

# Influência de Prolongados Períodos de Obesidade Sobre a Expressão Gênica Miocárdica

## *Influence of Long-Term Obesity on Myocardial Gene Expression*

Ana Paula Lima-Leopoldo<sup>1</sup>, André Soares Leopoldo<sup>1</sup>, Danielle Cristina Tomaz Silva<sup>2</sup>, André Ferreira do Nascimento<sup>2</sup>, Dijon Henrique Salomé de Campos<sup>2</sup>, Renata de Azevedo Melo Luvizotto<sup>2</sup>, Silvio Assis de Oliveira Júnior<sup>3</sup>, Carlos Roberto Padovani<sup>2</sup>, Célia Regina Nogueira<sup>2</sup>, Antonio Carlos Cicogna<sup>2</sup>

Universidade Federal do Espírito Santo<sup>1</sup>, Vitória, ES; Universidade Estadual Paulista<sup>2</sup>, Botucatu, SP; Universidade Federal do Mato Grosso do Sul<sup>3</sup>, Campo Grande, MS, Brasil

### Resumo

**Fundamento:** Vários autores mostraram que a deterioração da função cardíaca associa-se com o grau e a duração da obesidade. Os padrões de expressão gênica após longos períodos de obesidade precisam ser estabelecidos.

**Objetivo:** Este estudo testou a hipótese de que a exposição prolongada à obesidade leva à redução nos níveis de RNAm de proteínas envolvidas na homeostase do Ca<sup>2+</sup> miocárdico. Além disso, este estudo avaliou se uma diminuição no hormônio tireoidiano causava redução na expressão de RNAm.

**Métodos:** Ratos Wistar machos de 30 dias de idade foram distribuídos em dois grupos: controle (C) e obeso (Ob). O grupo C recebeu uma dieta padrão e o grupo Ob recebeu dietas hiperlipídicas por 15, 30 e 45 semanas. A obesidade foi definida pelo índice de adiposidade. A expressão gênica foi avaliada por PCR em tempo real quantitativa.

**Resultados:** O índice de adiposidade foi maior no grupo Ob do que no C em todas as etapas. Enquanto a obesidade nas semanas 15 e 45 determinou uma redução no RNAm de Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX) e calsequestrina (CSQ), observou-se aumento da expressão do RNAm de canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, receptor de rianodina, SERCA2a, fosfolamban (PLB), NCX e CSQ após a semana 30, em comparação ao grupo C. Não houve associação significativa entre os níveis de T<sub>3</sub> e a expressão de RNAm.

**Conclusões:** Nossos dados indicam que a obesidade por curtos ou longos períodos de tempo pode promover alteração na expressão gênica de proteínas reguladoras da homeostase do Ca<sup>2+</sup> sem influência do hormônio tireoidiano (Arq Bras Cardiol. 2013;100(3):229-237).

**Palavras-chave:** Obesidade, Expressão Gênica, Hormônios Tireoideanos, Miócitos Cardíacos, Miocárdio.

### Abstract

**Background:** Several authors have shown that deterioration of cardiac function is associated with the degree and duration of obesity. It is necessary to establish the gene expression patterns after prolonged periods of obesity.

**Objective:** This study tested the hypothesis that increased duration of exposure to obesity leads to a reduction in the mRNA levels of proteins involved in regulation of myocardial Ca<sup>2+</sup> homeostasis. In addition, this study verified whether the decrease in mRNA expression was caused by a reduction in thyroid hormone.

**Methods:** Thirty-day-old male Wistar rats were distributed in two groups: control (C) and obese (Ob). The C group was fed a standard diet and the Ob was fed with high-fat diets for 15, 30 and 45 weeks. Obesity was defined by adiposity index. The gene expression was assessed by quantitative real-time PCR.

**Results:** The adiposity index was higher in the Ob compared to the C after all periods. While obesity at 15 and 45 weeks resulted in a reduction in mRNA of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase (SERCA2a), Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger (NCX), and calsequestrin (CSQ), L-type Ca<sup>2+</sup> channels, ryanodine receptor, SERCA2a, phospholamban (PLB), NCX, and CSQ expression were increased compared to the C after 30 weeks. There was no significant association between T<sub>3</sub> levels and mRNA expression.

**Conclusions:** Our data indicate that obesity over the short and long periods of time may promote alteration in gene expression of Ca<sup>2+</sup> homeostasis regulatory proteins without influence by thyroid hormone (Arq Bras Cardiol. 2013;100(3):229-237).

**Keywords:** Obesity; Gene Expression; Thyroid Hormones; Myocytes, Cardiac; Myocardium.

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

**Correspondência:** Ana Paula Lima-Leopoldo •

Av. Fernando Ferrari, 514, Goiabeiras. CEP 29075-910, Vitória, ES - Brasil

E-mail: anapaula@cefd.ufes.br, anapaulalimaleopoldo@gmail.com

Artigo recebido em 10/08/12, revisado em 05/09/12, aceito em 26/10/12.

DOI: 10.5935/abc.20130045

## Introdução

A obesidade é o distúrbio metabólico crônico mais prevalente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento<sup>1</sup>. Essa doença desempenha papel importante na morbidade cardiovascular através de múltiplos mecanismos, entre os quais a homeostase do cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular<sup>2-4</sup>. Várias proteínas e canais, como Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA2a), receptor de rianodina (RyR), fosfolamban (PLB), canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, calsequestrina (CSQ) e trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (NCX), regulam a homeostase do Ca<sup>2+</sup> no músculo cardíaco<sup>3,4</sup>. Portanto, alterações na expressão e/ou função dessas proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> poderiam ser responsáveis pela disfunção cardíaca em modelos humanos e experimentais.

Estudos anteriores com avaliações por curtos períodos da expressão gênica das proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> em modelos de obesidade experimental mostraram resultados díspares<sup>5-7</sup>. Estudos com cães alimentados com uma dieta hiperlipídica por seis semanas mostraram níveis semelhantes de RNAm do RyR nos grupos controle e de dieta hiperlipídica<sup>5</sup>. Outros estudos com cães recebendo uma dieta hiperlipídica por nove semanas mostraram redução da expressão gênica do RNAm de SERCA2a e PLB no miocárdio<sup>6</sup>. Lima-Leopoldo e cols.<sup>7</sup> mostraram que ratos obesos recebendo um ciclo de dietas hiperlipídicas por 15 semanas, além de solução de água e açúcar, apresentavam níveis elevados do RNAm de SERCA2a, PLB e RyR. Como muitos autores mostraram que a disfunção cardíaca está associada ao grau e à duração da obesidade, tornou-se necessário estabelecer os padrões de expressão gênica após longos períodos de obesidade.

