

1 Introdução

Definida pela organização mundial de saúde como uma patologia complexa que apresenta graves dimensões sociais e psicológicas e que afeta praticamente todas as faixas etárias e grupos socioeconômicos, a obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde pública. Estatísticas mostram que mais de um bilhão de pessoas têm excesso de peso corporal, das quais, pelo menos 300 milhões são consideradas obesas (WHO, 2008). No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE¹) levantados no período de 2002-2003, das 95,5 milhões de pessoas de 20 anos ou mais de idade, 38,8 milhões (40,6%) têm excesso de peso e 10,5 milhões são obesas. Esta prevalência coloca o Brasil com um número de internações, devido ao excesso de peso, semelhante a dos países desenvolvidos, sendo 6,8% do total dos casos referente a homens e 9,3% a mulheres, o que equivale a 3,02 e 5,83 %, respectivamente, dos custos totais de hospitalização (Abeso²).

A alta incidência de indivíduos com excesso de peso é sem dúvida assustadora para os órgãos de saúde pública, uma vez que a obesidade se associa com várias doenças crônicas como insuficiência respiratória e renal, dislipidemia, diabetes tipo 2 e hipertensão (WHO, 2004; Poirier et al., 2006). Todas elas constituem importantes fatores de risco no desenvolvimento de doença cardiovasculares (Poirier et al., 2006; Abel et al., 2008). Além do mais, estudos anteriores mostraram que diabetes tipo 2 e dislipidemia estão associadas com alterações do metabolismo no fígado (Bugianesi et al., 2004). Estas doenças no fígado iniciam-se com esteatose, podendo evoluir para

¹ IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Site: www.ibge.gov.br

² Abeso – Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. Site: www.abeso.org.br

esteatoepatite, cirrose, insuficiência no fígado e carcinoma (Haynes et al., 2004; Cruz et al., 2006).

Estudo realizado para relacionar a obesidade à incidência de insuficiência cardíaca mostrou que indivíduos obesos apresentam maior chance de desenvolver insuficiência cardíaca que indivíduos com sobrepeso ($30 > \text{IMC} > 25$) e peso normal ($\text{IMC} < 25$) e que indivíduos com sobrepeso são mais susceptíveis em desenvolver insuficiência cardíaca que os indivíduos com peso normal (Abel et al., 2008). Esta mesma associação foi observada com a incidência de esteatose, mostrando que esta patologia está presente em 70% dos pacientes com $\text{IMC} > 40$ e que 18% desses pacientes atendem o critério de esteatoepatite, o que reforça a íntima e frequente relação entre as manifestações da esteatose hepática com o excesso de peso corporal (Cruz et al., 2006).

1.1 Obesidade e função cardíaca

As alterações cardíacas, tanto estruturais como funcionais, decorrentes na obesidade estão relacionadas a várias mudanças hormonais, como hiperleptinemia, resistência à insulina e a hiperatividade nervosa simpática, as quais podem agir diretamente ou não no tecido cardíaco. A contratilidade miocárdica depende de fatores intrínsecos, como a disponibilidade do cálcio citoplasmático $[\text{Ca}^{2+}]_i$ e da adenosina trifosfato (ATP) e também de fatores extrínsecos, como o aumento do volume sanguíneo ou da resistência vascular periférica (Rang et al., 2003; Abel et al., 2008).

O aumento do volume sanguíneo em indivíduos obesos dado pela necessidade de uma maior demanda metabólica, tanto pelo aumento da massa gorda como da

massa magra, leva a um maior trabalho cardíaco. Esta alteração hemodinâmica resulta em aumento da cavidade ventricular e hipertrofia excêntrica. Além disso, alguns indivíduos obesos apresentam hipertensão arterial, o que exige do coração força contrátil ainda maior para superar o aumento da resistência vascular periférica. A consequência dessas alterações hemodinâmicas é uma exacerbação na hipertrofia cardíaca excêntrica e concêntrica, caracterizada pelo aumento da cavidade e da espessura da parede ventricular. Silva et al. (2007) mostraram um aumento exagerado da massa ventricular em pacientes obesos com e sem hipertensão. Resultados de estudos recentes mostram que a hipertrofia cardíaca está diretamente relacionada com o aumento do IMC e da gordura visceral e epicárdica (Iacobellis, Leonetti, 2005). Outro fator envolvido com a alteração no volume do ventrículo esquerdo e hipertrofia dos miócitos na obesidade é a lipotoxicidade cardíaca (Lopaschuk et al., 2007).

Durante períodos excessivos de dieta rica em gordura, as altas concentrações de ácidos graxos ativam os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma- α e β (PPAR- α e β) e o co-ativador do PPAR- γ , ambos responsáveis em controlar a biogênese das mitocôndrias e dos genes envolvidos na captação e oxidação do ácido graxo nos cardiomiócitos (Lopaschuk, Kelly, 2008; Abel et al., 2008). Entretanto, nessa condição, a captação dos ácidos graxos sobrepuja a sua oxidação, resultando no acúmulo de lipídeos no músculo cardíaco, prejudicando o metabolismo e a função cardíaca.

A ATP gerada no coração vem da fosforilação oxidativa mitocondrial, podendo o ácido graxo, a glicose e o lactato servirem de substrato para o metabolismo cardíaco. No coração saudável, aproximadamente 70% da produção total de energia é proveniente dos ácidos graxos (Karmazyn et al., 2008). Entretanto,

fatores nutricionais podem alterar as proporções dos substratos utilizados, levando a lipotoxicidade ou glicotoxicidade. Com a resistência à ação de insulina na obesidade e o aumento da disponibilidade de ácido graxo, os cardiomiócitos aumentam a oxidação desse último substrato, levando a ativação das cadeias transportadoras de elétrons e, com isso, à produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas substâncias são capazes de ativar as proteínas desacopladoras e o translocador de nucleotídeo de adenina, as quais permitem o retorno dos elétrons para a matriz mitocondrial sem a necessidade de passar pela via de síntese do ATP (Mazumder, 2005; Boudina, Abel, 2008). Estas alterações levam a menor disponibilidade de ATP cardíaco, o que resulta na menor eficiência cardíaca (Mazumder, 2005; Boudina, Abel, 2008).

A diminuição da eficiência cardíaca, caracterizada por maior quantidade de oxigênio consumido e menor produção de ATP, pode prejudicar as atividades das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} , uma vez que tanto o processo de liberação como o de recaptção do Ca^{2+} são dependentes de ATP (Hüser et al, 2000; Bers, 2003). Além dessas modulações, o fluxo de Ca^{2+} depende da ação de alguns hormônios, como leptina e noradrenalina. O aumento da atividade nervosa simpática leva a ativação dos receptores β 1-adrenérgicos na superfície dos cardiomiócitos, resultando no aumento da adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e na ativação da proteína quinase A (PKA). A PKA é capaz de fosforilar vários substratos, facilitando o transiente de Ca^{2+} , entre eles os canais de Ca^{2+} tipo-L, os receptores de rianodina (RyR), o fosfolambam no sítio da serina 16 (P-PLB-Ser¹⁶) e a troponina inibitória (TnI) (Bers, 2003, a). A fosforilação dos RyR leva a liberação do Ca^{2+} , estocado no retículo sarcoplasmático, para o citoplasma. O $[\text{Ca}^{2+}]_i$ liga-se a inúmeras proteínas,

entre elas, a troponina ligada ao cálcio (TnC) levando a dissociação da TnI à actina. Essa mudança na interação TnC-TnI é percebida pela Tn ligada a tropomiosina (TnT), a qual é capaz de mudar a conformação da tropomiosina e, com isso, permitir a interação da miosina com a actina. A força de contração depende da quantidade de Ca^{2+} nos miofilamentos (Fabiato, 1983; Bers, 2002; Meissner, 2004). Após o evento excitação-contração, o relaxamento e a homeostasia ocorrem por quatro processos de transporte do Ca^{2+} : 1) recaptção para o retículo sarcoplasmático através da atividade da proteína Ca^{2+} ATPase na membrana do retículo sarcoplasmático (SERCA2); 2) extrusão através da bomba de Ca^{2+} -ATPase na membrana sarcolemal; 3) extrusão através da atividade do trocador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) ou 4) recaptção para a mitocôndria via Ca^{2+} uniporter (Bers, 2003, b). A atividade da SERCA2 é o processo mais importante na recaptção do Ca^{2+} no músculo cardíaco. Além disso, sabe-se que essa proteína é inibida pela ação do fosfolambam (PLB), também localizada na membrana do retículo sarcoplasmático (Watanabe et al., 2004). O PLB deixa de inibir a SERCA2 quando P-PLB-Ser¹⁶, como visto anteriormente, ou na treonina 17 (P-PLB-Tre¹⁷) (Chu, Kranias, 2002; Mattiazzi et al., 2005) via quinase dependente de cálcio-calmodulina II (CaMKII) (Fabiato, 1983; Bassani et al., 1994; Bers, 2002; Mattiazzi et al., 2005). Assim a ativação dos receptores β 1-adrenérgicos pela noradrenalina facilita a liberação (RyR) e a recaptção do Ca^{2+} (P-PLB-Ser¹⁶ e TnI).

Além da influência da noradrenalina, o transiente de Ca^{2+} no coração sofre a ação da leptina. Nickola et al. (2000) mostraram a influência deste hormônio na produção de óxido nítrico (NO). O NO é conhecida por S-nitrosilar os RyR, promovendo a maior liberação de Ca^{2+} durante a contração cardíaca e assim, aumentando a força de contração (Hare, 2003; Prabhu, 2004; Hare, Stamler, 2005;

Barouch et al., 2002). Estudos utilizando animais com deficiência na ação da leptina mostraram que a administração deste hormônio aumenta o P-PLB e a expressão protéica da SERCA2, o que favoreceu o transiente de Ca^{2+} nos cardiomiócitos (Minhas et al., 2005; Dong et al., 2006). Porém a ativação crônica dos receptores $\beta 1$ -adrenérgicos e dos receptores para leptina (ObR) devido à hiperatividade nervosa simpática e a hiperleptinemia, decorrentes na obesidade, podem levar a desensibilização e até mesmo a degradação destes receptores (Brum et al., 2006; Ren, 2008), prejudicando assim, o transiente de Ca^{2+} .

Vasanji et al. (2006) mostraram que ratos induzidos a obesidade por dieta rica em açúcar apresentaram diminuição na recaptação de Ca^{2+} para o retículo sarcoplasmático e essa diminuição foi associado com a menor fosforilação do PLB no sítio da Ser¹⁶ e Tre¹⁷ (Vasanji et al., 2006). Nesse mesmo estudo ficou claro que a indução da obesidade leva alterações estruturais e funcionais no coração, verificado pela menor fração de encurtamento e ejeção e pelo maior diâmetro do ventrículo esquerdo durante a diástole. Além disso, Relling et al. (2006) também observaram redução do P-PLB em ratos induzidos à obesidade com dieta rica em gordura, o que resultou na menor contração cardíaca.

1.2 Obesidade e conteúdo de gordura hepática

Estudos prévios mostram que a obesidade provoca depósitos de gordura no fígado, o que leva a um quadro de resistência hepática à insulina e, com isso, a perda no controle do metabolismo de glicose e lipídeos (Samuel et al., 2004; Farrell, Larter, 2006). A ingestão crônica de dieta rica em gordura aumenta a produção de triglicerídeos, provocando limitação nos depósitos de gordura no tecido adiposo. Este

saturamento de gordura no tecido adiposo faz com que o excesso de gordura comece a se depositar em outros tecidos, como o fígado e o coração (Suplicy et al., 2006). No indivíduo saudável, a ingestão alimentar leva a maior liberação de insulina e, com isso, a supressão da glicogênese e glicogenólise no fígado, controlando assim, a concentração plasmática de glicose. A insulina também controla a atividade da proteína de ligação ao elemento responsivo a esteróide (SREBP), aumentando a sua atividade e a síntese de ácidos graxos, triglicerídeos e lipoproteínas. Em indivíduos com resistência hepática à insulina, a ação deste hormônio é perdida, prejudicando a supressão da gliconeogênese e glicogenólise, resultando no aumento da concentração plasmática de glicose. A hiperglicemia tende a levar a hiperinsulinemia, capaz de aumentar a atividade da SREBP por mecanismo independente da sinalização do substrato receptor de insulina (SRI), isto é, uma proteína responsável pela resistência à insulina (Zecchin et al., 2006; Passarelli et al., 2006), aumentando ainda mais a presença de gordura no fígado. Além do mais, a resistência hepática à insulina leva a menor degradação das lipoproteínas no fígado, favorecendo a estimulação crônica da secreção das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), tanto pelo aumento do conteúdo proteico como pelo aumento do triglicerídeo, como visto anteriormente (Passarelli et al., 2006). Assim, o excesso de aporte hepático de ácido graxo pode ser proveniente tanto da hidrólise dos quilomicrons da alimentação, dos estoques do tecido adiposo, como da produção hepática pela lipogênese *de novo* (Garg, Misra, 2002).

Além destas alterações funcionais, o fígado gorduroso também apresenta diminuição no parênquima hepático. O constante bombardeio de ácidos graxos promove o aumento do estresse oxidativo, o que favorece a presença de inflamação

necrótica, lesão tecidual e fibrose, características estas que definem a progressão da doença para esteatoepatite. O diagnóstico desta doença é determinado pela dosagem de enzimas plasmáticas ou por diagnóstico de imagens, porém a falta de sintomas nos pacientes acaba prejudicando o seu diagnóstico precoce e o sucesso no tratamento, associando esta patologia a um alto índice de mortalidade (Adams et al., 2005; Farrell, Larter, 2006).

1.3 Efeito do treinamento físico e da restrição alimentar na obesidade

Apesar dos riscos a saúde ligados à obesidade, ainda se discute qual a melhor forma de tratamento para essa síndrome, já que a maioria dos obesos apresentam dificuldade em manter uma dieta hipocalórica por um período longo e, com isso, no controle do peso ao longo prazo. O insucesso nas dietas consecutivas, levando ao conhecido efeito *iô-iô*, pode, ao contrário, ser prejudicial a saúde. Este fato tem levado muitos agentes de saúde a recomendar a inclusão do exercício físico nos programas de emagrecimento como uma forma eficaz para manter o peso corporal em médio e longo prazo (Trombetta et al., 2005). Indivíduos obesos submetidos à restrição alimentar e treinamento físico apresentam redução no peso corporal em decorrência da perda de massa gordurosa (Trombetta et al., 2003). No entanto, estes indivíduos, diferentemente dos obesos submetidos apenas à restrição alimentar, não apresentam perda de massa magra. A restrição alimentar e o treinamento físico também provocam melhora na sensibilidade à insulina. Indivíduos obesos submetidos somente a esse tratamento não-medicamentoso apresentam diminuição nos níveis de insulina e glicemia de jejum e na relação insulinemia/glicemia durante um teste oral de tolerância à glicose (Trombetta et al, 2003).

Os efeitos da redução no peso corporal por restrição alimentar e exercício na concentração hepática de gordura e, possivelmente, na resistência hepática à insulina ainda são controversos. Alguns investigadores sugerem que o exercício físico diminui a concentração de triglicerídeos hepático em indivíduos obesos (Johnson et al., 2009). Outros não verificaram alteração na concentração de lipídios hepatocelular em indivíduos saudáveis com sobrepeso (Shojaee-Moradie et al., 2007). Estudo realizado em modelo experimental mostrou que o treinamento físico aumenta a oxidação de gordura no fígado e, com isso, previni a esteatose (Rector et al., 2008). Além disso, os efeitos da associação da restrição alimentar com o exercício, normalmente recomendados para o tratamento não-farmacológico da obesidade, na esteatose não são conhecidos.

Outros benefícios provocados pela perda de peso são a diminuição da atividade nervosa simpática e da concentração plasmática de leptina (Trombetta et al., 2003), lembrando que estas duas sinalizações no coração controlam a atividade das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} e, com isso, a função cardíaca (Bers, 2003; Saraiva et al, 2006; Minhas et al., 2006).

Estudo realizado em camundongos mostrou a importância do treinamento físico na melhora da fração de encurtamento (Kemi et al., 2007), o que foi associado com uma menor disponibilidade de $[Ca^{2+}]_i$ nos cardiomiócitos sugerindo com isso, uma maior sensibilidade dos miofilamentos ao Ca^{2+} . Nesse mesmo estudo, além da menor disponibilidade de $[Ca^{2+}]_i$ durante a sístole, viu também menor disponibilidade de $[Ca^{2+}]_i$ durante a diástole, o que foi atribuído a maior atividade da SERCA2, vista tanto pelo aumento da expressão desta proteína, como pelo aumento da P-PLB-Tre¹⁷ (Kemi et al., 2007).

