

## A Obesidade Preserva a Função do Miocárdio Durante o Bloqueio da Via Glicolítica

*Obesity Preserves Myocardial Function During Blockade of the Glycolytic Pathway*

Dijon Henrique Salomé de Campos<sup>1</sup>, André Soares Leopoldo<sup>2</sup>, Ana Paula Lima-Leopoldo<sup>2</sup>, André Ferreira do Nascimento<sup>3</sup>, Silvio Assis de Oliveira-Junior<sup>4</sup>, Danielle Cristina Tomaz da Silva<sup>1</sup>, Mario Mateus Sugizaki<sup>3</sup>, Carlos Roberto Padovani<sup>5</sup>, Antonio Carlos Cicogna<sup>1</sup>

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

### Resumo

**Fundamento:** A obesidade é definida por um acúmulo excessivo do tecido adiposo em relação a massa magra tecidual. Estudos realizados nos últimos anos sugerem que a função cardíaca em animais obesos pode se encontrar preservada, aumentada ou reduzida.

**Objetivo:** Estudar o balanço energético do miocárdio com a hipótese de que o aumento na oxidação de ácidos graxos e redução de glicose levam à disfunção cardíaca na obesidade.

**Métodos:** Ratos Wistar machos com 30 dias de idade foram alimentados com uma dieta padrão ou hipercalórica durante 30 semanas. A função e morfologia cardíacas foram analisadas. Neste trabalho foram estudadas as características gerais e comorbidades associadas com a obesidade. A estrutura cardíaca foi determinada pelo peso do coração e do ventrículo esquerdo (VE). A função do miocárdio foi avaliada pela análise de músculos papilares isolados do VE, na condição basal e depois de manobras inotrópicas e lusitrópicas: rigidez do miocárdio, contração pós-pausa, aumento da concentração extracelular de Ca<sup>2+</sup>, mudança na frequência de estímulos e inibição da via glicolítica.

**Resultados:** Os ratos obesos tiveram um aumento de tecido adiposo e comorbidades associadas à obesidade em relação aos ratos do grupo controle. A análise funcional após o bloqueio pelo iodoacetato não mostrou diferença na regressão linear da tensão desenvolvida (TD), entretanto, a tensão de repouso (TR) apresentou uma diferença estatística significativa entre o grupo controle e o grupo obeso, mais notadamente na inclinação da curva no grupo C.

**Conclusão:** O desequilíbrio energético na obesidade não promoveu disfunção cardíaca. Pelo contrário, a priorização na utilização de ácidos graxos promoveu uma proteção do músculo cardíaco durante a inibição da glicólise, sugerindo que esta via é menos utilizada pelo músculo cardíaco obeso. (Arq Bras Cardiol. 2014; 103(4):330-337)

**Palavras-chave:** Obesidade; Ratos; Miocárdio; Metabolismo; Ácidos Graxos.

### Abstract

**Background:** Obesity is defined by excessive accumulation of body fat relative to lean tissue. Studies during the last few years indicate that cardiac function in obese animals may be preserved, increased or diminished.

**Objective:** Study the energy balance of the myocardium with the hypothesis that the increase in fatty acid oxidation and reduced glucose leads to cardiac dysfunction in obesity.

**Methods:** 30-day-old male Wistar rats were fed standard and hypercaloric diet for 30 weeks. Cardiac function and morphology were assessed. In this paper was viewed the general characteristics and comorbidities associated to obesity. The structure cardiac was determined by weights of the heart and left ventricle (LV). Myocardial function was evaluated by studying isolated papillary muscles from the LV, under the baseline condition and after inotropic and lusitropic maneuvers: myocardial stiffness; postrest contraction; increase in extracellular Ca<sup>2+</sup> concentration; change in heart rate and inhibitor of glycolytic pathway.

**Results:** Compared with control group, the obese rats had increased body fat and co-morbidities associated with obesity. Functional assessment after blocking iodoacetate shows no difference in the linear regression of DT, however, the RT showed a statistically significant difference in behavior between the control and the obese group, most notable being the slope in group C.

**Conclusion:** The energy imbalance on obesity did not cause cardiac dysfunction. On the contrary, the prioritization of fatty acids utilization provides protection to cardiac muscle during the inhibition of glycolysis, suggesting that this pathway is fewer used by obese cardiac muscle. (Arq Bras Cardiol. 2014; 103(4):330-337)

**Keywords:** Obesity; Rats; Myocardial; Metabolism; Fatty Acid.

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

Correspondência: Antonio Carlos Cicogna/ Dijon HS Campos •

Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (UNESP); Rubião Júnior, S/N, CEP 18618-000, Botucatu, SP - Brasil.

E-mail: [dijoncampos@gmail.com](mailto:dijoncampos@gmail.com)

Artigo recebido em 06/12/13; revisado em 14/03/14; aceito em 19/05/14.

DOI: 10.5935/abc.20140135

## Introdução

A obesidade é uma doença metabólica crônica definida por um acúmulo excessivo de tecido adiposo em relação a massa magra tecidual<sup>1</sup>. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos vão estar com sobrepeso e destes, pelo menos 700 milhões serão considerados obesos (Índice de Massa Corporal [IMC] > 30 kg/m<sup>2</sup>)<sup>1</sup>. A maior disponibilidade e consumo de dietas altamente energéticas e palatáveis tem acarretado elevação do peso corporal na população<sup>2-4</sup>. Desta forma, obesidade induzida por dieta é o modelo mais apropriado para estudar as consequências dessa patologia<sup>2-4</sup>.

