



LORENA CRISTINA RIBEIRO DA ROSA

ALTERAÇÕES EM MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO E CARDÍACO DE
RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA.

Duque de Caxias

2017

LORENA CRISTINA RIBEIRO DA ROSA

ALTERAÇÕES EM MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO E CARDÍACO DE
RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional da Universidade do Grande Rio, Instituto Nacional de Metrologia, Universidade Estadual da Zona Oeste, como requisito à obtenção ao grau de mestre em biomedicina translacional.

Orientadores:

Profa. Dra. Thais Accorsi Mendonça

Prof. Dr. Fabio Azevedo Fortes

Duque de Caxias
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Rosa, Lorena Cristina Ribeiro da

Avaliação de possíveis alterações inflamatórias e morfológicas

em músculo estriado esquelético e cardíaco de ratos submetidos à dieta hiperlipídica/ Lorena Cristina Ribeiro da Rosa- 2017.

“Orientação: Prof. Fabio Fortes, Thaís Accorsi Mendonça”.

1. Biomedicina. 2. Dieta hiperlipídica - Ratos. I. Fortes, Fabio;

Accorsi-Mendonça, Thaís. II. Universidade do Grande Rio

LORENA CRISTINA RIBEIRO DA ROSA

ALTERAÇÕES EM MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO E CARDÍACO DE
RATOS WISTAR SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA.

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Biomedicina
Translacional da Universidade do Grande Rio,
como requisito à obtenção ao grau de mestre em
biomedicina translacional.

Área de Concentração: Biomedicina Translacional

Aprovado em _____ de _____ de _____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sérgio Seabra (UEZO)

Prof. Dr. Sergian Cardozo (Unigranrio)

Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares (UFRJ)

Dedico essa dissertação aos meus pais, que me apoiaram incansavelmente por toda essa jornada, e que independente da distância geográfica, estiveram comigo sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, pelo apoio incondicional. Não obstante a distância, sempre estivemos unidos.

Aos meus orientadores, Thais Accorsi Mendonça e Fábio Fortes, que me guiaram com maestria nessa caminhada para que eu pudesse realizar meu trabalho com êxito.

Aos meus amigos, pelo apoio psicológico em momentos de fraqueza, que na ausência da minha família, desempenharam esse papel.

Ao programa de Biomedicina Translacional (BioTrans), que me proporcionou a realização dessa pesquisa.

Aos professores do programa Biomedicina Translacional (BioTrans), que me auxiliaram a edificar o meu conhecimento.

Ao instituto Carlos Chagas (UFRJ), que cedeu partes de suas dependências físicas para realização desta pesquisa.

À Gabriela Carvalho (doutoranda do laboratório de fisiologia e terapia celular e molecular, UEZO), que colaborou incansavelmente para a realização dessa pesquisa.

A todos os outros componentes do laboratório de fisiologia e terapia celular e molecular, UEZO, que também contribuíram de alguma forma para a construção desse trabalho.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível*

Charlie Chaplin.

RESUMO

A obesidade é considerada uma pandemia de tempos modernos, devido ao número crescente de acometidos e a projeção futura desanimadora. O propósito desse trabalho foi avaliar as possíveis alterações no tecido muscular esquelético e cardíaco de ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Para tal, foram utilizados 12 ratos Wistar machos, subdivididos aleatoriamente em: (1) Grupo Controle: animais alimentados com ração contendo 10% de lipídios e (2) Grupo Experimental/ Dieta Hiperlipídica: no qual a ração continha 67% de lipídios. A cada semana, o peso dos animais foi monitorado e após 20 semanas, os animais foram eutanasiados. Foram realizadas biópsias de tecidos estriado cardíaco (ventrículo esquerdo) e muscular estriado esquelético (quadríceps direito). A morfologia celular foi avaliada através da coloração de Hematoxilina/ Eosina (H/E), e a deposição de colágeno através da coloração de PicroSirius Red (Pic). A análise da área ocupada por fibras, morfometria, tanto na coloração H/E como Pic foi realizada para ambos os grupos. Para o músculo cardíaco, coloração de H/E evidenciou uma integridade do miocárdio no grupo de animais com dieta convencional e um aumento da distância entre as fibras cardíacas para os animais do grupo experimental. Tal observação foi corroborada com a coloração de Pic. A quantificação morfométrica cardíaca apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com menor quantidade de fibra muscular (H/E) e o dobro de fibra colágena local no grupo submetido à intervenção dietética. Na morfometria do quadríceps, a quantificação através da coloração de H/E não apresentou diferença significativa entre os grupos, indicando a discreta perda das proteínas contráteis, fato corroborado com a coloração de Pic. A imunomarcagem em tecido estriado cardíaco evidenciou a Conexina 43 presente em discos intercalares, para animais com dieta convencional e; dispersa para animais com dieta hiperlipídica. A proteína actina apresentou-se imunomarcada, tanto no miocárdio como no tecido muscular esquelético, ao longo das fibras em ambos os grupos. Conclui-se que a dieta hiperlipídica causa alterações morfológicas no músculo cardíaco de ratos Wistar.