O coração é um importante órgão-alvo para a ação do hormônio tireoidiano (HT)<sup>8-10</sup>. Sugeriu-se que a habilidade do HT de regular a função cardíaca envolve seus efeitos genômicos<sup>11,12</sup>. Nesse aspecto, a influência e/ou o papel do HT nas proteínas reguladoras de Ca<sup>2+</sup> tem sido objeto de grande investigação<sup>12,13</sup> e vários estudos relataram o envolvimento do HT como modulador da transcrição gênica<sup>8,9,14,15</sup>. Entretanto, pouco se sabe sobre a relação entre a duração da obesidade, a expressão gênica de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> cardíacas e o HT.

Considerando-se essa falta de informação, este estudo teve como propósito testar a hipótese de que a exposição prolongada à obesidade leva à redução dos níveis de expressão do RNAm de proteínas envolvidas na homeostase do Ca<sup>2+</sup> miocárdico. Ainda, este estudo verificou se tal diminuição na expressão gênica acompanhou-se de redução nos níveis de HT.

## Material e Métodos

### Animais e procedimentos

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, São Paulo, Brasil (protocolo 573) e realizados conforme o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* publicado pelo National Research Council em 1996<sup>16</sup>.

Este estudo usou ratos Wistar machos de 30 dias de idade, pesando cerca de 100 g, originários do biotério central da Faculdade de Medicina de Botucatu. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas, com livre acesso a água, tendo sido submetidos aos diferentes regimes dietéticos descritos abaixo. Foram mantidos em condições ambientais padrão, com controle de luz (ciclos claro/escuro de 12 h; luz a partir das 6 horas), de temperatura ambiente (23 ± 3°C), e de umidade relativa (60 ± 5%).

### Desenho do estudo

Após sete dias de aclimação, os ratos foram randomizados em dois grupos: controle (C, n = 30) e obeso (Ob, n = 30). O grupo C recebeu dieta padrão e o grupo Ob recebeu, de forma alternada, quatro dietas hiperlipídicas palatáveis. O ganho de peso e o peso corporal foram monitorados uma vez por semana.

Na semana 3 deste estudo, estabeleceu-se o início da obesidade com base no ganho de peso previamente determinado pelo nosso grupo de estudo (dados não publicados). Nessa ocasião, semana 3, os ratos dos grupos C e Ob foram randomizados em seis novos grupos (C<sub>15'</sub>, Ob<sub>15'</sub>, C<sub>30'</sub>, Ob<sub>30'</sub>, C<sub>45'</sub> e Ob<sub>45'</sub>), tendo sido mantidas suas respectivas dietas por 15, 30 e 45 semanas consecutivas.

### Dietas

As dietas experimentais foram preparadas sob a forma de pastilhas por Agroceres (Rio Claro, SP, Brasil). A dieta padrão (RC Focus 1765) consistiu em 12,3% kcal de gordura, 57,9% kcal de carboidratos, e 29,8% kcal de proteína. As quatro dietas hiperlipídicas palatáveis (RC Focus 2413, 2414, 2415, e 2416) continham 49,2% kcal de gordura, 28,9% kcal de carboidratos, e 21,9% kcal de proteínas. Essas dietas hiperlipídicas eram hipercalóricas (dieta hiperlipídica = 3,65 kcal/g *versus* dieta hipolipídica = 2,95 kcal/g) devido ao maior conteúdo de energia proveniente da gordura. As dietas hiperlipídicas eram compostas de ácidos graxos saturados e insaturados, que forneciam 20% e 80% das calorias derivadas de gordura, respectivamente. Os componentes das dietas padrão e hiperlipídica foram previamente descritos<sup>17</sup>.

### Caracterização de obesidade

Utilizou-se um critério baseado no índice de adiposidade para confirmar a obesidade dos animais. Após serem anestesiados (pentobarbital sódico 50 mg/kg, intraperitoneal), os animais foram decapitados e toracotomizados, e seus coxins adiposos dissecados e pesados. O índice de adiposidade foi calculado de acordo com a seguinte fórmula: índice de adiposidade = (gordura corporal total (GC)/peso corporal final) × 100. A GC foi determinada a partir da soma dos pesos dos coxins adiposos, como se segue: GC = gordura epididimal + gordura retroperitoneal + gordura visceral.

### Comorbidades associadas à obesidade

Os ratos dos modelos de obesidade induzida por dieta podem desenvolver algumas características da obesidade humana, como hipertensão, intolerância à glicose (GL), resistência insulínica, dislipidemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. As seguintes avaliações foram realizadas em todos os grupos.

### Pressão arterial sistólica (PAS)

Após períodos de observação, a PAS da cauda foi medida em cada animal com o manguito semiautomático para cauda Narco BioSystems® PE 300 (International Biomedical, Austin, TX, EUA). A média de duas medidas foi registrada.

### Teste de tolerância à GL (TTG) e índice do modelo homeostático para avaliar resistência insulínica (HOMA-IR)

Após 15, 30 e 45 semanas de tratamento, tolerância à GL e resistência insulínica foram avaliadas através de TTG e HOMA-IR, respectivamente. Todos os ratos foram submetidos a jejum de 4-6 horas antes do TTG<sup>18</sup>. Após o período de jejum, uma amostra de sangue foi colhida da ponta da cauda em um tubo heparinizado. A glicemia basal de cada animal foi imediatamente determinada usando-se um glicosímetro (Accucheck Advantage; Roche Diagnostics Co., Indianapolis, IN, EUA). Em seguida, 2 g/kg de GL (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, EUA) foram injetados por via intravenosa e a glicemia medida após 15, 30, 60, 90, e 120 minutos<sup>18</sup>. A intolerância à GL foi avaliada pela área sob a curva (AUC) para GL. O HOMA-IR foi expresso como um índice de resistência insulínica e calculado pela seguinte fórmula:  $HOMA-IR = [glicemia\ de\ jejum\ (mmol/l) \times\ insulínia\ de\ jejum\ (\mu U/ml)]/22,5$ . Todos os ratos alimentaram-se normalmente e recuperaram seus pesos corporais em até um dia após esse regime.

### Medida de triglicerídeos (TG) e análise hormonal

Ao final de cada período experimental (15, 30 e 45 semanas), os animais foram submetidos a jejum por 12–15 h, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, intraperitoneal) e decapitados. Amostras de sangue foram colhidas em tubos heparinizados, e o soro separado por centrifugação a 3000 × g por 15 minutos e 4°C, sendo armazenado a –80°C para análise posterior. Os níveis de TG, insulina e leptina foram medidos no soro. A concentração sérica de TG foi medida com um kit comercial (CELM,® São Paulo, Brasil), utilizando-se um sistema de análise enzimática automático (Technicon, RA-XT™ System, Global Medical Instrumentation, Minnesota, EUA). Os níveis de leptina e insulina foram determinados com kits comerciais (Linco Research Inc., St. Louis, MO, EUA), utilizando-se ELISA.

