THIAGO BRUDER DO NASCIMENTO

ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E DESENVOLVIMENTO DE OBESIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA E ESTRESSE CRÔNICO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Farmacologia.

BOTUCATU – SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES E DESENVOLVIMENTO DE OBESIDADE EM ANIMAIS SUBMETIDOS À DIETA HIPERCALÓRICA E ESTRESSE CRÔNICO

THIAGO BRUDER DO NASCIMENTO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. SANDRA CORDELLINI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. ANTÔNIO CARLOS CICOGNA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração: Farmacologia.

BOTUCATU – SP
2011

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

Bruder-Nascimento, Thiago.

Alterações cardiovasculares e desenvolvimento de obesidade em animais submetidos à dieta hipercalórica e estresse crônico / Thiago Bruder do Nascimento. - Botucatu, 2011

Dissertação (mestrado) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2011

Orientador: Sandra Cordellini

Capes: 21001006

1. Farmacologia geral. 2. Miocárdio – Doenças. 3. Obesidade.

Palavras-chave: Função miocárdica; Estresse crônico; Obesidade; Reatividade vascular.

RESUMO

O estresse é entendido como um processo complexo e multidimensional, cuja resposta adaptativa é vista como um processo dinâmico no qual mecanismos fisiológicos do indivíduo mudam continuamente para ajustarem-se ao ambiente. Esse fator pode contribuir para alterações na função cardíaca, associada, ou não, ao trânsito de Ca^{2+} e a alteração vascular devido ao aumento da atividade da via l-arginina/óxido nítrico. A obesidade é uma doença complexa, caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo, levando a disfunções cardíacas e vasculares, que podem estar envolvidas com alteração no fluxo de Ca^{2+} e comprometimento da resposta vasodilatadora. O estresse é considerado um fator ambiental, portanto, responsável por alterações no balanço energético e peso corpóreo, uma vez que o peso corpóreo é a interação entre fatores genéticos e ambientais. Devido à escassez de estudos que avaliam o estresse crônico e dieta hipercalórica nas alterações cardiovasculares, e considerando a hipótese de que esta associação é capaz de atenuar o desenvolvimento da obesidade e intensificar as alterações cardiovasculares, o objetivo do presente trabalho foi confirmar essa hipótese em animais submetidos à dieta hipercalórica e ao estresse crônico. Ratos machos *Wistar*, divididos em quatro grupos: DN: dieta normocalórica; DN/Es: dieta normocalórica e submetidos ao estresse crônico; DH: dieta hipercalórica; DH/Es: dieta hipercalórica e submetidos ao estresse crônico, foram avaliados quanto aos perfis nutricionais, metabólicos e a remodelação cardiovascular. Os dados demonstraram que o estresse crônico impediu o desenvolvimento da obesidade, e em oposição à hipótese, o estresse crônico melhorou a função cardíaca e vascular, independente do tipo de dieta utilizada.

Palavras-chave: obesidade; estresse crônico; função miocárdica; reatividade vascular.

ABSTRACT

The stress is a complex and multidimensional process, the adaptive response is a dynamic process, in which individual physiologic mechanisms change to adjust to the environment, that causes alteration in the cardiac function, involved, or not, with Ca^{2+} flux and vascular alterations due to the increase of the l-arginine/nitric oxide pathway activity. The obesity is a complex disease, characterized by the excess of adipose tissue that causes cardiac and vascular dysfunction, involved with Ca^{2+} flux alterations and injury the vasodilating response. The stress is considered an environmental factor, therefore, it is responsible for the energetic balance alterations and weight gain, once the body weight is an interaction between genetic and environmental factors. There are few studies about chronic stress associated with the hypercaloric diet that evaluate the cardiovascular alterations, and considering the idea that this association can decrease the obesity development and increase the cardiovascular alterations, the aim of this research was evaluate the cardiovascular alterations and the obesity development in animals submitted to the hypercaloric diet and chronic stress. Male *Wistar* rats were separated into four groups: DN: standard diet; DN/Es: standard diet and chronic stress; DH: hypercaloric diet; DH/Es: hypercaloric diet and chronic stress were evaluated in relation to the nutritional and metabolic profile and cardiovascular remodellating. The data show that the chronic stress inhibited the obesity development, and different of the initial idea, the chronic stress improved the cardiac and vascular function, in both diets.

Key-words: obesity; chronic stress; cardiac function; vascular reactivity.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO
1.1 ESTRESSE
1.2 OBESIDADE
1.3 ESTRESSE E OBESIDADE
2 OBJETIVOS
3 MATERIAL E MÉTODOS
3.1 ANIMAIS
3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL
3.2.1 Rações
3.2.2 Estresse
3.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL NUTRICIONAL E DA INTENSIDADE DO ESTRESSE
3.3.1 Perfil nutricional
3.3.2 Intensidade do estresse
3.4 COMORBIDADES ASSOCIADAS À OBESIDADE E AO ESTRESSE
3.4.1 Pressão arterial sistêmica
3.4.2 Resistência à insulina
3.4.3 Intolerância à glicose
3.4.4 Concentrações séricas de insulina e leptina
3.5 PORCENTAGEM DE UMIDADE NOS TECIDOS
3.6 CARACTERIZAÇÃO DA REMODELAÇÃO CARDIOVASCULAR
3.6.1 Coração
3.6.1.1 Avaliação ecocardiográfica
3.6.1.2 Estrutura do coração *post mortem*
3.6.1.3 Estudo funcional do músculo papilar isolado
3.6.1.3.1 Parâmetros funcionais
3.6.1.3.2 Protocolo funcional
3.6.1.3.2.1 Protocolo funcional em condição basal
3.6.1.3.2.2 Manobras inotrópicas
3.6.1.3.2.2.1 Potencial pós-pausa
3.6.1.3.2.2.2 Elevação da frequência cardíaca
3.6.1.3.2.2.3 Elevação da concentração de Ca^{2+} extracelular
3.6.1.3.2.2.4 Elevação da concentração de Ca^{2+} extracelular na presença do diltiazem
3.6.2 Vaso
3.6.2.1 Reatividade vascular
3.6.2.1.1 Curvas concentração-efeito do cloreto de potássio (KCl)
3.6.2.1.2 Curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA)
3.6.2.1.3 Curvas concentração efeito à noradrenalina na presença de prazosin
3.6.2.1.4 Curvas concentração efeito à noradrenalina na presença de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)
3.6.2.1.5 Curvas concentração efeito à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NP)
3.6.2.1.6 Contribuição do Ca^{2+} intracelular e extracelular na resposta à noradrenalina

3.6.2.1.7 Avaliação de reatividade vascular
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA
4 RESULTADOS
4.1 PERFIL NUTRICIONAL
4.2 COMORBIDADES
4.2.1 Teste de resistência à insulina
4.2.2 Teste de tolerância à glicose
4.2.3 Hiperinsulinemia
4.2.4 Hiperleptinemia
4.2.5 Hipercosticosteronemia
4.2.6 Peso das glândulas adrenais
4.2.7 Hipertensão arterial sistêmica
4.3 PORCENTAGEM DE UMIDADE NOS TECIDOS
4.4 ALTERAÇÕES CARDÍACAS
4.4.1 Análise estrutural macroscópica *post mortem*
4.4.2 Análise ecocardiográfica
4.4.2.1 Análise estrutural
4.4.2.2 Análise funcional
4.4.3 Análise funcional do músculo papilar isolado
4.4.3.1 Avaliação da contração basal
4.4.3.2 Avaliação do potencial pós-pausa
4.4.3.3 Avaliação da frequência cardíaca
4.4.3.4 Avaliação da elevação de Ca^{2+}
4.4.3.5 Bloqueio do canal L pelo diltiazen
4.5 ALTERAÇÕES VASCULARES
4.5.1 Peso dos anéis de aorta
4.5.2 Curva concentração-efeito ao KCl
4.5.3 Curva concentração efeito à noradrenalina
4.5.4 Curvas concentração efeito à acetilcolina
4.5.5 Curvas concentração efeito ao nitroprussiato de sódio
4.5.6 Participação do Ca^{2+} intracelular e extracelular na resposta contrátil à noradrenalina
5 DISCUSSÃO
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MODELOS UTILIZADOS
5.2 REMODELAÇÃO CARDÍACA
5.2.1 Estudo ecocardiográfico e *post mortem*
5.3 MÚSCULO PAPILAR
5.4 REATIVIDADE VASCULAR
6 CONCLUSÕES
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESTRESSE

O primeiro pesquisador a definir estresse foi Selye (1936). Ele definiu estresse como uma resposta adaptativa, não específica, do indivíduo a um fator extrínseco físico ou psicológico-emocional. O estresse é entendido como um processo complexo e multidimensional (MCEWEN; SEEMAN, 1999), onde estressores agudos ou crônicos agem de diferentes maneiras. A resposta adaptativa ao estresse é considerada como processo dinâmico mediante o qual os pensamentos, os sentimentos, a conduta e os mecanismos fisiológicos do indivíduo mudam continuamente para se ajustar a um ambiente em constante transformação (SELYE 1936; STEADMAN, 1979).

A resposta ao estresse depende da intensidade, frequência, duração e o tipo do agente estressor. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) e o sistema nervoso simpático adrenomedular (SSAM) são os principais sistemas responsáveis pela resposta adaptativa ao estresse. Essas ativações resultam na liberação dos hormônios glicocorticóides, cortisol (humanos) ou corticosterona (ratos) pelo HHA, e noradrenalina (NA) e adrenalina pelo SSAM. Além disso, ocorre secundariamente a ativação do sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA) (HUIZENGA et al., 1998; TSIGOS; CHROUSOS, 2002).

A resposta adaptativa ao estresse ocorre por meio da ativação do sistema neuroendócrino, de múltiplos mecanismos moleculares, vias aferentes e eferentes distribuídas pelo sistema nervoso central (SNC) e pelos tecidos periféricos com funcionalidade integrada,

que no seu conjunto são designados como o “sistema de estresse”. A resposta individual ao estresse depende de uma multiplicidade de interações entre fatores genéticos e ambientais (CHROUSOS; GOLD, 1992).

O estresse pode contribuir para o desenvolvimento de muitas patologias como ansiedade crônica, depressão, sobrepeso, desordens na função imunológica, asma, úlcera péptica e alergias (VANLTALLIE, 2002; LEVINE; LEVINE, 2006) e resistência à insulina, (ROZANSKY et al., 2005). O estresse também está associado a alterações cardiovasculares como, hipertensão arterial e alteração na composição e função do coração (VIAU; MEANEY, 1991; HJEMDAHL, 2002).

Evidências epidemiológicas sugerem que o estresse é capaz de promover alterações cardíacas (ROZANSKY et al., 2005), a nível molecular, funcional e estrutural. Estudos em ratos submetidos ao estresse crônico mostraram diminuição da expressão dos genes dos receptores do tipo 1 e 2 para inositol-tri-fosfato (IP_3) e alterações no sistema de transporte de cálcio (Ca^{2+}) (KREPSOVA et al., 2004), aumento na expressão proteica de canal L (ZHAO et al., 2009), disfunção sistólica e diastólica no ventrículo esquerdo (BURRI et al., 2008) e focos de fibrose no miocárdio ventricular esquerdo (COSTOLI et al., 2004).

Além das alterações cardíacas observadas no estresse, autores mostram que também está associado a alterações vasculares, como aumento da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO) na circulação renal de coelhos estressados (DE MORAES et al., 2004), ratos submetidos ao estresse agudo mostraram diminuição da reatividade vascular à NA (MANUKHINA et al., 1998, MILAKOFSKY et al., 1993) e aumentada à acetilcolina (ACh) (CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998). As alterações vasculares induzidas pelo estresse mostram-se dependentes da hiperatividade do

sistema óxido nítrico e da integridade do endotélio, pois a remoção do endotélio igualou a resposta máxima quando comparada aos animais controles (CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; LANZA JÚNIOR; CORDELLINI, 2007).

1.2 OBESIDADE

A obesidade é uma doença complexa caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo (KORNER; ARONNE, 2003). A incidência e prevalência da obesidade no mundo têm aumentado progressivamente nas últimas décadas (MATHEW et al., 2007), sendo considerada atualmente, uma epidemia global e um importante problema em saúde pública, que afeta tanto países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos (ECKEL et al., 2002; O'BRIEN; DIXON, 2002; WONG et al., 2004). O número de indivíduos com sobrepeso atinge mais de um bilhão de pessoas, sendo que, mais de 30% desta população é obesa (site da OMS).

Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) aproximadamente 40 milhões de brasileiros apresentam sobrepeso, e dentre eles, 10,5 milhões são considerados obesos. Estima-se que em 2025, 35% da população brasileira estará acima do peso, já nos Estados Unidos a situação será ainda mais grave, a estimativa é que mais de 40% da população norte-americana será obesa (KOPELMAN, 2000; IBGE, 2003).

O tecido adiposo não é considerado simplesmente um reservatório de energia, mas como órgão, endócrino, parácrino e autócrino, capaz de sintetizar e liberar vários mediadores, leptina, adiponectinas, sistema renina angiotensina, resistina, fator de necrose tumoral alfa e

interleucinas-6. Os aumentos da leptina e insulina estão associados com a ativação do sistema nervoso simpático (MOHAMED-ALI et al., 1998; KERSHAW; FLIER, 2004; PAUSOVA, 2006; RONDINONE, 2006).

Os estudos que utilizam seres humanos obesos apresentam limitações éticas, financeiras e metodológicas (HALL et al., 1993). A obesidade experimental utilizando modelos genéticos (REN et al., 2000) ou manipulações dietéticas (FITZGERALD et al., 2001; CARROL et al., 2006) é uma alternativa para o estudo desta patologia. A obesidade resultante da utilização de dietas com alta densidade energética, gorduras ou hidrato de carbonos, é o modelo que mais apresenta semelhanças com a obesidade encontrada nos humanos (PEREIRA et al., 2003).

O aumento da taxa de tecido gorduroso está vinculado ao aumento da mortalidade e à redução na expectativa de vida (FONTAINE et al., 2003), e associado a diversas comorbidades como câncer, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, SSAM e do SRAA; além disso, a obesidade eleva o risco de mortalidade por doenças cardiovasculares em torno de 20 a 30% em homens (HALL, 2003; STEIN; COLDITZ, 2004), estando associada a diversas anormalidades como, doença arterial coronariana (SOWERS, 1998) e comprometimento da função cardíaca (ALPERT et al., 1995).

Os mecanismos envolvidos na disfunção do coração não estão totalmente esclarecidos; diversos fatores podem contribuir para este processo, como alteração nas proteínas contráteis, na matriz extracelular, nos substratos energéticos e no trânsito de Ca^{2+}. Alterações na homeostasia do Ca^{2+} celular, por modificação na expressão e/ou na função das proteínas, estão relacionadas com a disfunção cardíaca constatada em diversos modelos experimentais. Entretanto, são escassos os estudos que avaliaram a relação entre disfunção cardíaca, ciclo de

Ca^{2+} intracelular e obesidade (TSUTSUI et al., 1997; DING et al., 2008; SUGIZAKI et al., 2009). Leopoldo et al. (2011 *in press*) verificaram que ratos obesos por dieta hipercalórica rica em ácidos graxos insaturados por 15 semanas apresentaram disfunção miocárdica relacionada com alteração no trânsito de Ca^{2+} celular.

O transporte de Ca^{2+} é um dos principais mecanismos reguladores da contração e do relaxamento miocárdico, sendo os canais L e de rianodina responsáveis pela liberação, e a bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (RS) (SERCA2) pela recaptura do Ca^{2+} citosólico (BERS, 2002). A contração cardíaca inicia-se em nível celular, com a fase de despolarização pelo potencial de ação, acarretando abertura dos canais de Ca^{2+} do tipo L e influxo de Ca^{2+} do meio extracelular para o intracelular (BERS, 2002); este influxo promove aumento da concentração de Ca^{2+} livre no citosol que desencadeia a liberação de grande quantidade deste íon a partir do RS por meio do canal de rianodina, mecanismo conhecido como liberação de Ca^{2+} induzida por Ca^{2+}(FABIATTO, 1983). O aumento de Ca^{2+} citosólico possibilita a ligação desse íon com a troponina C e a interação entre actina e miosina. A restauração do Ca^{2+} a nível basal é promovida pela SERCA2 que é responsável pela recaptura deste íon para o RS.

Além das alterações cardíacas observadas na obesidade, alguns autores mostraram que esta doença está também associada a diversas disfunções vasculares. Em pesquisas clínicas, observou-se que a obesidade visceral compromete a resposta vasodilatadora à ACh (RUEDA-CLAUSEN et al., 2010); entretanto, outros autores não constataram diferenças na vasodilatação induzida pelo nitroprussiato de sódio (NP) entre os grupos controle e obeso (AUBIN et al., 2008; MORAES et al., 2008; RUEDA-CLAUSEN et al., 2010). Em trabalhos experimentais com ratos obesos por dieta hipercalórica foi constatado o comprometimento da vasodilatação induzida

pela ACh, em aortas torácicas (AUBIN et al., 2008) e artérias mesentéricas (MORAES et al., 2008). Estudos em humanos obesos verificaram que a infusão de cloreto de potássio (KCl) promoveu maior aumento na constrição em artérias mamárias (RUEDA-CLAUSEN et al., 2010). A avaliação da reatividade vascular em ratos obesos por dieta hipercalórica mostrou que a noradrenalina (NA) e a fenilefrina promoveram vasoconstrição semelhante ao grupo controle (NADERALI et al., 2001; FATANI et al., 2007).

O endotélio possui um importante papel na regulação do tônus vascular e na prevenção da progressão da aterosclerose através da produção e liberação de ambos os fatores vasodilatadores e vasoconstritores (VANE, 1990). O óxido nítrico (NO) representa o maior fator de relaxamento endógeno (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980), e sua produção pode ser induzida por estímulos físicos (*shear stress*) e agonistas como a ACh, NA, serotonina entre outros. A ativação da guanilato ciclase e subsequente acúmulo de GMPc é o principal mecanismo da vasodilatação induzida pelo NO no músculo liso vascular. Entretanto, NP, vasodilatador independente do endotélio, é capaz de induzir vasodilatação por se constituir numa fonte inorgânica de NO (SMITH; KRUSZYNA, 1974). A literatura relata disfunção endotelial associada à obesidade (POIRIER et al., 2006).

Neste contexto, a discrepância de resultados para agentes vasoconstritores e vasodilatadores demonstra que as alterações de reatividade vascular relacionadas à obesidade não estão completamente esclarecidas, merecendo maiores investigações.

1.3 ESTRESSE E OBESIDADE

A obesidade é uma doença multifatorial. O peso corpóreo é determinado por uma interação entre fatores genéticos, ambientais e psicossociais, que atuam por meio de mediadores fisiológicos regulando o consumo e o gasto de energia. Embora alterações genéticas sejam de importância inquestionável, o aumento acentuado da prevalência da obesidade é decorrente de mudanças comportamentais e ambientais. (KOPELMAN, 2000). Dentre esse último fator destaca-se o estresse, que pode influenciar diretamente o consumo calórico (Figura 1).

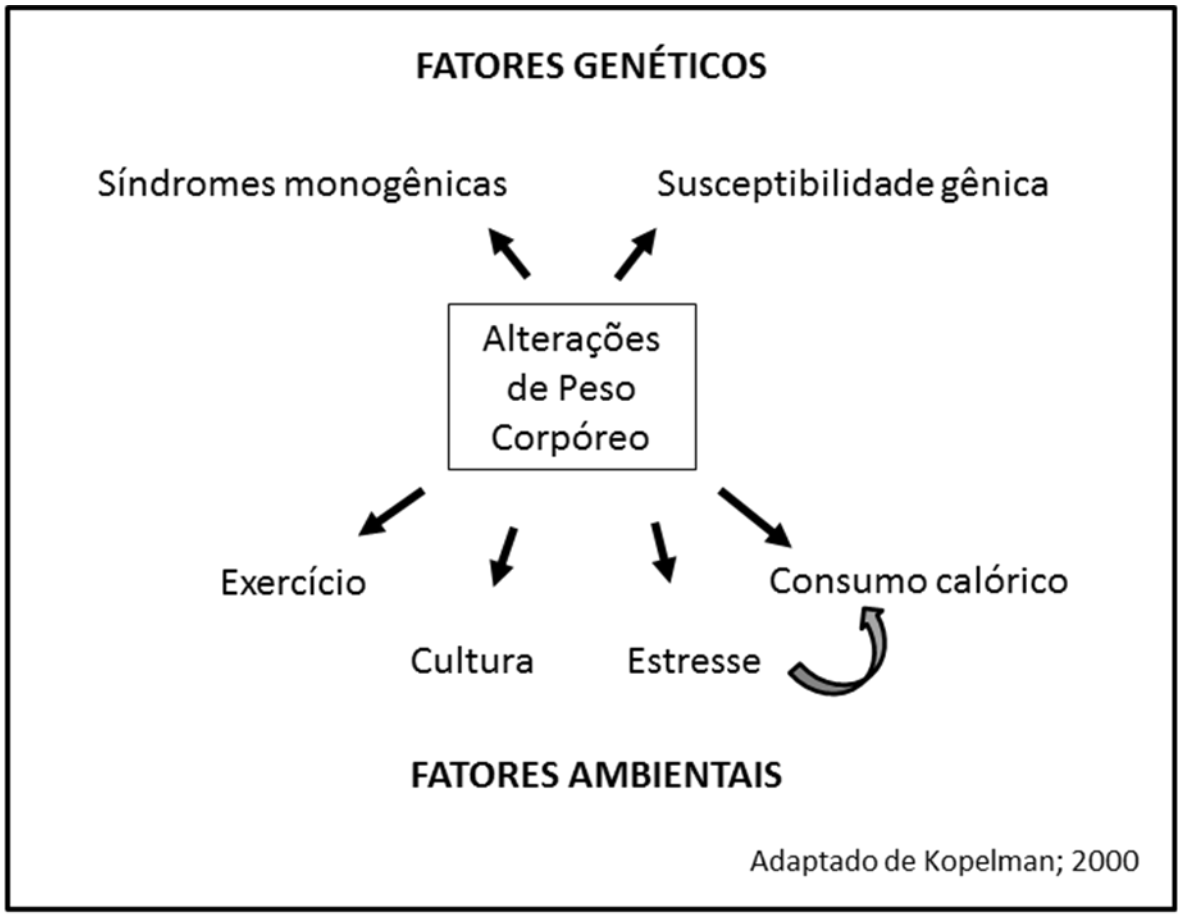

Figura 1. Fatores que influenciam nas alterações de peso corpóreo.