Palavras- Chave: Dieta hiperlipídica, Músculo Estriado, Ratos Wistar, Imunofluorescência

ABSTRACT

Obesity is considered a pandemic of modern times, due to the increasing number of affected and the future projection discouraging. The scope of this study evaluated possible inflammatory and morphological alterations in skeletal and cardiac striated muscle of rats submitted to high fat diet. To that end, 12 male Wistar rats were randomly subdivided into: (1) Control Group: animals fed on a diet containing 10% lipids and (2) High Fat Diet Group, in which the diet contained 67% of lipids. Each week, the weight of the animals was monitored and after 20 weeks the animals were euthanized. Biopsies of cardiac (left ventricle) and skeletal striated (right quadriceps) tissues were collected. The cell morphology was evaluated through the staining of Hematoxylin / Eosin (H/E) and the deposition of collagen was evaluated through the staining of PicroSirius Red (Pic). The analysis of the area occupied by fibers, morphometry in both H/E staining and Pic was performed for both groups. For the cardiac muscle, H/E staining showed a myocardial integrity in the group of animals on the conventional diet and an increase in the distance between the cardiac fibers for the animals in the High Fat Diet group. Such observation was corroborated by PicroSirius Red staining. The cardiac morphometric quantification showed a statistically significant difference between the groups, with a lower amount of muscle fiber (H / E staining) and twice the local collagen fiber in the group submitted to dietary intervention, that is, the High Fat Diet group. In the morphometry of quadriceps, the quantification through H/E staining showed no significant difference between the groups, indicating the discrete loss of the contractile proteins, a fact which was corroborated by the Pic staining. Immunoblotting in cardiac tissue revealed the *Connexin 43* present in intercalated discs, for animals with conventional diet and; dispersed for High Fat Diet animals. The actin protein was immuno labelled in both cardiac and skeletal muscle tissue along the fibers in both groups. These data reveal that the hyperlipidic diet is capable of causing significant morphological damage in the cardiac muscles of Wistar rats.

Key words: High fat diet, Striated muscle, Wistar rats, Immunofluorescence.

FIGURAS

Fig 01.	Comparação entre tecido adiposo subcutâneo e visceral, perfil de adipócitos e células imunes intrínsecas.	19
Fig 02.	Corte transversal do coração, onde observa-se a diferença entre a espessura da parede do ventrículo esquerdo e ventrículo direito.	23
Fig 03.	Coração com câmaras cardíacas/ fluxo sanguíneo.	23
Fig 04.	Diagrama que mostra os múltiplos níveis de estrutura de junção de gap.	26
Fig 05.	Unidade motora. A unidade motora consiste em um neurônio e uma fibra muscular por ele inervada.	31
Fig 06.	Anatomia do músculo esquelético e estrutura do sarcômero.	32
Fig 07.	Fotomicrografias de tecido muscular estriado cardíaco. Coloração Hematoxilina e Eosina.	43
Fig 08.	Fotomicrografias de tecido muscular estriado cardíaco. Coloração PicroSirius Red.	44
Fig 09.	Fotomicrografias de tecido muscular estriado esquelético. Coloração Hematoxilina e Eosina.	46
Fig 10.	Fotomicrografias de tecido muscular estriado esquelético. Coloração PicroSirius Red.	47
Fig 11.	Fotomicrografias da imunofluorescência do tecido estriado cardíaco de animais controle. Imunomarcação para proteína conexina 43.	50
Fig 12.	Fotomicrografias da imunofluorescência de tecido estriado cardíaco de animais do grupo dieta hiperlipídica. Imunomarcação para proteína conexina 43.	51
Fig 13.	Fotomicrografias de Imunofluorescência de tecido muscular estriado cardíaco. Imunomarcação para proteína actina.	52
Fig 14.	Fotomicrografias de Imunofluorescência de tecido muscular estriado esquelético. Imunomarcação para proteína actina.	53

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 01	Classificação de Obesidade, de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC), em indivíduos acima de 18 anos.	16
Tabela 02	Tabela 02. Classificação de obesidade e risco de acordo com a relação cintura quadril.	20
Tabela 03	Especificações dos reagentes utilizados na Imunofluorescência	39
Gráfico 01	Peso dos animais	41
Gráfico 02	Morfometria do tecido muscular estriado cardíaco	45
Gráfico 03	Morfometria do tecido muscular estriado esquelético.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

CONCEA	Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CX 43	Conexina 43
DBCA	Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA)
HE	Hematoxilina e Eosina
GH	Hormônio de crescimento
IFN α	Interferon Alfa
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina Tipo 1.
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-15	Interleucina 15
IL-10	Interleucina 10
IKK	Serina Quinase
IMC	Índice de Massa Corporal
JNK	Quinase C- jun
LI	Índice de Lee
PIC	Picrosísius red
RCQ	Relação Cintura- Quadril
MCP 1	Proteína quimiotática de monócito 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Proteína C-Reativa
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TGF β1	<i>Transforming growth factor beta 1</i> - Fator de transformação do crescimento beta
VD	Ventrículo Direito
VE	Ventrículo Esquerdo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
	2.1 OBESIDADE	17
	2.2 TIPOS DE OBESIDADE	18
	2.2.1 TIPOS DE TECIDO ADIPOSE	20
	2.3 PATOLOGIAS ASSOCIADAS À OBESIDADE	21
	2.4 CORAÇÃO	22
	2.4.1 MORFOLOGIA CARDÍACA	22
	2.4.2 FISILOGIA CARDÍACA	26
	2.5 OBESIDADE RELACIONADA AO CORAÇÃO	28
	2.6 MÚSCULO ESQUELÉTICO	30
	2.6.1 MORFOLOGIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	30
	2.6.2 FISILOGIA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO	32
	2.6.3 TIPOS DE FIBRA MUSCULAR	34
	2.7 OBESIDADE RELACIONADA AO MÚSCULO ESQUELÉTICO	34
3	OBJETIVOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
	4.1 ANIMAIS	36
	4.2 DIETA CONTROLE E HIPERLIPÍDICA	36
	4.3. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	37