Estudos recentes do nosso grupo mostraram que o treinamento físico melhora a homeostasia do Ca^{2+} . Rolim et al., (2007) e, mais recentemente, Medeiros et al., (2008) descreveram que o treinamento físico realizado regularmente melhora significativamente a atividade das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} na membrana celular e no retículo sarcoplasmático nos cardiomiócitos de camundongos com peso normal, porém com insuficiência cardíaca devido a hiperatividade nervosa simpática.

Em conjunto, estes conhecimentos nos remetem naturalmente a estudar os efeitos do tratamento não-farmacológico na função cardíaca e no perfil molecular das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} na obesidade e, além disso, a investigar se a restrição alimentar e o treinamento físico têm algum impacto na gordura hepática na obesidade.

2 Objetivos

Os objetivos da presente tese são:

- 1) Avaliar o efeito das terapias não farmacológicas, treinamento físico e restrição alimentar, na função cardíaca e no perfil molecular das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} ;
- 2) Avaliar o efeito do treinamento físico e da restrição alimentar no conteúdo hepático de gordura em ratos obesos;
- 3) Se existe um efeito sinérgico nessas respostas quando as duas intervenções estão associadas.

3 Métodos

Todos os procedimentos e experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos para o uso de animais de laboratório (www.cobea.org.br). Este estudo foi aprovado pela Comissão Científica do InCor (#SDC 2700/05/120) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP (#993/05).

3.1 Amostragem

Foram estudados ratos Wistar machos, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo. Os ratos foram mantidos no biotério do laboratório de Fisiologia na Escola de Educação Física e Esporte da Universidade de São Paulo, em sala climatizada (22-24 °C), em gaiolas com 3 ratos em cada e ciclo claro-escuro de 12-12 horas invertido ao ciclo regular. Os ratos foram divididos inicialmente em dois grupos: 1) os que receberam dieta normocalórica e 2) os que receberam dieta de cafeteria (hipercalórica). Para a dieta normocalórica, os ratos receberam ração comercial Labina[®] e para a dieta de cafeteria, eles receberam um ciclo de cinco dietas hipercalóricas diferentes, alteradas semanalmente por um período de 25 semanas (Nascimento et al., 2008). O uso dos diferentes tipos de dietas foi aplicado com o intuito de aumentar a palatabilidade do animal.

3.2 Medidas e Procedimentos

3.2.1 *Protocolo de Dieta Hipercalórica.* Os ratos que receberam a dieta hipercalórica foram alimentados por cinco dietas diferentes num período de uma semana cada uma delas. Os ingredientes e as composições nutricionais de cada dieta estão representados nas tabelas abaixo.

Tabela 1. Protocolo de dietas

Dieta 1	Pó Labina (Purina/SP) Amendoin torrado Caseína Óleo de milho Achocolatado Bolacha maisena Mistura vitamínica e mineral
Dieta 2	Pó Labina (Purina/SP) Amendoin torrado Caseína Óleo de milho Batata frita Mistura vitamínica e mineral
Dieta 3	Ração comercial labina Água com açúcar
Dieta 4	Pó Labina (Purina/SP) Amendoin torrado Caseína

	Óleo de milho
	Macarrão instantâneo
	Queijo ralado
	Mistura vitamínica e mineral
Dieta 5	Pó Labina (Purina/SP)
	Amendoim torrado
	Caseína
	Óleo de milho
	Leite condensado
	Bolacha Wafer
	Mistura vitamínica e mineral

Tabela 2. Composição das dietas

	CHO, %	Proteína, %	Gordura, %	Minerais, %	Fibras, %	Umidade, %	Energia Kcal/g
Dieta 1	35,6	28,9	20,4	3,5	2,6	8,9	4,4
Dieta 2	26,5	31,3	23,6	4,0	7,8	6,7	4,4
Dieta 4	32,6	30,5	20,5	4,5	3,1	8,8	4,4
Dieta 5	29,0	28,9	24,6	3,6	4,5	9,4	4,5
Labina	46,1	27,2	3,5	5,7	5,2	12,2	3,2

Ao término deste período, 25 semanas, os ratos que receberam a dieta de cafeteria (GOI) foram randomizados em:

- 1) Grupo Controle Obeso (GO);
- 2) Grupo Obeso Treinamento Físico (GOTF);

3) Grupo Obeso Restrição Alimentar (GORA) e

4) Grupo Obeso Treinamento Físico e Restrição Alimentar (GOTFRA).

Além disso, foi estudado um Grupo Controle Magro (GM).

3.2.2 Protocolo de Restrição Alimentar. Os ratos do GO, GOTF e GM continuaram recebendo a mesma dieta que a do início do protocolo, enquanto os ratos do GORA e GOTFRA foram submetidos a uma restrição alimentar. Para isso, a dieta hipercalórica foi substituída pela ração comercial com uma redução de 20 % da ingestão calórica diária em relação aos ratos do GOI na 25^a semana. O período de duração da restrição alimentar foi de 10 semanas (Figura 1). O consumo da dieta foi controlado diariamente e o peso corporal dos ratos semanalmente. Durante o período de restrição alimentar, os ratos do GORA e GOTFRA foram mantidos em gaiolas individuais a fim de controlar o consumo calórico diário.

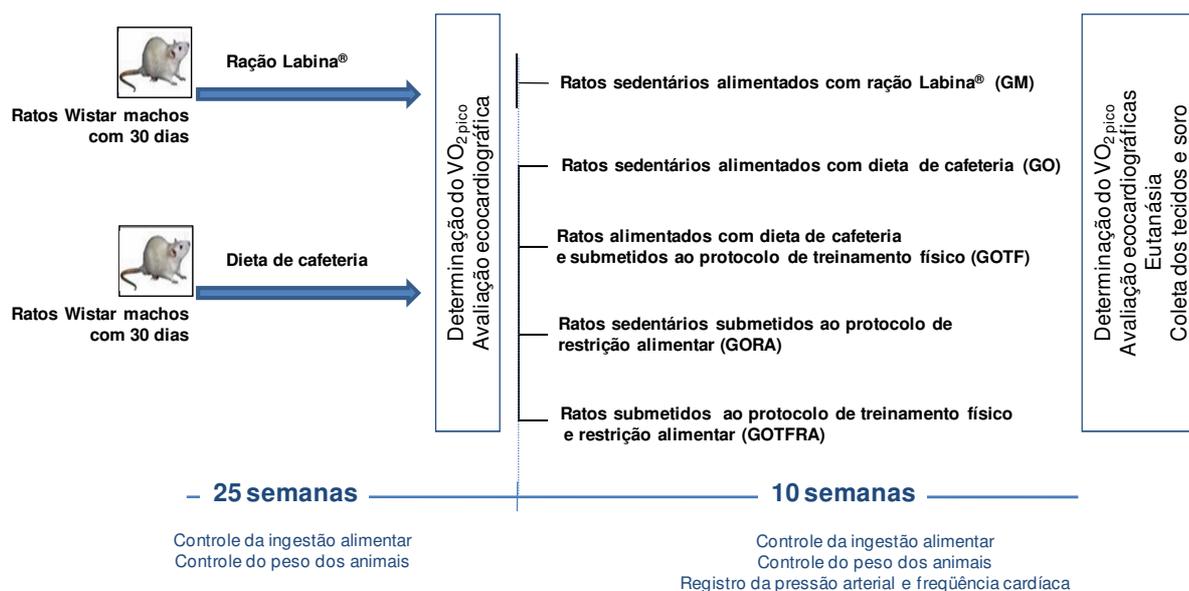


Figura 1. Planejamento Experimental.

3.2.3 Medida do Consumo de Oxigênio. A medida do consumo de oxigênio foi realizada através de um circuito aberto que consistiu da utilização de uma caixa metabólica conectada a um analisador de oxigênio que fornece a concentração desse gás no interior da caixa (Brooks, White, 1978). A caixa metabólica (9,5 x 32,5 x 11,5 cm) utilizada era subdividida internamente na sua porção superior (0,9 cm) por uma placa com 64 furos (0,3 cm de diâmetro) que possibilitava a mistura dos gases em seu interior. Uma abertura de 0,2 cm na superfície anterior da caixa permitia a entrada de um fluxo unidirecional de ar que era sugado por duas bombas aspiradoras conectadas por um tubo em forma de “Y” na porção superior da caixa. Uma das bombas aspirava o ar com velocidade de 2.500 mL/min (FANEM, MOD. CAL), enquanto a outra encaminhava o ar para o analisador de oxigênio com velocidade de 300 mL/min (Sable Systems Subsampller Version 3, SS-3). Para a determinação do consumo de oxigênio durante a realização do exercício físico, a caixa metabólica foi posicionada sobre uma esteira rolante. O consumo de oxigênio dos ratos foi determinado a partir da seguinte fórmula:

$$VO_2 \text{ (mL.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}) = \frac{[FO_{2\text{amb}} - FO_{2\text{momento}}] \times \text{Fluxo de ar}}{\text{Peso}}$$

Onde: $FO_{2\text{amb}}$ = fluxo de oxigênio dentro da caixa metabólica na ausência do animal;

$FO_{2\text{momento}}$ = fluxo de oxigênio dentro da caixa metabólica durante o momento

desejado; Peso = peso do rato, kg. O fluxo de ar corresponde à velocidade de sucção

do ar, no interior da caixa, pelas 2 bombas. No nosso estudo, 2.800 mL.

3.2.4 Protocolo de Exercício Físico Progressivo até a Exaustão. Antes da realização da medida do consumo de oxigênio de pico (VO_{2pico}), os ratos foram submetidos a um período de adaptação ao exercício que consistiu na prática de corrida durante 10 minutos utilizando velocidades variadas por três dias alternados. Após essa etapa, os ratos foram submetidos ao teste progressivo até a exaustão que consistiu da velocidade inicial de 5m/min e incrementos de 5 m/min a cada 3 minutos, até que os ratos não fossem mais capaz de manter a velocidade de corrida. Foi considerado VO_{2pico} o valor máximo do consumo de oxigênio alcançado durante o teste progressivo até a exaustão.

3.2.5 Protocolo de Treinamento Físico. Após a determinação do VO_{2pico} , os ratos do GOTF e GOTFRA foram submetidos ao protocolo de treinamento físico em esteira rolante. Na primeira semana do treinamento físico, os ratos treinaram com velocidade correspondente à 30-45% do VO_{2pico} durante 15-25 minutos. Nas duas semanas seguintes, a intensidade do treino foi aumentada progressivamente até que a velocidade de treinamento atingisse 60% do VO_{2pico} durante 60 minutos. Na quinta semana foi determinado novamente o VO_{2pico} e a intensidade do treinamento físico foi reajustado para 60% de VO_{2pico} durante 60 minutos (Tabela 3).

Tabela 3. Protocolo de treinamento físico

1º Semana		
Frequência (dias)	(%) VO ₂ pico	Tempo de exercício (min)
Segunda-feira	30	15
Terça-feira	35	15
Quarta-feira	35	20
Quinta-feira	45	20
Sexta-feira	45	25

2º Semana		
Frequência (dias)	(%) VO ₂ pico	Tempo de exercício (min)
Segunda-feira	35	25
Terça-feira	45	30
Quarta-feira	45	35
Quinta-feira	60	40
Sexta-feira	60	45

3 e 4º Semana		
Frequência (dias)	(%) VO ₂ pico	Tempo de exercício (min)
Segunda-feira	45	45
Terça-feira	50	60
Quarta-feira	55	60
Quinta-feira	60	60
Sexta-feira	60	60

5º Semana		
Protocolo de Exercício Físico Progressivo até a Exaustão		
Frequência (dias)	(%) VO ₂ pico	Tempo de exercício (min)
Terça-feira	50	50
Quarta-feira	55	50
Quinta-feira	55	55
Sexta-feira	60	60

6 e 10º Semana		
Frequência (dias)	(%) VO ₂ pico	Tempo de exercício (min)
Segunda-feira	55	60
Terça-feira	60	60
Quarta-feira	60	60
Quinta-feira	60	60
Sexta-feira	60	60

3.2.6 Avaliação da Frequência Cardíaca e Pressão Arterial. A pressão arterial caudal foi aferida semanalmente pelo método não invasivo de pletismografia da artéria caudal (registro indireto da pressão). Os ratos foram mantidos em cilindro de acrílico sob restrição de movimento e submetidos à aquecimento moderado para provocar vasodilatação da artéria caudal. O registro da pressão arterial foi realizado através da colocação de um manguito de borracha, ligado ao esfigmomanômetro, na região proximal da cauda e logo após, um transdutor pneumático para detecção dos sinais de passagem do fluxo sanguíneo permitindo o registro no sistema AT/CODAS

(DataQ Instruments, Inc., Ohio, USA), com frequência de amostragem de 1.000 Hz. Foi considerado como o valor da pressão arterial caudal aquele em que o pulso de pressão reaparece, isto é, quando a pressão exercida sobre a cauda torna-se ligeiramente menor que a pressão intra-arterial. A frequência cardíaca foi calculada a partir do intervalo de tempo de cada pulso de pressão caudal, detectado pelo transdutor sem a oclusão da passagem do fluxo sanguíneo na artéria caudal. Cinco medidas de pressão arterial caudal foram realizadas para cada rato, sendo desprezada a primeira e a última medida. Utilizamos a média dos valores restantes.

3.2.7 Avaliação da Função Ventricular. A função do ventrículo esquerdo foi avaliada por meio da ecocardiografia. As medidas ecocardiográficas seguiram as recomendações do Comitê de Padronização do modo M da Sociedade Americana de Ecocardiografia (Sahn et al., 1978). O exame ecocardiográfico foi realizado com os ratos anestesiados, por via intraperitoneal, com uma mistura de Xilasina (0,67 mg/Kg) e Ketamina (0,33 mg/kg). O rato anestesiado foi colocado em decúbito lateral em uma mesa cirúrgica apropriada. Foi utilizado o equipamento Sonos 5500 (Philips, Andover, EUA) com transdutor de 5 a 12 MHz, que permitiu imagens com 3 cm de profundidade. Para o registro das imagens foram utilizados três eletrodos que permitiram o registro do sinal eletrocardiográfico para obtenção da frequência cardíaca. Foram obtidos planos ecocardiográficos paraesternal longitudinal, paraesternal transversal e apical 2 e 4 câmaras. As imagens foram armazenadas em fitas de videocassete ou em disco óptico, para análise posterior. A função sistólica foi realizada pelo Modo M e calculada pela razão:

$$FS (\%) = \frac{DDVE - DSVE}{DSVE} \times 100$$

Onde: FS (%) = corresponde a fração de encurtamento, em porcentagem; DDVE = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo e DSVE = diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (Schiller et al., 1989).

A função diastólica foi avaliada pelos valores derivados da curva de velocidade do enchimento diastólico do ventrículo esquerdo realizado pelo Doppler tecidual e calculada pela razão:

$$E'/A' = \frac{\text{Onda E}}{\text{Onda A}}$$

Onde: Onda E = corresponde a velocidade máxima de enchimento diastólico precoce, em cm/s; Onda A = velocidade máxima de enchimento tardio, em cm/s.

É importante salientar que a acurácia e reprodutibilidade do exame ecocardiográfico transtorácico em estimar o tamanho e a função do ventrículo esquerdo em roedores têm sido confirmadas em uma série de estudos (Litwin et al., 1994). O exame ecocardiográfico transtorácico foi realizado antes e após o período de sedentarismo, treinamento físico e/ou restrição alimentar em todos os grupos estudados. Os exames foram realizados por um único observador e em cada exame foi coletado um total de três medidas para cada variável, sendo posteriormente calculada a média dessas medidas.

3.2.8 Eutanásia dos Animais. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais e sem alimento doze horas antes do início da eutanásia. A eutanásia foi realizada por decapitação respeitando os princípios éticos de estudo em animais, isto é, mantendo a sala em silêncio e a limpeza da área, a fim de evitar maior estresse para os ratos.

3.2.9 Coleta do Soro, Plasma e Tecido. Após a decapitação dos ratos, o sangue foi coletado em dois tubos com e sem heparina. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos e os sobrenadantes foram separados e congelados até o dia das dosagens. O coração foi rapidamente retirado, pesado e as câmeras separadas. Parte do ventrículo esquerdo foi mantida em formol 70% e parte homogenizado para futuras análises. O pulmão, fígado, rim, baço, adrenal e tecido adiposo (depósito de gordura retroperitoneal, mesentérica e epididimal) foram separados e pesados. O índice de adiposidade foi determinado através do cálculo:

$$IA (\%) = \frac{\text{Peso do tecido adiposo}}{\text{Peso corporal}} \times 100$$

Onde: IA (%) = índice de adiposidade, em porcentagem; Peso do tecido adiposo = corresponde a soma dos três depósitos de gordura retirados: retroperitoneal, mesentérica e epididimal. Peso corporal = com a mesma unidade utilizada para o depósito de gordura.