A literatura é bastante controvérsia em relação à influência do estresse na alteração de peso corpóreo. Chantal et al. (2003) verificaram que ratos submetidos ao estresse crônico e dieta hipercalórica ingeriram maior quantidade de alimentos, que resultou em maior ganho de peso corpóreo quando comparado aos animais com dieta hipercalórica isoladamente. Por outro lado, o modelo genético de camundongos sensíveis ao estresse mostrou redução do ganho de peso e eficiência calórica durante a exposição ao estresse crônico variado (TEEGARDEN; BALE, 2008). Camundongos subordinados, isto é, não dominante dentro do grupo, submetidos à dieta hiperlipídica apresentaram maior ganho de peso quando comparados aos animais dominantes (MOLES et al., 2006).

Ambos os fatores, obesidade e estresse possuem respostas adaptativas fisiológicas semelhantes nos sistemas imunológico, neuroendócrino e metabólico; assim, por exemplo, ocorrem alterações das citocinas inflamatórias, da atividade do SSAM, do SRAA, dos perfis séricos de insulina, leptina e glicose que podem ocasionar distúrbios cardiovasculares. (LEVINE; LEVINE, 2006). Entretanto, não foram encontrados na literatura estudos que avaliaram a relação entre estresse e obesidade com sistema cardiovascular.

2 OBJETIVOS

Avaliar as alterações cardiovasculares e o desenvolvimento de obesidade em animais submetidos à dieta hipercalórica e ao estresse crônico. A hipótese desse estudo foi que a associação entre o estresse crônico e a dieta hipercalórica atenuaria o desenvolvimento da obesidade e intensificaria a disfunção cardiovascular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

No presente estudo foram utilizados 80 ratos *Wistar* machos, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Laboratório Experimental do Departamento da Clínica Médica, Faculdade de Medicina, 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 (24 ± 2°C), umidade (55 ± 5°C) e ciclos claro e escuro (12 horas cada). 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" (1985), tendo sido aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do IB-UNESP-Botucatu, por estarem de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), protocolo nº 95/08-CEEA.

3.2 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os ratos foram randomizados em quatro grupos (n=20 animais/grupo): DN - tratados com dieta normocalórica; DN/Es - tratados com dieta normocalórica e submetidos ao estresse crônico; DH - tratados com dieta hipercalórica; DH/Es - tratados com dieta hipercalórica e

submetidos ao estresse crônico. Os ratos DN e DN/Es receberam ração padrão para roedores (RC Focus 1765, Agroceres®) e os DH e DH/Es ciclos de quatro rações hipercalóricas (RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416, Agroceres®), por período de 15 semanas. As rações hipercalóricas foram alternadas a cada 24 horas. Todos os grupos 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.(NASCIMENTO et al., 2008).

3.2.1 Rações

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 hipercalóricas RC Focus 2413, 2414, 2415 e 2416 (Figura 2) apresentaram a mesma composição nutricional, com exceção dos aditivos flavorizantes, acrescidos de 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, suplementos mineral e vitamínico. A composição de macro e micronutrientes das rações padrão e hipercalórica, mensurada pela empresa Agroceres®, está apresentada no Quadro 1. 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 2, 3 e 4, respectivamente.

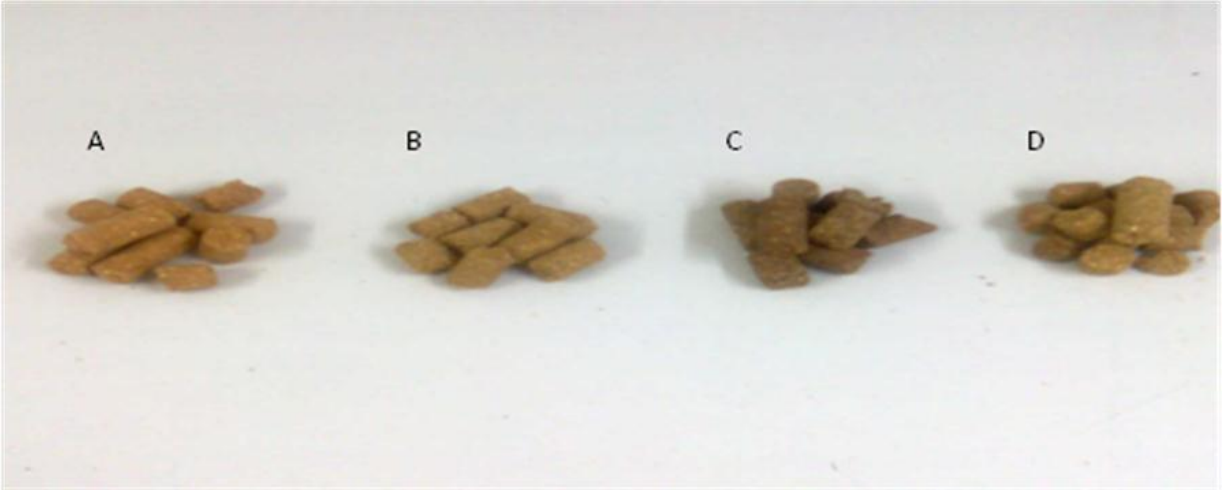

Figura 2- Exemplos de rações hipercalóricas *RC Focus 2413*. **A:** sabor queijo; **B:** sabor baunilha; **C:** sabor chocolate e **D:** sabor bacon.

Quadro 1- Macronutrientes e micronutrientes das rações (%).

Componentes	Rações	
	Padrão	**Hipercalórica***
Proteína	22,0	20,0
Carboidrato	42,7	26,4
Gordura	4,0	20,0
Minerais	9,0	10,0
Fibras	8,0	9,0
Umidade	12,0	12,5
Cálcio	1,5	1,4
Fósforo	0,8	0,7
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

*A dieta hipercalórica foi composta por rações hipercalóricas idênticas nutricionalmente, com exceção do aditivo flavorizante adicionado (queijo, bacon, chocolate ou baunilha).

Quadro 2- Perfil de aminoácidos das rações (%).

Aminoácidos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
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 3- Perfil de carboidratos das rações (%).

Carboidratos	Rações	
	Padrão	**Hipercalórica**
Rafinose	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
Ramnose	0,22	0,26
Manose	2,80	2,58

Quadro 4- Perfil de ácidos graxos saturados e insaturados das rações (%).

Ácidos graxos	Rações	
	Padrão	Hipercalórica
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
Esteárico (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 (c18:3n3)	3,72	0,87
Ácidos Graxos Saturados	21,16	20,21
Ácidos Graxos Insaturados	78,84	79,79

3.2.2 Estresse

No estresse devem-se levar em consideração a qualidade, a frequência, a severidade, o tipo de estresse, físico ou emocional, e a espécie animal a ser investigada (ADAM; EPEL, 2007). O estresse de imobilização é um modelo de estresse emocional e está entre as mais utilizadas (KVETNANSKY et al., 1979). A partir dos 30 dias de idade, os grupos DN/Es e DH/Es foram contidos, individualmente, em cápsulas metálicas (Figura 3), à temperatura ambiente de 25ºC, 1h por dia, 05 dias por semana, durante as 15 semanas do protocolo de indução de obesidade.

Nesta condição há uma intensa restrição dos movimentos do animal, permanecendo somente os movimentos respiratórios.

Durante a sessão de estresse, os grupos DN e DH permaneceram em suas gaiolas à temperatura ambiente de 25° C, sem receber ração ou água. Ao término da sessão, os grupos DN/Es e DH/Es voltaram para suas respectivas caixas. Quarenta e oito horas após a última sessão de estresse os animais foram submetidos aos protocolos experimentais.

Figura 3- Cápsulas de aço utilizadas na exposição diária ao estresse crônico de imobilização.

3.3 AVALIAÇÃO DO PERFIL NUTRICIONAL E DA INTENSIDADE DO ESTRESSE

3.3.1 Perfil nutricional

O perfil nutricional foi determinado pela análise de ingestão calórica, eficiência alimentar, peso e gordura corporal, índice de adiposidade e glicemia. A ingestão calórica foi calculada pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético

de cada ração (g x kcal). Com a finalidade de analisar a capacidade de o animal converter a energia consumida em peso corporal, a eficiência alimentar (EA) foi calculada, 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. A quantidade de gordura corporal total foi determinada pela somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral. O índice de adiposidade, utilizada para a determinação da possível obesidade, foi calculado, dividindo-se a gordura corporal total pelo peso corporal final, multiplicado por 100. Para análise do perfil glicêmico, os ratos foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (50mg/kg/IP, Cristália® Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda) e eutanasiados por decapitação. A seguir, as amostras de sangue foram coletadas em tubos tipo *Falcon* (TPP), centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R) e armazenadas em freezer à -80ºC (Thermo Fisher Scientific LLC). As concentrações séricas de glicose foram determinadas utilizando-se kit específico (CELMÒ) e analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Technicon, RA-XTTM System, Global Medical Instrumentation).

3.3.2 Intensidade do estresse

O nível de intensidade de estresse foi determinado pelos seguintes parâmetros: os níveis séricos de corticosterona e o peso das glândulas adrenais (TEEGARDEN; BALE, 2007) A concentração hormonal foi determinada pelo método de radioimunoensaio utilizando-se kit

específico (Coat-A-Count Rat Corticosterone – Diagnostic Products Corporation). As adrenais foram coletadas, dissecadas e o peso foi avaliado.

3.4 COMORBIDADES ASSOCIADAS À OBESIDADE E AO ESTRESSE

Considerando que a dieta hipercalórica, o desenvolvimento da obesidade e o estresse podem apresentar comorbidades como, hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia, (CARROL; TYAGI, 2005; RELLING et al., 2006) foram avaliados nos quatro grupos as seguintes variáveis:

3.4.1 Pressão arterial sistêmica

A pressão arterial foi avaliada pela mensuração da pressão arterial sistólica caudal (PAS), por plestimografia, utilizando-se electro-sphymomanometer, Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Inc). Com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal, os animais foram pré-aquecidos a 40°C por 5 minutos. O manguito foi colocado em torno da cauda do animal e conectado a um transdutor de pulso. Em seguida, o manguito foi insuflado a um valor superior à pressão arterial sistólica e, desinflado, para registro das pulsações arteriais em polígrafo Gould, modelo RS 3200. A PAS foi aferida a cada três semanas (momentos 0, 3, 6, 9, 12 e 15). O valor da PA foi a média de três registros consecutivos obtidos a intervalos de 1 minuto.

3.4.2 Resistência à insulina

Para esta metodologia, os animais foram submetidos a um período de jejum de 6 horas. As coletas sangüíneas, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal e após administração intraperitoneal de insulina regular (Novolin® R) equivalente a 1,5 UI/kg, tendo sido coletadas nos momentos 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos. O glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche®) foi utilizado para mensuração dos níveis glicêmicos.

3.4.3 Intolerância à glicose

Assim como no teste de tolerância à insulina, os animais foram submetidos a um período de jejum de 6 horas. As coletas de sangue, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal e após administração intraperitoneal de glicose 25% (Sigma®-Aldrich) equivalente a 2,0 g/kg, nos momentos 0, 15, 30, 60, 90, 120 e 180 minutos. O glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche®) foi utilizado para mensuração dos níveis glicêmicos.

3.4.4 Concentrações séricas de insulina e leptina

As concentrações hormonais foram determinadas pelo método de ELISA utilizando-se kits específicos (Linco Research Inc). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de micro-placa (Spectra MAX 190).

3.5 PORCENTAGEM DE UMIDADE NOS TECIDOS

Em razão da obesidade poder acarretar aumento na volemia corporal dos ratos, 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, realizou-se a pesagem in natura. Em seguida, as amostras foram submetidas à secagem em estufa (Kamp Metalúrgica), sob temperatura de 55 ± 5°C, por um período de 48 horas. A determinação do teor de água foi expressa em valores relativos e calculada pela seguinte fórmula: [(PN-PS)/PN] x 100%, onde PN representa o peso *in natura* e o PS o peso seco.

3.6 CARACTERIZAÇÃO DA REMODELAÇÃO CARDIOVASCULAR

3.6.1 Coração

O coração foi analisado por meio de estudos estruturais e funcionais. A estrutura foi avaliada *in vitro* por meio de ecocardiograma e *post mortem* por análises macroscópicas. A função do ventrículo esquerdo foi analisada *in vivo* por meio de ecocardiograma e *in vitro* utilizando o músculo papilar isolado do ventrículo esquerdo.

3.6.1.1 Avaliação ecocardiográfica

A avaliação funcional e morfológica do ventrículo esquerdo foi avaliada por meio do ecocardiograma. Esta metodologia permite avaliar o desempenho ventricular do coração *in situ*, portanto sujeito às variações de pré-carga, pós-carga, contratilidade e freqüência cardíaca. Os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10mg/kg) por via intraperitonial. Após tricotomia da região anterior do tórax, os animais foram posicionados em decúbito lateral esquerdo para realização do ecocardiograma com ecocardiógrafo (*Philips* HDI 5000) equipado com transdutor eletrônico de 12 MHz. Para medir as estruturas cardíacas, utilizou-se imagens em modo-M com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional com o transdutor na posição paraesternal eixo menor. A imagem monodimensional do ventrículo esquerdo foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. Ainda, imagens da aorta e do átrio esquerdo também foram obtidas na posição paraesternal eixo menor com o cursor do modo-M posicionado ao nível da valva aórtica. O registro da imagem monodimensional foi realizado por meio de impressora (UP-895MD *Sony Co*). Posteriormente, as estruturas cardíacas foram medidas manualmente com o auxílio de um paquímetro em, pelo menos, cinco ciclos cardíacos consecutivos. O diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE) e a espessura diastólica da parede posterior do VE (EDPP) e do septo intraventricular (EDSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro máximo da cavidade. O diâmetro sistólico do VE (DSVE) e a espessura sistólica da parede posterior do VE (ESPP) e septo intraventricular (ESSIV) foram medidos no momento correspondente ao diâmetro mínimo da cavidade. A espessura relativa da parede do VE foi medida pelo EDPP/DDVE e a massa do VE foi calculada por meio da seguinte fórmula: $\{[(DDVE + EDPP + EDSIV)^3 – DDVE^3] \times 1.04\} / 1000$, onde o valor de 1,04 indica

a densidade específica do miocárdio. O índice de massa do VE foi calculado pela normalização da massa do VE pelo peso corporal.

A função sistólica do VE foi avaliada calculando-se a porcentagem de encurtamento endocárdico: [(DDVE - DSVE) / DDVE] x 100; porcentagem de encurtamento médio: {[(DDVE + ½ EDPP + ½ EDSIV) – (DSVE + ½ ESPP + ½ ESSIV)] / (DDVE + ½ EDPP +½ EDSIV)} x 100 e a velocidade de encurtamento da parede posterior do VE (VEPP: tangente máxima do movimento sistólico da parede posterior). O índice cardíaco foi mensurado pela razão entre o débito cardíaco e o peso corporal. No estudo da função diastólica do VE foram medidos os picos das velocidades do fluxo transvalvar mitral correspondente à fase de enchimento inicial (onda E) e tardia, consequente à contração atrial (onda A), bem como o cálculo da relação onda E/onda A.

3.6.1.2 Estrutura do coração *post mortem*

As análises estruturais macroscópicas *post mortem* permitem identificar a presença de remodelação cardíaca a nível atrial e ventricular. A remodelação cardíaca macroscópica, que identifica a presença de hipertrofia, foi determinada pela análise dos seguintes parâmetros: peso do átrio, dos ventrículos esquerdo e direito, e das respectivas relações com o peso corporal final e o comprimento da tíbia.

3.6.1.3 Estudo funcional do músculo papilar isolado

O desempenho mecânico dos músculos papilares foi avaliado de acordo com a técnica utilizada rotineiramente em nosso laboratório. Este tipo de preparação permite o controle preciso da pós-carga e da pré-carga, o que é difícil de ser obtido no coração *in vivo*, e possibilita a análise da contratilidade miocárdica independentemente de variações de carga, frequência cardíaca, influência hormonal e substrato energético.

Ao término do período experimental, os animais foram anestesiados e submetidos à toracotomia mediana. Os corações foram rapidamente removidos e colocados em solução de Kreb's-Henseleit com a seguinte composição em mM: 118,5 NaCl; 4,69 KCl; 1,25 $CaCl_{2;}$ 1,16 $MgSO_4$; 1,18 KH_2PO_4; 5,50 glicose e 24,88 Na_2CO_3, mantidos à temperatura de 28°C, previamente oxigenada durante 10 minutos com 95% de oxigênio (O_2) e 5% de dióxido de carbono (CO_2). Depois de permanecidos aproximadamente 1 minuto na solução, os corações foram retirados e o ventrículo direito dissecado com a finalidade de expor o septo interventricular. Este foi dividido ao meio a fim de permitir a exposição adequada dos dois músculos papilares, anterior e posterior, do ventrículo esquerdo. Esses foram cuidadosamente dissecados, mantendo-se nas suas extremidades segmentos da parede ventricular. Esses fragmentos foram presos a anéis de aço inoxidável com diâmetro interno de 3,8 a 4,2 mm. O músculo papilar utilizado, após ter suas extremidades presas aos anéis, foi rapidamente transferido para câmara de vidro contendo solução de Krebs-Henseleit, continuamente oxigenada com 95% de O_2 e 5% de CO_2 e mantido à temperatura de 28°C, com auxílio de banho circulante (PAPST, K-5058). O músculo foi posicionado verticalmente e sua extremidade inferior acoplada a um fio de aço inoxidável, 0,38 mm de diâmetro, conectado a um transdutor de força (Grass FT03 Force Displacent, GRASS Technologies, Na Astro-Med, Inc. Product Hroup). O fio de

aço atravessava uma fenda, preenchida por mercúrio, existente no assoalho da câmara de vidro. A porção superior tendinosa do músculo foi conectada a um fio de aço, semelhante ao anterior, que estava ligado à extremidade do braço longo de uma alavanca isotônica. Sobre esta extremidade havia um micrômetro (The L.S. Starrett. Co. Athol.Mass.USA. nº463) que, controlava a extensão dos movimentos da alavanca, permitindo ajustar o comprimento de repouso do músculo. Na extremidade do braço curto da alavanca foi suspenso, por fio de aço, um peso de 5,0 g, denominado *pré-carga*, que teve por finalidade promover o estiramento inicial do músculo papilar. A alavanca era de alumínio, rígida e leve, sendo a razão entre os braços longo e curto de 4:1.

Os músculos papilares foram estimulados 12 vezes por minuto (0,2 Hz) por meio de eletrodos de platina tipo agulha (E8 – Grass), posicionados paralelamente ao eixo longitudinal dos músculos. Os eletrodos foram acoplados a estimulador elétrico que emitia estímulos em onda quadrada de 5 mili-segundos. A voltagem de estímulo, 12 a 15 volts, corresponde a 10% acima do valor mínimo necessário para provocar resposta mecânica máxima do músculo. O pH da solução Krebs-Henseleit estava entre 7,38 a 7,42 e a pressão parcial de oxigênio da solução era mantida entre 550 a 600 mmHg.

Após o período de 60 minutos, nos quais os músculos contraíram contra a pré-carga sem desenvolverem força - contração isotônica - foi colocada carga adicional de 50 g, denominada *pós-carga*, na extremidade do braço curto da alavanca. A carga total, pré-carga mais a pós-carga, impedia que os músculos encurtassem, passando os mesmos a desenvolverem somente força, contração isométrica. O excessivo estiramento muscular que poderia ser causado pela adição da pós-carga foi evitado pelo micrômetro que impediu a movimentação da alavanca.

Após a estabilização do músculo em contração isométrica, este foi progressivamente estirado, por meio do micrômetro, até a força desenvolvida atingir o seu valor máximo. O comprimento de estiramento da fibra muscular associado com a força ou tensão máxima desenvolvida, em contração isométrica, denominou-se Lmax. Após atingir Lmax, o músculo foi novamente colocado em contração isotônica durante 5 minutos. A seguir, o músculo papilar foi recolocado em contração isométrica, para determinação final de Lmax. O registro das variáveis foi iniciado após verificar se o músculo permaneceu estável em contração isométrica durante 15 minutos.

3.6.1.3.1 Parâmetros funcionais

Os seguintes parâmetros foram analisados: tensão desenvolvida (TD, g/mm^2), tensão de repouso (TR, g/mm^2), velocidade de variação da tensão desenvolvida (+dT/dt, $g/mm^2/s$), velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida (-dT/dt, $g/mm^2/s$). A curva de contração isométrica, que foi obtida durante os experimentos, está representada abaixo (Figura 4).

As contrações isométricas foram registradas em um sistema de aquisição de dados computadorizados (AcqKnowledge® MP 100, Byopac Systems, Inc). A análise das curvas permitiu determinar os valores dos parâmetros mecânicos. Os valores da TD, g/mm^2, TR, g/mm^2, +dT/dt, $g/mm^2/s$ e -dT/dt, $g/mm^2/s$ foram divididos pela área seccional do músculo papilar. Este processo de normalização permitiu comparar o desempenho de músculos de diferentes tamanhos. Os dados obtidos estão apresentados em valores absolutos (g/mm^2).

