c18:2n6c)	47,10	40,83
α-Linolênico (c18:3n3c)	3,72	0,87
Ácidos Graxos Saturados (%)	21,16	20,21
Ácidos Graxos Insaturados (%)	78,84	79,79

7.2- Curvas das dosagens dos hormônios tireoidianos

Dosagens realizadas pela empresa Genese Produtos Diagnósticos (São Paulo, SP, Brasil) com a tecnologia Luminex Corporation's xMAP™, por reação de imunoensaio multiplex, Lincoplex kits (Linco Research Inc, St. Louis, MO, USA).

7.2.1- Curva da dosagem de T3

Test Name: T3

Formula: $y = 6.50E+02 + (1.06E+04 / (1 + ((x / 2.96E+04)^{1.57E+00}))^{1.95E+01})$

Curve Data:

Coeff1 = 650.257425549637

Coeff2 = 10638.3697076286

Coeff3 = 29594.4228984533

Coeff4 = 1.57496590134791

Coeff5 = 19.4630782293911

7.2.2- Curva da dosagem de T4

Test Name: T4

Formula: $y = 2.22E+02 + (1.34E+04 / (1 + ((x / 2.77E+05)^{1.40E+00}))^{1.11E+01})$

Curve Data:

Coeff1 = 222.377743984198

Coeff2 = 13421.425375908

Coeff3 = 277225.80836656

Coeff4 = 1.40385159717857

Coeff5 = 11.0715412720862

7.2.3- Curva da dosagem de TSH

Test Name: TSH

Formula: $y = -3.50E+01 + (1.62E+04 / (1 + ((x / 1.32E+04)^{1.10E+00}))^{8.33E-01})$

Curve Data:

Coeff1 = -34.9653387285764

Coeff2 = 16172.9285583561

Coeff3 = 13180.4706361975

Coeff4 = -1.09549804233683

Coeff5 = 0.832610887363898

7.3- Amplificação de PCR em tempo real

7.3.1- Curvas de amplificação dos grupos controle e obeso 15 semanas

SERCA

RyR

Canal L

NCX

PLB

CSQ

β-actina

7.3.2- Curvas de amplificação dos grupos controle e obeso 30 semanas

SERCA **RyR** **Canal L** **NCX** **PLB** **CSQ** **β -actina**

7.3.3- Curvas de amplificação dos grupos controle e obeso 45 semanas

SERCA **RyR** **Canal L** **NCX** **PLB** **CSQ** **β-actina**

7.4- Dificuldades na técnica de Western Blot

7.4.1- RyR e pRyR

Apesar de todas as tentativas de padronização, verificamos que a qualidade dos blots não foram satisfatórios, o que impediu a quantificação das proteínas RyR e pRyR. Com a finalidade de identificar o(s) fator(es) responsável(eis) pela falta de qualidade dos blots foram realizados diversos experimentos, alterando-se a extração e concentração protéica, concentração do gel, diluição dos anticorpos e os tempos de corrida e transferência. As figuras abaixo ilustram as tentativas para a quantificação dessas proteínas. Apesar das diversas mudanças metodológicas, os blots não apresentaram a qualidade esperada.

RyR

Gel de poliacrilamida: 6,5%

Corrida: 4h

Transferência: úmida – 6h (troca do tampão após 3h)

Bloqueio: ON

Diluição anticorpo: 1:4000 (1% leite)

RyR

Gel de poliacrilamida: 6% com glicerol

Corrida: 9h

Transferência: úmida – 8h (troca do tampão após 4h)

Bloqueio: ON

Diluição anticorpo: 1:4000 (1% leite)

RyR

Gel de poliacrilamida: 6% com glicerol

Corrida: 9h

Transferência: úmida – 8h (troca do tampão após 4h)

Bloqueio: ON

Diluição anticorpo: 1:1000 (3% leite)

pRyR

Gel de poliacrilamida: 6,5%

Corrida: 4h

Transferência: úmida – 8h (troca do tampão após 4h)

Bloqueio: ON

Diluição anticorpo: 1:4000 (3% leite)

pRyR

Gel de poliacrilamida: 6%

Corrida: 6h

Transferência: úmida – 8h (troca do tampão após 4h)

Bloqueio: ON

Diluição anticorpo: 1:4000 (3% leite)

pRyR

Gel de poliacrilamida: 6% com glicerol

Corrida: 6h

Transferência: úmida – 8h (troca do tampão após 4h)

Bloqueio: ON

Diluição anticorpo: 1:5000 (1% leite)

7.4.2- NCX

A expressão de NCX também não apresentou a qualidade esperada, apesar de todas as alterações metodológicas. A literatura mostra que a quantificação protéica de NCX, geralmente, é realizada em 120kDa; além disso, algumas pesquisas mostram que a expressão de NCX apresenta duas isoformas, 120kDa e 70kDa. Os blots de NCX, visualizados neste estudo, apresentaram qualidade suficiente para quantificação; entretanto, esses blots sempre encontravam-se na altura de 70kDa. Uma vez que, os blots visualizados em 120 kDa nunca apresentaram boa qualidade, optamos pela não quantificação de NCX. As figuras abaixo ilustram os blots de NCX.

NCX

gel de poliacrilamida: 8% com glicerol

Corrida: 2h30

Transferência: úmida – 1h30

Bloqueio: 2h

anticorpo primário: 1:4000 (leite 3%)

NCX

gel de poliacrilamida: 10%

Corrida: 2h

Transferência: úmida – 1h30

Bloqueio: 2h

anticorpo primário: 1:4000 (leite 3%)

NCX

gel de poliacrilamida: 10% com glicerol

Corrida: 2h

Transferência: úmida – 1h30

Bloqueio: 2h

anticorpo primário: 1:2000 (leite 3%)