3.2.10 Determinação da Concentração de Lipídios Hepático. As concentrações hepática de colesterol total e triglicerídeos ($\mu\text{g/g}$ de tecido) foram determinadas pelo método enzimático (Laborlab, BR). Para isto, 100 mg do fígado de cada rato foi homogenizado isoladamente com 2,5 mL de solução de Dole, contendo 200 mL de isopropanol, 50 mL de n-heptano e 12,5 mL de ácido sulfúrico (8N), com o auxílio do Polytron (PT-K Brinkman Instruments). O homogenato foi agitado durante 30 minutos em temperatura ambiente no vórtex. A cada homogenizado foi colocado 1,5 mL de água milliq e 1,5 mL de n-heptano. As amostras foram novamente agitadas no vórtex e mantidas em repouso durante 5 minutos para decantar. Após este período, 1

mL de cada sobrenadante foi transferido para tubos individuais e estes tubos foram colocados para secar com ajuda de nitrogênio gasoso. Após a evaporação da solução nos tubos, os lipídeos foram resuspendidos em 50 μ L de duodecil sulfato de sódio 1% e 3 μ L destas suspensões foram utilizadas para as dosagens de triglicerídeos e colesterol total com a utilização de kits específicos para cada lipídeo.

3.2.11 Determinação da Concentração Plasmática de Colesterol Total e

Triglicérides. As concentrações plasmática de colesterol total e triglicérides (mg/dL) foram determinadas pelo método enzimático-Trinder (Labtest, BR).

3.2.12 Determinação da Concentração Plasmática de HDL-Colesterol.

A concentração plasmática da HDL-colesterol (mg/dL) foi determinada pela reação de ponto final (Labtest, BR).

3.2.13 Determinação da Concentração Plasmática de Glicose.

A concentração plasmática de glicose (mg/dL) foi determinada pelo método enzimático colorimétrico (Labtest, BR).

3.2.14 Determinação da Concentração Plasmática de Insulina e Leptina.

As concentrações plasmática de insulina (μ M/mL) e leptina (ng/dL) foram determinadas pelo método de radioimunoensaio com a utilização de kits específicos para ratos (Linco Research, EUA).

3.2.15 Avaliação da Resistência à Insulina. A resistência à insulina foi determinada pelo índice de HOMA-IR que consiste na multiplicação da concentração de insulina ($\mu\text{U/mL}$) e glicose (mM/L) em jejum e dividida por 22,5 (Matthews et al., 1985).

3.2.16 Avaliação da Atividade das Células Beta-Pancreáticas. A atividade das células β -pancreáticas foi determinada pelo índice de HOMA- β que consiste na multiplicação da concentração de insulina (mU/mL) por 20, dividida pela concentração de glicose (mM/L) em jejum subtraindo 3,5 (Matthews et al., 1985).

3.2.17 Determinação da Concentração de Citocina Plasmática. A determinação plasmática da concentração de TNF- α foi realizada com auxílio do serviço prestado pela Gênese (www.gendiag.com.br), multiplex, citocinas. A concentração do TNF- α foi feita pelo método Luminex MAP de detecção, fornecida por Millipore.

3.2.18 Quantificação de Catecolaminas Plasmáticas. As catecolaminas (adrenalina, Ad; noradrenalina, NA; dopamina, Dopa; e levodopamina, L-Dopa) foram dosadas com cromatografia líquida de alta performance com detecção eletroquímica (0,5 volts) (HPLC-ED). O sistema de HPLC consistiu de uma bomba modelo LC-10Advp e um detector amperométrico L-ECD-6A (Shimadzu) e um injetor Rheodyne com "loop" com capacidade de 100 μL . Os cromatogramas foram registrados e integrados pelo próprio Software HPLCvp (Shimadzu). Acoplado a esse sistema foi utilizada uma coluna de fase reversa Shim-pack CLC-ODS (M), C18, 5 (4,6 x 250 mm) (Shimadzu), com pré-coluna RP 18 Licrospher 100, 5 μm (4 x 4 mm)(Brownlee). A coluna foi equilibrada e eluída isocriticamente com tampão

fosfato dibásico de sódio (20 mM), pH 2,64, contendo ácido cítrico (20 mM), metanol (10%) e 556 mg/L de ácido heptânico sulfônico, com um fluxo de 0,8mL/minuto. O método foi adaptado para a realização da dosagem no plasma. Os cálculos foram feitos a partir da seguinte fórmula:

$$\text{pgA/mL} = \frac{\text{PsA/PsDHBA} \times \text{quantidade do padrão} \times \text{fator de diluição}}{\text{PstA/PstDHBA}}$$

Onde: A= amina; Ps= área do pico da amina na amostra; PstA= área do pico da amina no padrão; PsDHBA= área do pico de DHBA (dihidroxibenzilamina) na amostra; e PstDHBA= área do pico de DHBA no padrão. DHBA é o padrão interno de extração, usado para cálculo de recuperação nos tempos de retenção esperado. Todos os padrões serão provenientes da Sigma (Sigma Chemical, EUA). Os resultados serão expressos em µg de amina/mg de proteína.

3.2.19 Morfometrias. Após 48 horas de fixação em formol, o ventrículo esquerdo foi submetido ao processamento histológico. O tecido foi embebido em parafina e cortes de 5µm foram feitos (anéis) ao longo de seu maior eixo. Os anéis foram corados com hematoxilina-eosina ou picrossírius para análise do diâmetro dos cardiomiócitos ou para avaliação do volume de colágeno, respectivamente. Ambas as análises foram realizadas com o software LEICA QUANTIMET 500. Para análise do diâmetro dos cardiomiócitos foi utilizado aumento microscópico de 400 x. Os cardiomiócitos analisados estavam localizados na parede livre do ventrículo esquerdo e orientados em corte longitudinal. A integridade do cardiomiócito e a localização central do núcleo foram utilizadas como critério de escolha do campo. Foi considerado o valor do diâmetro a média de 40 valores medidos por rato. A análise quantitativa do

colágeno foi realizada com aumento microscópico de 200 x. A quantidade de colágeno foi determinada pelo razão da quantidade de colágeno pela quantidade de tecido total no campo. Foi considerado o volume de colágeno pela média de 10 campos medidos por lâmina de cada rato.

3.2.20 Avaliação do estado redox do músculo cardíaco. O estresse oxidativo foi avaliado pela razão da glutathiona reduzida pela glutathiona oxidada (GSH/GSSG). Para isto, o tecido cardíaco de cada rato foi homogenizado isoladamente em tampão contendo sucrose (0,32 M), ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico (10 mM) e etileno diamino tetracético (1 mM), pH 7,4, com auxílio do homogenizador Polytron (PT-K Brinkman Instruments). Os homogenatos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos à 4 °C e os sobrenadantes foram transferidos para tubos e estocados a -80 °C até a análise. As concentrações de GSH e GSSG foram determinadas por HPLC-ED (Rebrin, Sohal, 2004). Para isso, as amostras foram injetadas no HPLC e separadas por uma coluna de fase reversa C18 (5µm: 4,6 X 150 mm). Curvas de calibração foram realizadas para GSH e GSSH.

3.2.21 Biodisponibilidade de óxido nítrico. A biodisponibilidade de NO foi determinada através da dosagem de nitrato por quimioluminescência (Sievers, modelo NOA 280, EUA). Este método requer a redução de nitrato para NO por meio da reação do cloreto de vanádio em ácido clorídrico à 95 °C. O NO gerado é carregado pelo gás nitrogênio, um gás inerte, a uma câmara de geração de ozônio. A reação entre NO e ozônio gera luz, quantificada por fotomultiplicadoras. As curvas

de calibração em níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo, nitrato de sódio-Aldrich, utilizando um programa específico (Sievers versão 2.2, EUA). Os valores medidos de nitrato em μM foram corrigidos pela quantidade total de proteínas dos homogenatos pelo método Bradford (Biorad-EUA).

3.2.22 Avaliação da Expressão das Proteínas responsáveis pelo Transiente de Ca^{2+} no Músculo Cardíaco. Para as análises do perfil molecular de expressão de proteínas envolvidas na regulação de Ca^{2+} intracelular utilizamos o protocolo de Western blotting como descrito previamente (Laemmli , 1970; Rolim et al., 2007). Em resumo:

A) Preparação dos Homogenatos dos Ventrículos. O ventrículo esquerdo de cada rato foi homogenizado isoladamente através do homogenizador Polytron (PT-K Brinkman Instruments) em volume (9 x seu peso) de tampão de lise hipotônico contendo solução de tris com cloreto de hidrogênio (10 mM) e etileno diamino tetracético (5 mM), pH 7,4 na presença de uma mistura de inibidores de proteases e fosfatases. O processo de homogenização foi realizado 3 vezes durante 15 segundos com intervalos de 20 segundos entre as homogenizações. Todo o processo foi realizado em gelo. Os homogenatos foram centrifugados a 12.500 rpm por 20 minutos à 4 °C e os sobrenadantes foram transferidos para tubos individuais. A concentração de proteína das amostras foi analisada através do método de Bradford (Biorad-EUA). Alíquotas dos homogenatos foram armazenadas em freezer -80 °C até a sua utilização;

B) Quantificação da Proteína. As amostras contendo 50 µg de proteína foram separadas por gel de 6-12% de poliacrilamida contendo duodecil sulfato de sódio e transferidas para a membrana de nitrocelulose.

C) Western blotting. As membranas foram lavadas em tampão solução salina tamponada com fósforo – tween (PBS-T) por 5 minutos e bloqueadas com albumina de soro bovina (BSA) 3-5% por 1 h, lavadas novamente e incubadas com anticorpos primários em solução bloqueadora (PBS-T contendo 3% de BSA) por 12 horas, na geladeira, com agitação constante. Como anticorpos primários, utilizamos: A) os anticorpos policlonais de coelho para P-PLB-Ser¹⁶ (titulação recomendada pelo fabricante de 1:5000), P-PLB-Tre¹⁷ (titulação recomendada pelo fabricante de 1:5000), P-PKA-substratos Ser/Tre (titulação recomendada pelo fabricante de 1:1000), CaMKII (titulação recomendada pelo fabricante de 1:1000) e P-CaMKII-Tre²⁸⁶ (titulação recomendada pelo fabricante de 1:1000) obtidos da Cell Signaling (EUA); B) o anticorpo policlonal de rato para P-RyR-Ser²⁸⁰⁹ (titulação recomendada pelo fabricante de 1:2000) obtidos da Badrilla (RU); C) os anticorpos monoclonais de rato para RyR (titulação recomendada pelo fabricante de 1:1000), SERCA2 ATPase (titulação recomendada pelo fabricante de 1:2500), PLB (titulação recomendada pelo fabricante de 1:500) e NCX (titulação recomendada pelo fabricante de 1:2000); D) o anticorpo monoclonal de camundongo para α -tubulina (titulação recomendada pelo fabricante de 1:1000) obtidos da Santa Cruz (EUA). As membranas foram então lavadas 3 vezes com PBS-T e incubadas com os anticorpos secundários correspondentes em solução bloqueadora (PBS-T contendo 0,3% de BSA) por uma hora e meia, em temperatura ambiente, com agitação constante. Como anticorpos secundários utilizamos os anticorpos conjugados a peroxidase (anti-rato

ou anti-coelho, ECL, Amersham Biosciences, EUA; titulação recomendada pelo fabricante de 1:10000). Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada mais três vezes em solução de PBS-T. Por fim, a imuno detecção foi realizada através do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, EUA). A densidade relativa das bandas foi determinada utilizando o software do National Institutes of Health Image Software.

3.2.23 Análise Estatística. Os dados estão representados como a média \pm Erro Padrão (EP) e foram analisados pelo programa de estatística do Prism 4.0 Demo (GraphPad Software, San Diego, CA). Para comparação entre os ratos do GM com GOI em um mesmo período (25ª semana), o teste *t* de Student foi utilizado. Para a comparação entre os diferentes grupos (GM, GO, GOTF, GORA e GOTFRA) em um único tempo (35ª semana) utilizamos análise de variância de um fator e os diferentes grupos ao longo do tempo (da 25ª até a 35ª semana) utilizamos análise de variância de dois fatores com medidas repetidas. Quando a diferença estatística foi encontrada na análise de variância, o método de Bonferroni foi o escolhido. A correlação entre a fração de encurtamento e as concentrações de leptina e adrenalina foram realizados pela análise da regressão linear. Diferença estatística significativa para $P < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Ingestão alimentar e consumo calórico

O consumo de ração, água e caloria dos ratos do GM e GOI durante as 25 semanas são mostrados nas figuras 2A, 2B e 2C, respectivamente. Os resultados mostram que os ratos do GM ingeriram maior quantidade de ração, em gramas, da dieta padrão que os ratos do GOI ingeriram da dieta de cafeteria (hipercalórica). No entanto, quando a ingestão calórica foi calculada pela multiplicação da quantidade de ração consumida pelo valor calórico de cada dieta, verificamos que os ratos do GOI apresentaram maior consumo calórico, em algumas semanas, quando comparados com os ratos do GM. Na figura 2B que mostra a ingestão de água dos ratos, verificamos que os ratos do GM ingeriram a mesma quantidade de água que os ratos do GOI. Porém, analisando à quantidade de água ingerida pelos ratos do GOI ao longo do tempo, verificamos picos no consumo de água nas semanas em que os ratos receberam água com açúcar (3^a, 8^a, 13^a, 18^a e 23^a).

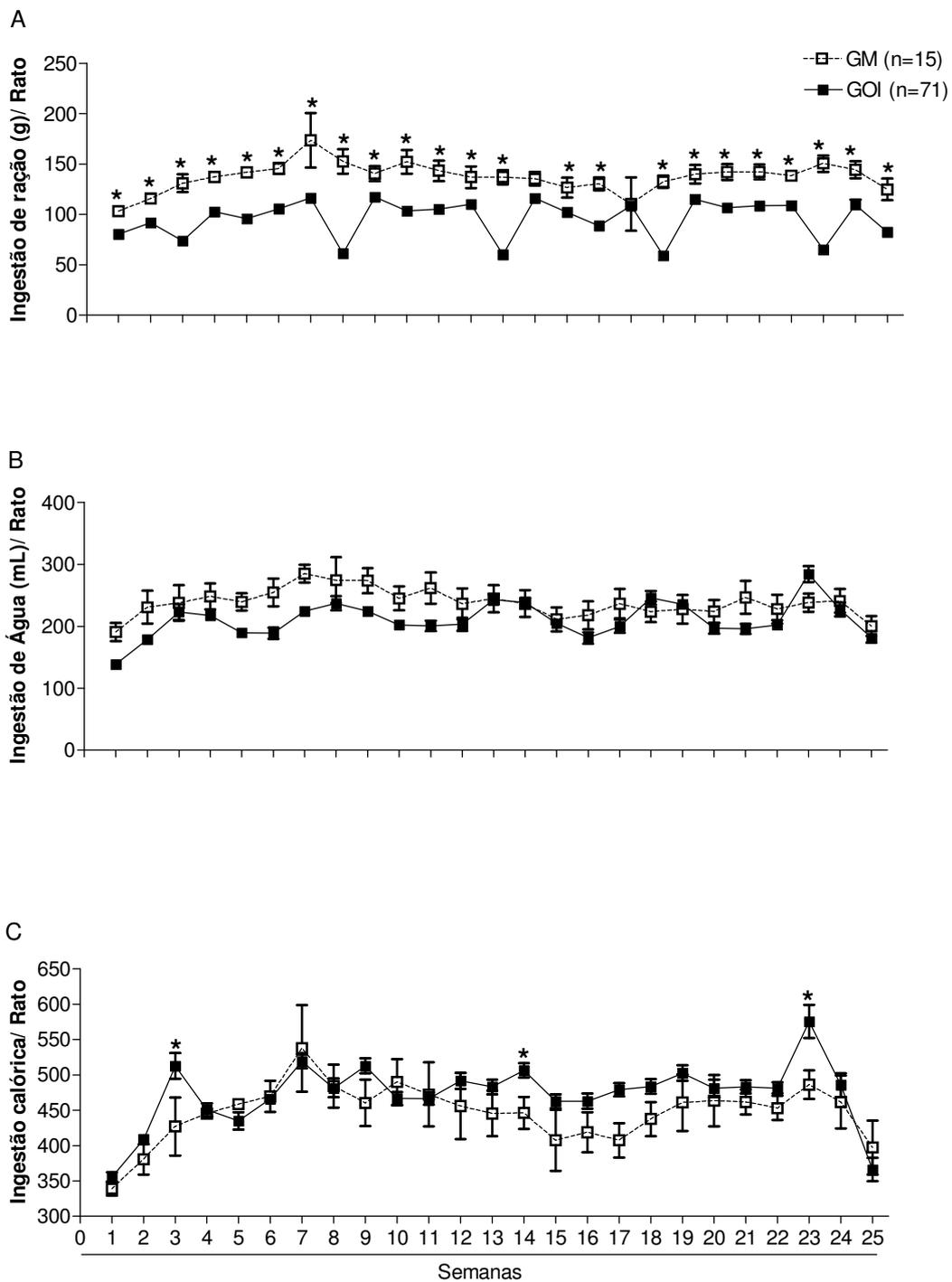


Figura 2. Ingestão de ração (painel A), ingestão de água (painel B) e ingestão calórica (painel C) em ratos submetidos à dieta padrão ou hipercalórica. Os dados estão expressos como média \pm EP de 15 ratos do grupo magro (GM) e 71 ratos do grupo obeso inicial (GOI). * $p < 0,05$ comparado entre os dois grupos na mesma semana por ANOVA de um fator.