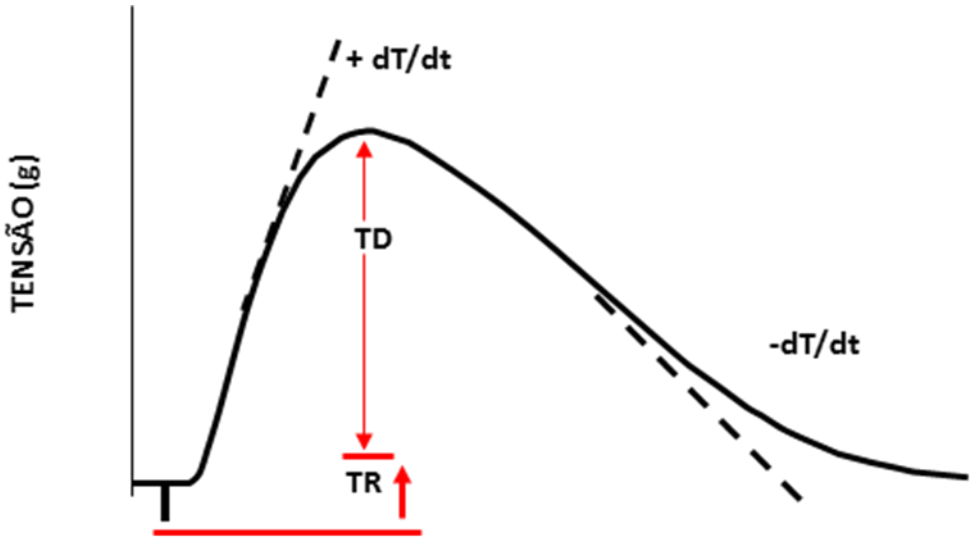

Figura 4- Representação da curva de contração isométrica.

3.6.1.3.2 Protocolo funcional

O desempenho mecânico dos músculos papilares em contração isométrica foi analisado sob condição basal e após diferentes manobras inotrópicas. Estas foram realizadas com a finalidade de identificar alterações da contração e do relaxamento que poderiam não ser observadas em condições basais. Além disso, as mesmas podem auxiliar no entendimento dos possíveis mecanismos relacionados com as alterações da função mecânica do miocárdio. As manobras mais frequentemente utilizadas são: potencial pós-pausa, variação da concentração de Ca^{2+} extracelular e alteração da freqüência de estímulo cardíaco, que permitem identificar a participação do trânsito de Ca^{2+} intracelular na patogênese da disfunção do miocárdio.

3.6.1.3.2.1 Protocolo funcional em condição basal

A obtenção dos dados em condição basal foi realizada com concentração de Ca^{2+} de 2,5 mM na solução de Kreb's-Henseleit.

3.6.1.3.2.2 Manobras inotrópicas

As seguintes manobras inotrópicas miocárdicas com efeitos positivos e negativos foram realizadas

3.6.1.3.2.2.1 Potencial pós-pausa

O potencial pós-pausa é um instrumento utilizado para estudar a função de liberação e armazenamento de Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático. Além disso, esta manobra permite analisar indiretamente o trocador Na^{+}/Ca^{2+}. A relação entre PPP e a função miocárdica foi realizada com concentração de Ca^{2+} de 0,5 mM de Kreb's Henseleit e após períodos de repouso de 10, 30 e 60 segundos com intervalos de 5 minutos entre cada elevação. Os períodos crescentes tiveram como finalidade disponibilizar maiores quantidades de Ca^{2+} citosólico e, portanto intensificar a magnitude do desempenho do músculo cardíaco.

3.6.1.3.2.2.2 Elevação da frequência cardíaca

A relação entre freqüência de batimentos e função cardíaca permite avaliar o trânsito de Ca^{2+} intracelular e o acoplamento excitação-contração. Esta manobra foi realizada com concentração de Ca^{2+} de 1,0 mM na solução de Kreb's Henseleit e após aumento seqüencial da frequência de estímulo de 0,2 para 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 1,0 e 0,2Hz, com intervalos de 5 minutos entre cada elevação.

3.6.1.3.2.2.3 Elevação da concentração de Ca^{2+} extracelular

A elevação da concentração de Ca^{2+} intracelular acarreta aumento do fluxo desse íon por meio dos canais lentos de Ca^{2+} e pela troca Na+/Ca^{2+}, o que permite avaliar os mecanismos relacionados com o transporte de Ca^{2+} intracelular e a função miocárdica. A elevação da concentração de Ca^{2+} na solução de Kreb's-Henseleit foi realizada com aumentos sequenciais de Ca^{2+} de 0,5 para 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM com intervalos de 5 minutos entre cada concentração.

3.6.1.3.2.2.4 Elevação da concentração de Ca^{2+} extracelular na presença do diltiazem

O diltiazem é um bloqueador específico de canais lentos sarcolemais da classe benzodiazepínicas (BUDRIESI et al., 2009). Os canais L no coração contêm subunidades α1c que são altamente sensíveis ao diltiazem, o que resulta em diminuição da entrada de Ca^{2+} miocárdico. Neste experimento, os músculos foram avaliados em elevação de Ca^{2+} de 0,5 para 1,0, 1,5, 2,0 e 2,5 mM com ausência ou presença do bloqueador. A concentração de diltiazem (Sigma Aldhrich Co.) e o tempo de exposição ao bloqueador para a realização do experimento

foram, respectivamente, 10^{-4} M e 60 minutos. Os dados obtidos foram expressos em porcentagem média de bloqueio.

As ações do bloqueador, diltiazem, sobre a função mecânica do músculo papilar foram expressas em variações percentuais médias (Δ) em relação ao momento da curva de Ca^{2+} sem a presença do bloqueador especifico (Ex: % média de bloqueio = valor da TD na concentração de 0,5 de Ca^{2+} intracelular com bloqueador em relação ao valor da TD na concentração de 0,5 de Ca^{2+} intracelular sem bloqueador). Este cálculo foi realizado pela seguinte fórmula: Δ(%) = (M2-M1)/M1x100, onde M1 é o valor na condição basal e M2 é o valor em resposta à variação da concentração de diltiazem.

Após o término das manobras de avaliação mecânica dos músculos papilares, os mesmos foram retirados da preparação e usados para a avaliação da área seccional. Os parâmetros morfológicos utilizados para caracterizar os músculos papilares foram: comprimento (mm), peso (mg) e área seccional (mm2). O comprimento *in vitro* (Lmáx) foi medido com auxílio de um catetômetro Gartner (Gartner Scientific Corporation). A porção muscular entre os anéis de aço foi cortada, submetida à secagem com papel filtro e pesada. Considerando- se que o músculo papilar tem forma cilíndrica, uniforme e peso específico, a área seccional foi calculada dividindo-se o peso pelo comprimento determinado em Lmáx.

Os músculos papilares dissecados inadequadamente ou que apresentaram comportamento funcional fora do padrão de normalidade foram excluídos do estudo. O desempenho mecânico foi considerado inadequado quando os valores das variáveis obtidos em contração isométrica apresentaram afastamento superior a 1,96 desvios padrão da média. Os músculos papilares que apresentaram área seccional entre 0,5 e 1,5 mm^2 foram utilizados no

experimento. Estes experimentos e procedimentos foram realizados nos grupos DN, DN/ES, DH e DH/Es.

3.6.2 Vaso

A avaliação da remodelação vascular foi verificada por meio de estudos funcional e estrutural.

3.6.2.1 Reatividade vascular

A análise funcional dos vasos foi feita utilizando-se as artérias aorta descendente. Nestes segmentos foi avaliada a reatividade vascular, de acordo com a metodologia descrita abaixo. Após serem mortos por decapitação, os animais foram submetidos à toracotomia, e em seguida procedeu-se o isolamento da aorta torácica. Após a remoção do tecido adiposo, a aorta foi subdividida em quatro anéis. Indistintamente, dois dos anéis tiveram os endotélios removidos mecanicamente. Os anéis foram suspensos em cuba para órgão isolado, contendo solução de Kreb's-Henseleit modificado (composição em mM: NaCl 113,0; KCl 4,7; $CaCl_2$ 2,5; KH_2PO_4 1,2; $MgSO_4$ 1,1; $NaHCO_3$ 25,0; Glicose 11,0; ácido ascórbico 0,11). A solução nutriente foi mantida a 37,0 $\pm$ 0,5^{o}C e saturada com carbogênio (95% O_2 e 5% CO_2). Os anéis foram conectados a transdutores de força isométricos, acoplados a um fisiógrafo (Ugo Basile). O período de estabilização foi de 1h, sob uma tensão inicial de 1,5 g mantida ao longo de todo o experimento, com trocas de solução nutriente e ajuste de tensão a cada 15 minutos.

A avaliação da função endotelial foi analisada a partir das respostas aos agentes vasoconstritores, cloreto de potássio e noradrenalina, e vasodilatadores, acetilcolina e nitroprussiato de sódio. Os experimentos foram desenvolvidos em anéis de aorta com (+E) e sem (-E) endotélio, estudados em paralelo.

3.6.2.1.1 Curvas concentração-efeito do cloreto de potássio (KCl)

Ao se completar o período de estabilização de 1h, as preparações foram inicialmente desafiadas com KCl na concentração de 60mM. Posteriormente, foram determinadas de modo cumulativo as curvas concentração-efeito (CCEs) ao KCl nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50, 60 e 70 mM.

3.6.2.1.2 Curvas concentração-efeito à noradrenalina (NA)

Ao se completar o período de estabilização de 1h, as preparações foram desafiadas com KCl na concentração de 60mM. Posteriormente, foram determinadas de modo cumulativo, as curvas concentração-efeito à NA (Sigma), nas concentrações de 10^{-11} a 10^{-4} M.

Ao final das CCEs, concentrações únicas de ACh (Sigma), 10^{-6} M, e NP (Sigma), 10^{-4} M, foram utilizadas para testar a integridade da célula endotelial e da camada muscular lisa, respectivamente.

3.6.2.1.3 Curvas concentração efeito à noradrenalina na presença de prazosin

Quando pertinente, o prazosin (Sigma), 10^{-8} M, que é antagonista reversível para receptor α_1 adrenérgico, foi adicionado 30min antes da realização da CCE à NA, permanecendo em contato com a preparação até o término do experimento.

Ao final das CCEs, concentrações únicas de ACh, 10^{-6} M, e NP, 10^{-4} M, foram utilizadas para testar a integridade da célula endotelial e da camada muscular lisa, respectivamente.

3.6.2.1.4 Curvas concentração efeito à noradrenalina na presença de N^G-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)

Quando pertinente, o L-NAME (Sigma), $3x10^{-4}$ M, que é inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), foi adicionado 30min antes da realização da CCE à NA, permanecendo em contato com a preparação até o término do experimento.

Ao final das CCEs, concentrações únicas de ACh, 10^{-6} M, e NP, 10^{-4} M, foram utilizadas para testar a integridade da célula endotelial e da camada muscular lisa, respectivamente.

3.6.2.1.5 Curvas concentração efeito à acetilcolina (ACh) e ao nitroprussiato de sódio (NP)

Ao se completar o período de estabilização de 1h, anéis de aorta foram pré-contraidos com noradrenalina, 10^{-7} M, e as CCEs à ACh foram obtidas nas concentrações de 10^{-13} a 10^{-4} M.

Posteriormente, após terem sido reestabilizadas, os anéis foram pré-contraídos novamente com noradrenalina, 10^{-7} M, e as CCEs foram obtidas com NP nas concentrações 10^{-12} a 10^{-4} M.

3.6.2.1.6 Contribuição do Ca^{2+} intracelular e extracelular na resposta à noradrenalina

Para analisar a contribuição relativa da liberação de Ca^{2+} intracelular na reatividade vascular à noradrenalina, resposta contrátil a este agonista foi obtida em solução de Kreb's-Henseleit livre de Ca^{2+}. Anéis (–E), para evitar o envolvimento de qualquer fator endotelial, foram expostos a essa solução por 1min e então foram estimulados com noradrenalina nas concentrações de 10^{-7} e 10^{-6}M, e a resposta máxima obtida foi avaliada. Além disso, o papel da mobilização do Ca^{2+} extracelular foi investigado por meio da contração induzida por cloreto de cálcio ($CaCl_2$) na presença de noradrenalina. Anéis (–E) foram primeiramente contraídos com noradrenalina, 10^{-7} M, para depleção dos estoques de Ca^{2+} intracelular em solução de Kreb's Henseleit livre de Ca^{2+} contendo EDTA (1mM) (por aproximadamente 90min), e então foram lavados em solução de Kreb's Henseleit livre de Ca^{2+} (sem EDTA) contendo noradrenalina, 10^{-7} M.

3.6.2.1.7 Avaliação de reatividade vascular

A reatividade vascular foi avaliada através das alterações da resposta máxima e potência (concentração eficaz 50% - CE50) do tecido aos agentes vasoconstritores e vasodilatadores em experimentos individuais. A CE50 é definida como a concentração molar do agonista

responsável pela obtenção de um efeito igual a 50% do efeito máximo. As CE50s foram medidas por determinação gráfica e as médias foram apresentadas como antilogarítmo da média aritmética dos log CE50 de cada experimento, com os respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%.

Para verificação da potência do antagonismo do prazosin nas CCEs à noradrenalina entre os diferentes grupos experimentais, o pA_2 foi calculado. Esta verificação foi estimada através da equação (1): pA2= log(CR-1)-logB, na qual CR é o log da diferença entre os valores de CE50 na ausência e na presença do antagonista e B é a concentração molar do antagonista (10^{-8}), (ARUNLAKSHANA; SHIELD, 1959).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise das características gerais, nutricionais, morfológicas e funcionais *in vivo, in situ* e *in vitro* em condição basal, bem como dos parâmetros de reatividade vascular, foram realizados pela de análise de variância (ANOVA) no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Tukey.

O desenvolvimento do peso corporal e a comparação do perfil glicêmico entre os grupos, visualizado tanto pelo teste de tolerância à insulina quanto pelo teste de tolerância à glicose, foram realizados pela ANOVA no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

As variáveis relacionadas ao estudo funcional do músculo papilar, após a realização das diferentes manobras inotrópicas, foram analisadas pela ANOVA no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

As ações do bloqueador, diltiazem, sobre a função mecânica do músculo papilar foram apresentadas por variações percentuais e submetidas a ANOVA no modelo de medidas repetidas para esquema de dois fatores independentes e complementada com o teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL NUTRICIONAL

A Tabela 1 mostra o perfil nutricional dos grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es. A dieta hipercalórica tornou os ratos DH obesos quando avaliados pelo índice de adiposidade (DH= 6,45 ± 2,16*; DN= 4,09 ± 1,48; $P<0.05$) O resultado mais importante deste trabalho em relação ao perfil nutricional é que o estresse impediu o desenvolvimento da obesidade nos ratos submetidos à dieta hipercalórica (DH/Es= 4,45 ± 1,52; DN= 4,09 ± 1,48; $P>0.05$). Outros avaliadores do perfil nutricional como, o peso corporal final, ingestão calórica, eficiência alimentar, ganho de peso, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral e a gordura corporal total foram maiores no DH do que o grupo DN. Entretanto, a ingestão alimentar foi maior nos animais do grupo DN e DN/Es. A glicose se mostrou elevada nos grupos DN/Es, DH e DH/Es em relação ao grupo DN, mostrando que o estresse *per se* alterou o perfil glicêmico.

A Figura 5 mostra o desenvolvimento semanal do peso corpóreo de ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. A partir da 5ª semana de idade houve um aumento de peso corpóreo significativo dos ratos DH em relação ao grupo DH/Es; esta diferença de peso se manteve até o final do protocolo. Na 12ª semana houve diferença significativa entre os grupos DN e DH, que se manteve até o término do protocolo. O conjunto de dados do perfil nutricional mostra que o

grupo DH ficou obeso, e que o estresse impediu o desenvolvimento da obesidade no grupo DH/Es.

Tabela 1- Perfil nutricional

Variáveis	Grupos			
	DN (n=20)	**DN/Es (n=20)**	**DH (n=20)**	**DH/Es (n=20)**
PCI (g)	139 ± 12	137 ± 17	140 ± 12	141 ± 11
PCF (g)	438 ± 49	421 ± 33	482 ± 54*	430 ± 31
Ingestão alimentar (g/dia)	23,1 ± 1,9#	23,2 ± 2,1#	21,2 ± 2,4	19,1 ± 2,3
Ingestão calórica (kcal/dia)	68,7 ± 5,1	69,2 ± 8,6	80,3 ± 7,8*	69,8 ± 6,3
Eficiência alimentar (g/Kcal)x100	2,24 ± 0,25	2,25 ± 0,32	2,64 ± 0,30*	2,41 ± 0,34
Ganho de peso (g)	299 ± 52	284 ± 56	342 ± 58*	289 ± 20
Gordura Epididimal (g)	6,78 ± 2,54	6,68 ± 3,15	11,2 ± 4,5*	6,82 ± 2,64
Gordura Retroperitoneal (g)	7,25 ± 3,61	7,02 ± 4,83	11,8 ± 5,1*	7,81 ± 2,98
Gordura Visceral (g)	4,76 ± 2,98	4,96 ± 3,70	8,61 ± 3,75*	4,65 ± 2,33
Gordura total (g)	18,8 ± 8,6	18,7 ± 11,2	31,5 ± 12,8*	19,3 ± 7,3
Índice de Adiposidade (%)	4,09 ± 1,48	4,07 ± 1,88	6,45 ± 2,16*	4,45 ± 1,52
Glicose (mg/dl)	92,1 ± 6,3	118 ± 11†	116 ± 13†	122 ± 10†

Dados expressos em média ± desvio padrão. DN: ratos mantidos em dieta normocalórica por 15 semanas; DN/Es: ratos mantidos em dieta normocalórica e submetidos ao estresse crônico de imobilização por 15 semanas; DH: ratos mantidos em dieta hipercalórica por 15 semanas; DH/Es: ratos mantidos em dieta hipercalórica e submetidos ao estresse crônico de imobilização por 15 semanas; PCI: peso corporal inicial; PCF: peso corporal final. Análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey Kramer. *P<0.05 DH vs DN e DH/Es. †P<0,05 DN/Es e DH vs DN, sem diferença estatística entre os grupos DN/Es, DH e DH/Es.

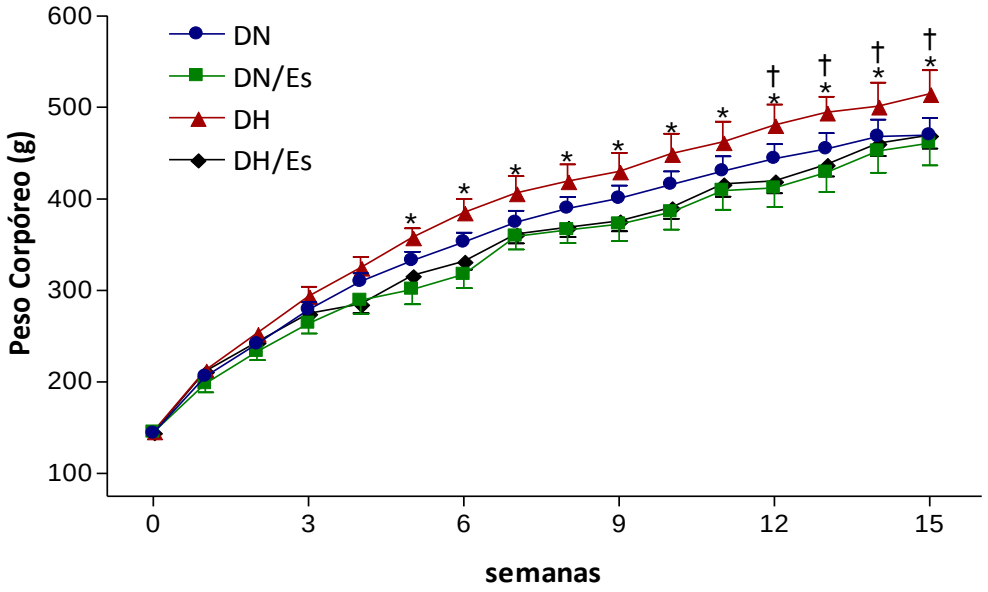

Figura 5- Desenvolvimento do peso corpóreo (n=20). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* para modelos de medidas repetidas em grupos independentes e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05 DH em relação DH/Es; †P<0,05 DH em relação DN.

4.2 COMORBIDADES

4.2.1 Teste de resistência à insulina

A Figura 6 ilustra o resultado do teste de resistência à insulina realizado nos grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Os níveis glicêmicos foram semelhantes nos grupos DN, DH/Es, DH e DH/Es no momento 0 e 30. Entretanto, após a administração intraperitoneal de insulina, momentos 5, 10, 15 e 25 min para o grupo DH e 5 e 10 min para o grupo DH/Es, a glicemia mostrou-se elevada em relação aos grupos DN e DN/Es, respectivamente

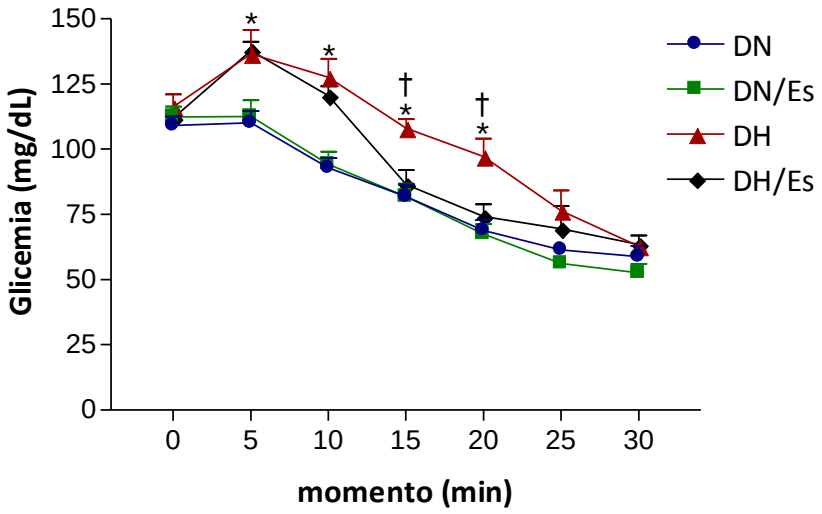

Figura 6- Teste de resistência à insulina (n=10). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* para modelos de medidas repetidas em grupos independentes e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05 DH e DH/Es vs DN e DN/Es; †P<0,05 DH vs DN e DH/Es.