	4.4 FASES EXPERIMENTAIS	38
	4.4.1 MICROSCOPIA DE LUZ CONVENCIONAL	38
	4.4.2 IMUNOFLUORESCÊNCIA	39
	4.4.3 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	40
5	RESULTADOS	41
	5.1 PESO DOS ANIMAIS	41
	5.2 MICROSCOPIA DE LUZ CONVENCIONAL	42
	5.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA	48
6	DISCUSSÃO	53
7	CONCLUSÕES	57
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
9	ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

Em tempos modernos, a obesidade é um dos mais preocupantes problemas de saúde pública, sendo considerada atualmente uma pandemia. Dados da Organização Mundial de Saúde, de 2017, mostram que 1,9 bilhões de pessoas no mundo apresentam sobrepeso, destes 600 milhões são obesos. Em termos percentuais esses números representam 39% (39% homens e 40% mulheres) e 13% (11% homens e 15% mulheres) da população mundial, respectivamente. Entre 1975 e 2016, o número de obesos no mundo triplicou, indicando índices alarmantes no futuro (WHO, 2017). Devido a esse cenário a Organização Mundial de Saúde adotou o termo chamado “globesidade”, como um indicativo da propagação mundial desta condição (WHO, 2016). A obesidade é citada como o mal do século XXI, pelo quão sério são os seus impactos na saúde mundial (GONZÁLEZ-MUNIESA *et al.*, 2017).

Entretanto, de um ponto de vista individual, a obesidade é o aumento do acúmulo de gordura corporal, e de acordo com a primeira lei da termodinâmica resulta do desequilíbrio entre a ingestão calórica e o gasto energético (SELLAYAH *et al.*, 2014).

A vanguarda científica a respeito demonstra que tal doença apresenta etiologia complexa, na qual o armazenamento de gordura está interconectado sob uma regulação integrada pelos sistemas neural e endócrino, onde diferentes neuropeptídeos e hormônios participam (MARTINÉZ, 2000). Ainda há agentes que podem modificar esse processo regulatório corporal como falta de sono, excesso de trabalho, dieta inadequada, nível de atividade física baixo, microbiota intestinal, disruptores endócrinos e efeitos epigenéticos (MCALLISTER *et al.*, 2009; ROMIEU *et al.*, 2017). Em grande parte dos estudos epidemiológicos, o diagnóstico da obesidade é realizado de forma clássica, através do Índice de Massa Corporal (IMC), obtido pela razão do peso (quilograma) e a altura ao quadrado (metro). O excesso de peso (sobrepeso) é diagnosticado quando o IMC alcança valor igual ou superior a 25 kg/m², enquanto a obesidade por valores de IMC superiores a 30 kg/m² (WHO, 2000). Todavia, a própria Organização Mundial de Saúde preconiza que esta medida deve ser considerada como um guia aproximado, devido possivelmente não corresponder ao mesmo grau de gordura em diferentes indivíduos (WHO, 2017).

A obesidade é considerada como um fator de risco no desenvolvimento de insuficiência cardíaca, devido ao acúmulo de tecido adiposo ectópico tanto no epicárdio, como no pericárdio. Outros acometimentos são também comumente observados nessa estrutura, como o remodelamento anatômico, através da hipertrofia cardíaca, em especial de ventrículo esquerdo (PATEL *et al.*, 2016).

Outro ponto observado ainda em hipertrofia cardíaca, são as alterações sofridas nas junções comunicantes (junções *GAP*), prejudicando a comunicação direta entre as células do coração através dos sincícios cardíacos. Essa estrutura, bem como as proteínas relacionadas, especificamente da família das conexinas, desempenham papel crucial na condução dos impulsos nervosos e morfogênese cardíaca. Em especial a conexina 43 (Cx 43), que é o principal constituinte das junções comunicantes em coração adulto. Dessa forma, torna-se um componente fundamental para o acoplamento eletroquímico dos cardiomiócitos, onde alterações nos níveis de Cx 43 indicam prognóstico ruim, pois sugerem diminuição da contratilidade cardíaca (VEERANK *et al.*, 2016).

A obesidade e sobrepeso também ocasionam grande impacto sobre a homeostase do músculo esquelético, que é apontado como o tecido de maior volume no corpo, representando entre 45% e 55% da massa corporal total. Dessa forma, é o principal responsável pela regulação do metabolismo da glicose, onde cerca de 80% é destinada para o metabolismo local. Neste órgão ocorre também a ativação da via da serina quinase (IKK), que bloqueia a resistência à sinalização de insulina em músculo de animais obesos, fato pode estar ligado a perda de massa muscular (PERIASAMY *et al.*, 2017).