A obesidade está associada ao aumento da mortalidade, redução da expectativa de vida<sup>5,6</sup> e doenças cardiovasculares<sup>7,8</sup>. Estudos clínicos mostram que a obesidade promove redução da função cardíaca e os mecanismos patofisiológicos responsáveis por essa alteração não são completamente esclarecidos<sup>9</sup>. Em condições aeróbicas normais, aproximadamente 70% da energia produzida pelo miocárdio deriva do metabolismo de ácidos graxos e 30% é derivada da via glicolítica<sup>10-13</sup>. Na obesidade, o aumento na captação e oxidação de ácidos graxos está associado ao decréscimo na utilização de glicose pelo miocárdio<sup>2,12,14-16</sup>. Estas alterações dos substratos energéticos podem ser responsáveis pela disfunção cardíaca observada em indivíduos obesos<sup>2,9,17-21</sup>. Em camundongos obesos e diabéticos db/db, a normalização do metabolismo energético com o aumento na utilização de glicose revertem a disfunção contrátil cardíaca<sup>20,21</sup>. Estes achados corroboram trabalhos que sugerem que o ATP gerado pela oxidação da glicose é utilizado preferencialmente pela bomba de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) do retículo sarcoplasmático (SERCA2)<sup>12,13,22-24</sup>, proteína responsável pela recaptação do cálcio citosólico. Este trabalho objetivou estudar o balanço energético do miocárdio com a hipótese de que o aumento na oxidação de ácidos graxos e redução na oxidação de glicose levam à disfunção cardíaca resultante de um déficit de ATP para a SERCA2. Esta premissa foi testada com a inibição da via da glicólise através da administração de iodoacetato (AIA) no miocárdio, droga que inibe a atividade da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase<sup>25</sup>. A inibição da glicólise aumenta a disfunção cardíaca de camundongos obesos.

## Métodos

### Modelo Animal e Protocolo Experimental

Ratos Wistar machos com 30 dias de idade foram distribuídos de forma aleatória em dois grupos: controle (C, n = 12) e obeso (Ob, n = 12). O grupo controle foi alimentado com uma ração padrão contendo 11,2 % de lipídeos, 55,5 % de carboidratos e 33,3 % de proteínas. O grupo obeso recebeu uma ração rica em lipídeos contendo 45,2% de lipídeos, 28,6% de carboidratos e 26,2% de proteínas. Os grupos receberam as dietas por 30 semanas consecutivas. A dieta rica em lipídeos foi formulada em nosso laboratório e continha ração em pó para ratos da Agrocere (Agrocere®, Rio Claro, SP, Brasil),

alimentos industrializados, suplemento proteico, vitaminas e minerais. A dieta rica em lipídeos possuía maior densidade calórica (3,65 kcal/g) em relação à dieta padrão (2,95 kcal/g) devido à maior quantidade de lipídeos, consistindo de ácidos graxos saturados (20,2 %) e insaturados (79,8 %). Todos os ratos foram alojados em gaiolas individuais em uma sala com controle ambiental com temperatura de 23 ± 3 °C, ciclo de 12 h claro/escuro e umidade relativa de 60 ± 5 %. O consumo alimentar foi medido diariamente e a água fornecida ad libitum. O peso corporal inicial e final (PCI e PCF, respectivamente) foram aferidos. O consumo calórico semanal foi calculado como a média de consumo da semana x o valor calórico de cada dieta. A eficiência alimentar, capacidade de transformar calorias consumidas em peso corporal, também foi analisada.

Todos os experimentos e procedimentos foram realizados de acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, publicado pelo U.S. National Institutes of Health<sup>26</sup>, e também foram aprovados pelo Comitê de Ética da Escola de Medicina de Botucatu (UNESP, Botucatu, Brasil).

### Composição das Dietas Experimentais

As dietas experimentais supriram quantidades suficientes de proteínas, vitaminas e minerais de acordo com o *Nutrient Requirements of Laboratory Animals* (1995). A dieta padrão e as quatro dietas ricas em lipídeos foram formuladas pela Agrocere (Rio Claro, SP, Brazil). Os ingredientes foram inicialmente triturados e em seguida misturados com vitaminas e minerais. A mistura foi peletizada, secada em um secador ventilado a 55 ± 5°C e em seguida estocada a -20°C. A dieta padrão (RC Focus 1765) continha óleo de soja, milho integral, farelo de trigo, farelo de soja, fosfato dicálcico, cloreto de sódio, farinha de carne e peixe, aditivo antioxidante, e mistura de vitaminas e minerais. Enquanto os ingredientes usados para preparar as dietas ricas em lipídeos foram cloreto de sódio, caseína, leite em pó, proteína concentrada de soja, milho integral, farinha de biscoito, fosfato dicálcico, carbonato de Ca<sup>2+</sup>, aditivo emulsificante, antioxidantes, sabores artificiais (queijo, baunilha, chocolate e bacon) e mistura de vitaminas e minerais. A composição da dieta rica em lipídeos consistiu de ácidos graxos saturados e insaturados que proveram 20% e 80% das calorias derivadas de gordura, respectivamente<sup>9,26</sup>.

### Determinação de Obesidade

Um critério baseado no índice de adiposidade foi utilizado para determinar a obesidade de acordo com diversos autores<sup>9,26-28</sup>. Após a anestesia (pentobarbital sódico 50 mg/kg por via intraperitoneal [i.p.]), os animais foram decapitados, toracotomizados e tiveram os depósitos de tecido adiposo dissecados e pesados. O índice de adiposidade foi calculado pela seguinte fórmula: índice de adiposidade = (gordura corporal total (GC)/peso corporal final) x 100. A GC foi calculada pela soma do peso individual de cada depósito de tecido adiposo: GC = gordura epididimal + gordura retroperitoneal + gordura visceral<sup>9,26</sup>.