4.2 Evolução do peso corporal dos ratos

A figura 3 mostra o ganho de peso corporal dos ratos durante todo o período de engorda. Conforme esperado, o peso dos ratos do grupo que recebeu as dietas hipercalóricas foi maior que o peso dos ratos do grupo que recebeu a dieta padrão a partir da 22^a semana.

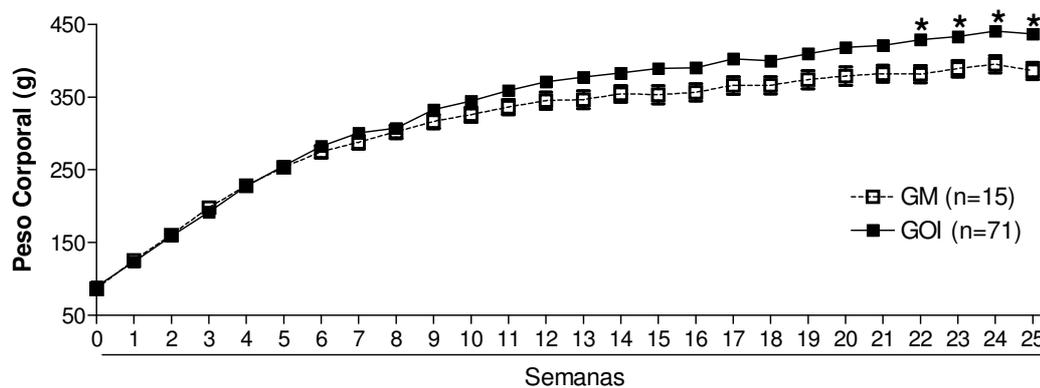


Figura 3. Evolução do peso corporal dos ratos submetidos à dieta padrão ou a dieta hipercalórica. Os dados estão expressos como média \pm EP de 15 ratos do grupo magro (GM) e 71 ratos do grupo obeso inicial (GOI). * $p < 0,05$ comparado com GM na mesma semana por ANOVA de dois fatores.

4.3 Consumo de oxigênio de pico

A figura 4 mostra o consumo de oxigênio de pico dos ratos do GM e GOI. Podemos verificar que não há diferença entre os grupos no consumo de oxigênio de pico e na velocidade máxima atingida durante o teste de esforço progressivo até a exaustão.

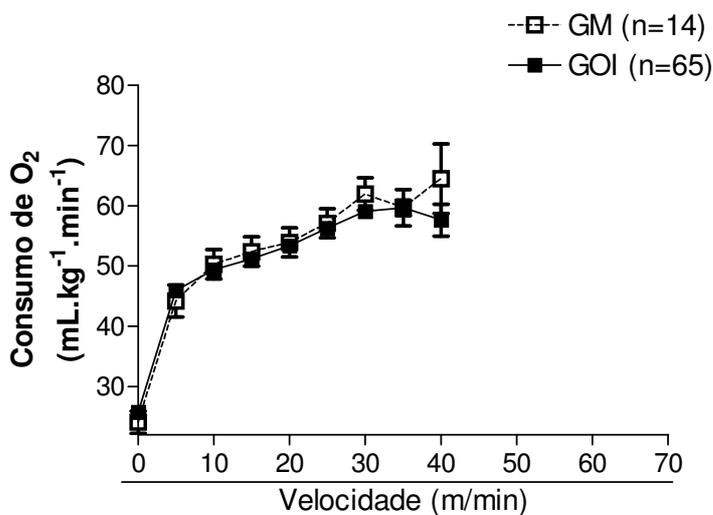


Figura 4. Consumo de oxigênio de pico em ratos do grupo magro (GM) e ratos do grupo obeso inicial (GOI). Os dados estão expressos como média \pm EP de 14 ratos do GM e 65 do grupo GOI. ANOVA de dois fatores.

4.4 Distância máxima percorrida

A figura 5 mostra a distância máxima percorrida pelos ratos do GM e GOI durante o teste progressivo máximo. Como podemos verificar no gráfico abaixo, os ratos do GOI apresentaram menor distância máxima percorrida quando comparados com os ratos do GM.

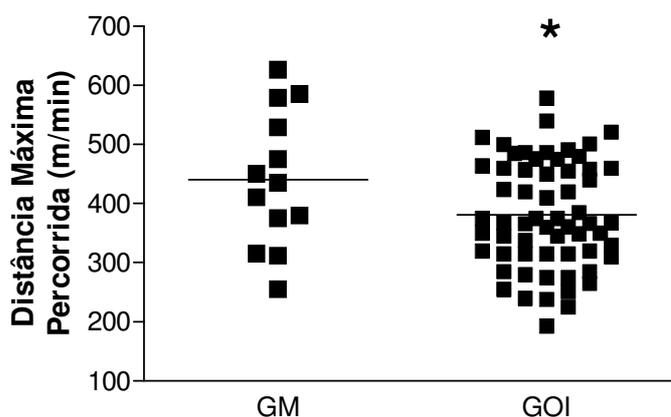


Figura 5. Dados individuais da distância máxima percorrida em ratos magros (GM) e ratos obesos (GOI). * $p < 0,05$ comparado com GM por Teste-T não pareado.

4.5 Valores de frequência cardíaca e pressão arterial

A figura 6A mostra os valores da frequência cardíaca (FC) e a figura 6B da pressão arterial caudal (PAC) em ratos do GM e GOI. Os valores da FC e PAC não foram diferentes entre estes dois grupos.

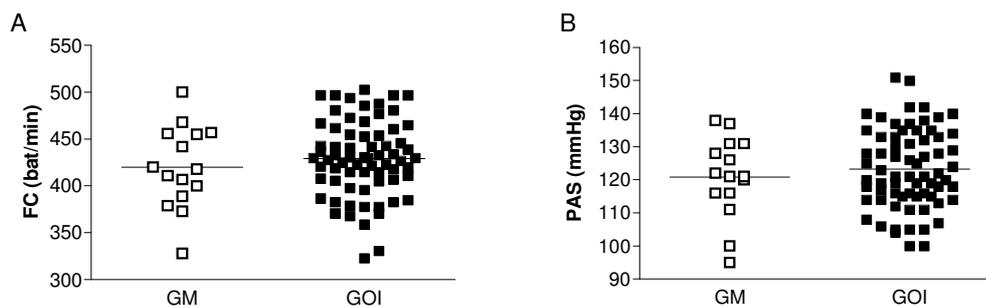


Figura 6. Dados individuais da frequência cardíaca (FC) e pressão arterial caudal (PAC) em ratos do grupo obeso inicial (GOI) e ratos do grupo magro (GM). Teste-T não pareado.

4.6 Função cardíaca

A tabela 4 mostra os dados ecocardiográficos dos ratos do GM e GOI na 25^a semana. Os ratos do GOI apresentaram leve aumento no diâmetro diastólico e sistólico do ventrículo esquerdo e leve diminuição na fração de encurtamento quando comparados com os ratos do GM.

Tabela 4. Dados ecocardiográficos

	GM (n)	GOI (n)
DDVE (mm)	6,0±0,1 (14)	6,2±0,7 (64)
DSVE (mm)	3,3±0,1 (15)	3,4±0,1 (64)
FE (%)	45,6±1,0 (14)	44,8±0,6 (63)
ES (mm)	1,1±0,1 (14)	1,1±0,1 (65)
PP D (mm)	1,3±0,1 (15)	1,3±0,1 (65)
E/A	1,1±0,1 (13)	1,1±0,1 (58)

DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, DSVE – diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, FE – fração de encurtamento, ES - espessura do septo, PPD- espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole, E/A – Doppler tecidual da onda E/A mitral na parede lateral do ventrículo esquerdo. Os valores são da média e do EP dos ratos do grupo magro (GM) e dos ratos do grupo obeso inicial (GOI). O número de ratos por grupo está em parêntesis. Teste-T não pareado.

4.7 Ingestão alimentar e consumo calórico durante o período de treinamento físico e/ou restrição alimentar

O consumo de ração, água e caloria dos diferentes grupos está representado nas figuras 7A, 7B e 7C, respectivamente. Na figura 7A podemos verificar que os ratos do GO ingeriram menor quantidade de ração, em gramas, na primeira, segunda, terceira e oitava semana comparado com os ratos do GM. Os ratos do GORA e GOTFRA ingeriram uma maior quantidade de ração, em gramas, na oitava semana que os ratos do GO. No entanto, a quantidade de caloria ingerida pelos ratos do GORA e GOTFRA foi menor que a ingerida pelos ratos no GO na terceira e na oitava semana (Figura 7C). Os ratos do GOTF não apresentaram diferença na ingestão alimentar, gramas e calorias, comparados com os ratos do GO. Em relação ao consumo de água, os ratos do GORA e GOTFRA ingeriram uma maior quantidade de água em relação aos ratos dos outros grupos, exceto na 3^a e 8^a semana, quando os ratos dos GO e GOTF receberam água com açúcar (Figura 7B).

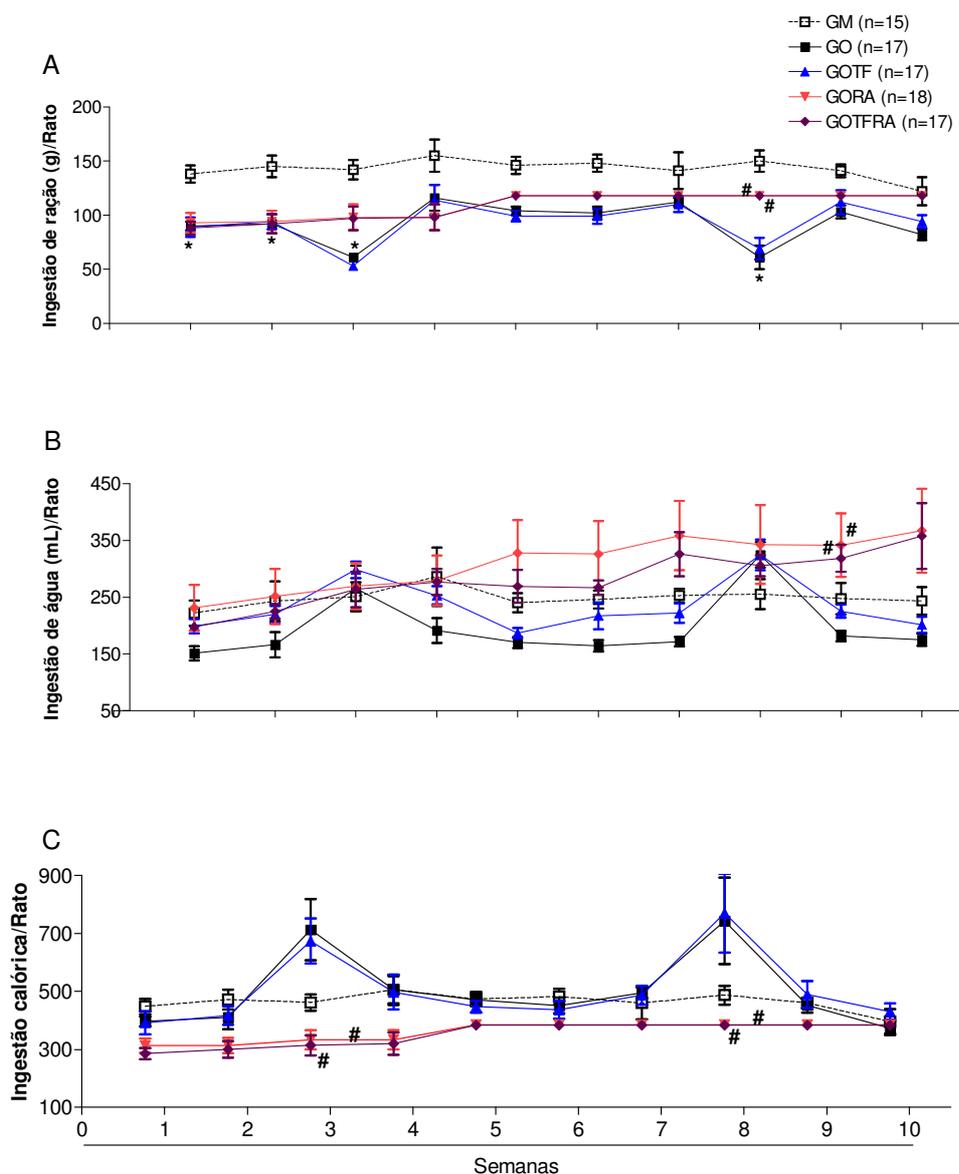


Figura 7. Ingestão de ração (painel A), ingestão de água (painel B) e ingestão de caloria (painel C) durante o período de treinamento físico e restrição alimentar. Os dados estão expressos como média \pm EP de 15 ratos do grupo magro (GM), 17 ratos do grupo obeso (GO), 17 ratos do grupo obeso treinado (GOTF), 18 ratos do grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e 17 ratos do grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). * $p < 0,05$ comparado com GM; e # $p < 0,05$ comparado com GO na mesma semana por ANOVA de dois fatores.

4.8 Variação do peso corporal dos ratos durante o período de treinamento físico e restrição alimentar

A figura 8 mostra que tanto os ratos que receberam a ração controle como os ratos que receberam a dieta de caferetia *ad libitum* continuaram ganhando peso ao longo do tempo. O ganho de peso nos ratos do GO ($437,20 \pm 13,09$ para $475,00 \pm 17,44$ g) foi maior comparado com os ratos do GM ($385,50 \pm 11,81$ para $414,50 \pm 13,37$ g). Porém, os ratos do GOTF mantiveram o peso ($427,70 \pm 12,48$ para $425,30 \pm 12,98$ g) e os ratos do GORA e GOTFRA perderam peso ao longo do procedimento experimental (GORA = $440,10 \pm 13,24$ para $391,80 \pm 7,52$ g e GOTFRA = $443,90 \pm 11,70$ para $375,80 \pm 7,54$ g).

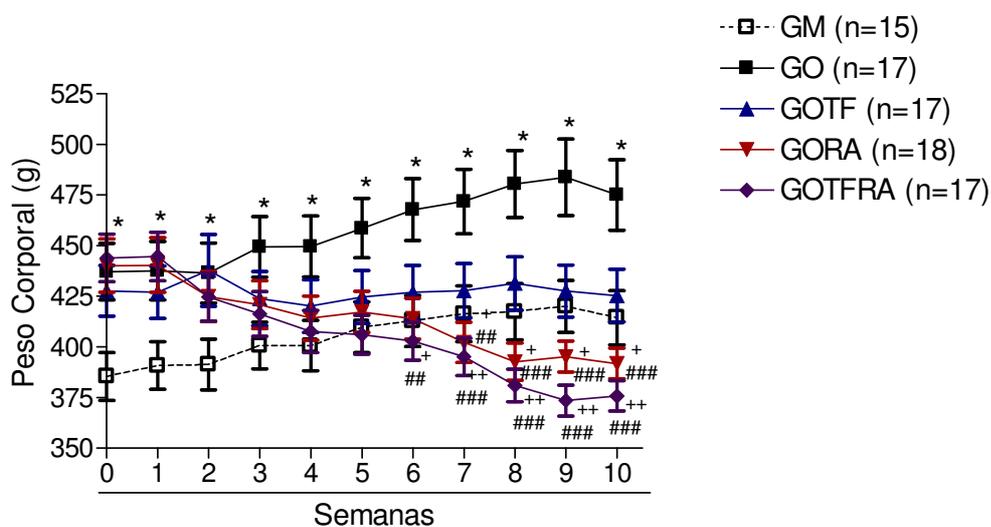


Figura 8. Variação do peso corporal dos ratos durante o período de treinamento físico e/ou restrição alimentar. Os dados estão expressos como média \pm EP de 15 ratos do grupo magro (GM), 17 ratos do grupo obeso (GO), 17 ratos do grupo obeso treinado (GOTF), 18 ratos do grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e 17 ratos do grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). * $p < 0,05$ comparado com GM; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparado com GO na mesma semana; + $p < 0,05$ e ++ $p < 0,01$ comparado com o mesmo grupo no início do intervenção por ANOVA de dois fatores com medidas repetidas.