Desta forma o escopo deste trabalho delinea-se em avaliar alterações inflamatórias e morfológicas em músculo estriado esquelético e cardíaco de ratos submetidos a dieta hiperlipídica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OBESIDADE

O sobrepeso e a obesidade são caracterizados pelo acúmulo excessivo de peso em forma de tecido adiposo, em níveis prejudiciais à saúde (WHO, 2017). A obesidade ainda pode ser classificada como uma síndrome de alterações fisiológicas, bioquímicas, metabólicas, anatômicas, psicológicas e sociais, causadas pelo acúmulo de tecido adiposo, com consequente acréscimo no peso corporal (LEV- RAN *et al.*, 2001).

Em grande parte dos estudos epidemiológicos, o diagnóstico do estado nutricional de adultos ainda é feito de forma clássica, a partir do Índice de Massa Corporal (IMC), obtido pela divisão do peso, medido em quilogramas, pela altura ao quadrado, medida em metros. O excesso de peso (sobrepeso) é diagnosticado quando o IMC alcança valor igual ou superior a 25 kg/m^2 , enquanto a obesidade é diagnosticada com valores de IMC superiores a 30 kg/m^2 . O sistema de classificação de sobrepeso e obesidade com base no índice de massa corporal (IMC) está detalhado na Tabela 01 (WHO, 2000/ WHO 2017)

Tabela 01: Classificação de Obesidade, de acordo com o Índice de Massa Corporal (IMC), em indivíduos acima de 18 anos (WHO, 2000).

Classificação	Categoria de IMC (Kg/m^2)
Baixo Peso	$<18,5$
Peso normal	$18,5 \leq \text{IMC} < 25,0$
Sobrepeso	$25,0 \leq \text{IMC} < 30,0$
Obesidade	$\text{IMC} \geq 30,0$
Obesidade Grau I	$30,0 \leq \text{IMC} < 35,0$
Obesidade Grau II	$35,0 \leq \text{IMC} < 40,0$
Obesidade Grau III	$\text{IMC} \geq 40,0$

De acordo com o *Fact sheet* de 2017 da Organização Mundial da Saúde sobre Obesidade, o sobrepeso e obesidade representam uma ameaça crescente para a saúde da população em cada vez mais países. Em muitos casos, o binômio Sobrepeso/Obesidade estão substituindo os problemas mais

tradicionais, como a desnutrição e doenças infecciosas, tornando-se o ponto álgico nos problemas de saúde contemporâneos. Além dos fatos supracitados, o aumento do peso corporal é indicativo como maior prevalência de doenças não transmissíveis (WHO, 2017).

A prevalência da obesidade no Brasil vem aumentando exponencialmente com o passar dos anos, não apresentando números muito otimistas no combate à essa doença para o futuro. Segundo o levantamento realizado pela entre fevereiro e dezembro de 2016, VIGITEL- Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (2016) mostrou que os números de pessoas com sobrepeso no país entre 2006 e 2016 cresceu 26, 3%, passando de 42,6% para 53,8% e com obesidade 60%, passando de 11, 8% para 18, 9 %nesse mesmo período.

2.2. TIPOS DE OBESIDADE

As classificações de obesidade foram criadas com intuito de identificar os níveis de gravidade ou comprometimento do indivíduo devido a doença. Sendo assim, pode ser categorizada de duas formas distintas: de acordo com o IMC e/ou localização da concentração de adiposidade.

A) Índice de Massa Corporal (IMC): De acordo com os padrões da Organização Mundial de Saúde (2000), a doença pode ser subdividida em categorias levando em consideração o IMC e consequentemente o peso corporal (ver Tabela 01) (FRANCO *et al.*, 2016).

B) Localização de Adiposidade: Pode ser classificada em:

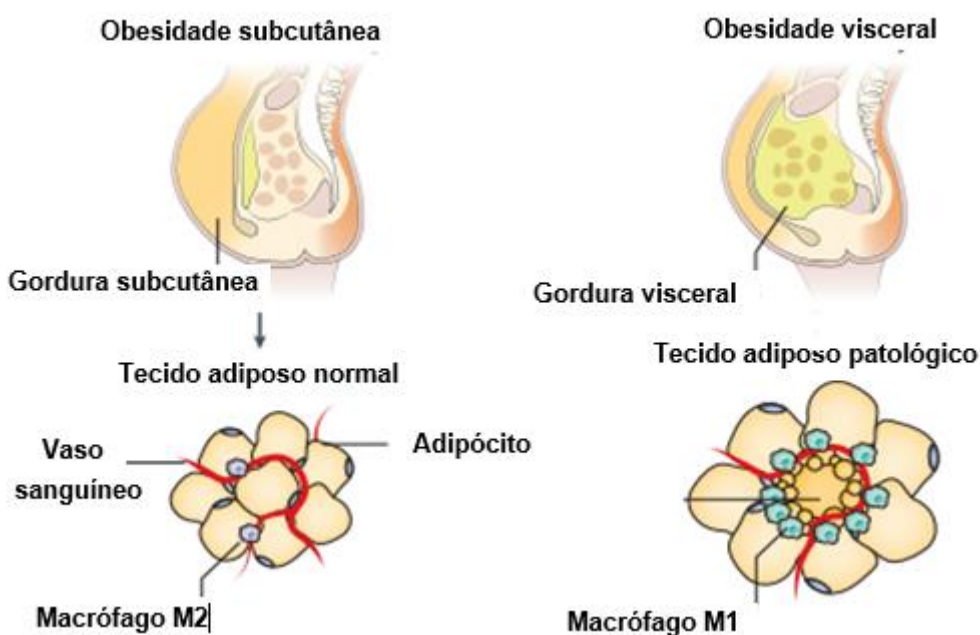
- **Obesidade ou Adiposidade Ginóide ou Ginecoide:** acúmulo de gordura nos membros inferiores e quadril. Situação observada especialmente em mulheres, muito comum em período gestacional ou mesmo durante a lactação (LEV-RAN *et al.*, 2001).