### Comorbidades Associadas à Obesidade

Os modelos experimentais de obesidade induzida em ratos podem apresentar características semelhantes à obesidade humana tais como hipertensão, intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. Desta forma ambos os grupos foram submetidos a diversas análises, sendo os testes bioquímicos realizados em dez animais de cada grupo.

### Pressão Arterial Sistólica

Na fase final dos experimentos, a pressão arterial sistólica foi medida na cauda dos ratos usando um método não invasivo<sup>27</sup> com um eletro-esfigmomanômetro da Narco BioSystems® (International Biomedical, Austin, TX, EUA). A média de duas medições foi registrada para cada animal.

### Teste Oral de Tolerância à Glicose

Ao fim do período de 30 semanas de alimentação, um teste oral de tolerância à glicose foi realizado. Os ratos pernoveram em jejum (12-15h) e amostras de sangue foram extraídas da extremidade da cauda. A glicose sanguínea foi obtida em condições basais e depois da administração intraperitoneal [i.p.] de uma dose de glicose de 2 g/kg<sup>9</sup>. Amostras de sangue foram coletadas em 0, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após, e foram analisadas com um glicômetro (Accu-Check Go Kit; Roche Diagnóstica Brasil Ltda, SP, Brasil).

### Análise Plasmática de Hormônios

Ao fim dos tratamentos, os animais foram submetidos a 12-15 h de jejum, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg intraperitoneal) e eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado em tubos heparinizados, em seguida foram centrifugados a 3000 x g por 15 minutos a 4°C, e estocados a -80°C. As concentrações plasmáticas de leptina e insulina foram determinadas por ELISA<sup>9</sup> usando kits comerciais específicos (Linco Research Inc., St. Louis, MO, EUA).

### Colesterol, Triglicerol, Ácidos Graxos não Esterificados, Insulina e Leptina

Ao fim do experimento, os animais foram submetidos a um jejum de 12-15 h, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) e eutanasiados por decapitação. Amostras de sangue foram coletadas em tubos heparinizados, o soro foi separado por centrifugação a 3000 x g por 15 minutos a 4°C, e em seguida foram estocados a -80°C até análises adicionais. O soro foi analisado para os níveis de glicose (GL), triglicerídeos (TG), colesterol total (CT), ácidos graxos não esterificados (AGNE) e hormônios (insulina e leptina). As concentrações séricas de GL, TG e CT foram medidas com um sistema de análise enzimático automático (Technicon, RA-XTM System, Global Medical Instrumentation, Minnesota, EUA). Os níveis de AGNEs foram determinados pelo método de Johnson e Peters (1993) usando kits de colorimétricos (WAKO NEFA-C, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japão). Os níveis de leptina e insulina foram determinados por ELISA usando kits comerciais específicos (Linco Research Inc., St. Louis, MO, USA).

### Análise da Gordura Corporal

Após anestesia (pentobarbital sódico 50 mg/kg i.p.), decapitação e toracotomia, os depósitos de tecido adiposo foram dissecados e pesados. O peso de tecido adiposo total foi calculado como a soma do peso de cada depósito de gordura individual: gordura epididimal + gordura retroperitoneal + gordura visceral. O índice de adiposidade foi calculado como: (gordura corporal total/peso corporal final) x 100<sup>9,26</sup>.

### Estrutura e Função Cardíaca

Os pesos do coração e ventrículo esquerdo (VE) foram determinados como índices de estrutura cardíaca depois de seus valores absolutos serem normalizados pelo comprimento da tibia.

A função do miocárdio foi analisada pelo estudo de músculos papilares isolados do VE. Este procedimento tem sido usado por diversos pesquisadores<sup>9,17,29</sup>. Esta técnica permite a mensuração da capacidade do músculo cardíaco de contrair e realizar força independente de influências *in vivo* que podem alterar a performance mecânica do miocárdio, tais como a frequência dos batimentos, pré-carga e pós-carga. Resumidamente, no experimento os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p.) e eutanasiados por decapitação. Os corações foram removidos rapidamente e colocados em uma solução de Krebs-Henseleit oxigenada a 28°C. Os músculos papilares dos ratos C (n = 12) e ratos Ob (n = 12) foram dissecados, e presos entre dois cliques de mola e colocados verticalmente em uma câmara contendo a solução de Krebs-Henseleit (118,5 mM NaCl; 4,69 mM KCl; 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>; 1,16 mM MgSO<sub>4</sub>; 1,18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 5,50 mM GL e 24,88 mM NaCO<sub>3</sub>) mantida a 28°C por um circulador de água termostaticado. A solução de banho foi borbulhada com oxigênio 95% e dióxido de carbono 5%, com pH de 7,4. O clipe de mola inferior foi ligado a um transdutor de força 120T-20B (Kyowa, Tóquio, Japão) por um fino fio de aço (1/15.000 polegada) que passou através do selo de mercúrio no fundo da câmara. O clipe de mola superior foi conectado a um fino fio de aço ligado a um braço alavancado rígido sobre o qual havia um parafuso micrométrico para o ajuste do comprimento do músculo. A preparação do músculo foi colocada entre dois eletrodos de platina (Grass E8, GRASS Technologies, An Astro-Med, Inc. Product Group, West Warwick, RI, EUA) e estimulado a uma frequência de 0,2 Hz (12 pulsos/min) usando pulsos de ondas quadradas de 5 ms de duração. A voltagem foi regulada para um valor 10% maior que o mínimo necessário para produzir a resposta mecânica máxima.