4.9 Consumo de oxigênio de pico

A figura 9 mostra o consumo de oxigênio de pico dos ratos nos diferentes grupos após o período de treinamento físico e/ou restrição alimentar. Podemos verificar que os ratos submetidos ao protocolo de treinamento físico com ou sem restrição alimentar apresentaram maior consumo de oxigênio de pico comparados com os ratos dos outros grupos.

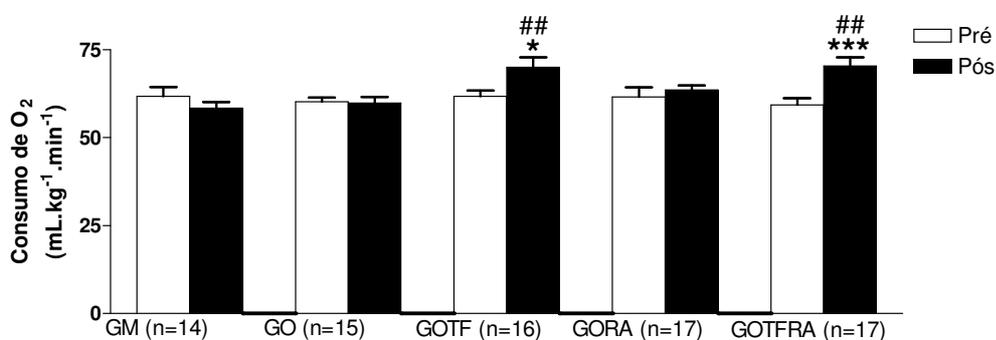


Figura 9. Consumo de oxigênio de pico nos ratos submetidos ou não ao protocolo de treinamento físico e/ou restrição alimentar. Os dados estão expressos como média \pm EP de 14 ratos do grupo magro (GM), 15 ratos do grupo obeso (GO), 16 ratos do grupo obeso treinado (GOTF), 17 ratos do grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e 17 ratos do grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado com o mesmo grupo pré; e ## $p < 0,01$ comparado com GO pós por ANOVA de dois fatores.

4.10 Distância máxima percorrida

A figura 10 mostra a distância máxima percorrida pelos ratos dos diferentes grupos estudados após o período de treinamento físico e/ou restrição alimentar. Podemos verificar que a distância percorrida pelos ratos do GOTF e GOTFRA foi maior comparados com os ratos do GO.

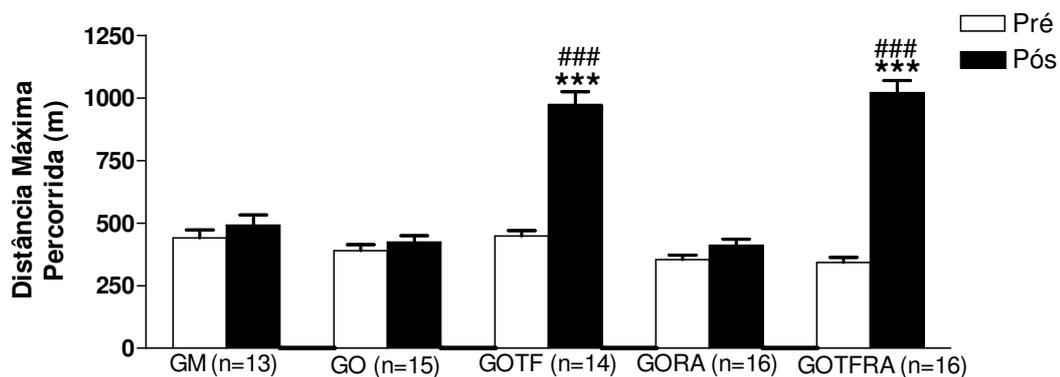


Figura 10. A distância máxima percorrida dos ratos submetidos ou não ao protocolo de treinamento físico e/ou restrição alimentar. Os dados estão expressos como média \pm EP de 13 ratos do grupo magro (GM), 15 ratos do grupo obeso (GO), 14 ratos do grupo obeso treinado (GOTF), 16 ratos do grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e 16 ratos do grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). *** $p < 0,001$ comparado com o mesmo grupo pré; e ### $p < 0,001$ comparado com GO pós por ANOVA de dois fatores.

4.11 Frequência cardíaca e pressão arterial durante o período de treinamento físico e/ou restrição alimentar

A figura 11A mostra os valores da FC e a figura 11B da PAC dos diferentes grupos estudados ao longo do período de treinamento físico e/ou restrição alimentar. A FC foi menor nos ratos do GOTFRA, com uma leve diminuição nos ratos do GOTF ($\Delta=10$ bat/min) e GORA ($\Delta=30$ bat/min). A PAC não foi alterada por nenhuma das intervenções empregadas.

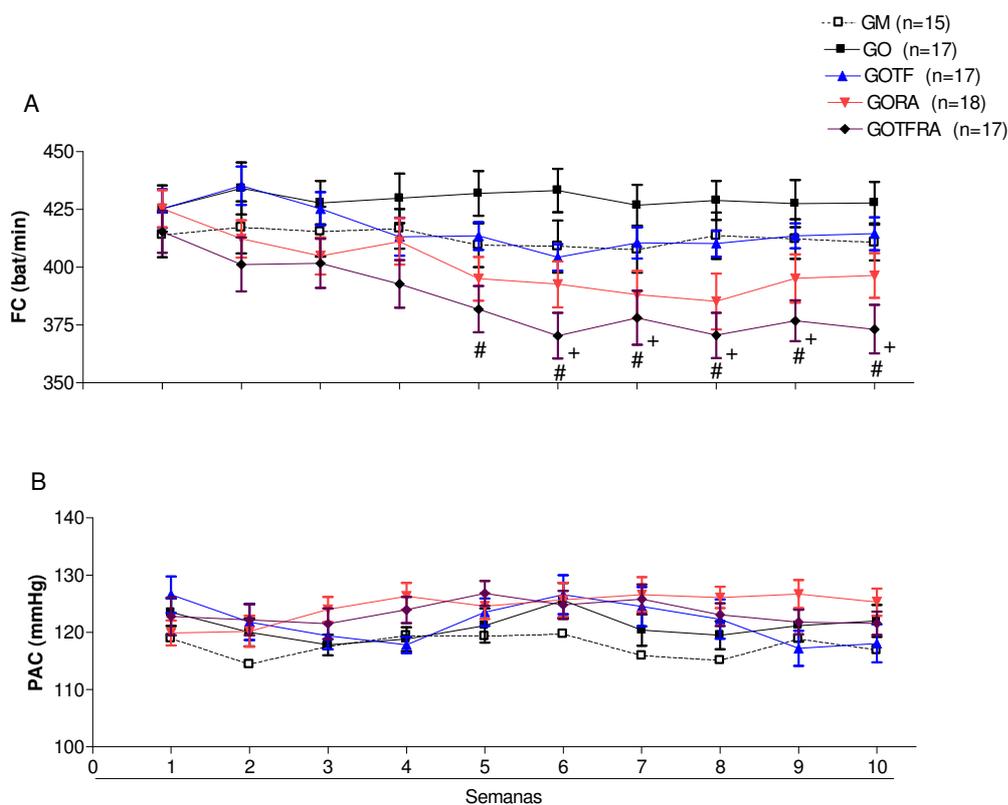


Figura 11. Frequência cardíaca (painel A) e pressão arterial caudal (painel B) dos ratos durante o período de treinamento físico e/ou restrição alimentar. Os dados estão expressos como média \pm EP de 15 ratos do grupo magro (GM), 17 ratos do grupo obeso (GO), 17 ratos do grupo obeso treinado (GOTF), 18 ratos do grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e 17 ratos do grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). #p < 0,05 comparado com GO na mesma semana; +p < 0,05 comparado com o mesmo grupo na semana 1 por ANOVA de dois fatores com medidas repetidas.

4.12 Peso dos órgãos dos diferentes grupos estudados

A tabela 5 mostra o peso dos diferentes tecidos isolados de acordo com os grupos estudados. Para analisar esses dados corrigimos o peso de cada tecido (g) pelo comprimento da tíbia do animal (mm) e multiplicamos por 100. Os ratos do GO apresentaram aumento significativo no peso da adrenal e do fígado comparados com os ratos do GM. A restrição alimentar associada ou não ao treinamento físico diminuiu o peso do coração e do pulmão. A diminuição do peso do baço só ocorreu

quando as duas intervenções foram associadas. Nenhuma das intervenções utilizadas foi capaz de reduzir o peso do fígado.

Tabela 5. Peso dos órgãos nos diferentes grupos estudados.

Tecidos/ Tíbiax100	GM (n)	GO (n)	GOTF (n)	GORA (n)	GOTFRA (n)
Coração	2,6±0,06 (14)	2,75±0,06 (15)	2,76±0,06 (16)	2,53±0,05 ^{##} (16)	2,45±0,05 ^{###+} (17)
Adrenal	0,13±0,01 (13)	0,16±0,01* (16)	0,15±0,01 (16)	0,14±0,01 (17)	0,14±0,01 (16)
Baço	1,70±0,05 (14)	1,70±0,05 (16)	1,70±0,05 (16)	1,70±0,05 (17)	1,60±0,05 ^{##} (16)
Pulmão	4,60±0,16 (13)	4,90±0,19 (16)	4,60±0,15 (14)	4,30±0,11 [#] (14)	4,30±0,12 [#] (16)
Fígado	23,80±0,50 (13)	25,80±0,50* (15)	26,90±0,50* (16)	26,50±0,50* (17)	25,90±0,50* (16)
Rim	6,34±0,12 (13)	6,37±0,18 (16)	6,24±0,18 (16)	5,93±0,10 (17)	5,97±0,09 (17)

Os valores são da média e do EP dos ratos do grupo magro (GM), grupo obeso (GO), grupo obeso treinado (GOTF), grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). O número de ratos por grupo está em parêntesis. *p < 0,05 comparado com GM; #p < 0,05 e ##p < 0,01 comparado com GO; e +p < 0,05 e +++p < 0,001 comparado com GOTF por ANOVA de um fator.

4.13 Porcentagem de gordura corporal

Após a morte dos ratos, os depósitos de gordura retroperitoneal, mesentérica e epididimal foram separados e pesados. O índice de adiposidade dos ratos do GO aumentou 50% quando comparado com o dos ratos do GM. O treinamento físico, a restrição alimentar ou a associação das duas intervenções reduziram o índice de adiposidade em 22, 51 e 58%, respectivamente (Figura 12).

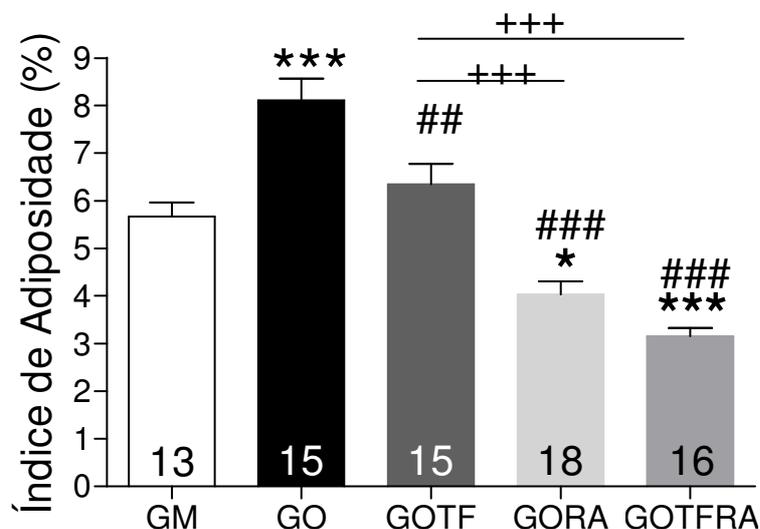


Figura 12. Índice de adiposidade nos diferentes grupos. Os dados estão expressos como média \pm EP de 13 ratos do grupo magro (GM), 15 ratos do grupo obeso (GO), 15 ratos do grupo obeso treinado (GOTF), 18 ratos do grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e 16 ratos do grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado com GM; ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ comparado com GO; e +++ $p < 0,001$ comparado com GOTF por ANOVA de um fator.

4.14 Perfil metabólico

A tabela 6 mostra os valores das dosagens plasmática e hepática do perfil metabólico nos diferentes grupos estudados. Os ratos do GO apresentaram maior concentração de leptina e glicose, resultando no aumento do índice HOMA-IR quando comparados com os ratos do GM. O treinamento, a restrição alimentar ou a associação das duas intervenções diminuíram a concentração plasmática de leptina com resultados semelhantes aos observados no índice de adiposidade. Entretanto, nenhum dos tratamentos foi capaz de diminuir a concentração plasmática de glicose, nem o índice HOMA-IR. A associação do treinamento físico com a restrição alimentar diminuiu a concentração de HDL-colesterol. O conteúdo hepático de triglicérido foi menor nos ratos submetidos à restrição alimentar que nos ratos

submetidos à dieta hipercalórica. A associação das duas intervenções provocou redução ainda mais expressiva no conteúdo de triglicerídeo, atingindo um nível inferior àquele dos ratos do GM.

Tabela 6. Perfil metabólico

Perfil Metabólico	GM (n)	GO (n)	GOTF (n)	GORA (n)	GOTFRA (n)
Colesterol (mg/dL)	67,1±3,4 (13)	75,9±4,0 (16)	71,1±3,5 (14)	73,4±4,1 (17)	62,6±4,8 (15)
LDL (mg/dL)	13,9±2,2 (12)	19,8±2,0 (7)	16,5±2,6 (11)	11,9±2,0 (10)	13,6±2,7 (11)
HDL (mg/dL)	40,1±2,6 (13)	50,7±3,7 (11)	49,6±2,7 (14)	45,1±2,4 (15)	36,3±3,6 ^{#+} (15)
TG (mg/dL)	57,3±3,6 (12)	60,7±4,1 (13)	58,4±5,5 (12)	72,1±5,4 [*] (14)	65,7±4,6 (13)
Glicose (mg/dL)	99,6±1,6 (13)	113,9±3,3 ^{**} (15)	113,9±2,3 [*] (14)	121,6±2,7 ^{***} (17)	113,8±3,4 [*] (15)
Insulina (ng/dL)	0,5±0,1 (14)	0,7±0,1 (15)	0,7±0,1 (14)	0,7±0,1 (15)	0,7±0,1 (15)
HOMA-IR	4,9±0,8 (13)	8,6±1,1 [*] (14)	8,4±1,4 [*] (14)	10,8±1,6 [*] (17)	8,0±1,2 [*] (14)
HOMA-β	75,5±13,0 (14)	92,3±9,9 (14)	88,1±13,1 (14)	87,1±9,4 (14)	73,7±9,0 (12)
Leptina (ng/dL)	2,9±0,3 (14)	6,4±0,7 ^{***} (15)	4,4±0,5 [#] (14)	2,5±0,3 ^{####} (16)	1,6±0,2 ^{#####} (16)
TNF-α (pg/mL)	2,0±0,2 (12)	2,1±0,2 (14)	1,8±0,2 (11)	2,9±0,4 (15)	1,8±0,2 (16)
Colesterol hepático (mg/g tecido)	1,3±0,1 (7)	1,3±0,1 (8)	1,1±0,1 (8)	1,1±0,1 (9)	0,9±0,1 [*] (7)
TG hepático (mg/g tecido)	2,2±0,4 (7)	2,7±0,3 (8)	1,9±0,2 (8)	1,3±0,1 ^{##} (8)	1,0±0,1 ^{###} (6)

LDL – colesterol de baixa densidade, HDL – colesterol de alta densidade, TG – triglicerídeo, HOMA-IR – resistência a insulina, HOMA-β – atividade das células β-pancreática, TNF-α – fator de necrose tumoral. Os valores são da média e do EP dos ratos do grupo magro (GM), grupo obeso (GO), grupo obeso treinado (GOTF), grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). O número de ratos por grupo está em parêntesis. *p < 0,05, **p < 0,01 e ***p < 0,001 comparado com GM; #p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001 comparado com GO; e +p < 0,05 e +++p < 0,001 comparado com GOTF por ANOVA de um fator.

4.15 Concentração de catecolaminas plasmática

A tabela 7 mostra os valores das dosagens das catecolaminas plasmáticas. A concentração plasmática de adrenalina e noradrenalina foi maior nos ratos do GO que nos ratos do GM. O treinamento físico, a restrição alimentar ou a associação das duas intervenções foram capazes de diminuir a concentração das catecolaminas para níveis semelhantes àqueles dos ratos do GM.