As concentrações séricas de triiodotironina livre (T<sub>3</sub>) e hormônio tireoestimulante (TSH) foram analisadas usando Diagnostics Products Genese (São Paulo, SP, Brasil) com Luminex Corporation's xMAP Technology™, através de imunoensaio multiplex, Lincoplex kits (Linco Research Inc, St. Louis, MO, EUA).

### Expressão gênica de importantes proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular

O RNA total foi extraído do tecido cardíaco (ventrículo esquerdo) utilizando-se Trizol (Invitrogen), de acordo com orientação do fabricante. O kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, CA, EUA) foi usado para a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de 1000 ng de RNA total. Utilizou-se PCR em tempo real para medir quantitativamente os níveis de RNAm de SERCA2a (Rn00568762\_m1), RyR (Rn01470303\_m1), PLB

(Rn01434045\_m1), canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L (Rn00709287\_m1), CSQ (Rn00567508\_m1) e NCX (Rn00570527\_m1). Para tal, utilizaram-se TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA), conforme as instruções do fabricante, e o sistema de detecção Applied Biosystems StepOne Plus. Todas as amostras foram avaliadas três vezes. As condições de ciclagem foram as seguintes: ativação da enzima a 50°C por 2 minutos; desnaturação a 95°C por 10 minutos; amplificação dos produtos de cDNA por 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos; e anelamento/extensão a 60°C por 1 minuto. A expressão gênica foi quantificada em relação aos valores dos grupos C (C<sub>15</sub>, C<sub>30</sub> e C<sub>45</sub>) após normalização por um controle interno ( $\beta$ -actina, Rn00667869\_m1), sendo determinada pelo método 2<sup>- $\Delta\Delta Ct$</sup> , como anteriormente descrito<sup>19</sup>.

### Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. As características gerais, comorbidades, dosagens hormonais e expressão gênica das proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular foram avaliadas através de análise de variância de dois fatores (ANOVA) para amostras independentes. Quando diferenças significativas foram encontradas (p < 0,05), aplicou-se o teste de Bonferroni *post hoc* para comparações múltiplas. A associação entre os níveis de HT e a expressão gênica de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular foi analisada pelo teste de correlação linear de Pearson. O nível de significância foi de 5%.

## Resultados

### Características gerais e comorbidades

A Figura 1 apresenta as características gerais dos animais. Em comparação aos animais controle, os obesos apresentaram valores significativamente maiores para as seguintes variáveis em todas as etapas do experimento: peso corporal final; ganho de peso; gordura corporal e índice de adiposidade (Figura 1, Painéis A, B, C e D). Utilizando-se o índice de adiposidade como indicador de obesidade, os ratos obesos apresentaram 79,5%, 82% e 69,5% mais gordura do que seus respectivos controles após 15, 30 e 45 semanas, respectivamente (Figura 1D). A exposição prolongada à dieta hiperlipídica não influenciou o grau de obesidade, pois a gordura corporal e o índice de adiposidade foram semelhantes nos diferentes grupos Ob (Figura 1C e D).

A Figura 2 resume as comorbidades associadas com obesidade. A AUC para GL e o HOMA-IR foram significativamente afetados pela exposição à obesidade. Os ratos dos grupos Ob apresentaram AUC para GL significativamente maior do que seus respectivos controles (Ob<sub>15</sub>>C<sub>15</sub>, Ob<sub>30</sub>>C<sub>30</sub> e Ob<sub>45</sub>>C<sub>45</sub>; p < 0,05) (Figura 2A). Os valores de HOMA-IR foram também significativamente maiores nos ratos dos grupos Ob do que naqueles dos grupos controle (Ob<sub>15</sub>>C<sub>15</sub> e Ob<sub>45</sub>>C<sub>45</sub>; p < 0,05) (Figura 2B). Embora os valores do HOMA-IR não tenham diferido significativamente entre os grupos na semana 30, essa medida apresentou uma tendência a ser maior (p = 0,054) nos ratos dos grupos Ob do que nos controle (Figura 2B).