4.2.2 Teste de tolerância à glicose

A Figura 7 ilustra o resultado do teste de tolerância à glicose realizado nos grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Os níveis glicêmicos não diferiram nos grupos DN, DH/Es, DH e DH/Es no momento 0 e 15 minutos, decaindo de modo semelhante nos grupos DN e DN/Es, a partir dos 30 minutos. Entretanto, o grupo DH teve a glicemia aumentada em relação ao grupo DN nos momentos 30 a 180 min, enquanto que o grupo DH/Es mostrou a glicemia aumentada em relação ao grupo DN/Es nos momentos 30 e 60 min.

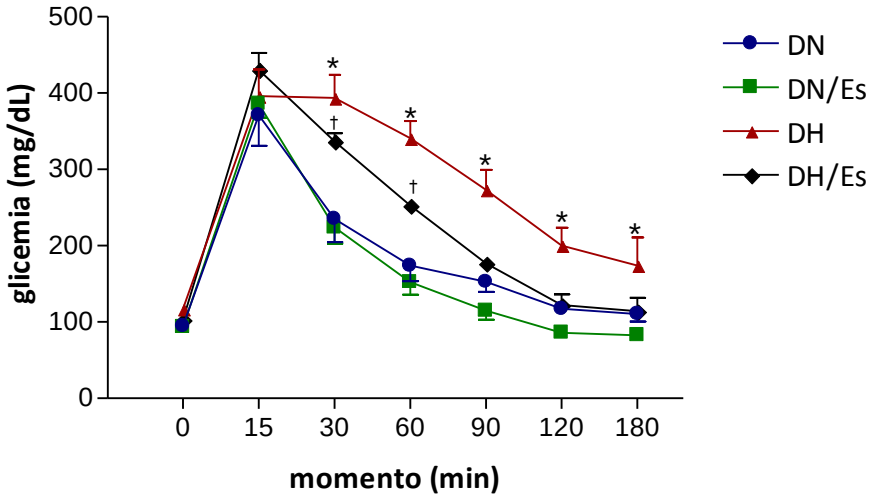

Figura 7- Teste de tolerância à glicose (n=10). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* para modelos de medidas repetidas em grupos independentes e pós-teste de Bonferroni. *P<0,05 DH vs DN e DH/Es; †P<0,05 DH/Es vs DN/Es.

4.2.3 Hiperinsulinemia

A Figura 8 mostra a concentração plasmática do hormônio insulina. O grupo DN/Es teve aumento nos níveis séricos de insulina em relação ao grupo DN. Ainda, o aumento dos níveis no grupo DH/Es não diferiu do grupo DN/Es. Entretanto, o grupo DH teve aumento significativo em relação tanto ao grupo DN quanto ao grupo DH/Es.

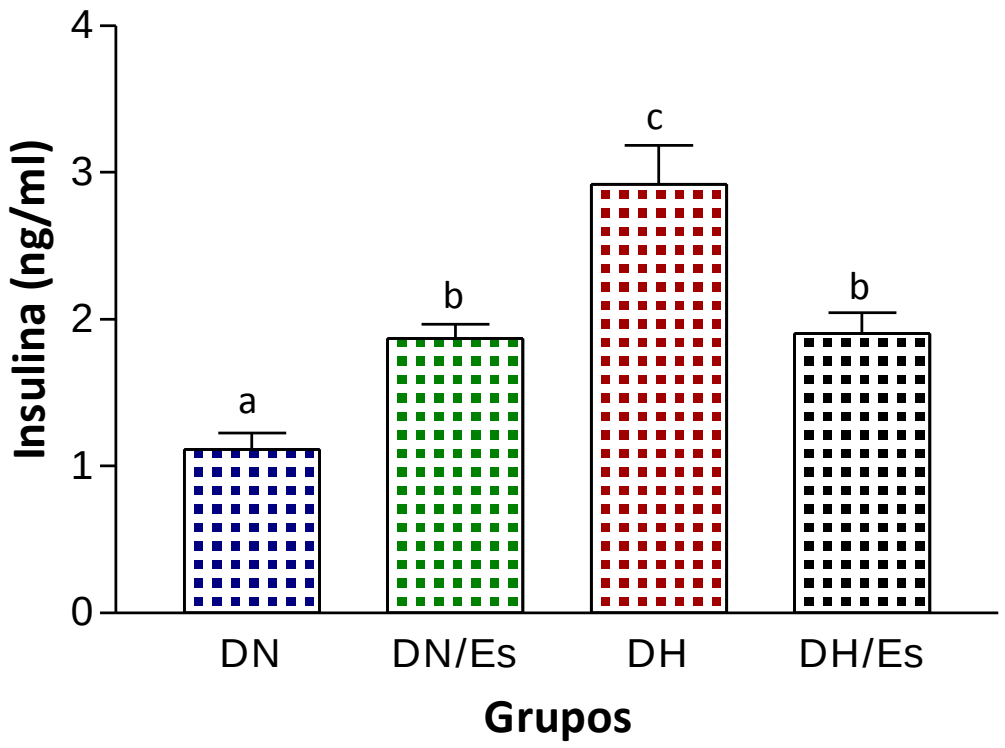

Figura 8- Níveis séricos de insulina (n=5-7). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Letras diferentes simbolizam diferença estatística significativa (P<0,05).

4.2.4 Hiperleptinemia

A Figura 9 mostra a concentração plasmática do hormônio leptina. Os níveis séricos de leptina do grupo DH mostraram-se aumentados quando comparados aos grupos DN e DH/Es. Ainda, o grupo DH/Es não diferiu do grupo DN/Es. Não houve diferença estadística significativa entre os grupos DN e DN/Es.

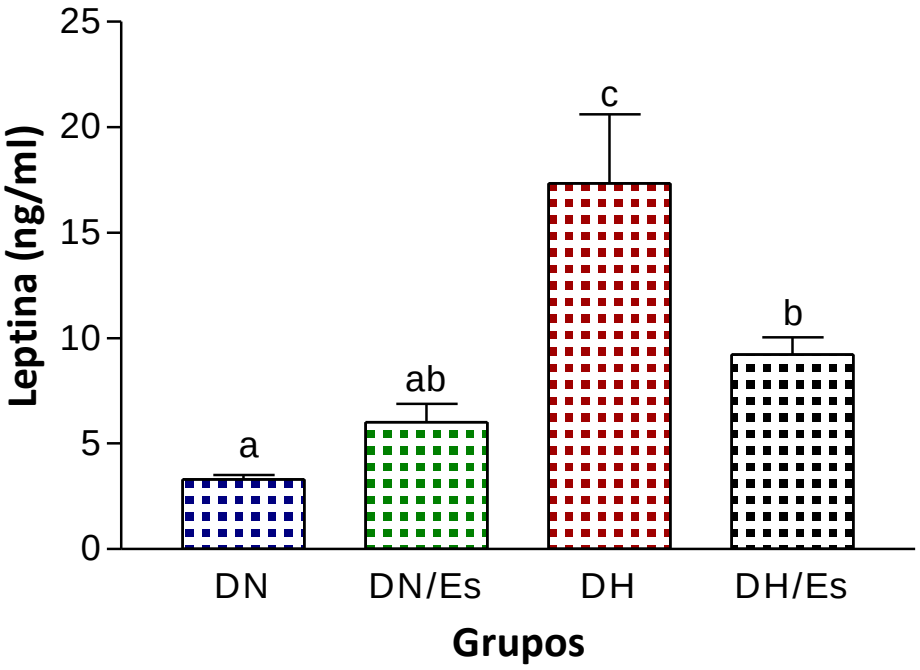

Figura 9- Níveis séricos de leptina (n=5-7). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Bonferroni. Letras diferentes simbolizam diferença estatística significativa (P<0,05).

4.2.5 Hipercosticosteronemia

A Figura 10 mostra a concentração plasmática do hormônio corticosterona. Ambos os grupos DN/Es e DH/Es tiveram aumento nos níveis séricos de corticosterona em relação aos seus respectivos controles. Estes níveis não diferiram entre os grupos DN e DH e entre os grupos DN/Es e DH/Es.

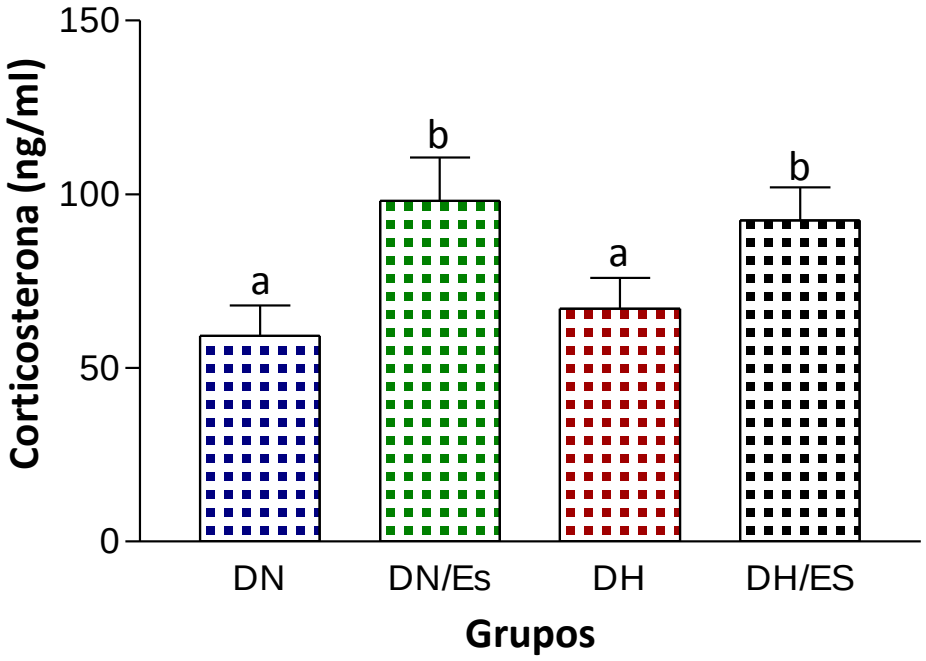

Figura 10- Níveis séricos de corticosterona (n=5). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Letras diferentes simbolizam diferença estatística significativa (P<0,05).

4.2.6. Peso das glândulas adrenais

A Figura 11 apresenta o peso das glândulas adrenais. Ambos os grupos DN/Es e DH/Es tiveram aumento do peso das glândulas em relação aos seus respectivos controles. Este peso não diferiu entre os grupos DN e DH e entre os grupos DN/Es e DH/Es.

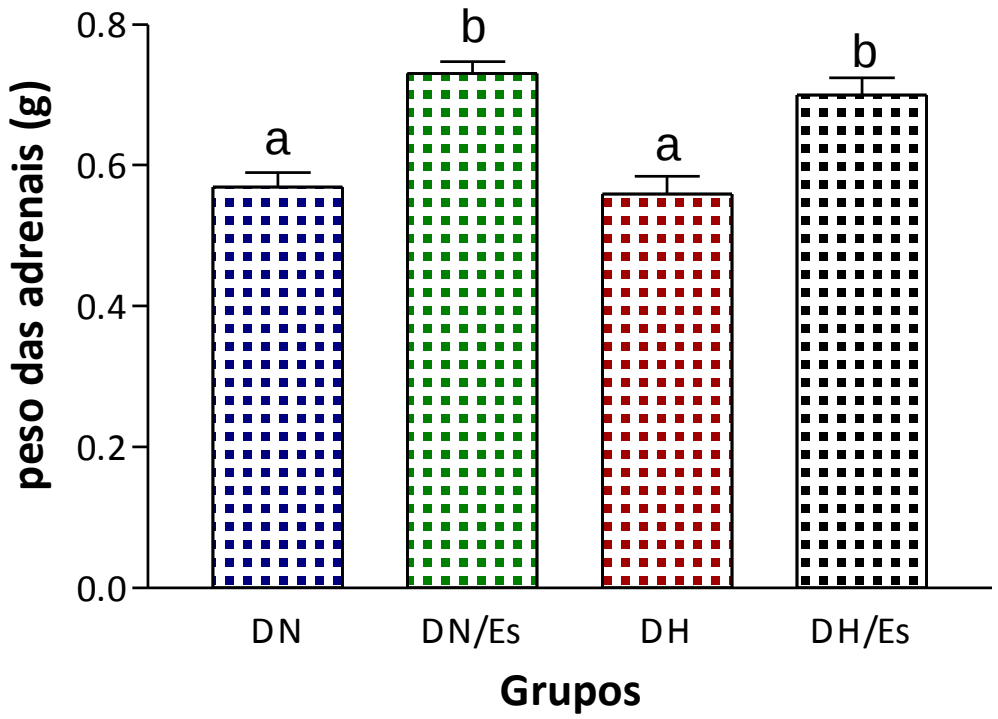

Figura 11- Peso das glândulas adrenais (n=20). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Letras diferentes simbolizam diferença estatística significativa (P<0,05).

4.2.7 Hipertensão arterial sistêmica

A Figura 12 ilustra os resultados de pressão arterial sistólica caudal nos grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es. A partir da 3ª semana, ambos os grupos DN/Es e DH/Es em relação aos seus respectivos grupos, tiveram aumento na pressão arterial significativo, que permaneceu até o término do experimento.

Os dados apresentados de comorbidades mostram que os modelos utilizados apresentaram alterações sistêmicas consistentes, sugerindo confiabilidade dos modelos.

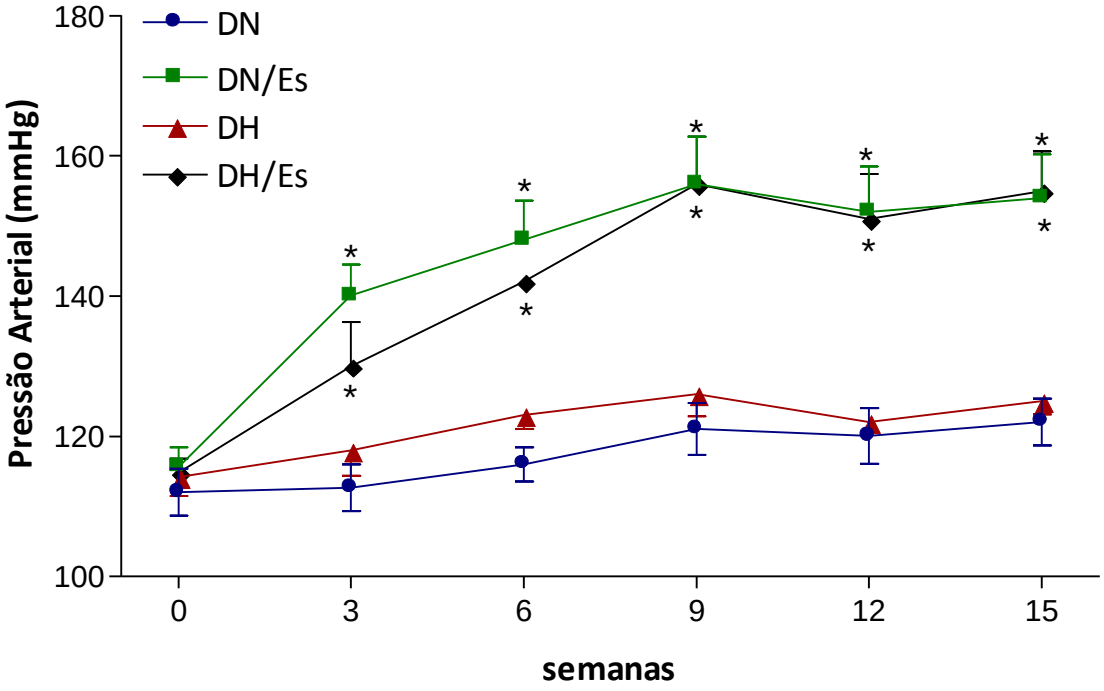

Figura 12- Desenvolvimento da pressão arterial sistólica semanal (n=20). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *P<0,05 DN/Es e DH/Es vs DN e DH.

4.3 PORCENTAGEM DE UMIDADE NOS TECIDOS

A Tabela 2 mostra a porcentagem de umidade dos tecidos dos ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Tabela 2- Porcentagem de umidade nos tecidos.

Variáveis	Grupos			
	DN (n=20)	**DN/Es (n=20)**	**DH (n=20)**	**DH/Es (n=20)**
VE (%)	75,4 ± 0,81	75,6 ± 0,82	76,0 ± 0,79	75,7 ± 0,80
VD (%)	75,7 ± 0,92	75,8 ± 1,01	75,6 ± 0,93	76,0 ± 0,91
AT (%)	77,8 ± 1,20	77,3 ± 1,83	76,9 ± 1,73	77,0 ± 1,70
Pulmão (%)	77,5 ± 0,55	77,3 ± 0,60	77,8 ± 0,81	77,6 ± 0,90
Fígado (%)	67,8 ± 0,86	67,6 ± 0,87	66,1 ± 1,25	66,6 ± 1,28

Dados expressos em média ± desvio padrão. VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey

4.4 ALTERAÇÕES CARDÍACAS

4.4.1 Análise estrutural macroscópica *post mortem*

A Tabela 3 apresenta o peso do coração dos grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es e suas respectivas relações com a tíbia e PCF. Os grupos DN/Es e DH/Es tiveram aumento na relação VE/PCF em relação aos grupos DN e DH. Nas demais varíaveis não ocorreu nenhuma alteração estatísticamente significativa.

Tabela 3- Análise macroscópica cardíaca.

Variáveis	Grupos			
	DN (n=20)	**DN/Es (n=20)**	**DH (n=20)**	**DH/Es (n=20)**
VE (g)	0,76 ± 0,11	0,81 ± 0,14	0,87 ± 0,12	0,79 ± 0,11
VD (g)	0,24 ± 0,06	0,25 ± 0,06	0,27 ± 0,06	0,26 ± 0,05
AT (g)	0,10 ± 0,05	0,08 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,09 ± 0,01
tíbia (cm)	4,41 ± 0,07	4,37 ± 0,10	4,39 ± 0,07	4,37 ± 0,09
VE/ tíbia	0,17 ± 0,02	0,18 ± 0,03	0,20 ± 0,02	0,18 ± 0,02
VD/ tíbia	0,054 ± 0,001	0,057 ± 0,002	0,061 ± 0,001	0,059 ± 0,001
AT/ tíbia	0,019 ± 0,001	0,019 ± 0,002	0,022 ± 0,003	0,020 ± 0,002
VE/PCF	1,71 ± 0,24	1,86 ± 0,37*	1,71 ± 0,22	1,84 ± 0,29*
VD/PCF	0,56 ± 0,97	0,57 ± 0,84	0,59 ± 0,82	0,60 ± 0,89
AT/PCF	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,20 ± 0,02
Pulmão (g)	1,64 ± 0,22	1,67 ± 0,20	1,69 ± 0,21	1,70 ± 0,21
Adrenais (g)	0,57 ± 0,09	0,73 ± 0,08*	0,56 ± 0,01	0,70 ± 0,01*

Dados expressos em média ± desvio padrão. VE: peso do ventrículo esquerdo; VD: peso do ventrículo direito; AT: peso do átrio; VE/tíbia: relação do peso do ventrículo esquerdo pela tíbia; VD/tíbia: relação do peso do ventrículo direito pela tíbia; AT/tíbia: relação do peso do átrio pela tíbia; 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. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey Kramer. *P<0,05 DN/Es e DH/Es vs DN e DH.

4.4.2 Análise ecocardiográfica

4.4.2.1 Análise estrutural

A Tabela 4 apresenta parâmetros estruturais do coração analisados por estudos ecocardiográficos nos ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Os grupos DN/Es e DH/Es tiveram um

aumento significativo no índice de massa do VE em relação aos seus respectivos controles. Não houve alterações estatisticamente significativas em outras variáveis.

Tabela 4- Análise estrutural ecocardiográfica.

Variáveis	Grupos			
	DN (n=8)	**DN/Es (n=8)**	**DH (n=8)**	**DH/Es (n=8)**
DDVE (mm)	8,33±0,41	8,28±0,42	8,38±0,54	8,67±0,27
DDVE/PCF (mm/g)	18,31±2,52	18,22±1,37	16,22±1,03	18,56±1,10
DSVE (mm)	3,79±0,23	3,92±0,11	3,87±0,16	4,04±0,19
EDPP (mm)	1,37±0,12	1,35±0,08	1,34±0,10	1,35±0,07
EDSIV (mm)	1,38±0,13	1,36±0,08	1,37±0,09	1,37±0,07
Espessura relativa VE	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01
AE (mm)	5,45±0,49	5,92±0,61	5,80±0,47	5,85±0,68
AE/PCF (mm/g)	12,0±2,17	13,0±1,89	11,62±1,51	12,5±1,36
Massa VE (mg)	0,81±0,12	0,79±0,11	0,82±0,16	0,88±0,08
Índice de Massa VE (mg/g)	1,67±0,21	1,78±0,15†	1,63±0,16	1,85±0,09†

Dados expressos em média ± desvio padrão. DDVE e DSVE: diâmetros diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo (VE); PCF: peso corporal final; EDPP: espessura diastólica da parede posterior do VE; EDSIV: espessura diastólica do septo ventricular; AE: diâmetro do átrio esquerdo. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey Kramer. *P<0,05 DN/Es e DH/Es em relação aos grupos DN e DH.

4.4.2.2 Análise funcional

A Tabela 5 mostra a avaliação funcional do ventrículo esquerdo por ecocardiograma em ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Não houve alterações funcionais do ventrículo esquerdo significativas entre os grupos.

Tabela 5- Análise funcional ecocardiográfica.