Tabela 7. Concentração de catecolaminas

Dosagens Plasmáticas	GM (n)	GO (n)	GOTF (n)	GORA (n)	GOTFRA (n)
NA (pg/mL)	624,3±29,1 (7)	991,9±84,8* (5)	649,1±37,9 [#] (7)	635,8±71,5 [#] (7)	669,1±60,4 [#] (6)
Ad (pg/mL)	658,2±95,1 (5)	1173,0±139,3* (5)	566,9±65,4 ^{##} (7)	583,8±136,5 ^{##} (6)	673,4±107,1 [#] (7)
Dopa (pg/mL)	49,8±5,1 (7)	81,0±18,8 (7)	68,3±14,3 (8)	78,7±13,6 (8)	72,1±5,2 (7)
L-Dopa (pg/mL)	154,6±36,6 (7)	102,3±6,4 (6)	162,4±35,1 (7)	132,2±16,5 (7)	160,8±15,5 (7)

NA – noradrenalina, Ad – adrenalina, Dopa – dopamina e L-Dopa – levodopamina. Os valores são da média e do EP dos ratos do grupo magro (GM), grupo obeso (GO), grupo obeso treinado (GOTF), grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). O número de ratos por grupo está em parêntesis. *p < 0,05 comparado com GM; [#]p < 0,05 e ^{##}p < 0,01 comparado com GO por ANOVA de um fator.

4.16 Função cardíaca

A tabela 8 mostra os dados ecocardiográficos realizados nos ratos após as intervenções utilizadas. Os ratos do GO apresentaram diminuição da fração de encurtamento quando comparada com os ratos do GM. O treinamento, a restrição alimentar ou a associação das duas intervenções foram capazes de prevenir a queda da função sistólica. A fração de encurtamento dos com intervenção não foi diferente daquela observada no grupo GM.

Tabela 8. Dados ecocardiográficos

	GM (n)	GO (n)	GOTF (n)	GORA (n)	GOTFRA (n)
DDVE (mm)	6,4±0,2 (15)	6,4±0,1 (15)	6,5±0,1 (15)	6,5±0,1 (18)	6,6±0,2 (16)
DSVE (mm)	3,6±0,2 (15)	4,0±0,1 (15)	3,8±0,1 (15)	3,8±0,1 (17)	3,8±0,1 (16)
FE (%)	44,7±1,5 (14)	39,2±1,5*	41,8±1,0 (15)	42,0±1,0 (17)	42,5±1,1 (15)
ES (mm)	1,0±0,1 (14)	1,1±0,1 (15)	1,1±0,1 (15)	1,1±0,1 (16)	1,0±0,1 (16)
PP D (mm)	1,2±0,1 (15)	1,2±0,1 (14)	1,2±0,1 (15)	1,2±0,1 (17)	1,2±0,1 (16)
E/A	1,1±0,1 (14)	1,2±0,2 (15)	1,2±0,1 (14)	0,9±0,1 (17)	0,9±0,1 (15)

DDVE – diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo, DSVE – diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo, FE – fração de encurtamento, ES - espessura do septo, PPD- espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole, E/A – Doppler tecidual da onda E/A mitral na parede lateral do ventrículo esquerdo. Os valores são da média e do EP dos ratos grupo magro (GM), grupo obeso (GO), grupo obeso treinado (GOTF), grupo obeso com restrição alimentar (GORA) e grupo obeso treinado com restrição alimentar (GOTFRA). O número de ratos por grupo está em parêntesis. *p < 0,05 comparado com GM por ANOVA de um fator.

4.17 Morfometria Cardíaca

A figura 13A mostra os valores do diâmetro dos cardiomiócitos e a figura 13B da % de colágeno no tecido cardíaco nos diferentes grupos estudados.

Verificamos uma tendência de hipertrofia cardíaca nos animais do GOTF. Com relação a % de colágeno, não observamos diferença significativa entre os grupos estudados.

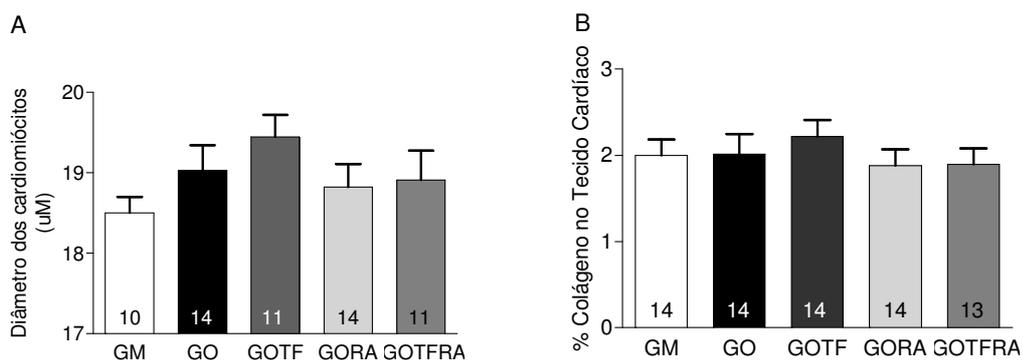


Figura 13. Hipertrofia e porcentagem de colágeno nos cardiomiócitos nos diferentes grupos. Os dados estão expressos como média \pm EP. GM = grupo magro; GO = grupo obeso; GOTF = grupo obeso treinado; GORA = Grupo obeso com restrição alimentar e GOTFRA = grupo obeso treinado com restrição alimentar. O número de ratos de cada grupo está expresso em cada barra dos gráficos. ANOVA de um fator.

4.18 Alterações nas atividades das proteínas relacionadas com o transiente de cálcio

Para verificarmos as possíveis alterações celulares decorrentes do desenvolvimento da obesidade e o papel do treinamento físico e da restrição alimentar, determinamos a expressão de diferentes proteínas no homogenato cardíaco. Como podemos verificar na 14D, a razão P-PLB-Tre¹⁷/PLB foi menor nos ratos do GO quando comparado com os ratos do GM e que, tanto o treinamento físico como a restrição alimentar, preservaram a razão P-PLB-Tre¹⁷/PLB. Quanto às proteínas responsáveis pela liberação do cálcio no retículo sarcoplasmático, verificamos que a obesidade não alterou a expressão do RyR e P-RyR-Ser²⁸⁰⁸ (Figura 14A). No entanto, a obesidade diminuiu a razão P-RyR-Ser²⁸⁰⁸/RyR e o treinamento físico e/ou a restrição alimentar preservaram esta razão (Figura 14F). Não verificamos alteração na expressão da Serca (Figura 14B), NCX (Figura 14C), normalizador α -tubulina (Figura 14A), P-PLB-Tre¹⁶/PLB (Figura 14E) e nem na PLB (Figura 14A) em nenhum dos grupos estudados.

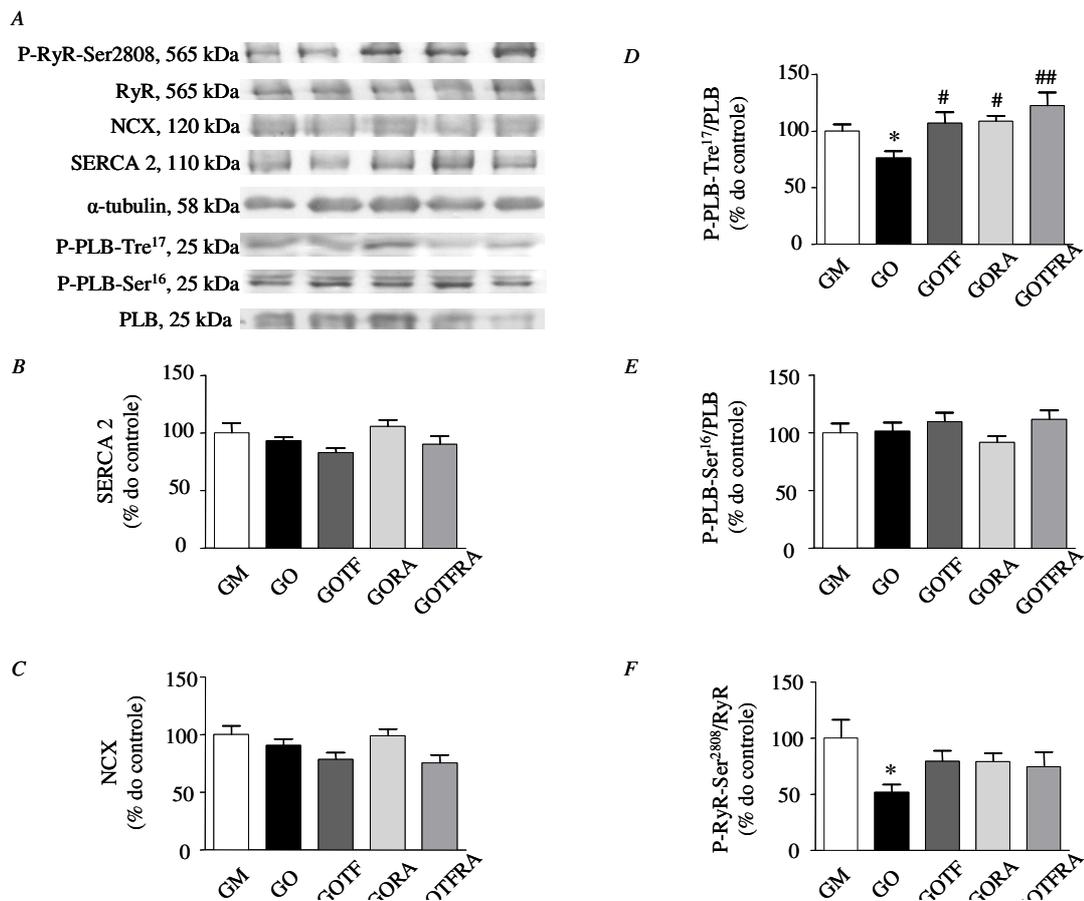


Figura 14. Expressão das proteínas responsáveis pelo transiente de cálcio nos cardiomiócitos nos diferentes grupos. SERCA 2 – cálcio ATPase do retículo sarcoplasmático, NCX – trocador sódio/cálcio, P-PLB-Tre17 – fosfolambam fosforilada no sítio da treonina 17, P-PLB-Ser16 – fosfolambam fosforilada no sítio da serina 16, PLB – fosfolambam, P-RyR-Ser2808 – receptor de rianodina fosforilada no sítio da serina 2808, RyR – receptor de rianodina. Os dados representam a média \pm EP da porcentagem em relação ao controle. GM = grupo magro; GO = grupo obeso; GOTF = grupo obeso treinado; GORA = grupo obeso com restrição alimentar; e GOTFRA = grupo obeso treinado com restrição alimentar. O número de ratos de cada grupo está expresso em cada barra dos gráficos. * $p < 0,05$ e comparado com GM; # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ comparado com GO por ANOVA de um fator.

4.19 Atividade das proteínas responsáveis pela cascata de sinalização β -adrenérgica

Para verificarmos se as alterações nas atividade das proteínas responsáveis pelo transiente de cálcio, P-PLB-Tre¹⁷/PLB e P-RyR-Ser²⁸⁰⁸ RyR (Figura 14D e F, respectivamente), são decorrentes da diminuição na sinalização β -adrenérgica dada pela hiperatividade nervosa simpática na obesidade, determinamos a expressão da fosforilação dos substratos ativados pela PKA e da fosforilação da CaMKII. Como podemos verificar, o treinamento físico e a restrição alimentar não foram capazes de alterar a fosforilação dos substratos ativados por PKA (Figura 15A) nem a razão P-CaMKII-Tre²⁸⁶/CaMKII (Figura 15B).

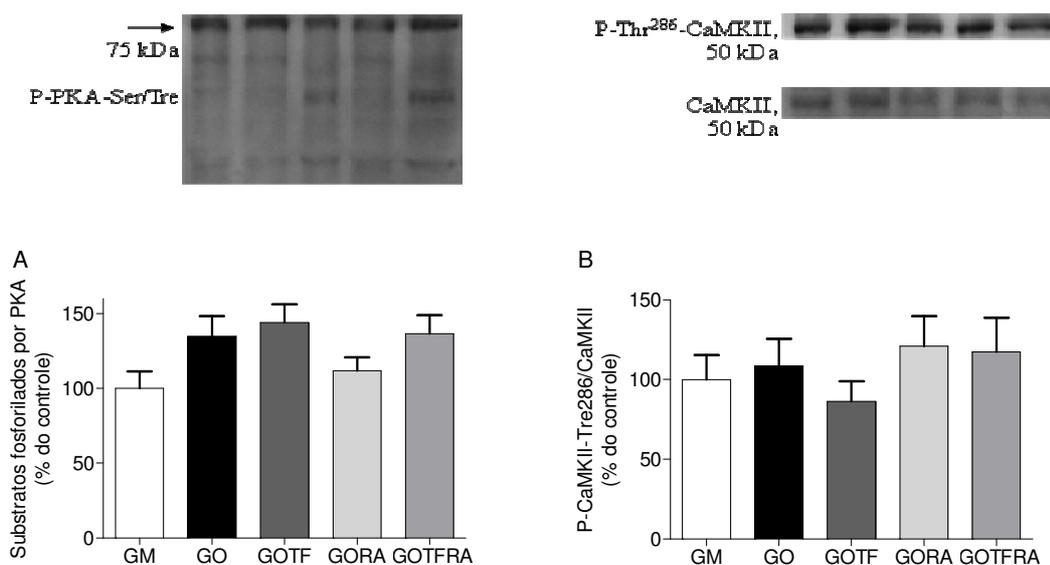


Figura 15. Expressão das proteínas presentes na sinalização β -adrenérgica nos cardiomiócitos nos diferentes grupos. P-PKA-Ser/tre – fosforilada dos substratos dependentes de PKA, CaMKII – proteína quinase dependente de cálcio/calmodolína e P-CaMkII-Tre286 – proteína quinase dependente de cálcio/calmodolína fosforilada no sítio da treonina 286. Os dados representam a média \pm EP da porcentagem em relação ao controle. GM = grupo magro; GO = grupo obeso; GOTF = grupo obeso treinado; GORA = grupo obeso com restrição alimentar; e GOTFRA = grupo obeso treinado com restrição alimentar. O número de ratos de cada grupo está expresso em cada barra dos gráficos.

4.20 Correlação entre função cardíaca, concentração de leptina e adrenalina

Para confirmar o possível envolvimento dos diferentes hormônios na função cardíaca, correlacionamos as concentrações de leptina e adrenalina com os dados da fração de encurtamento obtido pela ecocardiografia. Como podemos verificar na figura 16A, a concentração de leptina apresentou correlação inversa com a fração de encurtamento. A concentração de adrenalina não se correlacionou com a fração de encurtamento (Figura 16B).

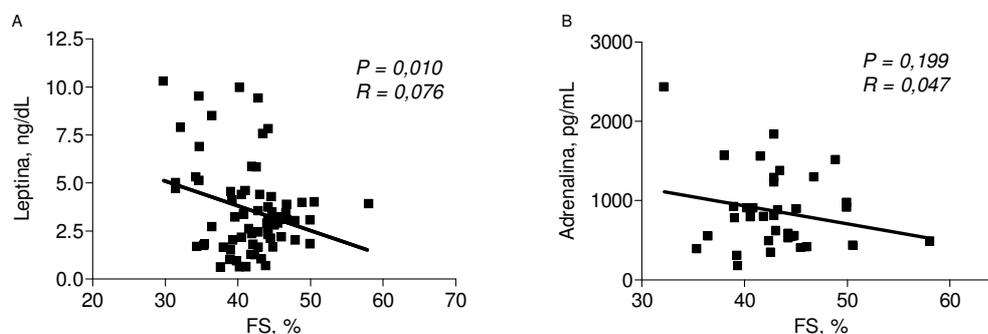


Figura 16. Correlação entre a concentração de leptina e adrenalina com a fração de encurtamento. Os dados representam valores individuais entre a concentração plasmática de leptina (A) e adrenalina (B) com a fração de encurtamento nos diferentes grupos estudados. A correlação foi realizada pela análise da regressão linear.

4.21 Biodisponibilidade de óxido nítrico e estresse oxidativo

A figura 17 mostra a biodisponibilidade de NO no homogenato cardíaco dos diferentes grupos estudados através da análise da concentração de nitrato (A) e do estresse oxidativo pela razão glutatona reduzida pela oxidada (B). Verificamos que os ratos do GO apresentaram menor concentração de nitrato e essa queda levou, pelo menos em parte, ao desequilíbrio redox-nitroso visto no item B. O treinamento físico, a restrição alimentar ou a associação das duas intervenções foram capazes de reverter

a queda na concentração de nitrato e na diminuição da razão GSH/GSSG quando comparado com os ratos do GO.