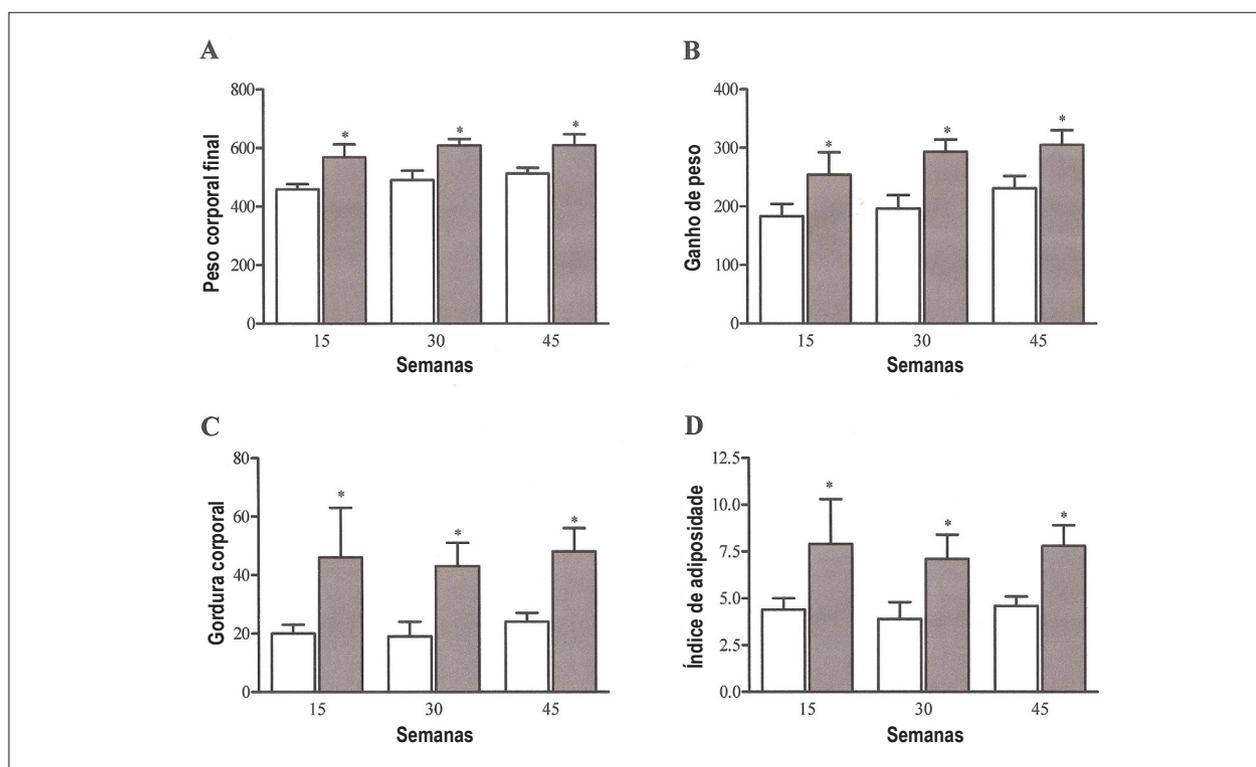


Figura 1 - Peso corporal final (A), ganho de peso (B), gordura corporal (C) e índice de adiposidade (D) em ratos controle (barras brancas) e ratos obesos (barras cinza) após 15, 30 e 45 semanas de experimento. Dados apresentados como média  $\pm$  DP; ANOVA de dois fatores e teste de Bonferroni post hoc; \*  $p < 0,05$  vs grupo controle.

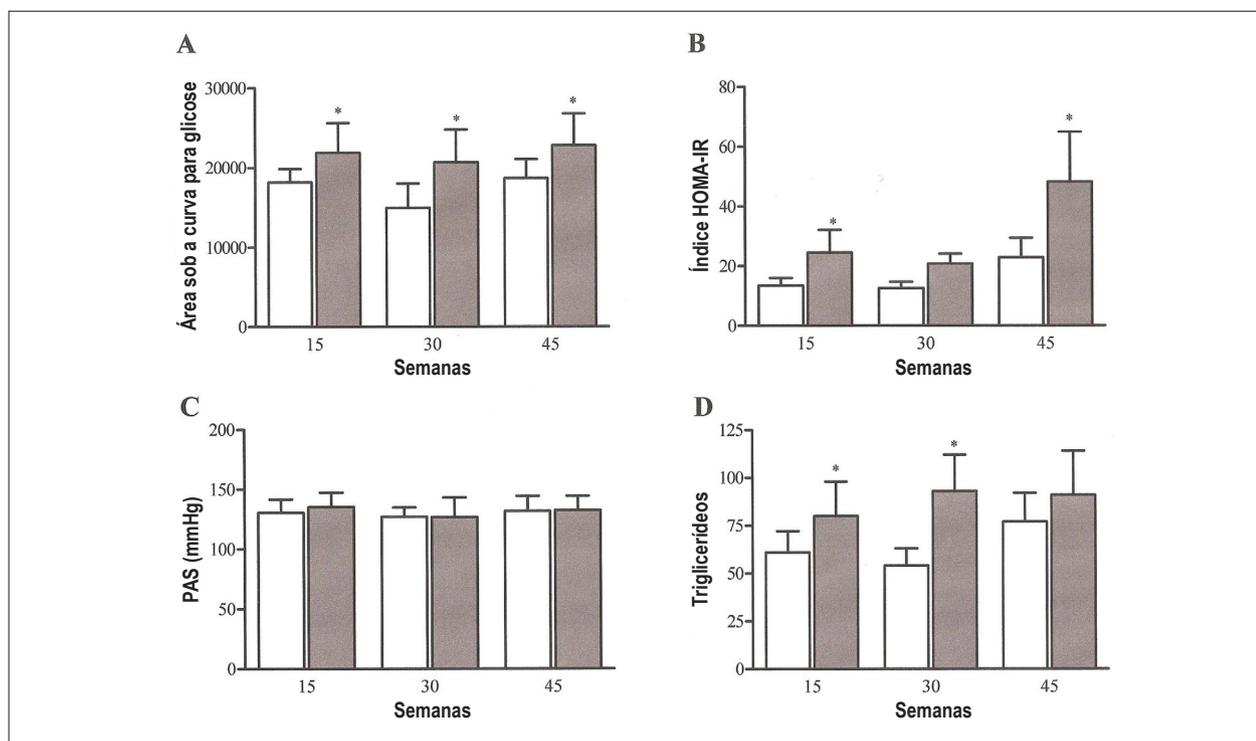


Figura 2 - AUC - Área sob a curva do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (A); índice HOMA-IR (B), PAS : Pressão arterial sistólica (C), e perfil lipídico (D) em ratos controle (barras brancas) e ratos obesos (barras cinza) após 15, 30 e 45 semanas de experimento. Dados apresentados como média  $\pm$  DP; ANOVA de dois fatores e teste de Bonferroni post hoc; \*  $p < 0,05$  vs grupo controle.

O TTG revelou comprometimento da tolerância à GL no grupo Ob em todas as etapas do experimento, o que é consistente com a noção de que obesidade é frequentemente acompanhada de resistência insulínica, que foi observada neste estudo e determinada pelo HOMA-IR. Além disso, a Figura 2D mostra significativa alteração nos níveis séricos de TG na obesidade induzida por dieta hiperlipídica em comparação àqueles nos três grupos C ( $Ob_{15} > C_{15}$  e  $Ob_{30} > C_{30}$ ;  $p < 0,05$ ). Na semana 45, os níveis de TG não diferiram significativamente entre os grupos ( $p = 0,086$ ). A duração da obesidade não teve efeito na PAS nos grupos Ob (Figura 2C).

### Análise hormonal

A Tabela 1 apresenta os valores de leptina, insulina, T<sub>3</sub> e TSH. A dieta hiperlipídica causou uma significativa elevação nos níveis de leptina e insulina em todas as etapas do experimento. A duração da obesidade afetou significativamente os níveis de leptina entre as semanas 15 e 45 ( $Ob_{45} > Ob_{15}$ ;  $p < 0,05$ ). No entanto, os níveis de leptina não diferiram significativamente nos grupos Ob entre as semanas 15 e 30 ou 30 e 45 ( $Ob_{15}$  versus  $Ob_{30}$ ;  $p = 0,055$ ; e  $Ob_{30}$  versus  $Ob_{45}$ ;  $p = 0,09$ ). Houve uma tendência à elevação nos níveis de leptina com o tempo, que foi influenciada pela duração da exposição à obesidade (Tabela 1). Além disso, a obesidade prolongada ( $Ob_{45} > Ob_{15}$  e  $Ob_{30}$ ;  $p < 0,05$ ) causou uma maior elevação dos níveis de insulina em comparação com a obesidade de curto e médio prazo, indicando que a duração da obesidade resultou em maior resistência insulínica (Tabela 1). De acordo com os resultados obtidos para leptina e insulina, a obesidade em todas as etapas acompanhou-se de hiperinsulinemia e hiperleptinemia.