Os músculos foram contraídos isotonicamente com cargas leves por 60 min e depois carregados (50g) para contrair isometricamente e esticarem até o máximo das curvas de comprimento-tensão. Após um período de 5 min durante o qual as preparações passaram por contrações isotônicas, os músculos foram submetidos de novo a condições isométricas e o pico da curva de comprimento-tensão (*L<sub>max</sub>*) foi cuidadosamente medido. Um período de 15 min de contração isométrica estável foi aplicado antes do período experimental e durante o qual uma contração isométrica foi registrada.

Os seguintes parâmetros foram medidos para a contração isométrica na  $L_{max}$ : pico de tensão desenvolvida (TD [ $\text{g}/\text{mm}^2$ ]), tensão em repouso (TR [ $\text{g}/\text{mm}^2$ ]), taxa máxima de desenvolvimento da tensão ( $+dT/dt$  [ $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$ ]), taxa máxima de redução da tensão ( $-dT/dt$  [ $\text{g}/\text{mm}^2/\text{s}$ ]) normalizadas pela área da seção transversal (AST). A rigidez miocárdica foi determinada pela razão entre a variação de comprimento do músculo e a tensão em repouso. A tensão em repouso foi analisada com o comprimento do músculo correspondendo a 90, 92, 94, 96, 98, e 100% da  $L_{max}$ . A curva de comprimento-tensão em repouso foi obtida usando uma análise de regressão exponencial:  $\log(\text{TR}) = -51,1118 + 25,5425 \log(L_{max})$  para o grupo C e  $\log(\text{TR}) = -58,1992 + 29,1455 \log(L_{max})$  para o grupo Ob.

Os parâmetros usados para caracterizar o músculo papilar foram o comprimento (mm), peso (mg), e AST ( $\text{mm}^2$ ). Ao fim do experimento, o comprimento do músculo em  $L_{max}$  foi medido com um catetômetro (Gartner Scientific Corporation, Chicago, IL, EUA) e o músculo entre os dois cliques foi secado e pesado. A área de seção transversal foi calculada com o peso do músculo e o comprimento, assumindo a uniformidade e a gravidade específica de 1,0. Todos os dados de força foram normalizados pela área da seção transversal.

Para determinar o mecanismo pelo qual a obesidade induz efeitos inotrópicos negativos sobre a função contrátil, os músculos papilares foram avaliados sob condições basais de  $2,5 \text{ nmol/L}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  e depois de manobras inotrópicas e lusitrópicas. Estas manobras foram: contração pós-reposo de 10, 30 e 60 segundos; aumento extracelular da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  de 0,5 para  $2,5 \text{ nmol/L}$ ; mudança da frequência cardíaca de 0,1 para  $2,0 \text{ Hz}$ ; adição de iodoacetato. A avaliação da via glicolítica foi realizada utilizando um inibidor específico, ácido iodoacético  $10^{-3} \text{ mM/L}$ . A função miocárdica foi registrada aos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 min depois da adição de ácido iodoacético na solução nutriente. O comportamento da TD e da TR depois da

administração do inibidor da rota glicolítica foi acompanhado para a construção do modelo da regressão linear.

### Análise estatística

Parâmetros nutricionais, hormonais, morfológicos e análises da função cardíaca foram apresentados como médias  $\pm$  desvio padrão e a comparação entre os grupos foi realizada com o teste t de Student para amostras independentes. O perfil de glicose dos grupos foi comparado por uma ANOVA de medidas repetidas. Quando diferenças significativas foram encontradas ( $p < 0,05$ ), o teste de Bonferroni post hoc para comparações múltiplas foi realizado. As curvas de regressão do bloqueio da via glicolítica e rigidez miocárdica foram comparadas pelo teste do coeficiente angular e regressão linear. A análise estatística foi realizada com o programa Sigma Plot 3.5 para Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, EUA). A normalidade das variáveis foi analisada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O nível de significância foi de 5%.

## Resultados

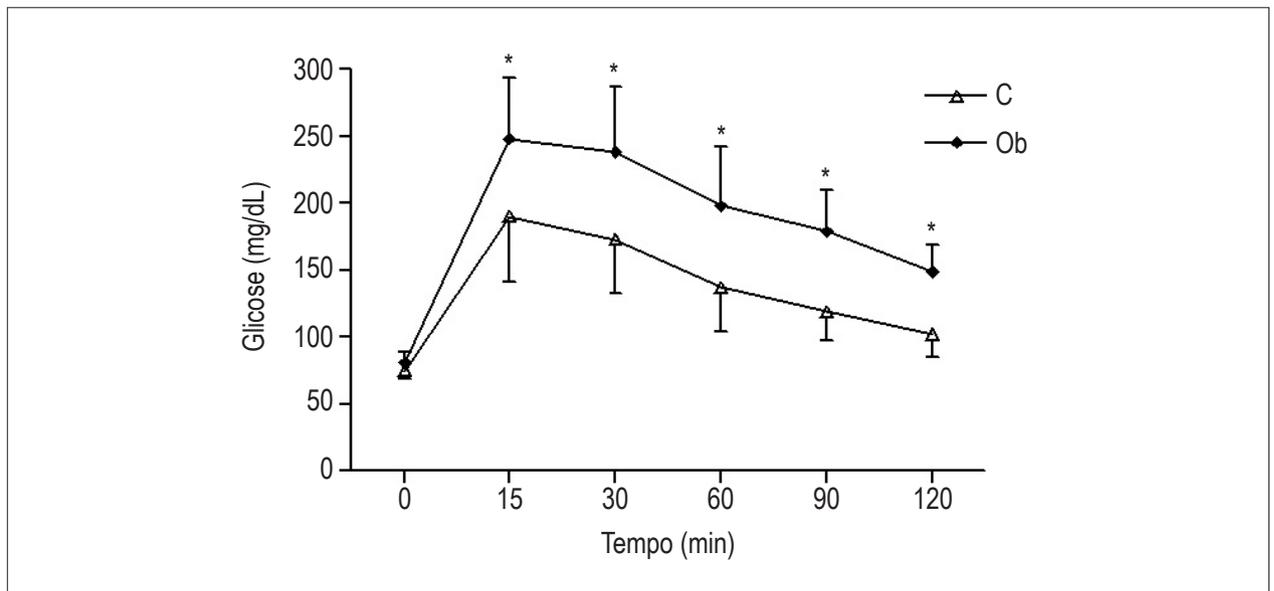
### Características gerais e comorbidades associadas à obesidade