- **Obesidade ou Adiposidade Androide, Central ou Abdominal:** acúmulo de gordura na região do abdome. Ainda acerca desse tipo de concentração adiposa, observa-se a gordura subcutânea e a gordura visceral ou metabolicamente ativa (BERDAH, 2016). O tecido adiposo visceral é considerado o mais prejudicial à

saúde, pois está relacionado à outras doenças concomitantes à obesidade por ser metabolicamente ativo. Está relacionado a produção de adipocinas pró-inflamatórias e a ativação do sistema nervoso simpático (SEVEN *et al.*, 2016).

Lev-Ran *et al.* (2001) consideram a medida da relação cintura-quadril (RCQ) e a circunferência abdominal como medidas mais eficiente nos estudos de obesidade, em especial quando aponta-se indicativos de risco cardiovascular, pois essas medidas apontam com mais precisão a obesidade visceral ou obesidade metabolicamente ativa. Na Tabela 02 apresenta-se a classificação de obesidade e risco cardíaco de acordo com a relação cintura quadril (WHO,2008). Embora, Calvo *et al* (2016) atentaram que o padrão RCQ apresenta-se como uma avaliação deficiente na distinção entre tecido adiposo e massa livre de gordura, pois são medidas de verificação indiretas, bem como necessitam de precisão por parte do avaliador em relação a ponto anatômicos, em especial na população obesa. Contudo, o padrão RCQ apresenta-se como um medida de baixo custo e podem ser utilizada em estudos epidemiológicos iniciais.

González- Muniesa *et al.* (2017) apresentam a classificação do tecidos adiposos, como: subcutâneo e visceral, baseado na sua localização. Onde o tecido adiposo visceral inclui: tecido intra-abdominal (principalmente tecido adiposo mesentérico), perirrenal e pericárdico.



Todas as figuras com nomes em português

Fig. 01. Comparação entre tecido adiposo subcutâneo e visceral, perfil de adipócitos e células imunes intrínsecas (GONZALÉZ- MUNIESA *et al.*, 2017).

2.2.1.TIPOS DE TECIDO ADIPOSEO

A) Tecido adiposo marrom: Está relacionado com a termogênese e a manutenção da temperatura corporal (SACKS & SYMONDS, 2013). É encontrado com mais abundância em recém nascidos. em especial na região subescapular e supraclavicular, bem como em torno dos rins, aorta, coração, pâncreas e traquéia (SANTHANAM *et al*, 2015).

Esse depósitos de gordura marrom diminuem consideravelmente com a idade, porém é possível ser encontrado em adultos. A presença desse tecido é correlacionada inversamente com o aumento do IMC (PRODHOMME *et al*, 2016).

B) Tecido adiposo branco: É o tecido adiposo mais abundante em seres humanos.Os adipócitos brancos forma considerados durante muito tempo como exclusivos depósitos de energia, no entanto, hoje sabe-se que são secretores de substâncias bioativas (adipocinas ou adipocitocinas), assumindo papel endócrino.

Outro tipo de adipócito encontrado, porém em menor quantidade,é o bege ou adipócios *brite*, visto em meio ao tecido adiposo branco, estabelecendo papel dissipador de energia (MATSUZAWA, 2006).

Tabela 02. Classificação de obesidade e risco cardíaco de acordo com a relação cintura quadril (WHO, 2008).

Indicador	Pontos de corte	Risco de complicação metabólica
Circunferência abdominal	Homens > 94 cm Mulheres > 80 cm	Aumentado
Circunferência abdominal	Homens >102 cm Mulheres > 88 cm	Substancialmente aumentado

Relação cintura- quadril	Homens > 0,90 cm	Substancialmente aumentado
	Mulheres > 85cm	

2.3. PATOLOGIAS ASSOCIADAS À OBESIDADE

Indivíduos obesos apresentam morte prematura quando comparados a eutróficos. Essas complicações não ocorrem somente pela obesidade *per se*, mas por outras patologias comumente associadas, as quais denomina-se co-morbidades (ORIO *et al.*, 2016).

Todavia, dentre essas doenças concomitantes, observa-se em especial a síndrome metabólica, que de acordo com Alberti *et al.* (2009) se caracteriza por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares, que ocorrem juntos frequentemente. Esses são: pressão arterial elevada, dislipidemia, aumento da glicemia em jejum e obesidade visceral.

Além da síndrome metabólica, as co-morbidades mais comuns associadas à obesidade são: distúrbios endócrinos (Diabetes tipo II), acometimentos respiratórios (apnéia do sono), doenças de natureza cardiovascular, que ocorrem mais comumente (hipertensão arterial sistêmica, aterosclerose, infarto agudo do miocárdio) e alguns tipos de câncer (fígado, endométrio e rim) (WANG *et al.*, 2011; NORDESTGAARD *et al.*, 2012; LAVIE *et al.*, 2017; GONZALEZ-MUNIEZA, 2017).