Os níveis séricos de T<sub>3</sub> e TSH foram determinados para avaliar o papel dos HTs na transcrição gênica induzida por obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Tabela 1). A duração da obesidade causou diferentes respostas nos níveis séricos de TSH nas semanas 15 e 45 nos grupos C e Ob ( $C_{15} > Ob_{15}$ ;  $C_{45} < Ob_{45}$ ). Os níveis de TSH não diferiram significativamente entre os grupos C e Ob após a semana 30 de obesidade. Além disso, longos períodos de obesidade influenciaram os níveis de TSH nos grupos Ob nas semanas 15 vs 45 ( $Ob_{15} < Ob_{45}$ ).

No entanto, a obesidade decorrente de exposição prolongada à dieta hiperlipídica não causou alterações estatisticamente significativas nos níveis de T<sub>3</sub> entre os grupos C e Ob em todas as etapas do experimento (Tabela 1). Os grupos Ob apresentaram menores níveis de T<sub>3</sub> na semana 15 ( $Ob_{15} < C_{15}$ ;  $p = 0,068$ ) e maiores na semana 45 ( $Ob_{45} > C_{45}$ ;  $p = 0,007$ ) em comparação aos respectivos níveis nos grupos C. Tais resultados mostram que T<sub>3</sub> e TSH respondem de maneira similar com relação à duração da exposição à obesidade ( $C_{15} > Ob_{15}$ ;  $C_{45} < Ob_{45}$ ).

### Expressão gênica de importantes proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular

Os níveis de RNAm das proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular foram analisados para explicar os mecanismos através dos quais a exposição prolongada à obesidade modula a função cardíaca. As medidas do RNAm de SERCA2a, RyR, PLB, canais de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, CSQ e NCX são apresentadas nas Figuras 3A, B, C, D, E e F. As Figuras 3A, E e F mostram que os diferentes períodos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica resultaram em significativa redução da expressão gênica de SERCA2a, CSQ e NCX nas semanas 15 e 45 ( $C_{15} > Ob_{15}$ ;  $C_{45} > Ob_{45}$ ;  $p < 0,05$ ). Além disso, os níveis de PLB e canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L diminuíram apenas com a exposição de curto prazo à obesidade (PLB:  $C_{15}$ :  $1,00 \pm 0,18$  vs  $Ob_{15}$ :  $0,53 \pm 0,13$ ; e canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L:  $C_{15}$ :  $1,00 \pm 0,18$  vs  $Ob_{15}$ :  $0,54 \pm 0,10$ ;  $p < 0,05$ ). Os níveis de RNAm do RyR foram semelhantes nos grupos C e Ob após 15 e 45 semanas de obesidade. Na semana 45, a expressão gênica de PLB e canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L não diferiu significativamente entre os grupos C e Ob (Figuras 3C e D). É importante notar que após 30 semanas de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, os níveis de RNAm de todas as proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular (SERCA2A, RyR, PLB, canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, CSQ e NCX) estavam elevados em comparação àqueles do grupo C (Figura 3A, B, C, D, E e F). A exposição prolongada à obesidade induzida por dieta hiperlipídica também resultou em diferenças estatisticamente significativas nos níveis de RNAm de SERCA2A, RyR, canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, CSQ e NCX nos grupos Ob, como mostra a Figura 3 ( $Ob_{30} > Ob_{15} = Ob_{45}$ ).

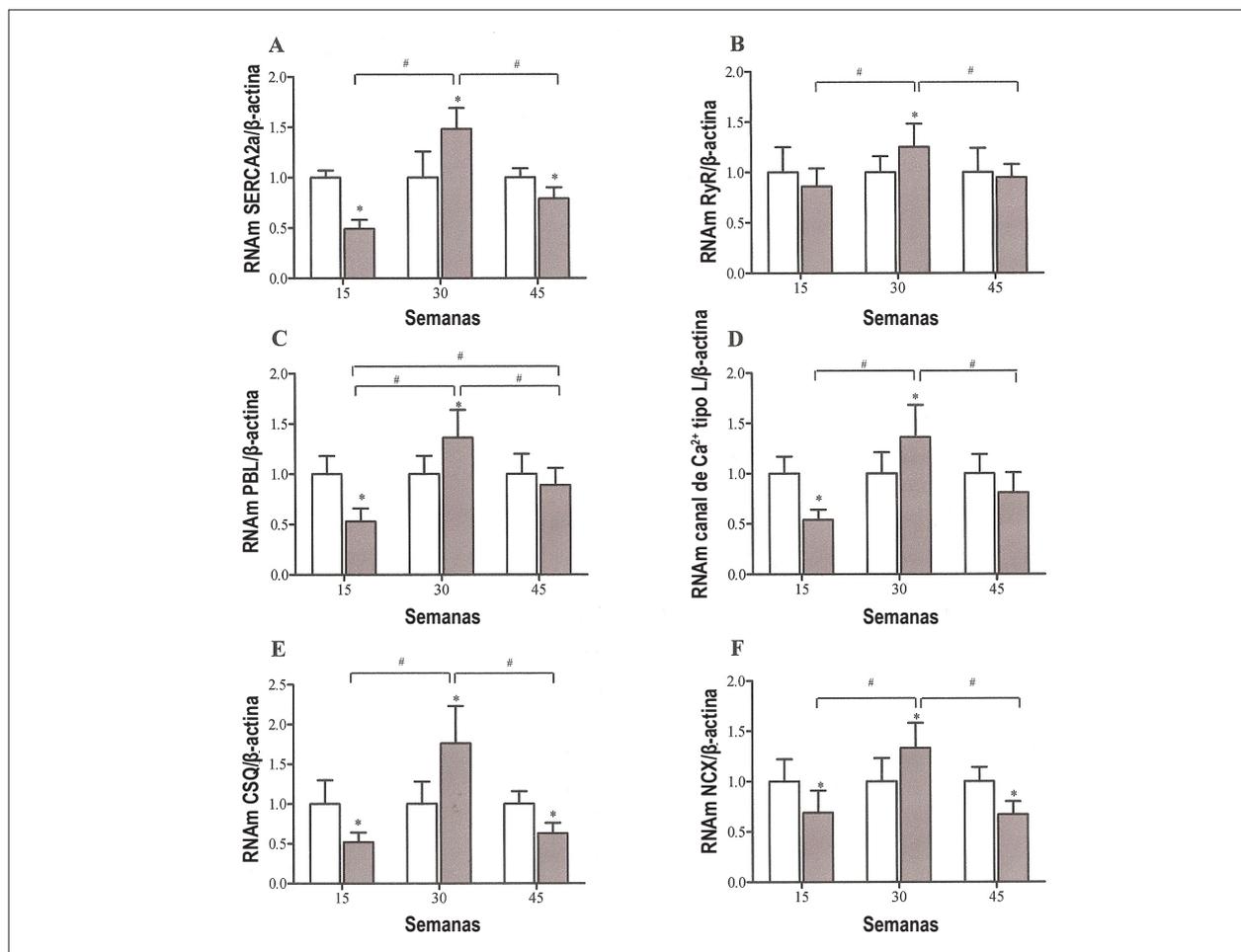
Tabela 1 - Análise hormonal dos grupos do experimento