Variáveis	Grupos			
	DN (n=8)	**DN/Es (n=8)**	**DH (n=8)**	**DH/Es (n=8)**
FC (bpm)	294 ± 55	287 ± 31	309 ± 57	298 ± 20
Volume Sistólico (mL)	0,52 ± 0,06	0,51 ± 0,07	0,53 ± 0,10	0,55 ± 0,06
Débito Cardíaco (mL/min)	153 ± 29	160 ± 20	160 ± 35	173 ± 31
IC (mL/min/g)	305 ± 50	320 ± 42	317 ± 45	353 ± 58
Encurtamento médio (%)	33,5 ± 4,3	32,5 ± 2,0	31,3 ± 1,7	32,2 ± 4,9
Onda E (cm/s)	90,1±11,5	87,3 ± 5,2	88,8 ±13,0	91,3 ± 9,8
Onda A (cm/s)	66,1± 22,2	55,7 ±6,6	68,6 ± 24,8	63,3 ±8,6
E/A	1,49 ± 0,47	1,58 ± 0,15	1,43 ± 0,46	1,45 ± 0,15

Dados expressos em média ± desvio padrão. FC: freqüência cardíaca; IC: índice cardíaco; E/A: razão entre os picos de fluxo de enchimento inicial (onda E) e da contração atrial (onda A) do fluxo transmitral. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer.

4.4.3 Análise funcional do músculo papilar isolado

4.4.3.1 Avaliação da contração basal

A Tabela 6 retrata a contração basal de ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Não ocorreu diferença estatística significativa entre os grupos.

Tabela 6- Contração isométrica basal na concentração de Ca^{2+} 2,5 mM

Variáveis	Grupos			
	DN (n=9)	**DN/E (n=8)**	**DH (n=9)**	**DH/Es (n=9)**
TD (g/mm^2)	6,64 ± 0,79	6,92 ± 1,31	6,76 ± 0,9	6,97 ± 0,71
TR (g/mm^2)	0,83 ± 0,26	0,88 ± 0,32	0,91 ± 0,29	0,90 ± 0,28
+dT/dt ($g/mm^2/s$)	71,6 ± 11,1	75,1 ± 13,9	72,9 ± 13,1	71,7 ± 4,3
-dT/dt ($g/mm^2/s$)	19,9 ± 2,1	21,1 ± 7,4	21,6 ± 5,5	21,2 ± 2,1
Área seccional (mm^2)	1,26 ± 0,21	1,29 ± 0,18	1,24 ± 0,3	1,31 ± 0,19

Dados expressos em média ± desvio padrão. TD: tensão desenvolvida; TR: tensão de repouso; +dT/dt: velocidade de variação da tensão desenvolvida; -dT/dt: velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

4.4.3.2 Avaliação do potencial pós-pausa

A Figura 13 mostra os resultados de potencial pós-pausa no músculo papilar em ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Houve um aumento significativo na TD dos grupos DN/Es e DH/Es, momentos 30 e 60 segundos, em relação aos seus respectivos controles. No parâmetro TR, no momento denominado basal, ocorreu aumento de resposta nos grupos DN/Es e DH/Es em relação aos grupos DN e DH. O grupo DN/Es mostrou aumento de TR em relação ao grupo DN nos momentos 10, 30 e 60 segundos. A +dT/dt mostrou-se aumentada no grupo DN/Es, momento 60 segundos, em relação ao grupo DN. Na –dT/dt, no momento 30 segundos, o grupo DH/Es manifestou aumento em relação ao grupo DN. No momento 60 segundos, ambos os grupos, DN/Es e DH/Es, tiveram acréscimo de –dT/dt em relação aos grupos DN e DH.

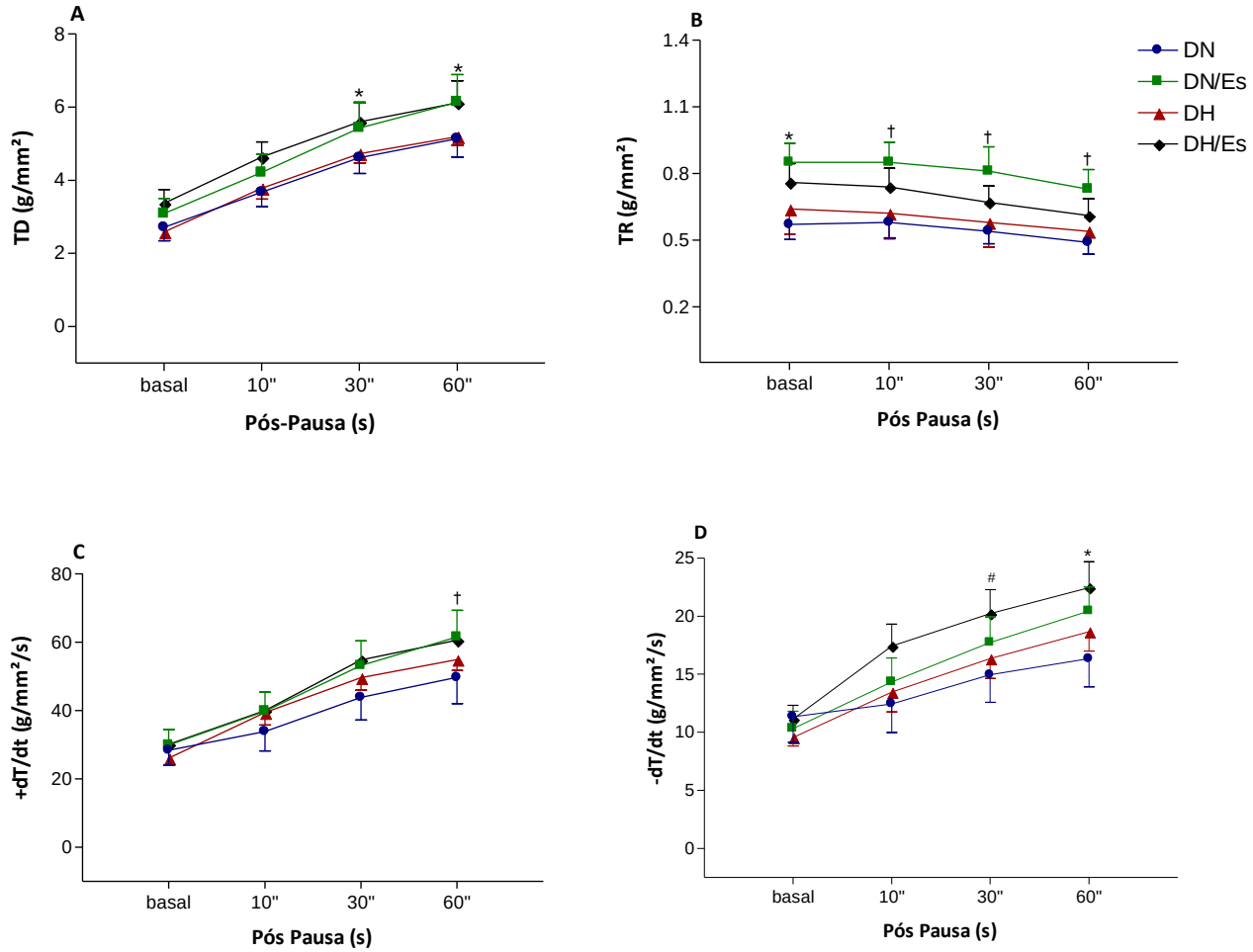

Figura 13- Potencial pós-pausa no miocárdio após o estímulo ser cessado durante 10, 30 e 60 segundos (n=9). **A:** TD (tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar); **B:** TR (tensão de repouso normalizado pela área seccional do músculo papilar); **C:** +dT/dt (velocidade de variação da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar); **D:** -dT/dt (velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. *P<0,05 DN/Es e DH/Es vs DN e DH; †P<0,05 DN/Es vs DN; #P<0,05 DH/Es em relação aos grupos DH.

4.4.3.3 Avaliação da frequência cardíaca

A Figura 14 mostra os resultados de frequência cardíaca no músculo papilar dos ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. No parâmetro TD, houve um aumento de resposta no momento basal e 0,1 dos grupos DN/Es e DH/Es em relação aos grupos DN e DH. Ainda, no momento 0,1 no parâmetro +dT/dt, ocorreu aumento de resposta nos grupos DN/Es e DH/Es em relação aos grupos DN e DH, respectivamente.

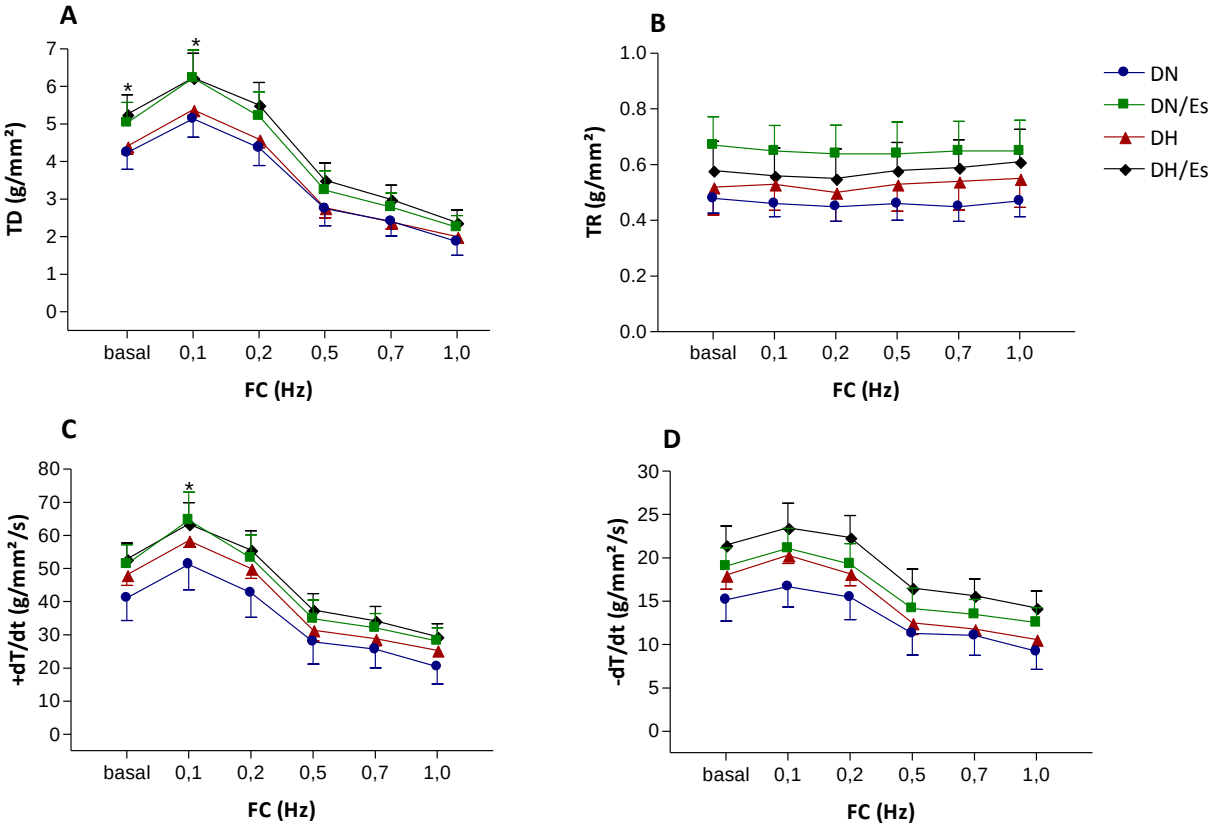

Figura 14. Efeitos da elevação da freqüência cardíaca no miocárdio (n=9). **A:** TD (tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar); **B:** TR (tensão de repouso normalizado pela área seccional do músculo papilar); **C:** +dT/dt (velocidade de variação da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar); **D:** -dT/dt (velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. *P<0,05 DN/Es e DH/Es vs DN e DH.

4.4.3.4 Avaliação da elevação de Ca^{2+}

A Figura 15 mostra os resultados de elevação de Ca^{2+} no músculo papilar de ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Nos parâmetros TD e +dT/dt, nas concentrações 1,5, 2,0 e 2,5, as respostas se mostraram aumentadas nos grupos DN/Es e DH/Es em relação aos grupos DN e DH, respectivamente.

No parêmetro –dT/dt, ocorreu aumento nos grupos DN/Es e DH/Es em relação aos grupos DN e DH, respectivamente, nas concentrações de 1,5 e 2,0. Ainda, na concentração 2,5, o grupo DH/Es teve aumento –dT/dt em relação ao grupo DH.

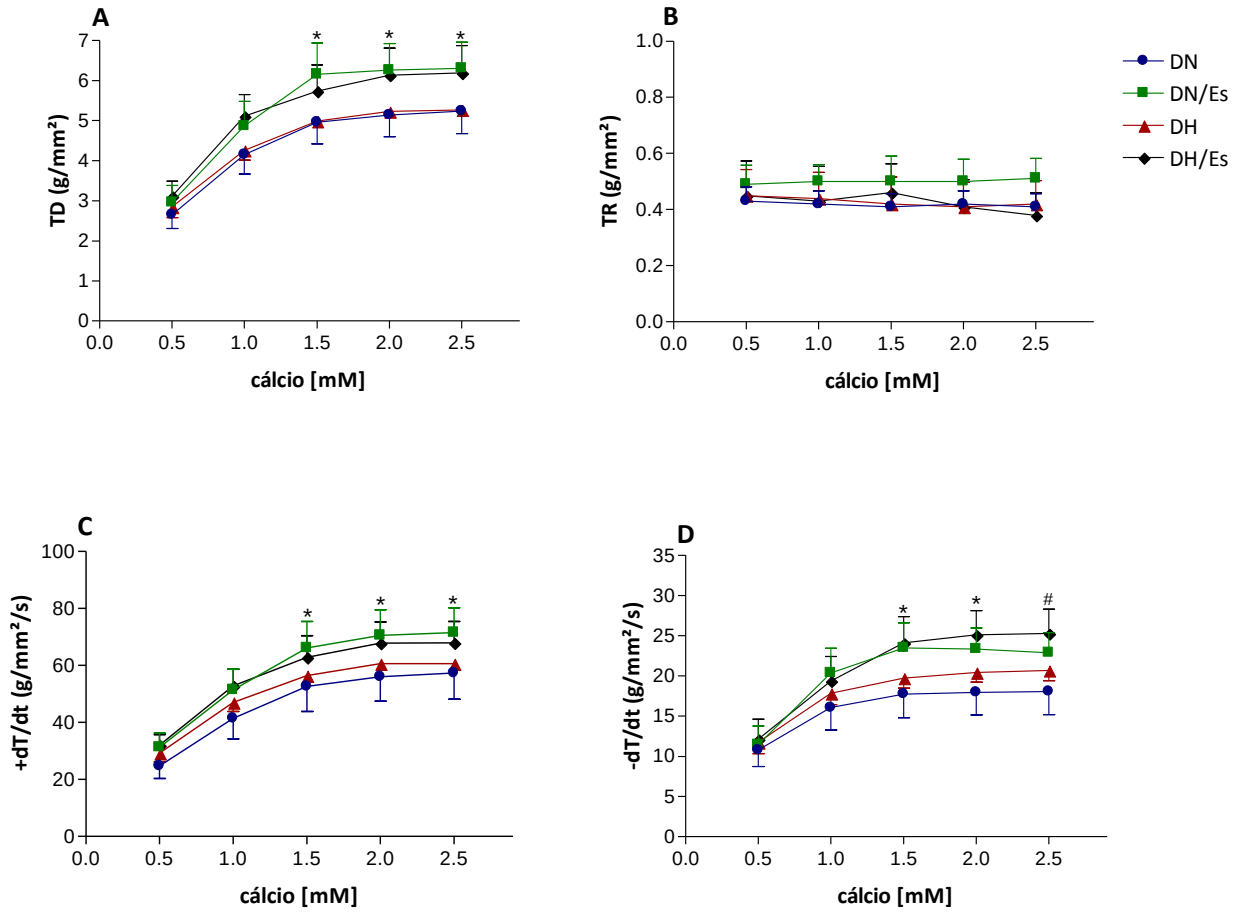

Figura 15- Efeitos da elevação da concentração de Ca^{2+} extracelular no miocárdio (n=9). **A:** TD (tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar); **B:** TR (tensão de repouso normalizada pela área seccional do músculo papilar); **C:** +dT/dt (velocidade de variação da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar); **D:** -dT/dt (velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls. *P<0,05 DN/Es e DH/Es vs DN e DH; †P<0,05 DN/Es em relação aos demais grupos. #P<0,05 DH/Es vs DH.

4.4.3.5 Bloqueio do canal L pelo diltiazen

A Figura 16 mostra a influência do diltiazen sobre a função do músculo papilar dos ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Não ocorreu nenhuma alteração estatisticamente significativa nos experimentos na presença de diltiazem.

Os dados de remodelação cardíaca sugerem que o estresse melhorou o desempenho do músculo cardíaco *in vitro*, independente da dieta, e não alterou o desempenho do coração *in vivo*. A obesidade não promoveu mudança na função do coração.

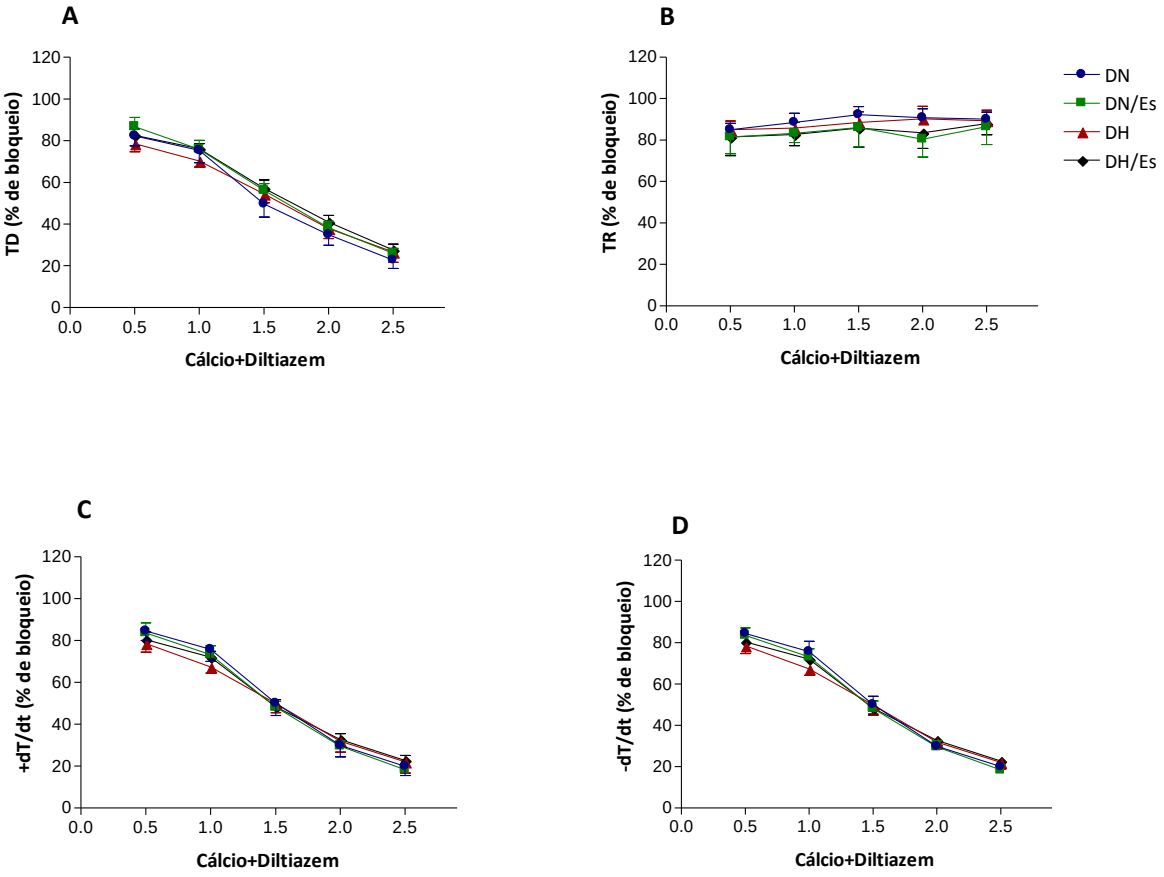

Figura 16- Efeitos do bloqueio dos canais L de Ca^{2+} com diltiazem no miocárdio (n=9). **A:** TD (tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar); **B:** TR (tensão de repouso normalizada pela área seccional do músculo papilar); **C:** +dT/dt (velocidade de variação da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar); **D:** -dT/dt (velocidade de variação de decréscimo da tensão desenvolvida normalizada pela área seccional do músculo papilar). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de comparações múltiplas de Student-Newman-Keuls.

4.5 ALTERAÇÕES VASCULARES

4.5.1 Peso dos anéis de aorta

O peso dos anéis foi mensurado nos grupos DN, DN/Es, Dh e DH/Es. Não houve diferença estatística entre os grupos [Peso dos anéis (g): DN: 0,0089 ± 0,0010; DN/Es: 0,0092 ± 0,0012; DH: 0,0094 ± 0,0016; DH/Es: 0,0099 ± 0,0018].

4.5.2 Curva concentração-efeito ao KCl

Nas Tabelas 7 e 8 e na Figura 17 são apresentados dados de CCEs ao KCL de grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Os grupos DN/Es e DH/Es em relação aos demais grupos tiveram diminuição de resposta máxima em anéis com endotélio, não ocorrendo diferença na CE50 nestes mesmos anéis. Não houve diferença de resposta máxima e de CE50 em anéis sem endotélio.

Tabela 7- Reposta máxima (g), em curvas concentração-efeito ao KCl obtidas em anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada.

Agonista		Resposta Máxima (g)			
		DN (n=7)	**DN/Es (n=8)**	**DH (n=7)**	**DH/Es (n=8)**
KCl	aorta com endotélio	2,65 ± 0,48[a]	2,05 ± 0,26[b]	2,32 ± 0,39[ab]	2,03 ± 0,26[b]
	aorta sem endotélio	2,62 ± 0,64[ab]	2,18 ± 0,62[ab]	2,38 ± 0,35[ab]	2,25 ± 0,57[ab]

Dados expressos em média ± desvio padrão. Resposta máxima em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis da mesma aorta torácica isolada de ratos. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. Letras diferentes representam diferença significativa (P<0,05).