Além das supracitadas, as doenças de ordem músculo-esqueléticas e psicossociais são também muito comuns e frequentemente atuam como fatores restritivos no processo de emagrecimento, pois muitas vezes são causas de dores limitantes de isolamento social, respectivamente (HARLEY, 2016).

As co-morbidades de ordem cardiovascular estão associadas com mais periodicidade em casos de obesidade visceral, bem como ao redor ou mesmo dentro de órgãos como: fígado, rins e coração, em uma condição referida como gordura ectópica (GONZALEZ- MUNIEZA *et al.*, 2017).

Evidências mostram que a forma em que o tecido adiposo se acumula também está associada a promoção do risco cardiometabólico, sensibilidade à insulina e dislipidemia. Caso o excesso de energia seja acumulado em forma de hiperplasia de tecido adiposo subcutâneo, ocorre a proteção de órgãos como:

coração, rins e fígado, contra a deposição de gordura ectópica nociva (GONZALEZ- MUNIEZA *et al.*, 2015).

Em específico, trataremos de co-morbididades associadas a obesidade versus alterações morfofisiológicas observadas no músculo estriado cardíaco e músculos esquelético. Desta forma, os próximos tópicos apresenta a morfologia destes órgãos, bem como sua relação com a obesidade e possíveis consequências.

2.4. CORAÇÃO

2.4.1. MORFOLOGIA CARDÍACA

- **Localização:** O coração localiza-se na região torácica, atrás do esterno e a frente da coluna vertebral e esôfago, no mediastino médio, o seu tamanho total é similar ao de um punho cerrado (DRAKE *et al.*, 2015).

- **Estrutura:** O coração é dividido em quatro câmaras distintas, duas superiores: átrios direito e esquerdo; e duas inferiores: ventrículos direito e esquerdo; valvas internas: tricúspide, mitral, pulmonar e aórtica; artérias e veias coronárias; vasos: aorta, artéria pulmonar, veia cava superior, veia cava inferior, veias pulmonares; sistema de formação e condução do estímulo elétrico (MOORE *et al.*, 2014).

1.Átrios: São as câmaras superiores do coração e têm função de receber o conteúdo advindo da circulação. No caso do átrio direito o sangue recebido é o sistêmico e o átrio esquerdo recebe o sangue pulmonar.

2.Ventrículos: São as câmaras inferiores e têm função de ejetar o sangue neles contido, para o meio externo ao coração. O ventrículo direito, possui duas câmaras distintas, uma de enchimento e outra de esvaziamento, a de enchimento recebe o conteúdo do átrio direito e a de esvaziamento envia sangue aos pulmões.

O ventrículo esquerdo (VE) necessita vencer uma grande resistência para propeler o sangue contido em seu interior, bem maior que o ventrículo direito (VD), pois no primeiro caso a barreira à ser vencida é a pós- carga. Dessa forma comumente a parede do VE apresenta no mínimo o dobro de hipertrofia (aumento do miocárdio e músculos papilares) em relação ao outro ventrículo. A rede de trabéculas também é mais reforçada.

A resistência pós- carga é considerada como a dificuldade apresentada ao ventrículo esquerdo, para ejetar o volume de sangue nele contido. Entende-se que a resistência vascular periférica, é o maior fator determinante no aumento do pós-carga, fazendo com que o VE necessite dispendar muita força para esvaziar-se, ocasionado um quadro de hipertrofia do mesmo (GUYTON & HALL, 2011).

A obesidade está intimamente relacionada com o aumento do pós- carga devido às co-morbidades quase sempre presentes, nesse caso destacam-se: doença vascular, hipertensão arterial sistêmica, doença coronariana e aterosclerose (GOMES *et al.*, 2010).

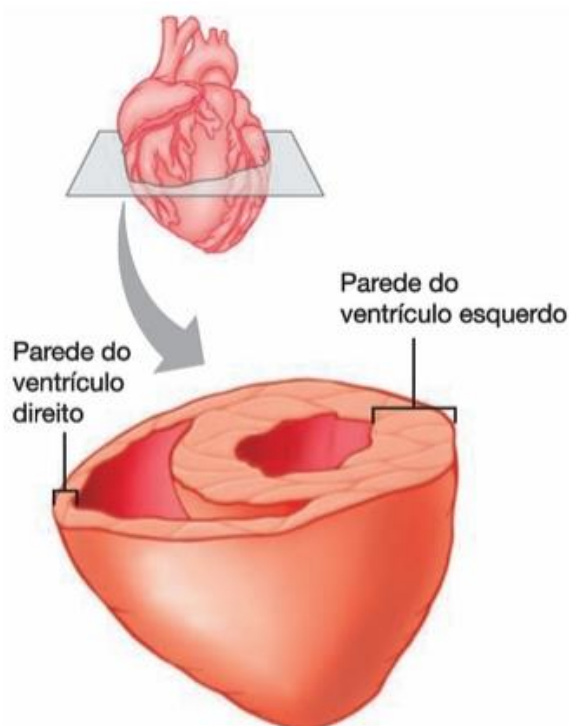


Fig. 02. Corte transversal do coração, onde observa-se a diferença entre a espessura da parede do ventrículo esquerdo e ventrículo direito (CINDY, 2013).

3. Válvulas cardíacas: As válvulas tricúspide e mitral localizam-se entre os átrios e ventrículos e impedem que o sangue circulem no sentido contrário. As válvulas aórticas e pulmonares controlam a saída de material do ventrículos para o meio externo do coração (GUYTON & HALL, 2011).