Hormônio	Grupos	Tratamento		
		semana 15	semana 30	semana 45
Leptina (ng/ml)	C	3,1 ± 0,9	3,0 ± 0,8	4,5 ± 0,6
	Ob	6,2 ± 1,5**	8,2 ± 2,7*	9,9 ± 1,9*
Insulina (ng/ml)	C	0,86 ± 0,19	0,81 ± 0,10	1,35 ± 0,27
	Ob	1,39 ± 0,37**	1,18 ± 0,18**	2,86 ± 0,54*
T3 (pg/ml)	C	20223 ± 5415	14294 ± 3373	19353 ± 5213
	Ob	15874 ± 1390#	18087 ± 4413	23783 ± 3042
TSH (pg/ml)	C	1837 ± 574	1387 ± 93	1552 ± 456
	Ob	1143 ± 381**	1694 ± 390	2135 ± 492*

Níveis séricos hormonais nos grupos controle (C) e obeso (Ob) nas semanas 15, 30 e 45; leptina e insulina - 8 animais em cada grupo; TSH - hormônio tireoestimulante e T<sub>3</sub> - triiodotironina: 6 ratos por grupo. Dados expressos como média ± DP; ANOVA de dois fatores e teste de Bonferroni post hoc; \*  $p < 0,05$  vs. grupo C. #  $p < 0,05$  vs. grupo  $Ob_{45}$ .

O potencial dos HTs para alterar a expressão gênica das proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular também foi avaliado. A Tabela 2 mostra os resultados do teste de correlação linear de Pearson. Não houve correlações significativas entre os níveis de T<sub>3</sub> livre e os do RNAm de

SERCA2a, RyR, PLB, canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, e NCX. Tais resultados demonstram que o T<sub>3</sub> livre não influenciou e/ou não regulou a transcrição das proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular após uma longa exposição a obesidade (Tabela 2).



**Figura 3** - Níveis de RNAm de importantes proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> intracelular determinados por PCR em tempo real de ratos controle (barras brancas) e ratos obesos (barras cinza) após 15, 30 e 45 semanas de experimento. A: SERCA2a - Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático; B: RyR - receptor de rianodina; C: PLB - fosfolamban; D: canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L; E: CSQ - calsequestrina; e F: NCX - trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>. Dados apresentados como média ± DP; ANOVA de dois fatores e teste de Bonferroni post hoc; \* p<0,05 vs grupo controle; # p<0,05 vs respectivo grupo obeso.

**Tabela 2** - Correlações entre triiodotironina livre (T<sub>3</sub>) e níveis de RNAm de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup>

RNAm	T <sub>3</sub>	
	coeficiente de correlação	valor de p
SERCA2a	-0,021	0,89
RyR	-0,040	0,81
PLB	0,056	0,74
Canal de Ca <sup>2+</sup> do tipo L	-0,168	0,33
NCX	-0,254	0,14

SERCA2a - Ca<sup>2+</sup>-ATPase do retículo sarcoplasmático; PLB: fosfolamban; RyR: receptor de rianodina; CSQ: calsequestrina; NCX: trocador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>; teste de correlação linear de Pearson.

## Discussão

A obesidade alcançou níveis epidêmicos recentemente, e seus efeitos adversos foram exaustivamente estudados em animais experimentais. No entanto, há pouca informação disponível quanto à relação entre a duração da obesidade e a regulação do Ca<sup>2+</sup>. A maior contribuição deste estudo é a demonstração de que a exposição à obesidade altera a expressão gênica das proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> de maneira diferente. Enquanto a exposição à obesidade por 30 semanas promoveu elevações nos níveis de RNAm, a exposição à obesidade por 15 e 45 semanas resultou em redução dos níveis de RNAm, sugerindo que a obesidade de curta exposição e a de longa exposição possam diferir quanto ao processo de remodelação cardíaca. Além disso, não houve influência dos HTs na expressão gênica das proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> após longos períodos de exposição à obesidade. Acreditamos que este seja o primeiro estudo a relatar a expressão de RNAm cardíaco de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> em animais obesos e o papel dos HTs na regulação da expressão gênica de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> em longos períodos de tempo.

Dietas ricas em gordura foram usadas por décadas para os modelos de obesidade em roedores. A dieta hiperlipídica usada teve intensidade e duração suficientes para promover obesidade em ratos em todas as etapas experimentais (15, 30 e 45 semanas). O desenvolvimento de obesidade ao longo do tempo caracterizou-se por diferenças significativas de peso corporal, gordura corporal, coxins adiposos e índice de adiposidade em comparação a ratos controle. Segundo a literatura, o consumo aumentado de gordura pode não se acompanhar de uma elevação na oxidação, o que favorece uma maior deposição de gordura em animais que recebem uma dieta hiperlipídica<sup>20</sup>. No entanto, neste estudo, o tempo de exposição à dieta hiperlipídica não exacerbou aquela condição, pois a obesidade não foi acompanhada por uma elevação na intensidade ou grau da adiposidade. Como em estudos anteriores<sup>21-26</sup>, a dieta hiperlipídica usada neste estudo foi eficiente para promover numerosas comorbidades associadas com obesidade de curto e longo prazo, tais como intolerância à GL, hiperinsulinemia, resistência insulínica, hiperleptinemia e dislipidemia, observada pela elevação de TG séricos. Embora não tenha havido alterações significativas nos níveis de TG após 45 semanas ( $p = 0,086$ ), os níveis de TG tenderam a se elevar com o tempo e com a exposição à obesidade. Tais resultados demonstram que a obesidade prolongada causa alterações nos parâmetros metabólicos e hormonais sem afetar a PAS.