Tabela 8- Concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada.

Agonista		[1]CE50 (x 10 M)			
		DN (n=7)	**DN/Es (n=8)**	**DH (n=7)**	**DH/Es (n=8)**
KCl	aorta com endotélio	2,97 (0,75–11,6)	7,05 (3,14–26,1)	2,89 (0,54–6,72)	9,49 (2,41–37,3)
	aorta sem endotélio	1,06 (0,73 – 11,5)	2,73 (0,28– 6,5)	4,87 (1,71–13,8)	4,16 (0,87–19,7)

Dados expressos em intervalo de confiança de 95%. Concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito ao KCl obtidas em dois anéis, com (+E) e sem endotélio (-E), de aorta torácica isolada. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste.

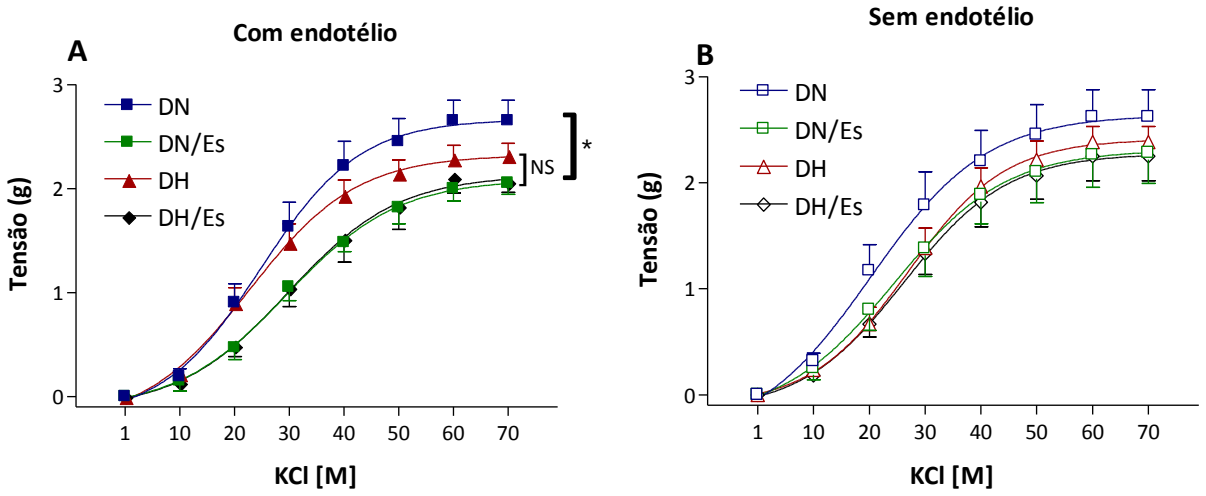

Figura 17- Curvas concentração-efeito médias ao KCl obtidas em aortas torácicas (n=7-8;). **A:** anéis de aorta com endotélio; **B:** anéis de aorta sem endotélio. Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. *P<0.05 DH em relação aos demais grupos.

4.5.3 Curva concentração efeito à noradrenalina

As Tabelas 9 e 10 e a Figura 18 mostram dados de CCEs à NA, na presença ou ausência de L-NAME, de grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Em anéis sem endotélio, os grupos DN/Es e DH/Es tiveram uma hiporreatividade à NA em relação aos grupos DN e DH, a qual foi restaurada pela presença de L-NAME. Não houve diferença estatística de CE50 entre os grupos.

Em anéis com endotélio, o grupo DH mostrou diminuição de resposta máxima em relação ao grupo DN, ainda os grupos DN/Es e DH/Es também tiveram diminuição da resposta em relação ao grupo DN. Esta hiporreatividade foi abolida na presença de L-NAME. Ainda, a presença de L-NAME determinou deslocamento à esquerda em todos os grupos.

Tabela 9- Resposta máxima (g), em curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada

Agonista		**Resposta Máxima (g)**			
		DN (n=5)	**DN/Es (n=7)**	**DH (n=6)**	**DH/Es (n=7)**
Noradrenalina	aorta com endotélio	2,65 ± 0,21[a]	1,20 ± 0,40[b]	1,82 ± 0,45[bc]	1,18 ± 0,36[b]
	aorta sem endotélio	4,58 ± 0,64[d]	3,17 ± 0,58[e]	4,10 ± 0,24[d]	3,43 ± 0,64[e]
Noradrenalina/ L-NAME	aorta com endotélio	4,62 ± 0,70[d]	4,40 ± 0,63[d]	4,12 ± 0,40[d]	4,18 ± 0,64[d]
	aorta sem endotélio	4,64 ± 0,55[d]	4,16 ± 0,78[d]	4,18 ± 0,25[d]	4,08 ± 0,45[d]

Dados expressos em média ± desvio padrão. Resposta máxima em curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada, na presença ou ausência de L-NAME $3x10^{-4}$ (inibidor NOS). Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. Letras diferentes representam diferença significativa (P<0,05).

Tabela 10. Concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada.

Agonista		[1]CE50 ($x10^{-7}$M)			
		DN (n=5)	**DN/Es (n=7)**	**DH (n=6)**	**DH/Es (n=7)**
Noradrenalina	aorta com endotélio	4,58[a] (3,27-6,42)	1,02[a] (0,29-4,54)	1,08[a] (0,55-2,17)	2,78[a] (1,04-7,39)
	aorta sem endotélio	0,24[b] (0,08-0,73)	0,19[b] (0,04-0,81)	0,16[b] (0,07-0,38)	0,82[b] (0,53-2,60)
Noradrenalina/ L-NAME	aorta com endotélio	0,89[b] (0,22-3,53)	0,82[b] (0,13-4,90)	0,99[b] (0,59-1,65)	0,98[b] (0,16-5,70)
	aorta sem endotélio	0,36[b] (0,28-3,92)	0,91[b] (0,18-7,14)	0,61[b] (0,29-1,29)	0,80[b] (0,19-3,26)

Dados expressos em intervalo de confiança de 95%. Concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada, na presença ou ausência de L-NAME $3x10^{-4}$ (inibidor NOS). Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. Letras diferentes representam diferença significativa ($P<0,05$).

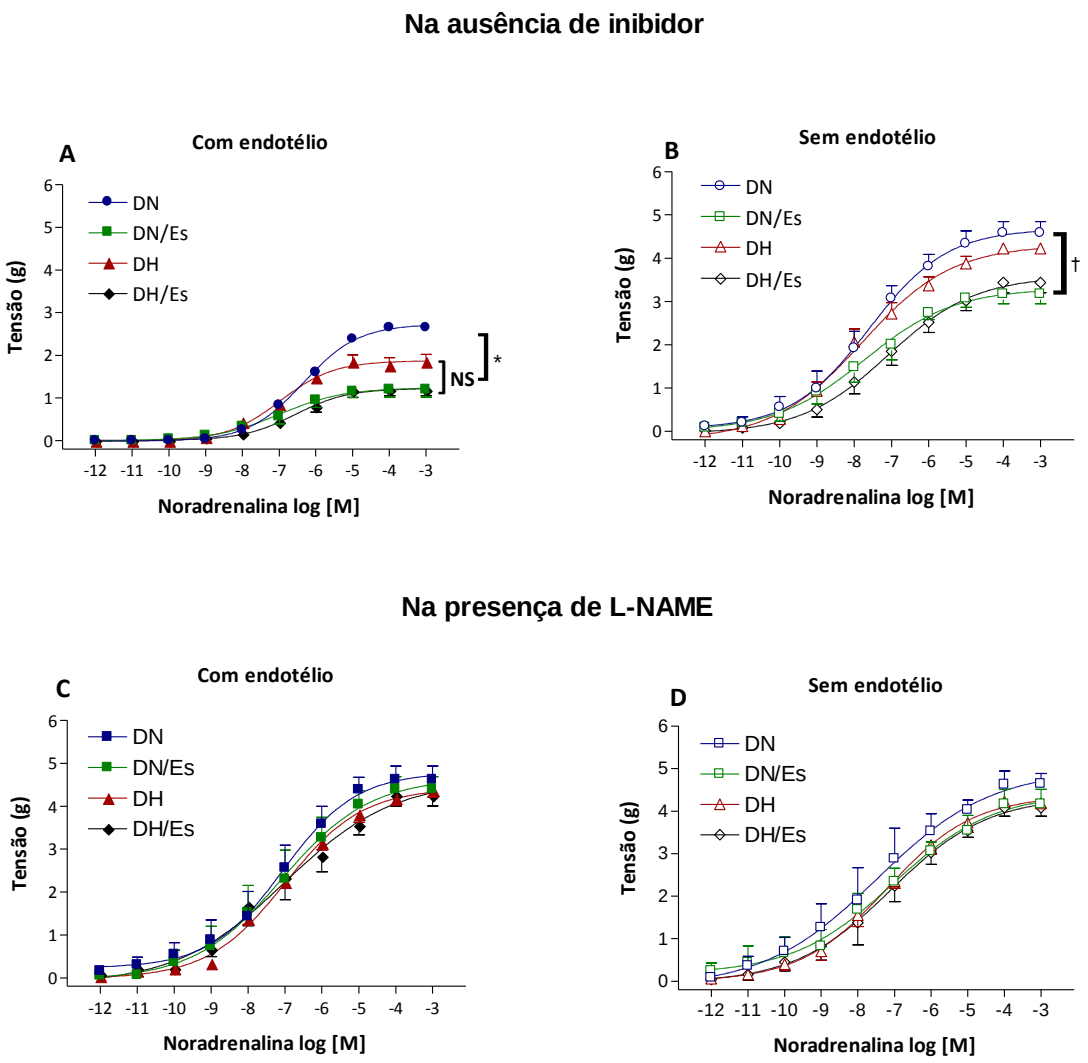

Figura 18- Curvas concentração-efeito médias à noradrenalina obtidas em aortas torácicas (n=5-7). **A:** anéis de aorta com endotélio; **B:** anéis de aorta sem endotélio; **C:** anéis de aorta com endotélio na presença de L-NAME ($3x10^{-4}$ M); **D:** anéis de aorta sem endotélio na presença de L-NAME ($3x10^{-4}$ M). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste Tukey teste. *P<0,05 DN vs DH e DN;Es; †P<0,05 DN e DH vs DN/Es e DH/Es.

A Tabela 11 e a Figura 19 mostram curvas concentração efeito à noradrenalina na presença ou ausência de prazosin (10^{-8} M). Não houve diferença estatística significativa nos valores de pA_2 entre os grupos. Entretanto, houve diferença em anéis de aorta com endotélio em relação a anéis de aorta sem endotélio.

Tabela 11- pA_2, de curvas concentração-efeito à noradrenalina obtidas em anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada

Agonista		**pA^2**			
		DN (n=7)	**DN/Es (n=8)**	**DH (n=7)**	**DH/Es (n=8)**
Noradrenalina	aorta com endotélio	8,089 ± 0,22	8,187 ± 0,17	8,185 ± 0,15	8,086 ± 0,09
	aorta sem endotélio	9,783 ± 0,17*	9,830 ± 0,11*	9,771 ± 0,14*	9,909 ± 0,10*

Dados expressos em média ± desvio padrão. pA_2 de curvas concentração-efeito à noradrenalina na presença ou ausência de prazosin (10^{-8})obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, da mesma aorta torácica isolada de ratos. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey. *P < 0,05 em relação à preparações com endotélio.

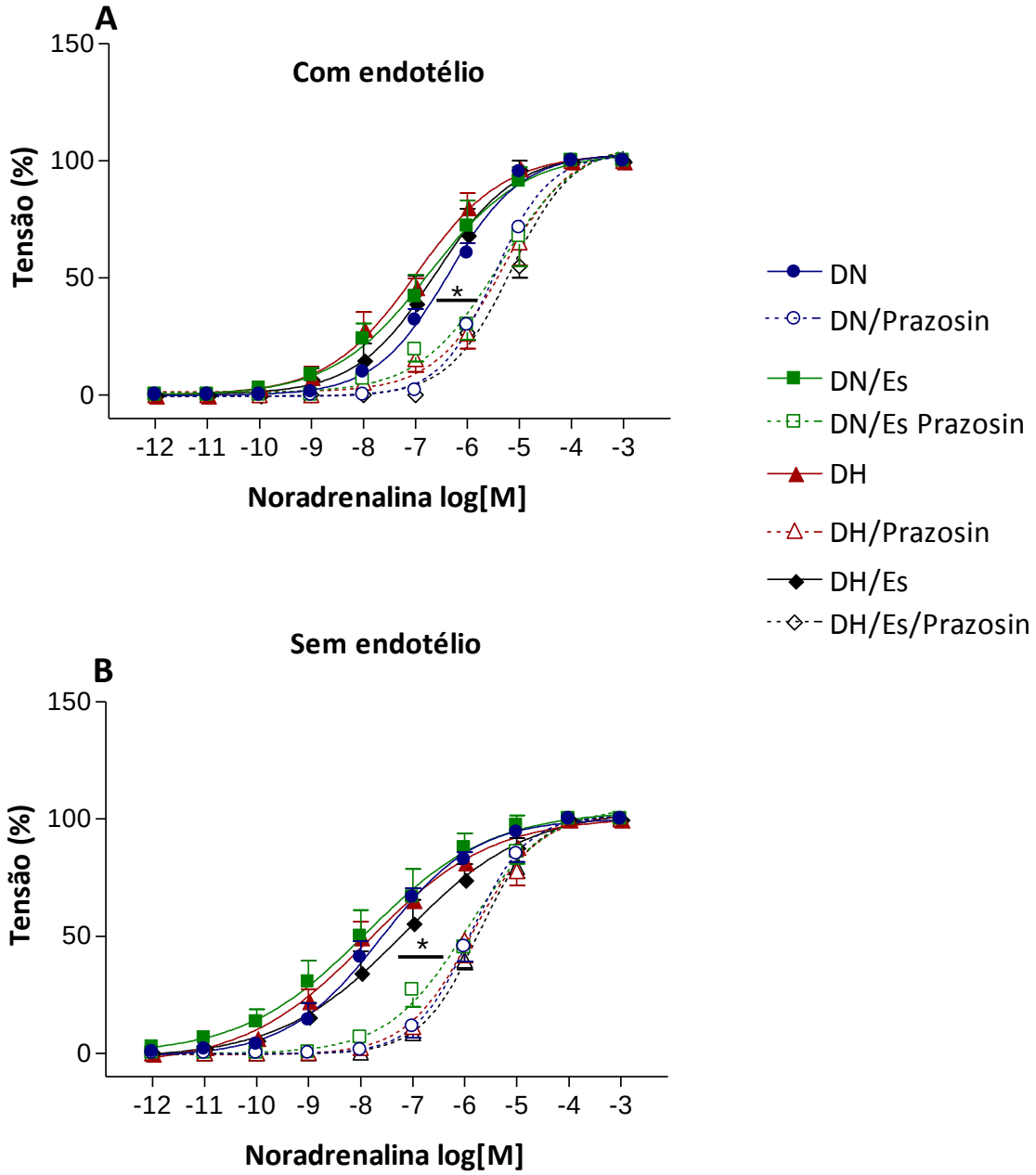

Figura 19- Curvas concentração-efeito médias à noradrenalina na presença ou ausência de prazosin (antagonista reversível de adrenoceptores-α_1) obtidas em aortas torácicas (n=5-7). **A:** anéis de aorta com endotélio na ausência (símbolos cheios) ou presença de prazosin (símbolos vazios); **B:** anéis de aorta sem endotélio na ausência (símbolos cheios) ou presença de prazosin (símbolos vazios). Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. P<0.05 presença vs ausência de antagonista.

4.5.4 Curvas concentração efeito à acetilcolina

A Tabela 12 e a Figura 20 mostram CCEs à ACh em ratos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Os grupos DN/Es, DH e DH/Es tiveram diminuição semelhante de resposta máxima e de valores de CE50 em relação ao grupo DN. A remoção do endotélio inibe a vasodilatação induzida pela acetilcolina.

Tabela 12- Resposta máxima (%) e **c**oncentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito à acetilcolina obtida em anéis com endotélio de aorta torácica isolada.

Agonista		**% de relaxamento**			
		DN (n=5)	**DN/Es (n=7)**	**DH (n=7)**	**DH/Es (n=7)**
Acetilcolina	Resposta Máxima (%)	62,4 ± 8,63[a]	95,3 ± 16,2[b]	82,6 ± 8,20[b]	84,6 ± 4,92[b]
	CE50% ($x10^{-8}$ M)	5,29[a] (0,58-48,3)	0,42[a] (0,02-7,93)	0,35[a] (0,06-2,25)	0,22[a] (0,06-0,76)

Resposta máxima expressa em média ± desvio padrão da média. Concentração eficaz 50% dados expressa em intervalo de confiança de 95%. Curvas concentração-efeito à acetilcolina obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. Letras diferentes indicam significância estatística dentro do mesmo parâmetro (P<0,05).

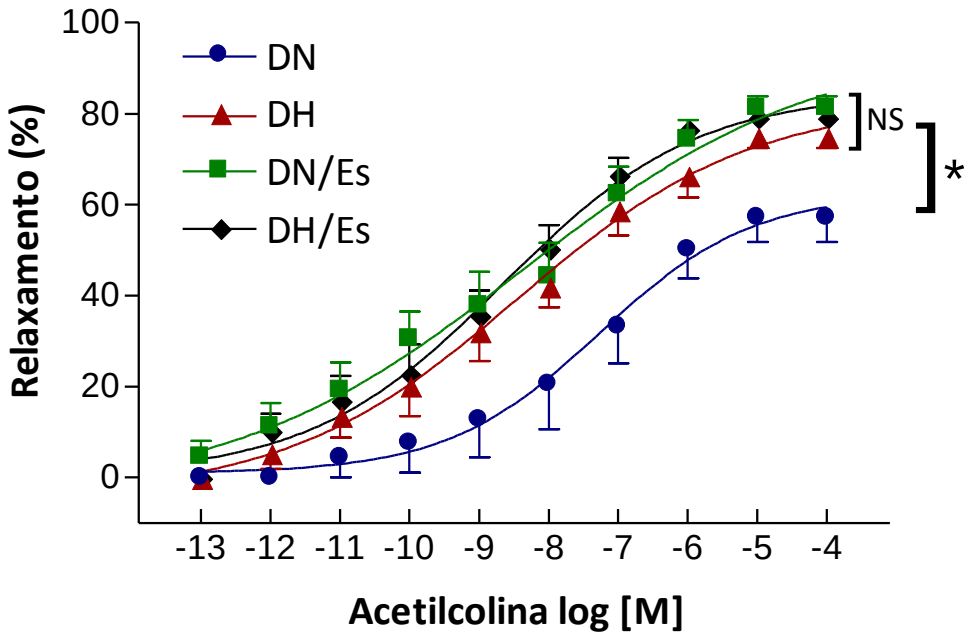

Figura 20- Curvas concentração-efeito médias à acetilcolina obtidas em aortas torácicas (n=5-7). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. *P<0,05.

4.5.5 Curvas concentração efeito ao nitroprussiato de sódio

As Tabelas 13 e 14 e, a Figura 21 mostram resultados de CCEs ao NP nos grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Independentemente da presença do endotélio, não houve alteração significativa de resposta máxima ao NP entre os grupos. Ainda, os valores de CE50 nos grupos DN e DH foram semelhantes e não foram afetados pela remoção do endotélio. Entretanto, os grupos DN/Es e DH/Es demostraram diminuição significativa dos valores de CE50, em relação aos seus respectivos grupos na ausência de estresse (DN e DH), e esta diminuição foi

significativamente maior na preparação sem endotélio do que na presença de endotélio íntegro.

Tabela 13- Reposta máxima (g), em curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada.

Agonista		Resposta máxima (% de relaxamento)			
		DN (n=5)	DN/Es (n=7)	DH (n=7)	DH/Es (n=7)
Nitroprussiato de Sódio	aorta com endotélio	104 ± 5,4	108 ± 10,4	104 ± 4,9	105 ± 5,5
	aorta sem endotélio	101 ± 5,4	103 ± 3,7	100 ± 2,9	101 ± 2,8

Dados expressos em média ± desvio padrão. Resposta máxima em curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio em curvas concentração-efeito obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste.

Tabela 14- Concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada

Agonista		[1]CE50 ($x10^{-9}$M)			
		DN (n=5)	DN/Es (n=7)	DH (n=7)	DH/Es (n=7)
Nitroprussiato de Sódio	aorta com endotélio	$5,804^{Aa}$ (2,02-16,6)	$0,068^{Bb}$ (0,01-0,41)	$3,849^{Aa}$ (0,14-10,2)	$0,087^{Bb}$ (0,02-0,48)
	aorta sem endotélio	$4,143^{Ac}$ (2,53-0,76)	$0,258^{Cd}$ (0,09-0,71)	$2,365^{Ac}$ (1,61-3,46)	$0,161^{Cd}$ (0,06-0,39)

Dados expressos em intervalo de confiança de 95%. Concentração eficaz 50% em curvas concentração-efeito ao nitroprussiato de sódio obtidas em dois anéis, com e sem endotélio, de aorta torácica isolada. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. Letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística significativa em anéis com endotélio *vs* sem endotélio (P<0,05). Letras minúsculas diferentes representam diferença estatística significativa entre os grupos (P<0,05).