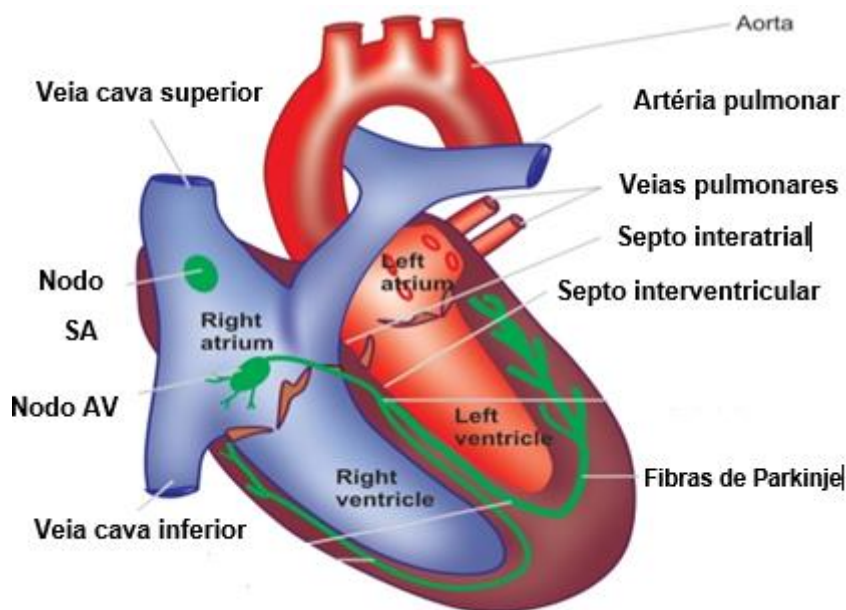


Fig. 03. Coração com câmaras cardíacas/ fluxo sanguíneo (MOHAN, 2010).

4. Camadas cardíacas: O músculo cardíaco é composto por células alongada e ramificadas, interligadas por junções intercelulares complexas, com estriações similares as observadas no músculo esquelético. Contudo essas células não são multinucleadas como as musculares, apresentando de um a dois núcleos centralizados. As fibras cardíacas são envolvidas por uma tênue bainha conjuntiva (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O coração é constituído por camadas ou paredes, que funcionam como revestimento das câmaras e sistema vascular, são elas: pericárdio, miocárdio, endocárdio (Figura 02).

A) Endocárdio: É constituído por células endoteliais, sob uma camada subendotelial de tecido conjuntivo frouxo e delgado, a qual reveste a parede da cavidade interna dos átrios e ventrículos (MOHAN, 2010).

O endocárdio faz o revestimento interno das valvas cardíacas, músculo papilares e dos vasos sanguíneos que conectam o coração à circulação sistêmica e pulmonar (RAO & KESAVA, 2011).

B) Miocárdio: É a camada média e mais espessa da parede cardíaca, constituído por fibras musculares cardíacas e por tecido conjuntivo fibroso. Considerada por muitos autores a principal camada do coração.

O arranjo dessas células musculares é extremamente variado, visto que mesmo em cortes histológicos pequenos, observa-se células orientadas em

diversas direções. Devido essa formação, as células são interconectadas por uma estrutura dita: discos intercalados.

As fibras cardíacas, que compõem o miocárdio, são ricas em retículo sarcoplasmático e mitocôndrias. A presença dessa última organela, favorece bastante a utilização de ATP como fonte de energia para a contração muscular.

Outra peculiaridade dessas células é a presença das junções *tight* nas membranas, favorecendo o transporte de íons e o potencial de ação na membrana celular (MOHAN, 2010).

O miocárdio, que representa o músculo estriado cardíaco, apresenta estrutura similar ao músculo estriado esquelético. A principal característica que garante essa semelhança é a presença de sarcômeros, constituídos por filamentos de actina e miosina, devido a alternância de coloração, confere esse aspecto estriado. Outra semelhança é a forma de contração deslizante entre esses filamentos (RAO & KASAVA, 2011).

Uma das principais atribuições do miocárdio é a contratilidade (bomba) cardíaca, garantindo que o sangue seja impulsionado em seu interior, assim como para o interior dos vasos sanguíneos externos.

C) Pericárdio: Restringe o coração a sua porção do mediastino, embora não seja empecilho para contrações vigorosas e rápidas. É uma membrana de constituição fibro- serosa que reveste o coração, pode ser chamado também de saco pericárdico. Dessa forma o pericárdio pode ser subdividido em: pericárdio visceral ou epicárdio e pericárdio parietal, representado por um saco fibroso.

As duas camadas do pericárdio citadas anteriormente, são revestidas por células mesoteliais e normalmente contém de 10-30 ml de líquido seroso límpido e aquoso, que funciona como lubrificante e absorve choque contra coração (MOHAN, 2010).

2.4.2. FISILOGIA CARDÍACA

A principal função do coração é suprir a necessidade de aporte sanguíneo de todo o organismo, principalmente pela premência tecidual de oxigênio (MOORE *et al.*, 2014). Desse modo todas as estruturas cardíacas atuam concomitantemente em harmonia para que essa função seja mantida.

BOMBA CARDÍACA: O coração na verdade é formado por duas bombas cardíacas distintas, onde a primeira recebe sangue do corpo e bombeia aos pulmões e a outra exerce papel exatamente inverso. Dessa maneira o sangue circula continuamente, que é o sistema circulatório.