Sabe-se que a obesidade se acompanha de muitas alterações hormonais, como os níveis do HT. Neste estudo, a obesidade causou um aumento nos níveis séricos de TSH após 45 semanas ( $Ob_{45} > C_{45}$ ), provavelmente devido aos níveis elevados de leptina no grupo Ob. Estudos com animais experimentais e com seres humanos mostraram que a leptina estimula a liberação de TSH<sup>27,28</sup>. Além disso, estudos anteriores mostraram uma relação positiva entre níveis séricos de TSH e leptina, indicando que os HTs sofrem um processo de adaptação com a adiposidade crescente<sup>29,30</sup>. A ausência de alterações nos níveis de leptina e TSH no grupo C ao longo do tempo corrobora essa afirmação. Outro

importante achado do presente estudo é que as respostas de T<sub>3</sub> e TSH mostraram tendências semelhantes nos grupos Ob ao longo do tempo. Segundo a literatura<sup>31</sup>, alterações nos níveis de T<sub>3</sub> e TSH frequentemente se associam a alterações na gordura corporal, e nossos resultados sugerem que esse efeito possa ser influenciado pelos níveis elevados de leptina ao longo do tempo.

Com relação à pesquisa usando modelos obesos, acreditamos ser este o primeiro estudo a avaliar a influência da exposição prolongada à obesidade na expressão gênica de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup>. Em cardiomiócitos, as proteínas associadas com a regulação do Ca<sup>2+</sup> miocárdico participam na liberação, recaptura e extrusão do Ca<sup>2+</sup>, desempenhando um papel chave na regulação da função cardíaca<sup>34</sup>. O presente estudo mostrou que a duração da obesidade resultou em diferentes respostas na expressão gênica de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> após 15, 30 e 45 semanas. Nossos resultados mostraram que a obesidade induzida por uma dieta hiperlipídica causou inicialmente (semana 15) uma redução da expressão gênica. Em consequência, na semana 30, os mecanismos celulares envolvidos no funcionamento do coração aumentaram numa tentativa de reestabelecer os níveis de RNAm cardíaco molecular. Após a normalização desse processo, a transcrição de RNAm voltou a níveis normais e/ou reduzidos (semana 45). Tais achados sugerem que, no presente estudo, houve remodelamento dos processos cardíacos após longos períodos de exposição à obesidade. Rider e cols.<sup>32</sup> afirmaram que o remodelamento cardíaco é uma característica adaptativa da obesidade. Segundo Cohn e cols.<sup>33</sup>, o remodelamento cardíaco é definido como uma expressão genômica que resulta em alterações moleculares, celulares e intersticiais, sendo clinicamente manifesta como alterações de tamanho, forma e função do coração, e resultando de sobrecarga ou lesão cardíaca. Além disso, aqueles autores relatam que o remodelamento cardíaco é influenciado por sobrecarga hemodinâmica, ativação neuro-hormonal e outros fatores ainda em investigação. Logo, uma possível explicação para nossos resultados é que esse processo possa estar relacionado à sobrecarga de gordura imposta ao coração. Após 15 semanas, tal sobrecarga representa uma agressão ao coração (obesidade), que então se remodela para normalizar as alterações cardíacas moleculares e celulares na semana 30. Finalmente, o coração se adapta, retornando aos níveis normais e/ou reduzidos de RNAm (semana 45), uma vez não ser mais necessário manter níveis aumentados de RNA. Esses resultados podem ser corroborados pelos nossos estudos anteriores e outros demonstrando que a obesidade induziu e promoveu disfunção miocárdica<sup>17,34,35</sup>, que poderia estar relacionada a alterações nos níveis de RNAm após 15 semanas de obesidade. Além disso, pesquisas conduzidas em nosso laboratório mostraram que a função cardíaca volta ao normal após 30 e 45 semanas de obesidade (dados não publicados).

Uma explicação alternativa para a normalização do processo de remodelamento cardíaco após 45 semanas pode estar relacionada à composição da dieta. A dieta hiperlipídica usada neste estudo consistiu de grande quantidade de ácidos graxos insaturados, o que pode ter sido um mecanismo de

proteção para o coração, mesmo na presença de obesidade. Os mecanismos subjacentes aos efeitos da exposição prolongada à obesidade nos níveis de RNAm de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> permanecem desconhecidos. Os agentes e as vias que podem mediar as respostas moleculares e celulares (alterações na expressão gênica) envolvidas no remodelamento cardíaco incluem várias citocinas, receptores β-adrenérgicos, neurotransmissores, mensageiros intracelulares e hormônios, como a insulina<sup>3,36-38</sup>.

Um importante mediador envolvido na ativação de vários fatores de transcrição e, portanto, fundamental nas respostas de expressão gênica é o HT. A literatura relata que os HTs podem desempenhar um papel positivo na expressão gênica de SERCA, RyR e canal de Ca<sup>2+</sup> do tipo L, e um papel negativo na expressão de PLB e NCX<sup>9</sup>. Entretanto, em desacordo com essa hipótese, o HT não afetou a expressão gênica de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup> miocárdico, tendo por base a análise de correlação, que demonstrou nenhuma associação significativa entre T<sub>3</sub> e os níveis de RNAm de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup>. Como mostrado no processo de remodelamento cardíaco, diferentes estímulos externos podem ativar vários fatores de transcrição<sup>36</sup>. Logo, podemos inferir que o mesmo mediador/estímulo possa ter ativado diferentes fatores de transcrição, levando a respostas semelhantes na expressão gênica. Como a obesidade se associa a níveis elevados de endotelina, angiotensina II e citocinas<sup>39,40</sup>, que atuam através de diferentes fatores de transcrição, parece provável que alguns desses fatores estejam envolvidos nas mudanças na expressão de RNAm de proteínas reguladoras do Ca<sup>2+</sup>.

## Conclusão

Nossos dados indicam que a obesidade por curtos ou longos períodos de tempo pode promover alteração na expressão gênica de proteínas reguladoras da homeostase do Ca<sup>2+</sup> sem influência do HT. Um importante aspecto é que o conhecimento das alterações do RNAm em diferentes etapas durante o desenvolvimento e estabelecimento da obesidade

poderia contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na disfunção cardíaca causada pela obesidade. No entanto, estudos adicionais se fazem necessários para determinar quais mediadores influenciam o comportamento do RNAm em cada etapa do processo de remodelamento induzido por obesidade.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Nascimento AF, Luvizotto RAM, Padovani CR, Nogueira CR, Cicogna AC; Obtenção de dados: Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DAT, Nascimento AF, Campos DHS, Luvizotto RAM, Nogueira CR, Oliveira Júnior SA, Cicogna AC; Análise e interpretação dos dados: Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DAT, Campos DHS, Luvizotto RAM, Padovani CR, Nogueira CR, Oliveira Júnior SA, Cicogna AC; Análise estatística: Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Padovani CR, Cicogna AC; Obtenção de financiamento: Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Nascimento AF, Campos DHS, Cicogna AC; Redação do manuscrito: Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Nascimento AF, Nogueira CR, Cicogna AC; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual: Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DAT, Luvizotto RAM, Padovani CR, Nogueira CR, Oliveira Júnior SA, Cicogna AC.