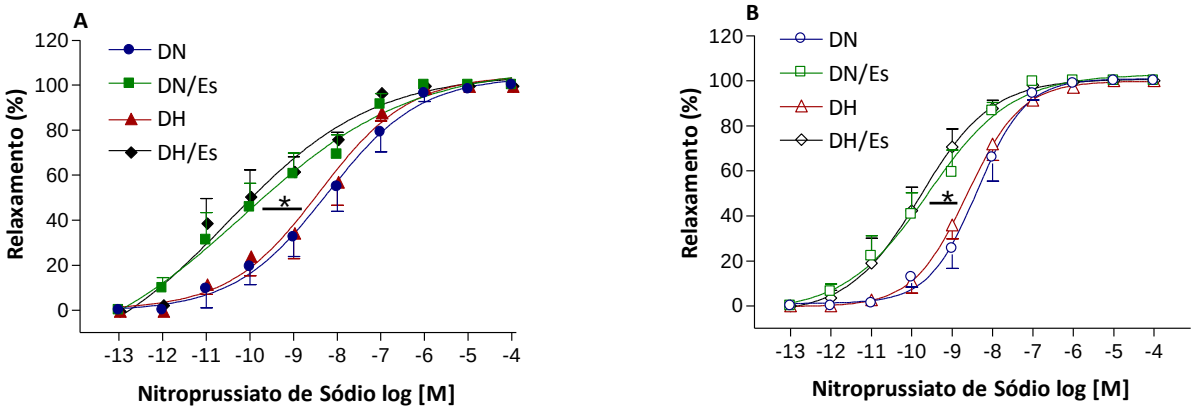

Figura 21- Curvas concentração-efeito médias nitroprussiato de sódio obtidas em aortas torácicas (n=5-7). **A:** anéis de aorta com endotélio; **B:** anéis de aorta sem endotélio. Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e pós-teste de Tukey teste. P<0,05 DN e DH vs DN/Es e DH/Es.

4.5.6 Participação do Ca^{2+} intracelular e extracelular na resposta contrátil à noradrenalina

A Figura 22 mostra a participação do Ca^{2+} intra e extracelular na contração à NA nos grupos DN, DN/Es, DH e DH/Es. Independente da concentração, não houve diferença estatística significativa entre os grupos para resposta da aorta à NA na ausência de [Ca^{2+}] extracelular [resposta máxima (g tensão): DN 0,58 ± 0,07 para NA 10^{-7} M e 0,91 ± 0,10 para NA 10^{-6}; DN/Es 0,55 ± 0,12 para NA 10^{-7} M e 0,75 ± 0,10 para NA 10^{-6}; DH 0,52 ± 0,11 para NA 10^{-7} M e 0,84 ± 0,08 para NA 10^{-6} M e DH/Es 0,40 ± 0,10 para NA 10^{-7} M e 0,64 ± 0,10 para NA 10^{-6} M]. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Da mesma maneira, nenhuma alteração significativa na resposta máxima e nos valores de CE50 foi observada para as CCEs ao $CaCl_2$ [resposta máxima (g tensão): DN 2,68 ± 0,40; DN/Es 2,04 ± 0,34; DH 2,47 ± 0,27 e DH/Es 2,19 ± 0,22; CE50 (M): DN 1,53 (0,30-7,76); DN/Es 1,06 (0,18-6,11); DH 2,32 (0,64-8,36) e DH/ES 2,32 (0,64-8,36)]. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Os resultados de reatividade vascular podem sugerir que os grupos DN/Es, DH e DH/Es desenvolveram uma resposta adaptativa vascular benéfica.

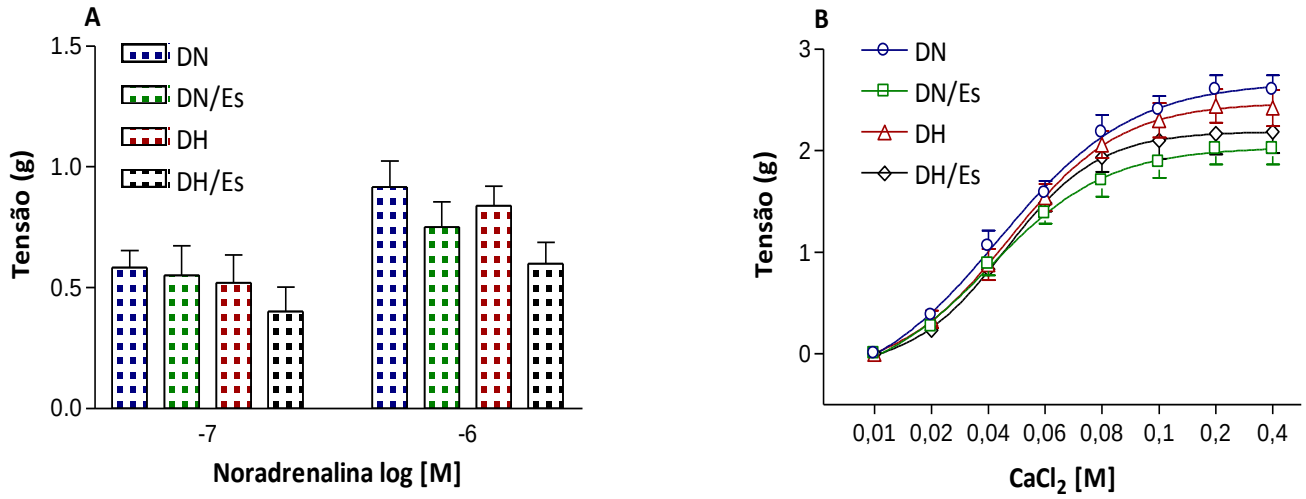

Figura 22- Experimentos de verificação do Ca^{2+} intracelular e extracelular (n=5-7). **A:** Contração induzida por noradrenalina em anéis de aorta sem endotélio em solução de Kreb's-Henseleit livre de Ca^{2+}; **B:** Curvas Concentração Efeito ao $CaCl_2$ em anéis de aorta sem endotélio realizada em solução de Kreb's-Henseleit livre de Ca^{2+} contendo noradrenalina (10^7M). Dados expressos em média ± desvio padrão. Análise de variância (ANOVA) *two way* e

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MODELOS UTILIZADOS

O resultado desta investigação mostrou que estresse crônico não alterou o índice de adiposidade em relação ao grupo controle, já que não modificou a ingestão alimentar e calórica dos animais submetidos à dieta padrão. A literatura mostra que em estudos experimentais, o estresse pode levar, em alguns casos, aumento, mas principalmente a diminuição do consumo calórico, e consequente, perda de peso corpóreo (LEVINE; MORLEY, 1981; MORLEY et al., 1983). A relação entre estresse, ingestão alimentar e perda de peso vem sendo utilizada como um marcador confiável para verificar a severidade do modelo de estresse. Em humanos, o estresse afeta a alimentação de maneira bidimensional; um subgrupo, aproximadamente 30%, tem diminuição de ingestão alimentar, e consequente perda de peso durante ou depois do estresse, enquanto que a maioria dos indivíduos aumenta a ingestão alimentar durante o estresse (STONE; BROWNELL, 1994; EPEL et al., 2004).

Diversos estudos têm utilizado dieta hipercalórica à base de ácidos graxos insaturados para analisar a relação entre coração e obesidade. O presente estudo mostrou concordância com as investigações anteriores (FITZGERALD et al., 2001; CARROL et al., 2006), desde que a dieta hipercalórica utilizada aumentou significativamente o índice de adiposidade em relação ao grupo controle. O maior consumo de gordura e da ingestão calórica, não acompanhada da elevação na oxidação dos lipídeos, favorece o acúmulo de tecido adiposo (TENTOLOURIS et al., 2008).

Um dado importante do presente trabalho foi que o estresse crônico impediu o desenvolvimento de obesidade no grupo DH/Es; o índice de adiposidade deste grupo foi semelhante ao do grupo controle e menor que o do DH. Este dado está em concordância parcial com a hipótese inicial, em que se afirmava que o estresse atenuaria o desenvolvimento da obesidade. Este fenômeno está relacionado com a menor ingestão calórica do grupo DH/Es; além disso, o estresse está associado com elevação dos níveis de catecolaminas, agentes responsáveis pela lipólise do tecido gorduroso. (LEVINE; LEVINE, 2006) Este dado está em discordância com Chantal et al. (2003) que verificaram ganho de peso em ratos submetidos ao estresse e mantidos sob dieta hipercalórica.

A obesidade e o estresse estão associados a alterações metabólicas como, intolerância à glicose, resistência à insulina, hipertensão arterial, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e hipercorticosteronemia (LEVINE; LEVINE, 2006; ADAM; EPEL, 2007). No presente estudo o estresse desenvolveu hiperinsulinemia, hipercorticosteronemia e hipertensão arterial. A obesidade apresentou as comorbidades citadas acima, com exceção da hipertensão arterial. O grupo DH/Es apresentou as mesmas comorbidades do grupo DN/Es, com exceção de hiperleptinemia, manifestada apenas no grupo DN/Es.

Os mecanismos responsáveis pelo controle da pressão arterial incluem hiperatividade do SAM, aumento da atividade do SRAA, estresse oxidativo, os quais acarretam vasoconstrição periférica e aumento da reabsorção de sódio (PAUSOVA, 2006; RELLING et al., 2006; BOUSTANY-KARI et al., 2007). O aumento de pressão arterial associada aos grupos submetidos ao estresse provavelmente está relacionado com os fatores citados anteriormente, apesar desses mecanismos não terem sido avaliados neste trabalho. A ausência da alteração da

pressão arterial no grupo DH, provavelmente, reflete que a obesidade não alterou os fatores envolvidos no controle da pressão arterial. Os resultados deste estudo estão de acordo com os trabalhos desenvolvidos anteriormente e que utilizaram a mesma metodologia para indução da obesidade (CARROL et al., 2006; RELLING et al., 2006). Entretanto o estresse, independente da dieta, ficou caracterizado por aumento da pressão arterial, esses dados estão de acordo com resultados vistos na literatura, que mostram que o estresse está associado com fatores responsáveis por elevação da pressão arterial, como aumento da atividade SSAM e do SSRA (LEVINE; LEVINE, 2006).

Outra alteração observada no presente trabalho foi a hipercorticosteronemia nos animais dos grupos DN/Es e DH/Es. Este aumento foi independente da dieta e estão em concordância com os dados da literatura (ADAM; EPEL, 2007). A explicação para este aumento está relacionada ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), que é um dos principais sistemas responsáveis na resposta adaptativa ao estresse. O hormônio liberador de corticotrofina (CRH) é liberado pelo núcleo paraventricular, o qual inicia a resposta ao estresse e compõe o principal regulador hipotalâmico do eixo HHA. O CRH estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) da hipófise anterior. O ACTH circulante atua na zona fasciculada do córtex da adrenal onde estimula a liberação de cortisol em humanos ou corticosterona nos ratos. O cortisol promove um *"feedback negativo"* no hipotálamo, responsável por manter a concentração de cortisol dentro de uma faixa operacional. (HUIZENGA et al., 1998) A literatura mostra que o estresse crônico promove hipertrofia das glândulas adrenais (RICART-JANÉ et al., 2002), dados que ratificam os achados do presente trabalho. Essa hipertrofia aumenta os indícios de hiperatividade do eixo HHA nos animais submetidos ao estresse.

Os níveis séricos de glicose mostraram-se elevados na presença de obesidade e nos grupos expostos ao estresse crônico, após a anestesia e decapitação. Entretanto, esse resultado na condição basal não se consolidou durante o teste de tolerância à glicose, onde os níveis de glicose nos animais conscientes foram iguais nos quatro grupos. O teste de tolerância à glicose mostrou que os dois grupos submetidos à dieta hipercalórica apresentaram nível glicêmico aumentados em relação aos grupos submetidos à dieta normocalórica. Esse dado mostra que o estresse não teve influência no comportamento da glicose após a sobrecarga. A intolerância à glicose observada nos animais DH, estágio intermediário entre a homeostase normal da glicose e o diabetes mellitus tipo 2, deve estar relacionada com o desenvolvimento de resistência à insulina nos animais (PEREIRA et al., 2003). As ações biológicas da insulina são essenciais para a regulação e para manutenção dos níveis de glicose (PEREIRA et al., 2003). A resistência à insulina é definida pela diminuição da sensibilidade ou resposta à ação metabólica da insulina. A resistência à ação deste hormônio ocorre quando os níveis circulantes de insulina são insuficientes para regular este processo (QUON, 2001). Nesta situação, as células β do pâncreas secretam maiores quantidades de insulina, condição denominada hiperinsulinemia, acarretando aumento da captação de glicose, sendo gerado na tentativa de manter os níveis glicêmicos normais (JELLINGER, 2007). Nossos resultados permitem sugerir que o grupo DH manifestou resistência à insulina. Esse fato pode ser visualizado na Figura 4, em que se verificou aumento nos níveis de insulina nos grupos DH. A resistência à insulina pode ser gerada por alterações nos números de receptores para insulina e na sinalização insulínica (MAEGAWA et al., 1986; FIELD et al., 1990); muitos pesquisadores têm observado que a resistência à insulina em modelos experimentais de obesidade pode estar associada às anormalidades no

transportador da glicose 4 (GLUT 4). Neste contexto podemos inferir que a resistência à insulina pode ter ocorrido como consequência na alteração do GLUT 4.

Um dado interessante deste trabalho é que, embora os grupos submetidos ao estresse não tenham desenvolvido resistência à insulina, estes apresentaram hiperinsulinemia. A literatura refere que os glicocorticoides possuem uma relação com a insulina no balanço energético e este pode desregular-se com o estresse crônico. Os glicocorticoides exercem efeito diabetogênico por interferir com a ação da insulina em diferentes níveis, como na alteração no transporte para o meio intracelular de glicose através do GLUT 4 (ROSMOND, 2003). Estes resultados sugerem que apesar dos níveis de insulina se mostrarem aumentados, uma possível explicação seria que a hiperatividade do sistema nervoso autônomo simpático libera noradrenalina que, atuando nos receptores β_2-adrenérgico pancreático aumentam a liberação de insulina (FRONTONI et al., 2003)

O estresse não promoveu aumento nos níveis séricos de leptina; entretanto, a dieta hipercalórica promoveu hiperleptinemia nos grupos DH e DH/Es, sendo mais elevado no grupo DH; esses dados levam a conclusão que o fator mais importante para o aumento d leptina é o tecido gorduroso, embora a dieta hipercalórica também aumente a taxa de leptina. A leptina é produzida pelo tecido adiposo e age no sistema nervoso aumentando a saciedade e a liberação de catecolaminas (PAUSOVA, 2006) Os níveis de leptina se correlacionam com a quantidade de gordura corporal, diminuindo a lipogênese e aumentando a lipólise (AINSLIE et al., 2000) Atualmente tem sido relatado que as dietas hipercalóricas inibem a ação da leptina, elevando a ingestão alimentar, esta elevação é devida à falha no mecanismo da saciedade, o que acarreta aumento da adiposidade (FREDERICH et al., 1995; AINSLIE et al., 2000).

5.2 REMODELAÇÃO CARDÍACA

5.2.1 Estudo ecocardiográfico e *post mortem*

Neste estudo não ocorreram alterações estruturais macroscópicas importantes. O único índice que variou foi a relação VE/PCF, avaliado por ecocardiograma ou *post mortem*, que se mostrou aumentado no grupo DN/Es e DH/Es em relação aos seus respectivos controles. Entretanto, essa alteração, não se confirmou em outros sinalizadores de hipertrofia como, relação de VE/tíbia ou peso isolado do ventrículo esquerdo. Em conclusão, se o processo de hipertrofia no ventrículo esquerdo ocorreu, o mesmo foi de pequena magnitude, incapaz de alterar a função sistólica ou diastólica *in vivo* do ventrículo esquerdo que se manteve iguais nos quatro grupos. Os resultados da avaliação funcional e estrutural mostram que as alterações neuroendócrina que ocorrem com o estresse crônico e obesidade (LEVINE; LEVINE, 2006) não foram capazes de alterar as estruturas responsáveis pelo funcionamento do coração. É importante ressaltar que o ecocardiograma representa uma importante metodologia para avaliar morfologia e a função do coração (TANAKA et al., 1996; ONO et al., 2002). É um método versátil, indolor e não invasivo, com adequada sensibilidade para detecção de anormalidades morfofuncionais cardíacas.

5.3 MÚSCULO PAPILAR

Neste estudo a função miocárdica foi analisada também *in vitro* por meio de músculos papilares isolados do VE. A avaliação da função basal, em concentração extracelular de Ca2+ (2.5 mM) capaz de estimular a quase totalidade dos miócitos existentes no músculo papilar, mostrou o mesmo comportamento normal do coração avaliado por ecocardiograma, isto é, não houve diferença entre os grupos. Os resultados obtidos mostram um comportamento funcional na situação basal excelente, músculos papilares extremamente íntegros.

A avaliação da função mecânica com manobras inotrópicas positivas como, pós-pausa, elevação da frequência cardíaca e a elevação sucessiva da concentração de Ca^{2+} extracelular, possibilitam observar os efeitos da maior oferta de Ca^{2+} intracelular miocitário, sendo capazes de detectar alterações na função cardíaca dependentes do trânsito de Ca^{2+}. Nos animais do grupo DH não se verificou diferença em relação ao grupo DN; esse resultado contrasta com o de Leopoldo et al. (2011 *in press*) que verificaram que os ratos obesos apresentaram uma performance melhor do que os controles. A explicação para esse desencontro encontra-se na diferença metodológica; Leopoldo et al. (2011 *in press*) utilizaram um critério de inclusão de ratos DH/obesos mais restritivos do que o utilizado no presente estudo, além disso, o tempo de obesidade foi maior nesses animais.

Neste experimento o estresse, isolado ou associado à dieta, promoveu uma melhoria do comportamento mecânico em relação aos seus respectivos controles. O(s) mecanismo(s) responsável(is) por essa melhoria não está(ão) esclarecido(s); acredita-se, que a melhora na resposta à estimulação inotrópica dos ratos estressados pode estar relacionada ao aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}. Essa especulação baseia-se em trabalhos da literatura, em que os autores sugerem que o exercício físico melhora a função cardíaca por meio do

mecanismo citado (WISLØFF et al., 2001). O exercício físico e o estresse possuem alterações neuroendócrinas semelhantes, por exemplo, aumento nos níveis de ACTH, corticosterona, mineralocorticoides, vasopressina e catecolaminas (WILMORE; COSTILL, 2005; BJOERNTOP; ROSMOND, 2001). Outro fator que poderia participar da melhoria no grupo estressado seria o aumento da atividade e da expressão do canal L, observado por Zhao et al. (2009) em ratos submetidos ao estresse crônico de restrição.

O presente trabalho também avaliou a função miocárdica por meio de manobras inotrópicas negativas, como o bloqueio do canal L pelo diltiazem. Esta manobra, que diminui a oferta de Ca^{2+} tecidual, acarretou um comportamento dos músculos papilares diferente dos estímulos inotrópicos citados anteriormente; enquanto, as positivas acarretaram diferença de comportamento funcional entre os grupos estressados e respectivos controles, o bloqueio com diltiazem não gerou alteração entre os grupos. Não encontramos na literatura explicação para diferença de comportamento dos músculos perante as manobras; em razão de termos aventados que o grupo estressado apresentou melhor desempenho, em razão do aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+}, podemos especular que o diltiazem normalizou o aumento da sensibilidade resultante do estresse.

Em resumo, enquanto ecocardiografia e o músculo papilar, situação basal, não revelaram alterações de comportamento entre os diferentes grupos, as manobras inotrópicas positivas potencializaram a função miocárdica nos grupos estressados; o mecanismo responsável é desconhecido, tendo-se sugerido aumento da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio.

5.4 REATIVIDADE VASCULAR

A disfunção da reatividade vascular associada à obesidade induzida por dieta tem sido frequentemente relatada por muitos autores (NADERALI; WILLIAMS, 2003; FATANI et al., 2007; MUNDY et al., 2007). Entretanto, a literatura é escassa quanto a alterações vasculares na influência do estresse no desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hipercalórica.

No presente estudo, a obesidade e o estresse determinaram resposta vascular adaptativa, caracterizada por hiporreatividade à NA semelhantemente aos achados na literatura (CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; FATANI et al., 2007). Enquanto a resposta vascular adaptativa à obesidade mostrou-se dependente da integridade do endotélio, a do estresse mostrou-se independente da integridade. Esta hipótese decorre da observação de que a remoção do endotélio aboliu a hiporreatividade à NA em aorta de DH, mas não afetou a hiporreatividade a este agonista em aorta de ratos do grupo DH/ES. A presença de L-NAME aboliu ambas as respostas adaptativas. Estes dados em conjunto sugerem que ambas as respostas adaptativas envolvam aumento de atividade da via NO vascular, mas em estruturas celulares distintas, isto é, célula endotelial para a obesidade e músculo liso vascular para o estresse. O aumento da atividade da via NO no estresse corrobora dados anteriores de nosso laboratório e da literatura (CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; LANZA JUNIOR; CORDELLINI, 2007). Contrariamente, a literatura frequentemente relata prejuízo da via NO na obesidade (LEVINE; LEVINE, 2006). A discrepância entre estes achados poderia ser atribuída ao modelo de obesidade utilizado. A literatura mostra inúmeros modelos de obesidade, que variam desde modelos genéticos a diferentes modelos de dietas (REN et al., 2000; FITZGERALD et al., 2001;

CARROL et al., 2006;). A associação de ambos obesidade e estresse não potencializou a resposta vascular adaptativa.

A literatura mostra que o NO possui muitos mediadores capazes de estimular a liberação do mesmo pela estimulação da óxido nítrico sintase endotelial (eNOS); a insulina (KIM et al., 2006), a leptina (VECCHIONE et al., 2002) e até mesmo o glicorticóide (HAFESI-MOGHADAM et al., 2002) são exemplos de mediadores que possuem essa capacidade. Assim, a hiperinsulinemia, a hiperleptinemia e a hipercorticosteronemia poderiam servir de explicações para a hiporreatividade à NA vista no presente estudo.