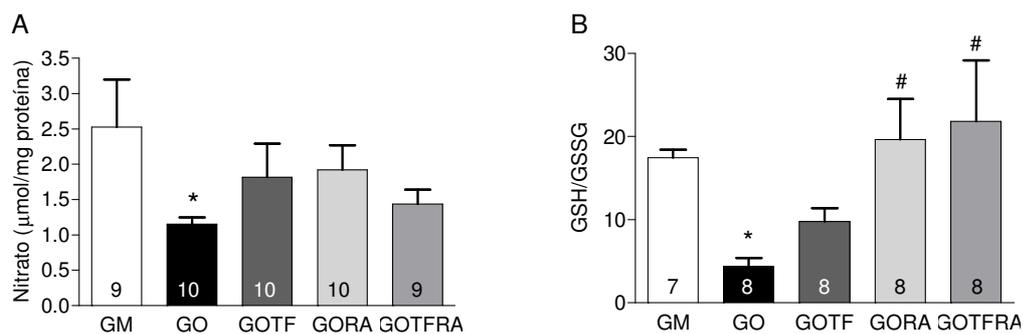


Figura 17. Concentração de nitrato (A) e a razão entre GSH/GSSG (B) nos diferentes grupos estudados. Os dados representam a média \pm EP. GM = grupo magro; GO = grupo obeso; GOTF = grupo obeso treinado; GORA = grupo obeso com restrição alimentar; e GOTFRA = grupo obeso treinado com restrição alimentar. O número de ratos de cada grupo está expresso em cada barra dos gráficos. * $p < 0,05$ comparado com GM e # $p < 0.05$ comparado com GO por ANOVA de um fator.

5 Discussão

Os principais achados do presente estudo são: 1) a perda de peso por treinamento físico ou restrição alimentar por um período de 10 semanas previne alteração na função sistólica do ventrículo esquerdo relacionada ao perfil molecular das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} em ratos obesos 2) a perda de peso por essas intervenções diminuem a esteatose hepática em ratos obesos, apesar de não normalizar o HOMA e 3) a associação do treinamento físico e da restrição alimentar não tem um efeito sinérgico na função sistólica do ventrículo esquerdo, na expressão das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} e no conteúdo hepático de gordura.

5.1 Efeito do treinamento físico e da restrição alimentar na função cardíaca

Estudos prévios demonstraram que a obesidade pode provocar diminuição no transiente de Ca^{+2} em consequência de uma redução no conteúdo de Ca^{+2} estocado no retículo sarcoplasmático. Isto ocorre pelo menor sequestro de Ca^{+2} ou pela maior liberação de Ca^{+2} pelo retículo sarcoplasmático durante o ciclo cardíaco. Estes estudos sugerem, também, que essas alterações estão associadas à diminuição na expressão do P-PLB-Ser¹⁶ e -Tre¹⁷ ou ao aumento na expressão do P-RyR-Ser²⁸⁰⁸. O presente estudo amplia o conhecimento para o fato da perda de peso por restrição alimentar ou restrição alimentar mais exercício físico prevenir a diminuição na expressão do P-PLB-Tre¹⁷ e P-RyR-Ser²⁸⁰⁸ em ratos obesos. Uma vez que o PLB na sua forma fosforilada deixa de inibir a atividade da SERCA e a recaptção de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ para o retículo sarcoplasmático e que o RyR na membrana do retículo

sarcoplasmático na forma fosforilada aumenta a liberação do Ca^{2+} para o citoplasma, é possível sugerir que essas proteínas estão diretamente relacionadas à preservação da função cardíaca nos ratos obesos submetidos à restrição alimentar e exercício físico.

Os mecanismos envolvidos na preservação da expressão do P-PLB-Tre¹⁷ e P-RyR-Ser²⁸⁰⁸ não são conhecidos. Nossa primeira hipótese era associar a expressão do P-PLB-Tre¹⁷ e P-RyR-Ser²⁸⁰⁸ à diminuição nos níveis de adrenalina e noradrenalina. No entanto, nós não observamos alterações na fosforilação dos substratos de PKA e CaMKII, ambos componentes das vias de sinalização adrenérgica. A semelhança de expressão P-PLB-Ser¹⁶ entre ratos obesos e ratos magros suporta a idéia de que não houve alteração na fosforilação nos substratos de PKA. Por outro lado, a redução na expressão de P-RyR-Ser²⁸⁰⁸ e P-PLN-Thr¹⁷ não estão de acordo com inalteração da expressão de CaMKII, desde que ambos RyR-Ser²⁸⁰⁸ e PLN-Thr¹⁷ são resíduos preferencialmente fosforilados pela CaMKII. Portanto, alguém poderia especular que a atividade de CaMKII está reduzida na obesidade, apesar da falta de alterações na expressão de P-CaMKII-Thr²⁸⁶. Outra possibilidade é que fosforilação em sítios da CaMKII ao invés de Thr²⁸⁶ tem um papel importante na regulação da atividade de CaMKII.

Redução na expressão de P-RyR-Ser²⁸⁰⁸ and P-PLN-Thr¹⁷ sugerem que o transiente de Ca^{2+} está alterado na obesidade, o que está relacionado à diminuição na função contrátil do coração. No entanto, hiperleptinemia, balanço redox diminuído e redução dos níveis de nitrato também poderiam afetar o transiente de Ca^{2+} e a função cardíaca, uma vez que resistência à leptina, estresse oxidativo e nitrosativo podem levar à prejuízo no pico de transiente de Ca^{2+} . De fato, redução na biodisponibilidade

de NO diminui o seu efeito inibitório sobre a xantina oxidase, cuja consequência é o aumento na produção de superóxido (Hare, Stamler, 2005; Saraiva et al., 2006). RyR oxidada por superóxido e peroxinitrito cause vasamento de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático. Além disso, SERCA oxidada por superóxido diminui a recaptação de Ca^{2+} (Hare, Stamler, 2005; Zimmet, Hare, 2006). Estas alterações resultam em menor pico de Ca^{2+} citosólico durante a sístole e diminuição na força contrátil. O nosso estudo mostra que o exercício físico e a restrição alimentar reduzem os níveis plasmáticos de leptina em ratos obesos. Além disso, essas intervenções não-farmacológicas aumentam os níveis cardíaco de nitrato e a razão GSH/GSSG, o que são consistentes com uma maior biodisponibilidade de NO. Assim, esses achados favorecem a idéia de que a redução de leptina associada ao aumento do balance redox e os níveis de nitrato contribuem para a melhora no transiente de Ca^{2+} e na função cardíaca observada em ratos obesos submetidos à exercício e restrição alimentar.

No presente estudo, nós levantamos a hipótese de que o treinamento físico associado à restrição alimentar teria um efeito sinérgico na preservação da função cardíaca. No entanto, os resultados alcançados não comprovam essa hipótese. Surpreendentemente, nós não achamos um efeito sinérgico na associação do exercício físico com a restrição alimentar na fosforilação das proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} . Uma explicação clara para este resultado não é conhecida nesse momento. Entretanto, uma explicação mais plausível para isto é o fato do treinamento físico e da restrição alimentar isoladamente normalizar a expressão das proteínas envolvidas no transiente de Ca^{2+} . Além disso, a redução da atividade do sistema nervoso simpático por restrição alimentar ou treinamento físico corrobora os

dados de outro estudo que mostrou que o treinamento físico e a dieta hipocalórica provocam redução semelhante na atividade nervosa simpática muscular em mulheres obesas (Trombetta et al., 2003).

Por que a dieta hipercalórica não alterou a função diastólica? Existem pelo menos duas alternativas para responder essa questão. Primeiro, a recaptação de $[Ca^{2+}]_i$ pelo P-PLB-Ser¹⁶ é suficiente para manter a função diastólica. Segundo, o aumento crônico de $[Ca^{2+}]_i$ diminui a sensibilidade dos miofilamentos ao $[Ca^{2+}]_i$, não interferindo, portanto, no relaxamento dos cardiomiócito. Terceiro, no estudo que mostra a existência de disfunção diastólica em ratos obesos, deixa claro que a atividade da Serca é dependente da ação da insulina no coração, em nosso estudo, apesar de vermos a resistência hepática à insulina, não verificamos a resistência à insulina no músculo cardíaco.

Outro ponto que merece discussão em nosso estudo é o modelo experimental de obesidade. A dieta de cafeteria utilizada provocou aumento expressivo no peso corporal e no índice de adiposidade. Além disso, ela aumentou as concentrações de glicose, adrenalina, noradrenalina e leptina e diminuiu a razão GSH/GSSG, a tolerância ao esforço e a função cardíaca. Esses achados mostram a efetividade da nossa estratégia experimental que parece mimetizar a obesidade humana. Por outro lado, alguém poderia questionar o fato do nosso modelo experimental não ter causado aumento na pressão arterial. Na realidade, não existe concordância na literatura quanto à hipertensão arterial na obesidade. Estudos prévios, inclusive do nosso grupo, não mostraram aumento significativo na pressão arterial em obesos (Negrão et al., 2001; Trombetta et al., 2003; Dong et al., 2006). Naqueles estudos, embora a pressão arterial estivesse próxima do limite superior de normalidade em

indivíduos obesos, ela não era significativamente superior àquela de indivíduos magros.

5.2 Efeito do treinamento físico e da restrição alimentar no conteúdo de gordura hepática.

Estudos prévios demonstram que a obesidade está associada com esteatose, isto é, presença de gordura no fígado, denominada doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Farrell, Larter, 2006; Kusminski et al., 2009). A presença de gordura nos hepatócitos aumenta o risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica, dislipidemia e resistência hepática à insulina (Suplicy et al., 2006; Kusminski et al., 2009). Nos pacientes diabéticos tipo 2, o índice de resistência hepática à insulina e a deteriorização da supressão da produção hepática de glicose correlacionam-se diretamente com a quantidade de gordura hepática (Suplicy et al., 2006). O nosso modelo experimental de ingesta de dieta hipercalórica sugere o desenvolvimento de DHGNA. Os animais obesos apresentaram aumento de peso do fígado, sugerindo a presença de alterações estruturais neste órgão, aumento na concentração plasmática de glicose e no índice HOMA-IR. A concentração de glicose plasmática reflete o equilíbrio entre a captação, utilização de glicose pelo organismo e a sua produção pelo fígado. O mecanismo de captação de glicose pelos tecidos e a sua utilização depende da ação da insulina na membrana celular, que serve de estímulo necessário para desencadear uma cascata de sinalização no interior das células e promover a migração dos transportadores de glicose para a superfície destas células facilitando a captação de glicose para a sua posterior utilização para o fornecimento de energia. Quando a concentração de glicose plasmática diminui, logo

ocorre uma queda na concentração da insulina e, com isso, o aumento da glicogenólise e gliconeogênese, dois processos responsáveis pela produção hepática de glicose. A resistência hepática à insulina leva à perda no equilíbrio de captação e liberação hepática a glicose, levando a maior concentração de glicose na circulação.

Estudo recente mostrou que o exercício físico diminui a concentração de triglicerídeo hepático em indivíduos obesos (Johnson et al., 2009). Esta redução na esteatose após treinamento físico parece estar associada à oxidação de gordura no fígado, já que animais submetidos a treinamento físico apresentam oxidação hepática de gordura. Outro estudo, no entanto, não verificou alteração na concentração de lípides hepatocelular em indivíduos saudáveis com sobrepeso (Shojaee-Moradie et al., 2007). Os nossos resultados evidenciam que a associação de restrição alimentar e exercício físico é uma estratégia importante para diminuir a taxa de triglicerídeos no fígado. Essa conduta não-farmacológica diminuiu tanto os níveis de triglicérides no fígado de ratos obesos que eles atingiram níveis inferiores aos verificados no fígado dos animais sedentários submetidos à dieta padrão.

A surpresa no presente estudo foi o fato da restrição alimentar ou a sua associação com treinamento físico não terem normalizado o HOMA-IR. Primeiro, estudo prévio do nosso grupo mostrou que a dieta hipocalórica associada ao treinamento físico melhora a resistência à insulina pelo HOMA em mulheres obesas (Trombetta et al., 2003). Segundo, o HOMA-IR é um parâmetro associado à habilidade da insulina em frear a produção hepática de glicose em jejum e, com isso, a quantidade de glicose liberada na circulação. Seria lógico, portanto, imaginar que a associação do treinamento físico à restrição alimentar melhorasse esse metabolismo da glicose no fígado. É possível que um programa de treinamento físico mais intenso

ou mesmo mais prolongado provoque uma melhora mais acentuada no HOMA-IR em animais obesos, já que um estudo recente mostrou que o treinamento intervalado, intercalando exercício de intensidade moderada e exercício de alta intensidade, mostrou que o treinamento intervalado provoca uma melhora mais acentuada no padrão metabólico que o treinamento moderado (Tjønnå et al., 2008).

Apesar de alguns investigadores sugerirem uma associação entre os níveis de triglicerídeos no fígado e de resistência à insulina, o nosso estudo mostrou que os tratamentos não farmacológicos baseados em exercício e restrição alimentar diminuí significativamente os níveis de triglicérides no fígado, mas não o HOMA-IR. Uma explicação para isto é o fato da restrição alimentar provocar um aumento na lipólise do tecido adiposo e, com isso, no fluxo de ácido graxo para o fígado, o que pode contribuir para a supressão da inibição da liberação hepática de glicose. Esta hipótese pode ser confirmada pelo aumento dos níveis de triglicérides plasmáticos nos ratos submetidos apenas a restrição alimentar. Este efeito sobre o fluxo de ácidos graxos parece ter sido neutralizado pelo exercício físico, já que os animais submetidos ao treinamento físico e restrição alimentar não apresentaram aumento plasmático de triglicérides. De fato, Morio et al. (2004) mostraram que durante ou após exercício aumenta o ciclo de VLDL e a captação dos triglicérides das lipoproteínas para fonte de energia na musculatura esquelética. Outro mecanismo que pode ser especulado seria a falta de ação destas intervenções na cascata de sinalização de vias inflamatórias desencadeado no fígado durante o desenvolvimento da obesidade. Alternativamente, o HOMA-IR é um teste limitado para avaliar a resistência à insulina no fígado.

Geralmente o aumento na concentração de glicose leva a maior produção e liberação de insulina pelas células β -pancreáticas. A ausência da hiperinsulinemia em nosso modelo pode ser explicado por dois mecanismos independentes: 1) pela lipotoxicidade das células β -pancreáticas, o acúmulo de lipídeos no pâncreas decorrente da obesidade pode induzir a apoptose das células β -pancreáticas. Apesar deste mecanismo não ser totalmente conhecido, sabe-se que o aumento de acil-coenzima A leva a produção de ceramidas e do NO, sendo este último prejudicial as células β -pancreáticas (Bays et al., 2004; Chacra, 2006); e 2) pela hiperleptinemia. A leptina age nas células β -pancreáticas hiperpolarizando-as, isto é, diminuindo o potencial de membrana da célula, o que dificulta a estimulação da mesma e a liberação de insulina (Ceddia et al., 2002).

Além do controle da disponibilidade de glicose e triglicerídeo, o fígado é responsável pelo controle da produção e disponibilidade do colesterol circulante. Sabe-se ainda que a insulina controla a biossíntese do colesterol através da atividade das proteínas de ligação a elemento responsivo a esteróide, de maneira independente do substrato receptor de insulina, isso é, este mecanismo ocorre mesmo na presença de resistência hepática à insulina. Provavelmente, a ausência de hipercolesterolemia em nosso modelo está associada à ausência de hiperinsulinemia ou ainda, pelo tipo de gordura presente na dieta de cafeteria. Segundo Diniz et al. (2004), dieta rica em gordura saturada e insaturada é capaz de aumentar o peso corporal, porém apenas a dieta rica em gordura saturada é capaz de alterar as concentrações de lipídeos plasmáticos. Em nosso estudo, a associação do treinamento físico com a restrição alimentar levou a menor concentração da fração do HDL-colesterol. Este resultado pode estar associado à redução na concentração do colesterol total. É possível

também que o tempo de treinamento físico tenha sido insuficiente para provocar aumento na concentração de HDL-colesterol. Outros estudos sugerem que o aumento no HDL-colesterol depende da duração e da intensidade do treinamento físico (Haram et al., 2009).

6 Limitações

A falta de informação relacionada à expressão de proteínas responsáveis pelo ciclo de Ca^{2+} na 25ª semana impede saber a relação temporal entre a alteração na função sistólica e a alteração na expressão dessas proteínas. Isto poderia inclusive nos dar informações a respeito da relação de causa e efeito entre esses dois fenômenos.

Alguém poderia levantar a questão que a melhora na P-RyR e P-PLB e na fração de encurtamento do ventrículo esquerdo são insuficientes para mostrar uma relação de causa e efeito entre a melhora da função cardíaca e do transiente de Ca^{2+} . Embora o transiente de Ca^{2+} não tenha sido diretamente avaliado, ele apresenta uma forte associação com a expressão das proteínas responsáveis pelo transiente de Ca^{2+} e a função cardíaca (Bers et al., 2006; Dong et al., 2006; Kranias, Bers, 2007).