As características gerais e comorbidades associadas à obesidade estão apresentadas na Tabela 1. O peso final corporal, gordura corporal total, índice de adiposidade e glicose, leptina e níveis de insulina foram maiores no grupo Ob em relação ao grupo C. Não houve diferença significativa entre os grupos em relação aos níveis de proteínas e lipídeos. Os resultados do teste de tolerância à glicose estão apresentados na Figura 1. Os níveis basais de glicose foram similares entre os grupos. Após a administração intravenosa de glicose, a taxa sanguínea desta foi maior para o grupo Ob em todos os períodos avaliados.

Tabela 1 – Características gerais e comorbidades associadas a obesidade

Variáveis	Grupos		Valor de p
	C (n = 12)	Ob (n = 12)	
PCF (g)	498 $\pm$ 25	562 $\pm$ 36*	0,03467
Índice de adiposidade (%)	4,28 $\pm$ 1,65	5,96 $\pm$ 1,54*	0,02872
Glicose (mg/dL)	107 $\pm$ 22	126 $\pm$ 19*	0,00548
Triglicérides (mg/dL)	60,1 $\pm$ 15,2	66,1 $\pm$ 24,4	0,30161
Colesterol (mg/dL)	58,3 $\pm$ 10,5	59,0 $\pm$ 8,1	0,78859
HDL (mg/dL)	24,8 $\pm$ 4,3	27,1 $\pm$ 4,9	0,10570
LDL (mg/dL)	14,0 $\pm$ 3,3	12,2 $\pm$ 2,8	0,13769
NEFA (mmol/L)	0,27 $\pm$ 0,05	0,28 $\pm$ 0,06	0,66658
Leptina (ng/dL)	2,40 $\pm$ 0,36	7,60 $\pm$ 0,81*	0,00005
Insulina (ng/dL)	0,23 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,07*	0,00067
PAS (mmHg)	127 $\pm$ 12	129 $\pm$ 13	0,87912

Valores expressos em média  $\pm$  desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; PCF: peso corporal final; HDL: lipoproteína de alta densidade; LDL: lipoproteína de baixa densidade; NEFA: ácidos graxos não esterificados; PAS: pressão arterial sistólica. Teste t de Student's para amostras independentes.



**Figura 1** – Teste oral de tolerância à glicose nos animais do grupo controle (C, n = 12) e animais do grupo obeso (Ob, n = 12). Os valores são expressos como média  $\pm$  desvio padrão. ANOVA e teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  vs. C.

### Estrutura e função cardíaca

A estrutura cardíaca macroscópica está apresentada na Tabela 2. Os resultados indicam que não houve diferença significativa entre os dois grupos. A função basal dos músculos papilares cardíacos está apresentada na Tabela 3 e os dados mostraram que não houve diferença significativa nas medidas mecânicas. Além disso, ambos os grupos apresentaram o mesmo comportamento nas estimulações inotrópicas. A influência da variação do comprimento do músculo papilar sobre a tensão em repouso é apresentada na Figura 2, não havendo diferenças significativas entre os dois grupos. Os resultados indicam que a obesidade não aumentou a rigidez do miocárdio. A avaliação funcional após o bloqueio com iodoacetato é apresentada nas Figuras 3A e 3B. Não houve diferença na regressão linear da TD entre os grupos (Figura 3A), já para a TR houve diferença estatística entre o comportamento do grupo controle e o grupo obeso, sendo a inclinação da curva do grupo C mais marcante (Figura 3B).

### Discussão

A dieta foi capaz de levar os animais à obesidade tendo em vista que o índice de adiposidade foi 39,2% superior ao controle. Os dados desta pesquisa são compatíveis com os resultados de pesquisas realizadas em nosso laboratório usando a mesma metodologia<sup>9,17,26</sup>. Nesta pesquisa foram observadas comorbidades associadas à obesidade experimental como a intolerância à glicose, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. Os resultados revelaram que o nosso modelo experimental promoveu alterações em parâmetros metabólicos e hormonais que estão de acordo com os achados de vários pesquisadores<sup>9,30,31</sup>.

A obesidade não causou remodelações estruturais na frequência cardíaca ou pressão arterial sistólica. Os dados diferem de estudos que observaram que a obesidade induzida por dieta rica em lipídeos causa hipertrofia cardíaca<sup>9,26,32,33</sup> e aumento da pressão arterial<sup>34</sup>. A alteração nessas variáveis não sugere que e a obesidade não causou mudanças significativas em neuro-hormônios capazes de promover a proliferação celular, vasoconstrição e retenção hidrossalina.