Outra observação interessante deste estudo foi que as respostas vasculares adaptativas induzidas, tanto pela obesidade quanto pelo estresse, mostraram-se inespecíficas ao agente vasoativo utilizado. Esta hipótese vem da observação de hiporreatividade, expressa pela diminuição nos valores de CE50 e aumento de resposta máxima à ACh, em aorta de ratos DH, DN/ES e DH/ES quando comparada ao grupo DN. Mais uma vez os achados do presente estudo corroboram a literatura que relata aumento da via NO vascular induzida pelo estresse (MILAKOFSKY et al., 1993; CORDELLINI; VASSILIEFF, 1998; MANUKHINA et al., 1998; LANZA JUNIOR; CORDELLINI, 2007). Entretanto, muitos estudos relatam dano da dieta hipercalórica sobre a reatividade vascular a agentes vasodilatadores. Por exemplo, a obesidade induzida por dieta hipercalórica leva a um prejuízo da vasodilatação dependente do endotélio (NADERALI; WILLIAMS, 2003; MUNDY et al., 2007). A divergência nestes achados poderia ser devida a diferenças na composição, no tempo e período de exposição à dieta, como anteriormente observado por Mundy et al. (2007). Estes autores relataram prejuízo da função endotelial apenas na dieta altamente gordurosa, mas não na dieta moderadamente gordurosa.

Diferentemente do observado para a ACh, vasodilatador dependente da célula endotelial, o estresse, mas não a obesidade, determinou resposta vascular adaptativa ao NP em aorta de ratos DN e DH, caracterizada pelo aumento de potência a este agente vasodilatador independente do endotélio. Este achado corrobora relatos de Naderali et al. (2004) que não observaram alteração na resposta ao NP em artéria mesentérica de ratos obesos por dieta. O aumento da potência vasodilatador ao NP induzida pelo estresse foi maior em preparações com endotélio íntegro relativamente a preparações sem endotélio. Este achado não surpreende, uma vez que ao lado da vasodilatação em resposta às ações do NP mediadas pelo GMP-cíclico soma-se a liberação endotelial de NO basal. As diferenças entre as respostas vasculares adaptativas induzidas pelo estresse e obesidade reveladas pelo aumento da vasodilatação em resposta às ações da ACh e do NP mediadas pelo GMP-cíclico reforçam a hipótese anteriormente expressa de que a hiporreatividade ao estresse e à obesidades são mediadas, respectivamente, pelo músculo liso e célula endotelial.

A presença de prazosin, antagonista específico de adrenoceptores-α_1, determinou decréscimo característico nos valores de CE50 à NA que foi semelhante em todos os grupos experimentais. Dessa maneira, fica descartado o envolvimento de ambos adrenoceptores-α_1 e adrenoceptores-α_2, disponíveis para a interação com a NA após bloqueio α_1, na resposta vascular adaptativa induzida por ambos, obesidade e estresse. Ainda, o decréscimo nos valores de CE50 à NA na presença de prazosin foi maior nas preparações sem endotélio do que nas preparações com endotélio íntegro. Este dado não surpreende, uma vez que na presença de prazosin, ocorre maior disponibilidade de agonista noradrenérgico para atuar em adrenoceptores-α_2 endoteliais responsáveis pela liberação de NO (ANGUS et al., 1986;

VANHOUTTE; MILLER, 1989), diminuindo o deslocamento da curva à NA na presença do antagonista adrenoceptores-α_1.

Semelhantemente ao observado para a NA, a obesidade, isoladamente ou em associação ao estresse, determinou resposta vascular adaptativa ao KCl, caracterizada por hiporreatividade. Entretanto, esta resposta vascular adaptativa mostrou-se dependente da integridade do endotélio, diferentemente do observado para a NA. Estes dados sugerem que a resposta vascular adaptativa ao KCl induzida por ambos, obesidade e estresse, envolve aumento da disponibilidade de fator(es) endotelial(iais), provavelmente NO como observado para a NA, modulando a vasoconstrição induzida pelo KCl em aorta de ratos DH, DN/ES e DH/Es. Estes dados corroboram a literatura que relata que em ratos obesos com idade superior a 20 semanas, geralmente, não são observadas alterações de reatividade vascular, ou se estas se fazem presentes, correspondem a uma diminuição na sensibilidade vascular para agonistas de receptores α-adrenérgicos e KCl (COX; KIKTA, 1992;. SEXL et al., 1995; TURNER; WHITE, 1996; FATANI et al., 2007).

Para verificar se as alterações na mobilização de Ca^{2+} poderiam participar da resposta vascular adaptaiva induzida por ambos, estresse e obesidade, investigou-se a resposta da NA e do $CaCl_2$ em solução de Kreb's-Henseleit livre de Ca^{2+}, parâmetros que permitem inferir sobre os estoques intracelulares e o influxo do meio extracelular dos íons Ca^{2+}, respectivamente. Uma vez que nenhuma alteração na resposta à NA e ao $CaCl_2$ foi observada nesta condição, sugere-se que as respostas vasculares adaptativas induzidas pela obesidade e o estressse não envolvem alterações no trânsito do íon Ca^{2+}.

Embora se tenha observado resposta vascular adaptativa ao estresse e obesidade, isoladamente, a associação de ambas as condições não determinou potencialização desta resposta adptativa.

Considerando-se a hiporreatividade à NA e ao KCl, o aumento de resposta à ACh e ao NP e o aumento da atividade da via NO como respostas vasculares adaptativas benéficas pode-se sugerir que estas adaptações se fazem no sentido de diminuir o risco cardiovascular associado à obesidade e ao estresse. Ainda, a hipertensão arterial observada no estresse seria consequência de alterações hemodinâmicas, provavelmente não associadas à reatividade vascular.

6 CONCLUSÕES

O estresse crônico e a dieta hipercalórica são capazes de melhorar a função vascular, com possível participação da via l-arginina/NO.

O estresse crônico é capaz de aumentar o desempenho do músculo cardíaco e impedir o desenvolvimento da obesidade, independente da dieta utilizada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- ADAM, T.C, EPEL, E.S. Stress, eating and the reward system. **Physiol Behav.**, v. 24, s. 91, pt. 4, p. 449-58, 2007.

2- AINSLIE, D.A; et al. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, s. 2, p.438-42, 2000.

3- ALPERT, M.A; 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.**, v. 76, s. 16, p.1194-7, 1995.

4- ANGUS, J.A, COCKS, T.M, SATOH K. The alpha adrenoceptors on endothelial cells. **Fed Proc.**, v. 45, p. 2355–9, 1986.

5- ARUNLAKSHANA, O, SCHILD, H.O. Some quantitative uses of drug antagonists. **Br J Pharmacol Chemother.**, v. 14, p. 48-58, 1959.

6- AUBIN, M.; et al. Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. **Phar and Exp Therap.**, v.325, p. 961-68, 2008.

7- BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, v. 415, s. 6868, p.198-205, 2002.

8- BJOERNTORP, .P, ROSMOND R. Do stress reactions cause abdominal obesity and comorbidities? **Obes Rev**., v.2, p. 73-86, 2001.

9- BOUSTANY-KARI, C.M., et al. Enhanced vascular contractility and diminished coronary artery flow in rats made hypertensive from diet-induced obesity. **Int J Obes (Lond).**,v. 31, s. 11, p. 1652-9, 2007.

10- BUDRIESI, R., et al. L-Type calcium channel blockers: from diltiazem to 1,2,4-oxadiazol-5-ones via thiazinooxadiazol-3-one derivatives. **J Med Chem.**, v. 23, s. 52, pt. 8, p. 2352-62, 2009.

11- BURRI, M.V.; et al. Assessment of systolic and diastolic left ventricular and left atrial function using vector velocity imaging in Takotsubo cardiomyopathy. **Echocardiography**, v.25, s. 10, p. 1138-44, 2008.

12- CARROLL, J.F, TYAGI, S.C. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. **Am J Hypertens.**, v. 18, s. 5, p. 692-8, 2005.

13- CARROLL, J.F, ZENEBE, W.J, STRANGE, T.B. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. **Hypertension**, v.48, p.65-72, 2006.

14- CHANTAL ,M, BARRY, E.L, AMBROSE, A.D;M. Stress facilitates body weight gain in genetically predisposed rats on médium-fat diet. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, v.285, p.R791-9, 2003.

15- CHROUSOS, G.P, GOLD, P.W. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. **JAMA**, v. 267, s. 9, p. 1244-52, 1992.

16- Committee on Care and Use of Laboratory Animals. **Guide for the care and use of laboratory animals. Bethesda: National Institute of Health**; 1985.

17- CORDELLINI, S, VASSILIEFF, V.S. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. **Gen Pharmacol.**, v. 30, s. 1, p. 79-83, 1998.

18- COSTOLI, T.; et al. Effects of chronic psychosocial stress on cardiac autonomic responsiveness and myocardial structure in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, v.286, p. H2133-40, 2004.

19- COX, R.H, KIKTA, D.C. Age-related changes in thoracic aorta of obese Zucker rats. **Am J Physiol.**, v. 262, p. H1548– 56, 1992.

20- DE MORAES, R.; et al. Effects of exercise training on the vascular reactivity of the whole kidney circulation in rabbits. **J Appl Physiol.**, v. 97, s. 2, p. 683-8, 2004.

21- DING, Y.F.; et al. Defective intracellular Ca^{2+} homeostasis contributes to myocyte dysfunction during ventricular remodelling induced by chronic volume overload in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 35, s. 7, p. 827-35, 2008.

22- ECKEL, R.H, BAROUCH, W.W, ERSHOW, A.G. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. **Circulation**, v. 105, s. 24, p. 2923-8, 2002.

23- EPEL, E.; et al. Are stress eaters at risk for the metabolic syndrome? **Ann NY Acad Sci.**, v. 1032, p. 208-10, 2004.

24- FABIATTO, A. calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmatic reticulum. **Am J Physiol.**, v. 245, s. 1, p. c1-14, 1983.

25- FATANI, S.; et al. Differential vascular dysfunction in response to diets of differing macronutrient composition: a phenomenological study. **Nut. & Metab.**, v.4, p.9-15, 2007.

26- FIELD, C.J.; et al. Diet fat composition alters membrane phospholipid composition, insulin binding, and glucose metabolism in adipocytes from control and diabetic animals. **J Biol Chem.**, v. 265, s. 19, p. 11143-50, 1990.

27- FITZGERALD, S.M.; et al. Cardiovascular and renal responses to a high-fat diet in Osborne-Mendel rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.281, p. H547-52, 2001.

28- FONTAINE, K.R.; et al. Years of life lost due to obesity. **JAMA**, v.289, p. 187-93, 2003.

29- FREDERICH, R.C.; et al. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. **Nat Med.**,v. 1, s. 12, p.1311-4, 1995.

30- FRONTONI, S.; et al. Early autonomic dysfunction in glucose-tolerant but insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients. **Hypertension.**, v.41, s. 6, p. 1223-7, 2003.

31- FURCHGOTT, R.F, ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v. 27, s. 288, pt. 5789, p. 373-61, 1980.

32- HAFEZI-MOGHADAM, A.,; et al. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. **Nat Med.**, v. 8, s. 5, p. 473-9, 2002.

33- HALL, J.E, BRANDS, M.W, DIXON, W.N. Obesity-induced hypertension: renal function and systemic hemodynamics. **Hypertension,** v. 22, p. 292-99, 1993.

34- HALL, J.E. The kidney, hypertension and obesity. **Hypertension**, v. 41, p. 625-33, 2003.

35- HJEMDAHL, P. Stress and the metabolic syndrome. **Circulation**, v.106, p. 2634-6, 2002.

36- HUIZENGA, N.A.;, et al. Interperson variability but intraperson stability of baseline plasma cortisol concentrations, and its relation to feedback sensitivity of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis to a low dose of dexamethasone in elderly individuals. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 83, s. 1, p. 47-54, 1998.

37- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Antropometria e análise do estado nutricional de crianças e adolescentes no Brasil. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2003:140 p

38- JELLINGER, P.S. Metabolic consequence of hyperglycemia and insulin resistance. **Clin Cornerstone**, v. 8, s. 7, p. S30-42, 2007.

39- KERSHAW, E.E, FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **J Clin Endocrinol Metab**, v.89, p. 2548-56, 2004.

40- KIM, J.A. et al. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. **Circulation**,v. 113, s. 15, p. 1888-904, 2006.

41- KOPELMAN, P.G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, p. 635-43, 2000.

42- KORNER, J, ARONNE, L.J. The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. **J Clin Invest.**, v. 111, s. 5, p. 565-70, 2003.

43- KREPSOVA, K.; et al. Repeated immobilization stress decreases mRNA and protein levels of the type 1 IP3 receptor in rat heart. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 1018, p. 339-44, 2004.

44- KVETNANSKY, R.et al. Effects of chronic guanethidine treatment and adrenal medullectomy on plasma levels of catecholamines and corticosterone in forcibly immobilized rats. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 209, s. 2, p. 287-91, 1979.

45- LANZA JÚNIOR, U, CORDELLINI, S. Differential vascular adaptive response to stress exposure in male and female rats: Role of gonadal hormones and endothelial cells. **Stress**, v. 10, s. 1, p. 27-36, 2007.

46- LEOPOLDO, A.S.ç et al. Involvement of L-type calcium channel and Serca2 in myocardial dysfunction induced by obesity. **J of Cell Physiol.**,(*in press*), 2011.

47- LEVINE, A.S, MORLEY, J.E. Stress-induced eating in rats. **Am J Physiol.,** v.241, s. 1, p.R72-6, 1981.

48- LEVINE, T.B, LEVINE, A.B. **Metabolic Syndrome and Cardiovascular Disease**. 1a ed. Philadephia: Elsevier, 2006. 488p.

49- MAEGAWA, H.; et al. Effect of diet change on insulin action: difference between muscles and adipocytes. **Am J Physiol.**, v. 251, s. 5, pt. 1, p. E616-23, 1986.

50- MANUKHINA, E.B.; et al. Effect of adaptation to periodic hypoxia on post infarction fall of blood pressure and hyperactivation of the endothelium. **Fisiol Zh.**, v. 37, p. 98-105, 1998.

51- MATHEW, B.; et al. Obesity-hypertension: emerging concepts in pathophysiology and treatment. **Am J Med Sci.**, v. 334, s. 1, p. 23-30, 2007.

52- MCEWEN, B.S, SEEMAN, T. Protective and damaging effects of mediators of stress. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. **Ann N Y Acad Sci.**, v. 896, p. 30-47 1999.

53- MILAKOFSKY, L, HARRIS, N, VOGEL, W.H. Effects of repeated stress on plasma arginine levels in young and old rats. **Physiol Behav.**, v. 54, p. 725-8, 1993.

54- MOHAMED-ALI, V, PINKNEY, J.H, COPPACK, S.W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ**. Int J Obes Relat Metab Dis**,v. 22, p.1145-58, 1998.

55- MOLES, A.; et al. Psychosocial stress affects energy balance in mice: modulation by social status. **Psychoneuroendocrinology,** v.31, s.5, p.623-33, 2006.

56- MORAES, C.; et al. Exercise training improves relaxation response and SOD-I expression in aortic and mesenteric rings from high caloric diet-fed rats. **BMC Physol.**,p. 8-12, 2008.

57- MORLEY, J.E, LEVINE, A.S, ROWLAND, N.E. Minireview. Stress induced eating. **Life Sci.**, v. 32, s. 19, p. 2169-82, 1983.

58- MUNDY, A.L.; et al. Fat intake vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: Implications for diet-induced obesity. **Cardiovasc Res.**, v. 73, p. 368-375, 2007.

59- NADERALI, E.K., et al. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is independent of the degree of increase in total body weight. **Clin Sci (Lond).**, v.100, s. 6, p. 635-41, 2001.

60- NADERALI, E.K, FATANI, S, WILLIAMS, G. Chronic withdrawal of a high-palatable obesity-inducing diet completely reverses metabolic and vascular abnormalities associated with dietary-obesity in the rat. **Atherosclerosis**, v. 172, s. 1, p. 63-9,2004.

61- NADERALI, E.K, WILLIAMS, G. Prolonged endothelial-dependent and -independent arterial dysfunction induced in the rat by short-term feeding with a high-fat, high-sucrose diet. **Atherosclerosis**, v. 166, s. 2, p. 253-9, 2003.

62- NASCIMENTO, A.F.; et al. A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** v.52, s. 6, p. 968-74, 2008.

63- O' BRIEN, P.E, DIXON, J.B. The extent of the problem of obesity. **Am J Surg.**, v. 184, p. 4S-8S, 2002.

64- ONO, K.; et al. Echo doppler assessment of left ventricular function in rats with hypertensive hypertrophy. **J Am Soc Echocardiogr.**, v. 15, s. 2, p. 109-17, 2002.

65- PAUSOVA, Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. **Curr Opin Nephrol and Hypertens.**, v.15, p. 173-8, 2006.

66- PEREIRA, L.O, DE FRANSCISCHI, R.P, LANCHA, Jr, AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab.**, v. 47, s. 2, p. 111-27, 2003.

67- POIRIER, P.; et al. Obesity and Cardiovascular Disease: Pathophysiology, Evaluation, and Effect of Weight Loss. **Circulation**, v. 113, p. 898-918, 2006.

68- QUON, M.J. Limitations of the fasting glucose to insulin ratio as an index of insulin sensitivity. **J Clin Endocrinol Metab.**, v.86, s. 10, p. 4615-7, 2001.

69- RELLING, D.P.; et al. High fat diet induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte disfunction and upregulation of foxo3a transcription factor independent of lipotoxic and apoptosis. **J Hypertens.**,v. 24, s. 3, p. 549-61, 2006.

70- REN, J.; et al. Basal and ethanol-induced cardiac contractile response in lean and obese zucker rat hearts. **J of Biomed Sci.**, v.7, p. 390-400, 2000.

71- RICART-JANÉ, D.; et al. Immobilization stress alerts intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. **Metabolism**, v. 51, s. 7, p. 925-31, 2002.

72- RANDINONE, C.M. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. **Endocrine.**,v. 29, p. 81-90, 2006.

73- ROSMOND, R. Stress induced disturbances of the HPA axis: a pathway to Type 2 diabetes? **Med Sci Monit.**, v. 9, s. 2, p.RA35-9, 2003.

74- ROZANSKI, A.; et al. The epidemiology, pathophysiology, and management of psychosocial risk factors in cardiac practice: The emerging field of behavioral cardiology. **Brain Beh and Imm.**, v. 20, s.2, p.113-119, 2005.

75- RUEDA-CLAUSEN, C.F.; et al. The presence of abdominal obesity is associated with changes in vascular function independently of other cardiovascular risk factors. **Int J Cardiol.**, v. 18, s. 139, pt. 1, p. 32-41, 2010.

76- SELYE, H. A Syndrome produced by diverse nocuous agents**. Nature**, v. 138, s. 32, 1936.

77- SEXL, V.; et al. Age-related changes in vascular reactivity in genetically diabetic rats. **Pharmacology**, v. 50, p. 238– 46, 1995.

78- SMITH, R.P, KRUSZYNA, H. Nitroprusside produces cyanide poisoning via reaction with hemoglobin. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 191, s. 3, p.557-63, 1974.

79- SOWERS, J.R. Obesity and cardiovascular disease. **Clin Chem.**, v.44, s. 8, pt. 2, p.1821-5, 1998.

80- STEADMAN, R.G. The assessment of sultriness: part I: A temperature-humidity index based on human physiology and clothing science. **J Appl Meteor.**, v.18, p.861-84, 1979.

81- STEIN, C.J, COLDITZ, G.A. The epidemic of obesity. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 89, s. 6, p. 2522-5, 2004.

82- STONE, A.A, BROWNELL, K.D. The stress eating paradox: multiple daily measurements in adult males and females. **Psychol Health**, v. 9, p. 425-36, 1994.

83- SUGIZAKI, M.M.; et al. Severe food restriction induces myocardial dysfunction related to SERCA2 activity. **Can J Physiol Pharmacol.**, v. 87, s. 9, p. 666-73, 2009.

84- TANAKA, N.; et al. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. **Circulation,** v. 94, s. 5, p. 1109-17, 1996.

85- TEEGARDEN, S.L, BALE, T.L. Effects of stress on dietary preference and intake are dependent on access and stress sensitivity. **Physiol Behav.**, v.18, s. 93, pt. 4-5, p. 713-23. 2008.

86- TENTOLOURIS, N.; et al. 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**, v. 57, s. 3, p.313-20, 2008.

87- TSIGOS C, CHROUSOS GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. **J Psychosom Res.**, v. 53, s. 4, p. 865-71, 2002.

88- TSUTSUI, H.; et al. Alterations in sarcoplasmic reticulum calcium-storing proteins in pressure-overload cardiac hypertrophy. **Am J Physiol.**, v. 272, s.1, pt. 2, p. H168-75, 1997.

89- TURNER, N.C, WHITE, P. Effects of streptozotocin-induced diabetes on vascular reactivity in genetically hyperinsulinemic obese Zucker rats. **J Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 27, p. 884–90, 1996.

90- VANE, J.R, ANGGARD, E.E, BOTTING, R.M. Regulatory functions of the vascular endothelium. **N Engl J Med.**, v.5, s. 323, pt. 1, p. 27-36, 1990.

91- VANHOUTTE, P.M, MILLER, V.M. Alpha 2-adrenoceptors and endothelium-derived relaxing factor. **Am J Med.**, v. 87, s. 3C, p. 1-5, 1989.

92- VANLTALLIE, T.B. Stress: a risk factor for serious illness**. Metabolism,** 1, p. 40- 45, 2002.

93- VECCHIONE, C.; et al. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. **Diabetes,** v.51, s. 1, p. 168-173, 2002.

94- VIAU, V, MEANEY, M.J. Variations in the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress during the estrous cycle in the rat. **Endocrinology.**, v. 129, s. 5, p. 2503-11, 1991.

95- WILMORE, J.H, COSTILL, D.L. **Physiology of sport and exercise.** 3ed. Champaign, IL: Human Kinetics, 2005.

96- WISLØFF, U.; et al. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovasc Res.**, v. 50, s. 3, p. 495-508, 2001.

97- WONG, C.Y.; et al. Alterations of left ventricular myocardial characteristics associated with obesity. **Circulation**, v. 110. S. 19, p. 3081-7, 2004.

98- **World Health Organization. Obesity and Overweight.** Access: [2009 Aug 20]. Available from: http://www.who.int

99- ZHAO, Y.; et al. L-type calcium channel current up-regulation by chronic stress is associated with increased α1c subunit expression in rat ventricular myocytes. **Cell Stress and Chaper.**, v. 14, p. 33-41, 2009.