Outro ponto que poderia ser questionado em nosso estudo é o fato da somatória de efeitos do treinamento físico e da restrição alimentar provocar um balanço energético negativo. Esse argumento parece pouco provável já que a massa dos músculos sóleo, plantar e gastrocnêmio (dados não mostrados) foi semelhante entre os grupos tratados. Além disso, o índice de adiposidade e a concentração de leptina não foram diferentes entre o grupo com restrição alimentar e o grupo com treinamento físico associado à restrição alimentar.

Um dos marcadores mais expressivos de treinamento físico é a bradicardia de repouso. Então, por que os grupos submetidos a treinamento físico não apresentaram redução da frequência cardíaca? Estudo anterior do nosso grupo também não

mostrou redução significativa da frequência cardíaca em mulheres obesas submetidas ao treinamento físico e dieta hipocalórica (Trombetta et al., 2003). Uma possibilidade para esses achados é a intensidade absoluta de treinamento físico utilizada. Isto é, o estímulo para provocar bradicardia é maior que o utilizado no presente estudo.

Embora o presente estudo claramente mostre que a restrição alimentar e o treinamento físico normalizam a quantidade de gordura hepática em ratos obesos, ele é insuficiente para mostrar que essas intervenções melhoram a resistência hepática à insulina. Pela avaliação do HOMA, alguém poderia chegar à conclusão de que isto não ocorreu, uma vez que a restrição alimentar e o exercício não normalizaram o HOMA. Este é assunto para outras investigações.

7 Perspectivas

O presente estudo reforça a idéia de que o tratamento não medicamentoso baseado em treinamento físico e restrição alimentar deve ser a conduta inicial para o tratamento da obesidade. A perda de peso por esse tratamento previni a disfunção cardíaca e as alterações na P-PLB-Tre¹⁷ e P-RyR-Ser²⁸⁰⁸. Além disso, o presente estudo mostra que a perda de peso por restrição alimentar e exercício corrige a esteatose. A disfunção cardíaca é um dos principais problemas de saúde pública (Bhatia et al., 2006). Ela é a principal causa de mortalidade nos países industrializados e em desenvolvimento (Hunt et al., 2002; Bhatia et al., 2006). A esteatose está associada com resistência à insulina, dislipidemia e a síndrome metabólica, todas elas constituem fatores de risco para o desenvolvimento de doença cardiovascular. Finalmente, esta conduta melhora a capacidade funcional, o que tem um significado clínico muito importante. Primeiro, a capacidade funcional está diretamente relacionada ao prognóstico de vida, tanto em indivíduos saudáveis, como em indivíduos com doenças cardiovasculares (Blair, Brodney, 1999; Vatten et al., 2006). A melhora na capacidade funcional pode ser uma garantia de manutenção do peso corporal. Pessoas mais aptas tendem a manter a rotina de exercício com mais regularidade e motivação que pessoas menos aptas.

8 Conclusão

A perda de peso por treinamento físico ou restrição alimentar previne a disfunção cardíaca e as alterações no perfil molecular das proteínas relacionadas ao transiente de Ca^{2+} intracelular no músculo cardíaco em ratos obesos. No entanto, não há efeito sinérgico pela associação dessas intervenções na função cardíaca e no perfil molecular das proteínas relacionadas ao transiente de Ca^{2+} intracelular no músculo cardíaco. A associação do treinamento físico e da restrição alimentar é uma conduta muito importante para reduzir gordura hepática na obesidade.

9 Referências

Abel ED, Litwin SE, Sweeney G. Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev.* 2008;88:389-419.

Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: a population-based cohort study. *Gastroenterology.* 2005;129:113-21.

Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodrigues ER, Huang PL, Lima JAC, Berkowitz DE, Hare JM. Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.* 2002;416:337-9.

Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J Physiol.* 1994;476:279-93.

Bays H, Mandarino L, DeFronzo RA. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: peroxisomal proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89:463-78. Review.

Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002; 415:198-205.

Bers DM. Myofilaments: the end effector of E-C coupling. In: Bers DM. editor. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. 2a ed. Netherlands-USA:Kluwer academic publishers;2003a.p.19-38.

Bers DM. Sources and sinks of activator calcium. In: Bers DM. editor. *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force*. 2a ed. Netherlands- USA:Kluwer academic publishers;2003b.p.39-62.

Bers DM, Despa S, Bossuyt J. Regulation of Ca²⁺ and Na⁺ in normal and failing cardiac myocytes. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1080:165-77.

Bhatia RS, Tu JV, Lee DS, Austin PC, Fang J, Haouzi A, Gong Y, Liu PP. Outcome of heart failure with preserved ejection fraction in a population-based study. *N Engl J Med*. 2006;355:260-9.

Blair SN, Brodney S. Effects of physical inactivity and obesity on morbidity and mortality: current evidence and research issues. *Med Sci Sports Exerc*. 1999;31:S646-62. [Abstract]

Boudina S, Abel ED. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology*. 2006;21:250-8. Review.

Brooks GA, White TP. Determination of metabolic and heart rate responses of rats to treadmill exercise. *American Physiological Society*. 1978;45:1009-15.

Brum PC, Rolim NP, Bacurau AV, Medeiros A. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc*. 2006 Sep;78:485-503. Review.

Bugianesi E, Marzocchi R, Villanova N, Marchesini G. Non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis (NAFLD/NASH): treatment. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2004;18:1105-16. Review.

Ceddia RB, Koistinen HA, Zierath JR, Sweeney G. Analysis of paradoxical observations on the association between leptin and insulin resistance. *FASEB J*. 2002;16:1163-76. Review.

Chacra AR. Diabetes mellitus e síndrome metabólica. In: Godoy-Mattos AF. editor. *Síndrome metabólica*. São Paulo-SP: Atheneu, 2006. p.93-104.

Chu G, Kranias EG. Functional interplay between dual site phospholamban phosphorylation: insights from genetically altered mouse models. *Basic Res Cardiol*. 2002;97:I43-8. [Abstract].

Cruz T, Cotrim HP, Paraná R, Pereira JE, Mello V. O fígado e a síndrome metabólica. In: Godoy-Matos. editor. *Síndrome metabólica*. São Paulo-SP; Atheneu; 2006.p. 260-76.

Diniz YS, Cicogna AC, Padovani CR, Santana LS, Faine LA, Novelli EL. Diets rich in saturated and polyunsaturated fatty acids: metabolic shifting and cardiac health. *Nutrition*. 2004;20:230-4.

Dong F, Zhang X, Yang X, Esberg LB, Yang H, Zhang Z, Culver B, Ren J. Impaired cardiac contractile function in ventricular myocytes from leptin-deficient *ob/ob* obese mice. *J of Endocrinol*. 2006;188:25-36.

Fabiato A. Calcium induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am J Physiol*. 1983;245:C1-14.

Farrell GC, Larter CZ. Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to cirrhosis. *Hepatology*. 2006;43:S99-112. Review.

Garg A, Misra A. Hepatic steatosis, insulin resistance, and adipose tissue disorders. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87:3019-22. Review.

Haram PM, Kemi OJ, Lee SJ, Bendheim MØ, Al-Share QY, Waldum HL, Gilligan LJ, Koch LG, Britton SL, Najjar SM, Wisløff U. Aerobic interval training vs.

continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity. *Cardiovasc Res.* 2009;81:723-32.

Hare JM. Nitric oxide and excitation-contraction coupling. *J of Molecular and Cellular Cardiology.* 2003;35:719-27. Review.

Hare JM, Stamler JS. NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest.* 2005;115:509-17. Review.

Haynes P, Liangpunsakul S, Chalasani N. Nonalcoholic fatty liver disease in individuals with severe obesity. *Clin Liver Dis.* 2004;8:535-47.

Hunt SA, Baker DW, Chin MH, Cinquegrani MP, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, Goldstein S, Gregoratos G, Jessup ML, Noble RJ, Packer M, Silver MA, Stevenson LW, Gibbons RJ, Antman EM, Alpert JS, Faxon DP, Fuster V, Gregoratos G, Jacobs AK, Hiratzka LF, Russell RO, Smith SC; American College of Cardiology; American Heart Association. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. *J Heart Lung Transplant.* 2002;21:189-203.

Hüser J, Wang YG, Sheehan KA, Cifuentes F, Lipsius SL, Blatter LA. Functional coupling between glycolysis and excitation-contraction coupling underlies alternans in cat heart cells. *J Physiol.* 2000;524:795-806.

Iacobellis G, Leonetti F. Epicardial adipose tissue and insulin resistance in obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90:6300-02.

Johnson NA, Sachinwalla T, Walton DW, Smith K, Armstrong A, Thompson MW, George J. Aerobic exercise training reduces hepatic and visceral lipids in obese individuals without weight loss. *Hepatology.* 2009;50:1105-12.

Karmazyn M, Purdham DM, Rajapuhitam V, Zeidan A. Signalling mechanism underling the metabolic and other effects of the heart. *Cardiovas Res.* 2008;79:279-86.

Kemi OJ, Ellingsen O, Ceci M, Grimaldi S, Smith GL, Condorelli G, Wisløff U. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and Ca²⁺ cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:354-61.

Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem.* 2007;45:523-37.

Kusminski CM, Shetty S, Orci L, Unger RH, Scherer PE. Diabetes and apoptosis: lipotoxicity. *Apoptosis.* 2009. [Abstract].

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227:680-85.

Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas SP. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*. 1994;89:345-54.

Lopaschuk GD, Folmes CDL, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res*. 2007;101:335-47. Review.

Lopaschuk GD, Kelly DP. Signalling in cardiac metabolism. *Cardiovasc Res*. 2008;79:205-7. Review.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenki AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985;28: 412-19.

Mattiuzzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E. Role of phospholamban on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc Res*. 2005;68:366-75. Review.

Mazumder PK, O'Neill BT, Roberts MW, Buchanan J, Yun UJ, Cooksey RC, Boudina S, Abel ED. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes*. 2004;53:2366-74.

Medeiros A, Rolim NPL, Oliveira RSF, Rosa KT, Mattos KC, Casarini DE, Irigonyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrão CE, Brum PC. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. *J Appl Physiol.* 2008;104:103-9.

Meissner G. Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium.* 2004;35:621-8. Review.

Minhas KM, Khan SA, Raju SVY, Phan AC, Gonzalez DR, Skaf MW, Lee K, Tejani AD, Saliaris AP, Barouch LA, O'Donnell CP, Emala CW, Berkowitz DE, Hare JM. Leptin repletion restores depressed β -adrenergic contractility in *ob/ob* mice independently of cardiac hypertrophy. *J Physiol.* 2005;565:463-74.

Morio B, Holmbäck U, Gore D, Wolfe RR. Increased VLDL-TAG turnover during and after acute moderate-intensity exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 2004;36:801-6.

Nascimento AF, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Luvizotto RA, Nogueira CR, Cicogna AC. A hypocaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in Wistar rats. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2008;52:968-74.

Negrão CE, Rondon MU, Tinucci T, Alves MJ, Roveda F, Braga AM, Reis SF, Nastari L, Barretto AC, Krieger EM, Middlekauff HR. Abnormal neurovascular

control during exercises is linked to heart failure severity. *A J Physiol.* 2001;280: H1286-92.

Nickola MW, Wold LE, Colligan PB, Wang GJ, Samson WK, Ren J. Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes: role of NO. *Hypertension.* 2000;36:501-5.

Passarelli M, Nakandakare ER, Quintao ECR. Dislipidemia e síndrome metabólica. In: Godoy-Mattos AF. editor. *Síndrome metabólica.* São Paulo-SP: Atheneu, 2006. p.75-92.

Poirier P, Giles TD, Bray GA, Hong Y, Stern JS, Pi-Sunyer FX, Eckel RH. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:968-76. Review.

Prabhu SD. Nitric oxide protects against pathological ventricular remodeling. Reconsideration of the role of NO in the failing heart. *Circ Res.* 2004;94:1155-7. Review.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Farmacologia.* 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2003. p.300-23.

Rebrin I, Sohal RS. Comparison of thiol redox state of mitochondria and homogenates of various tissues between two strains of mice with different longevity. *Exp Gerontol.* 2004;39:1513-9.

Rector RS, Thyfault JP, Morris RT, Laye MJ, Borengasser SJ, Booth FW, Ibdah JA. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;294:G619-26.

Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, Saari JT, Ren J. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens.* 2006;24:549-61.

Ren J, Zhu BH, Relling DP, Esberg LB, Ceylan-Isik AF. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. *Obesity.* 2008;16:2417-23.

Rolim NP, Medeiros A, Rosa KT, Mattos KC, Irigoyen MC, Krieger EM, Krieger JE, Negrao CE, Brum PC. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca²⁺ handling protein expression in heart failure. *Physiol Genomics.* 2007;29:246-52.

Sahn DJ, DeMaia A, Kisslo J, Weyman A. The committee on m-mode standardization of American Society of Echocardiography results of a survey of echocardiography measurements. *Circulation*. 1978;58:1072-83.

Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, Romanelli AJ, Shulman GI. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 2004;279:32345-53.

Saraiva RM, Minhas KM, Zheng M, Pitz E, Treuer A, Gonzalez D, Schuleri KH, Vandegaer KM, Barouch LA, Hare JM. Reduced neuronal nitric oxide synthase expression contributes to cardiac oxidative stress and nitroso-redox imbalance in *ob/ob* mice. *Nit ox*. 2006;16:331-38.

Schiller NB, Shah PM, Crawford M, DeMaria A, Devereux R, Feihgenbaum H, Gutgessel H, Reichek N, Sahn D, Schnittger I. Recommendations for quantitation of the left ventricle by two-dimensional echocardiography. *J of the Am Soc Echocardiog*. 1989;2:358-67.

Shojaee-Moradie F, Baynes KC, Pentecost C, Bell JD, Thomas EL, Jackson NC, Stolinski M, Whyte M, Lovell D, Bowes SB, Gibney J, Jones RH, Umpleby AM. Exercise training reduces fatty acid availability and improves the insulin sensitivity of glucose metabolism. *Diabetologia*. 2007;50:404-13.

Silva EA, Flexa F, Zanella MT. Abdominal obesity, insulin resistance and hypertension: impact on left ventricular mass and function in women.

Arq Bras Cardiol. 2007;89:77-82.

Suplicy H, Vieira AR, Godoy-Mattos AF. Excesso de peso, obesidade e síndrome metabólica. In: Godoy-Mattos AF. editor. *Síndrome metabólica*. São Paulo-SP: Atheneu, 2006. p.55-64.

Tjønnå AE, Lee SJ, Rognmo Ø, Stølen TO, Bye A, Haram PM, Loennechen JP, Al-Share QY, Skogvoll E, Slørdahl SA, Kemi OJ, Najjar SM, Wisløff U. Aerobic interval training versus continuous moderate exercise as a treatment for the metabolic syndrome: a pilot study. *Circulation.* 2008;118:346-54.

Trombetta IC, Batalha LT, Rondon MUPB, Laterza MC, Kuniyoshi FHS, Gowdak MMG, Barreto ACP, Halpern A, Villares SMF, Negrão CE. Weight loss improves neurovascular and muscle metaboreflex control in obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H974-82.

Trombetta IC, Batalha LT, Halpern A. Exercício e obesidade In: Negrão CE, Barreto ACP. editores. *Cardiologia do exercício, do atleta ao cardiopata*. Barueri – SP: Manole; 2005.p.148-66.

Vasanji Z, Cantor EJ, Juric D, Moyen M, Netticadan T. Alteration in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;291:C772-80.

Vatten LJ, Nilsen TI, Romundstad PR, Drøyvold WB, Holmen J. Adiposity and physical activity as predictors of cardiovascular mortality. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2006;13:909-15.

Virkamäki A, Korshennikova E, Seppälä-Lindroos A, Vehkavaara S, Goto T, Halavaara J, Häkkinen AM, Yki-Järvinen H. Intramyocellular lipid is associated with resistance to in vivo insulin actions on glucose uptake, antilipolysis, and early insulin signaling pathways in human skeletal muscle. *Diabetes.* 2001;50:2337-43.

Watanabe A, Arai M, Yamazaki M, Koitabashi N, Wuytack F, Kurabayashi M. Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca²⁺ uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum. *Mol Cell Cardiol.* 2004;37:691-8.

WHO - World Health Organization. Obesity and overweight. 2004. Site: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/obesity/en>

WHO - World Health Organization. Obesity. Facts related to chronic diseases. 2008. Site: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/chronic/en>

Zecchin HG, Carvalheria JBC, Saad MJA. Bases moleculares da resistência à insulina. In: Godoy-Mattos AF. editor. *Síndrome metabólica*. São Paulo: Atheneu, 2006. p.19-46.

Zimmet JM, Hare JM. Nitroso-redox interaction in the cardiovascular system. *Circulation*. 2006;114:1531-44. Review.

Apoio financeiro: FAPESP (06/50851-3) e CNPq (478463/2006-5).