Neste estudo a função miocárdica foi avaliada *in vitro* com o uso de músculos papilares isolados do VE. Preparações de músculos papilares permitem a mensuração da capacidade do músculo cardíaco de contrair e relaxar independente de influências *in vivo* que podem alterar a performance mecânica do miocárdio, tais como mudanças de frequência e carga cardíaca. A estimulação inotrópica permite a identificação de alterações nas fases de contração e relaxamento que não podem ser detectadas em condições basais e isso ajuda na compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações da função miocárdica. Os animais utilizados em ambos os grupos possuíam a área seccional transversa semelhantes e isto permite evitar a influência da área seccional transversa sobre os resultados<sup>35</sup>. Os resultados demonstraram que a obesidade não causou a deterioração da função cardíaca nem da rigidez do miocárdio, tanto em condições basais como com a estimulação inotrópica. Este comportamento é similar ao encontrado por outros autores que utilizaram corações isolados de coelhos com 12 semanas de idade<sup>36</sup> e miócitos isolados de camundongos obesos com 14 semanas de idade<sup>37</sup>. Entretanto, outros pesquisadores encontraram resultados divergentes onde foi encontrada uma redução da função mecânica de miócitos isolados de camundongos com 12 semanas<sup>38</sup>, estes autores também observaram uma

Tabela 2 – Estrutura macroscópica cardíaca

Variáveis	Grupos		Valor de p
	C (n = 12)	Ob (n = 12)	
VE (g)	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,82766
Coração (g)	0,055 ± 0,01	0,060 ± 0,01	0,06416
VE/TI (g/mm)	0,021 ± 0,003	0,023 ± 0,002	0,12565
Coração/TI (g/mm)	0,29 ± 0,02	0,32 ± 0,02	0,32872

Valores expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; VE: ventrículo esquerdo; TI: tibia. Teste t de Student's para amostras independentes.

Tabela 3 – Contração isométrica basal

Variáveis	Grupos		Valor de p
	C (n = 12)	Ob (n = 12)	
TD (g/mm <sup>2</sup> )	7,14 ± 1,77	6,89 ± 1,54	0,22756
TR (g/mm <sup>2</sup> )	0,68 ± 0,24	0,67 ± 0,20	0,61639
+dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	69,4 ± 18,1	62,9 ± 14,6	0,19907
-dT/dt (g/mm <sup>2</sup> /s)	22,1 ± 5,9	21,6 ± 4,9	0,52313
AS (mm <sup>2</sup> )	0,97 ± 0,24	0,98 ± 0,27	0,38607

Valores expressos em média ± desvio padrão. C: controle; Ob: obeso; TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; +dT/dt: velocidade máxima de elevação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade máxima de decréscimo da tensão desenvolvida; AS: área seccional. Teste t de Student's para amostras independentes.

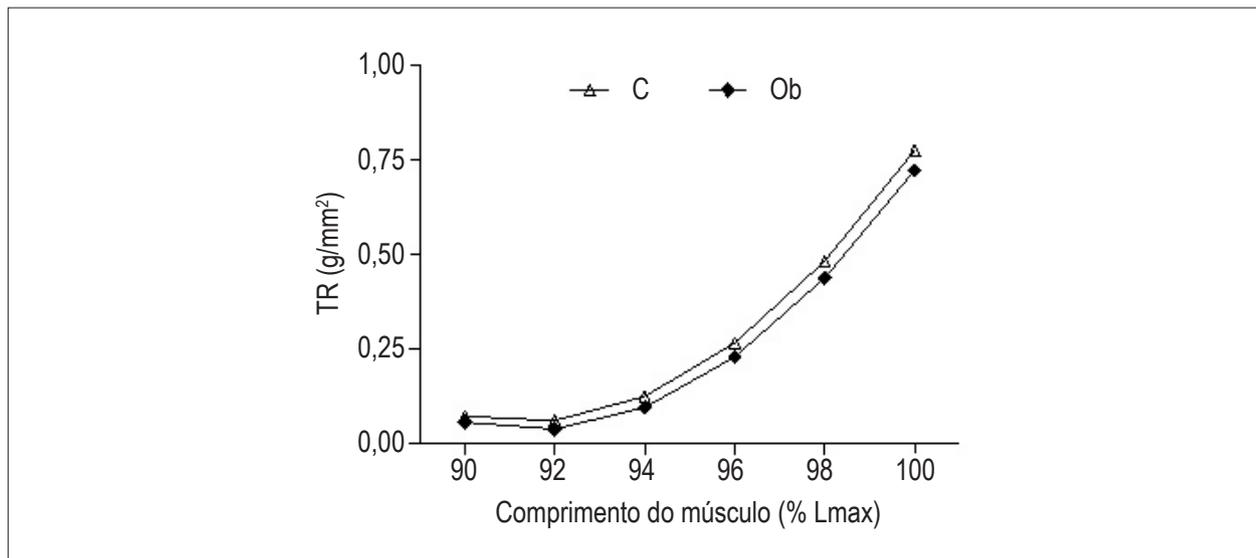


Figura 2 – A influência da variação do comprimento do músculo sobre a tensão em repouso dos animais do grupo controle (C, n = 12) e animais do grupo obeso (Ob, n = 012). Regressão linear.

elevação da performance contrátil basal do músculo papilar nos camundongos obesos com 7 semanas. Leopoldo e cols.<sup>9</sup> não observaram alterações na função miocárdica basal de ratos com 15 semanas, entretanto estes autores encontraram diferenças entre o grupo controle e o grupo

obeso após a utilização de bloqueadores para SERCA2 e canal de Ca<sup>2+</sup> tipo L.