## Potencial Conflito de Interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de Financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

## Vinculação Acadêmica

Este artigo é parte de tese de Doutorado de Ana Paula Lima Leopoldo pela Universidade Estadual Paulista.

## Referências

1. Eckel RH, Barouch WW, Ershow AG. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute-National of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Working Group on the pathophysiology of obesity-associated cardiovascular disease. *Circulation*. 2002;105(24):2923-8.
2. Relling DP, Esberg LB, Fang CX, Johnson WT, Murphy EJ, Carlson EC, et al. High-fat diet-induced juvenile obesity leads to cardiomyocyte dysfunction and upregulation of Foxo3a transcription factor independent of lipotoxicity and apoptosis. *J Hypertens*. 2006;24(3):549-61.
3. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205.
4. Opie LH. Myocardial contraction and relaxation. In: Opie LH. *The heart: physiology from cell to circulation*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p. 221-45.
5. Dincer UD, Araiza A, Knudson JD, Shao CH, Bidasee KR, Tune JD. Dysfunction of cardiac ryanodine receptors in the metabolic syndrome. *J Moll Cell Cardiol*. 2006;41(1):108-14.
6. Philip-Couderc P, Smith F, Hall JE, Pathak A, Roncalli J, Harmancey R, et al. Kinetic analysis of cardiac transcriptome regulation during chronic high-fat diet in dogs. *Physiol Genomics*. 2004;19(1):32-40.
7. Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, Leopoldo AS, Carvalho RF, Nogueira CR, Nascimento AF, et al. Obesity induces upregulation of genes involved in myocardial Ca<sup>2+</sup> handling. *Braz J Med Biol Res*. 2008;41(7):615-20.
8. Carr AN, Kranias EG. Thyroid hormone regulation of calcium cycling proteins. *Thyroid*. 2002;12(6):453-7.
9. Dillmann WH. Cellular action of thyroid hormone on the heart. *Thyroid*. 2002;12(6):447-52.
10. Kahaly GJ, Dillmann WH. Thyroid hormone action in the heart. *Endocr Rev*. 2005;26(5):704-28.
11. Dillmann WH. Biochemical basis of thyroid hormone action in the heart. *Am J Med*. 1990;88(6):626-30.
12. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev*. 2001;81(3):1097-142.

13. Klein I, Ojamaa K. Thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 2001;344(7):501-9.
14. Danzi S, Klein I. Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease. *Thyroid*. 2002;12(6):467-72.
15. Klein I, Danzi S. Thyroid disease and the heart. *Circulation*. 2007;116(15):1725-35.
16. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals: Washington, (DC): National Academy Press; 1996.
17. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM, do Nascimento AF, de Campos DH, Luvizotto RA, et al. Involvement of L-type calcium channel and SERCA2A in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol*. 2011;226(11):2934-42.
18. Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signaling in rats. *Diabetologia*. 2005;48(6):1229-37.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
20. Tentolouris N, Pavlatos S, Kokkinos A, Perrea D, Pagoni S, Katsilambros N. Diet-induced thermogenesis and substrate oxidation are not different between lean and obese women after two different isocaloric meals, one rich in protein and one rich in fat. *Metabolism*. 2008;57(3):313-20.
21. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;31(1-3):27-35.
22. da Silva AA, Kuo JJ, Tallam LS, Hall JE. Role of endothelin-1 in blood pressure regulation in a rat model of visceral obesity and hypertension. *Hypertension*. 2004;43(2):383-7.
23. Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes*. 2005;29(11):1368-78.
24. Huang BW, Chiang MT, Yao HT, Chiang W. The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats. *Diabetes Obes Metab*. 2004;6(2):120-6.
25. Li L, Yang G, Li Q, Tang Y, Li K. High-fat- and Lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasma resistin and adiponectin levels. *Ann Nutr Metab*. 2006;50(6):499-505.
26. Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*. 2009;52(6):1133-42.
27. Michalaki MA, Vagenakis AG, Leonardou AS, Argentou MN, Habeos IG, Makri MG, et al. Thyroid function in humans with morbid obesity. *Thyroid*. 2006;16(1):73-8.
28. Ortiga-Carvalho TM, Oliveira KJ, Soares BA, Pazos-Moura CC. The role of leptin in the regulation of TSH secretion in the fed state: in vivo and in vitro studies. *J Endocrinol*. 2002;174(1):121-5.
29. Matzen LE, Kvetny J, Pedersen KK. TSH, thyroid hormones and nuclear-binding of T3 in mononuclear blood cells from obese and non-obese women. *Scand J Clin Lab Invest*. 1989;49(3):249-53.
30. Tagliaferri M, Berselli ME, Calò G, Minocci A, Savia G, Petroni ML, et al. Subclinical hypothyroidism in obese patients: relation to resting energy expenditure, serum leptin, body composition, and lipid profile. *Obes Res*. 2001;9(3):196-201.
31. Reinehr T. Obesity and thyroid function. *Mol Cell Endocrinol*. 2010;316(2):165-71.
32. Rider OJ, Francis JM, Ali MK, Byrne J, Clarke K, Neubauer S, et al. Determinants of left ventricular mass in obesity; a cardiovascular magnetic resonance study. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2009;11:9.
33. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2000;35(3):569-82.
34. Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, do Nascimento AF, Luvizotto RA, de Campos DH, et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol*. 2010;26(8):423-9.
35. Ren J, Zhu BH, Relling DP, Esberg LB, Ceylan-Isik AF. High-fat diet-induced obesity leads to resistance to leptin-induced cardiomyocyte contractile response. *Obesity (Silver Spring)*. 2008;16(11):2417-23.
36. Katz AM. Heart failure. In: Katz AM. *Physiology of the heart*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 510-48.
37. Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004;63(3):403-13.
38. Young LH, Dahl DM, Rauner D, Barrett EJ. Physiological hyperinsulinemia inhibits myocardial protein degradation in vivo in the canine heart. *Circ Res*. 1992;71(2):393-400.
39. Pausova Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2006;15(2):173-8.
40. Rondinone CM. Adipocyte-derived hormones, cytokines, and mediators. *Endocrine*. 2006;29(1):81-90.