O bloqueio da via glicolítica com o iodoacetado sobre a função miocárdica mostrou que a inclinação da curva de tensão desenvolvida em animais obesos foi similar ao grupo

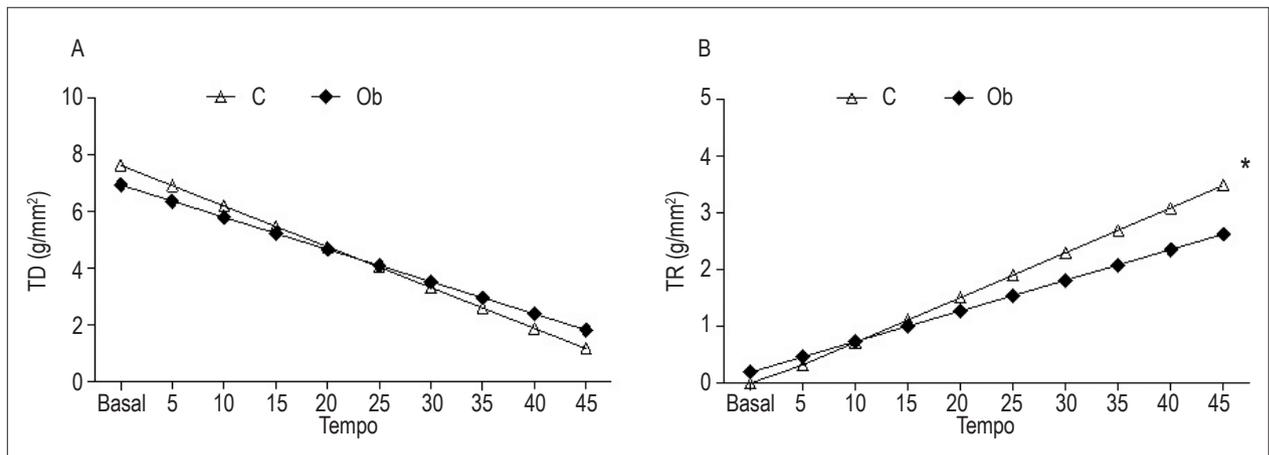


Figura 3 – Efeitos do bloqueio da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase pelo iodoacetado no miocárdio de ratos através do modelo de regressão linear nos animais do grupo controle (C, n = 12) e animais do grupo obeso (Ob, n = 12). A) TD: pico da tensão desenvolvida; B) TR: tensão em repouso. Regressão linear. \*  $p < 0,05$  vs. Ob.

controle, entretanto esta inclinação na curva de tensão de repouso dos animais obesos foi significativamente menor do que no controle. Contrário às expectativas, estes resultados sugerem que os ratos do grupo controle possuem maior rigidez miocárdica do que os ratos obesos. Este comportamento pode estar relacionado a uma maior elevação do cálcio citoplasmático resultante possivelmente de uma menor recaptura pela SERCA2 e ou maior afinidade entre o cálcio e a troponina C. A menor contratura observada em ratos obesos sugere que a priorização pelo miocárdio por ácidos graxos em relação à glicose aumentou a disponibilidade de energia para a SERCA2 e promoveu uma proteção ao miocárdio durante o bloqueio da via glicolítica. Isto indica que em situações em que ocorre o aumento nas concentrações de ácidos graxos, a SERCA2 também utiliza energia proveniente da beta-oxidação. Desta forma, neste experimento, a obesidade promoveu alterações metabólicas que resultaram em uma proteção miocárdica.

A TR e a TD apresentaram comportamentos distintos, sendo que o fato da TD ter sido igual entre os grupos pode estar relacionado à taxa da quantidade de cálcio que se difunde em relação a que é removida do citosol durante um ciclo cardíaco. De acordo com Katz<sup>39</sup>, a razão é de aproximadamente 150, o que mostra que a quantidade de cálcio que é removida é menor em relação a que se difunde para o interior da célula<sup>39</sup>. A SERCA2 é a maior responsável pela recaptura dos íons de cálcio nos roedores<sup>40</sup> e utiliza ATP para a sua atividade, assim um déficit de energia para essa estrutura poderia causar consequências mais deletérias para a diástole do que para a sístole<sup>40</sup>.

## Conclusão

O desequilíbrio energético na obesidade não acarreta disfunção cardíaca. Ao contrário, a priorização da utilização de ácidos graxos proporciona proteção ao músculo cardíaco durante o bloqueio da glicólise, sugerindo que esta via metabólica é menos utilizada pelo miócito nos animais obesos.

Estes resultados sugerem que o uso de ácidos graxos pelo miocárdio, em determinadas situações, pode gerar efeitos

benéficos; assim, poderia desempenhar um papel em modelos de remodelagem cardíaca como uma terapia de baixo custo e fácil implementação.

## Agradecimentos

Agradecemos a José C. Georgette, Mário B. Bruno, Sandra A. Fabio, Camila R. C. Camacho e Corina J. Correa pela assistência técnica. O abstract foi revisado e editado por nativos da língua Inglesa com conhecimento na área biomédica da BioMed Proofreading (Cleveland, Ohio, EUA).

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho de pesquisa: Campos DHS, Nascimento AF, Cicogna AC; Obtenção de dados: Campos DHS, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Oliveira-Júnior AS, SILVA DCT; Análise e interpretação dos dados: Campos DHS, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Oliveira-Júnior AS, Sugizaki MM, Cicogna AC; Análise estatística: Campos DHS, Leopoldo AS, Padovani CR; Obtenção de financiamento: Campos DHS, Cicogna AC; Redação do manuscrito: Campos DHS, Cicogna AC; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Campos DHS, Sugizaki MM, Cicogna AC.

## Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP - processo n° 07/59747-7 e 07/46595-0.

## Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de Dissertação de Mestrado de Dijon Henrique Salomé de Campos pela Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP.

## Referências

1. World Health Organization (WHO). Obesity and overweight. Geneva;2011. [Access in 2014 May 03]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
2. Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res*. 2007;101(4):335-47.
3. Sumiyoshi M, Sakanaka M, Kimura Y. Chronic intake of high-fat and high-sucrose diets differentially affects glucose intolerance in mice. *J Nutr*. 2006;136(3):582-7.
4. Thakker GD, Frangogiannis NG, Bujak M, Zymek P, Gaubatz JW, Reddy AK, et al. Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(5):H2504-14.
5. Fontaine KR, Redden DT, Wang C, Westfall AO, Allison DB. Years of life lost due to obesity. *JAMA*. 2003;289(2):187-93.
6. Olshansky SJ, Passaro DJ, Hershow RC, Layden J, Carnes BA, Brody J, et al. A potential decline in life expectancy in the United States in the 21st century. *N Engl J Med*. 2005;352(11):1138-45.
7. Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM*. 2006;99(9):565-79.
8. 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.
9. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, do Nascimento AF, de Campos DH, Luvizotto Rde A, et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2a in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol*. 2011;226(11):2934-42.
10. Stanley WC, Recchia FA, Lopaschuk GD. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. 2005;85(3):1093-129.
11. An D, Pulinkunnil T, Qi D, Ghosh S, Abrahami A, Rodrigues B. The metabolic "switch" AMPK regulates cardiac heparin-releasable lipoprotein lipase. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(1):246-53.
12. Okoshi K, Guimaraes JF, Di Muzio BP, Fernandes AA, Okoshi MP. Miocardiopatia diabética. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(2):160-7.
13. An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(4):H1489-506.
14. Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation*. 1999;99(4):578-88.
15. Nuutila P, Koivisto VA, Knuuti J, Ruotsalainen U, Teras M, Haaparanta M, et al. Glucose-free fatty acid cycle operates in human heart and skeletal muscle in vivo. *J Clin Invest*. 1992;89(6):1767-74.
16. Peterson LR, Herrero P, Schechtman KB, Racette SB, Waggoner AD, Kisrieva-Ware Z, et al. Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. *Circulation*. 2004;109(18):2191-6.
17. Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, do Nascimento AF, Luvizotto Rde A, de Campos DH, et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol*. 2010;26(8):423-9.
18. Boudina S, Sena S, O'Neill BT, Tathireddy P, Young ME, Abel ED. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. *Circulation* 2005;112(17):2686-95.
19. Aasum E, Belke DD, Severson DL, Riemersma RA, Cooper M, Andreassen M, et al. Cardiac function and metabolism in Type 2 diabetic mice after treatment with BM 17.0744, a novel PPAR-alpha activator. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(3):H949-57.
20. Belke DD, Larsen TS, Gibbs EM, Severson DL. Altered metabolism causes cardiac dysfunction in perfused hearts from diabetic (db/db) mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000;279(5):E1104-13.
21. Semeniuk LM, Kryski AJ, Severson DL. Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(3):H976-82.
22. Entman ML, Bornet EP, Van Winkle WB, Goldstein MA, Schwartz A. Association of glycogenolysis with cardiac sarcoplasmic reticulum: II. Effect of glycogen depletion, deoxycholate solubilization and cardiac ischemia: evidence for a phosphorylase kinase membrane complex. *J Mol Cell Cardiol*. 1977;9(7):515-28.
23. Weiss JN, Lamp ST. Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in isolated guinea pig cardiac myocytes. *Science*. 1987;238(4823):67-9.
24. Weiss JN, Lamp ST. Cardiac ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *J Gen Physiol*. 1989;94(5):911-35.
25. Kusuoka H, Marban E. Mechanism of the diastolic dysfunction induced by glycolytic inhibition. Does adenosine triphosphate derived from glycolysis play a favored role in cellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in ferret myocardium? *J Clin Invest*. 1994;93(3):1216-23.
26. Medei E, Lima-Leopoldo AP, Pereira-Junior PP, Leopoldo AS, Campos DH, Raimundo JM, Sudo RT, et al. Could a high-fat diet rich in unsaturated fatty acids impair the cardiovascular system? *Can J Cardiol*. 2010;26(10):542-8.
27. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange T. Cardiovascular function in rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006;48(1):65-72.
28. 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*. 2007;31(11):1652-9.
29. Bruder-Nascimento T, Campos DHS, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Okoshi K, Cordellini S, et al. Chronic stress improves the myocardial function without altering L-type Ca<sup>2+</sup> channel activity in rats. *Arq Bras Cardiol*. 2012;99(4):907-14.
30. 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(6):499-505.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. 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.
35. Bing OH, Wiegner AW, Brooks WW, Fishbein MC, Pfeffer JM. Papillary muscle structure-function relations in the aging spontaneously hypertensive rat. *Clin Exp Hypertens A*. 1988;10(1):37-58.
36. Carroll JF, Summers RL, Dzielak DJ, Cockrell K, Montani JP, Mizelle HL. Diastolic compliance is reduced in obese rabbits. *Hypertension*. 1999;33(3):811-5.
37. Ricci E, Smallwood S, Chouabe C, Mertani HC, Raccurt M, Morel G, et al. Electrophysiological characterization of left ventricular myocytes from obese Sprague-Dawley rat. *Obesity*. 2006;14(5):778-86.
38. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia*. 2005;48(6):1229-37.
39. Katz AM. *Physiology of the heart*. 4th ed. Philadelphia: Lipponcott Williams&Wilkins; 2006. p. 162-99.
40. Opie LH, Bers DM. Excitation-contraction coupling and calcium. In: Opie LH. *Heart physiology: from cell to circulation*. 4th ed. Philadelphia: Lipponcott Williams&Wilkins;2004. p. 159-85.