O átrio direito recebe o sangue da circulação sistêmica (sangue venoso) e pressiona a válvula tricúspide para alcançar o ventrículo direito. Por sua vez o ventrículo direito empurra o seu conteúdo através da válvula pulmonar para a artéria pulmonar e pulmões. Assim que o sangue passa pelo pulmões e é oxigenado, retorna ao coração através das veias pulmonares alcançando o átrio esquerdo, finalmente a força exercida pelo volume sanguíneo no átrio esquerdo pressiona a válvula mitral e esse conteúdo chega ao ventrículo esquerdo, que por sua vez exerce enorme pressão, devido à força de sua parede, sobre a válvula aórtica para chegar à artéria aorta e à toda circulação sistêmica novamente (GUYTON & HALL, 2014).

SINCÍCIO CARDÍACO: O músculo estriado cardíaco se assemelha muito ao músculo esquelético, devido o mecanismo de contração através do deslizamento dos filamentos de actina e miosina serem muito similares, entretanto as fibras musculares cardíacas apresentam a peculiaridade de serem interconectadas entre si, essa estrutura é denominada sincício. Existem dois sincícios no coração: o atrial e o ventricular. Essa característica garante que toda a massa de fibras interligadas se contraíam concomitantes (MOORE *et al.*, 2014).

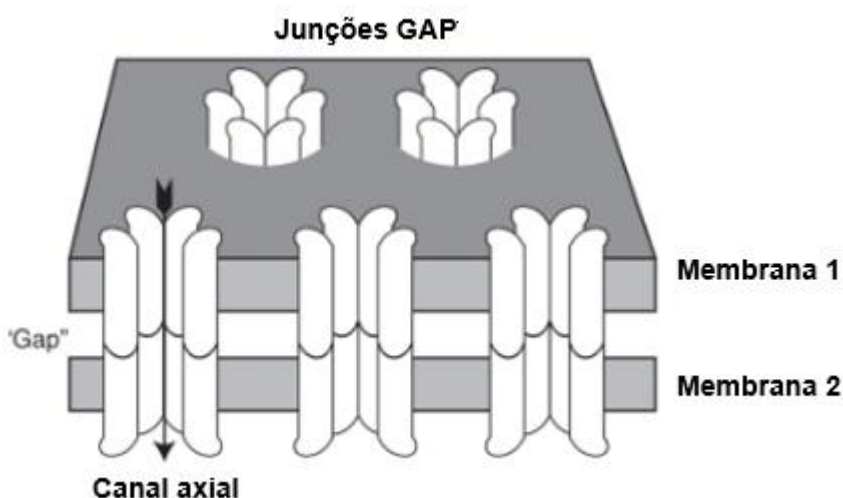


Fig. 04. Diagrama que mostra os múltiplos níveis de estrutura de junção de gap (GOODENOUGHT & PAUL, 2009).

JUNÇÕES COMUNICANTES: As fibras do músculo cardíaco são constituídas por muitas células individuais conectadas por estruturas denominadas discos intercalados. Esses discos são parte das membranas celulares que separam as células do miocárdio uma das outras (GUYTON & HALL, 2011).

Detalhadamente, essas estruturas são pontos onde as membranas entre as células se fundem entre si, formando as junções comunicantes (*gap junction* ou junções *gap*). Contudo, essa constituição permite a rápida difusão de íons no eixo longitudinal das fibras miocárdicas, quase que livremente. (GUYTON & HALL, 2011).

Outra propriedade importante das junções *gap* é a natureza hidrofílica dos canais, fato que elimina a necessidade dos íons atravessarem a barreira da membrana plasmática de natureza lipídica. Dessa forma, em condições homeostáticas, o potencial de ação ocasionado pela difusão iônica, se propaga sem muita resistência pelas células que constituem o mesmo sincício. Essas vias (conexons) são ricas em um tipo de proteína transmembrana denominada conexina. Em verdade as conexinas são um grupo de proteínas semelhantes em sua sequência de aminoácidos. Dependendo da natureza do tecido, é expressada um tipo diferente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

No coração, o tipo de conexina observada é a 43. Em condições normais a conexina 43 se encontra na membrana plasmática, constituindo as junções comunicantes, todavia em casos de remodelamento cardíaco pelo ganho de peso, observa-se a diminuição da intensidade de marcação dessa proteína, bem como a redistribuição da mesma ao longo da lateral da célula (Azevedo *et al*, 2016).

Em condições patológicas, o número de junções *gap* se torna menor na membrana plasmática, tornando essa condução mais lenta devido grande resistência para a passagem de íons excitatórios de uma fibra condutora para a próxima. Consequentemente, a velocidade de contração cardíaca é prejudicada (Azevedo *et al.*, 2016).

Essas modificações nos canais iônicos, peculiares do remodelamento cardíaco, são prejudiciais à transmissão elétrica dos impulsos de forma geral, muitas vezes diminuindo a contratilidade local, ou mesmo causando irregularidades no ritmo de contração do miocárdio (Vassalo & Lima, 1993). Esses acometimentos fisiológicos são associados à arritmias ventriculares malignas, incluindo taquicardia ventricular sustentada e fibrilação ventricular (Azevedo *et al.*, 2016).

2.5. OBESIDADE RELACIONADA AO CORAÇÃO

De Cleve *et al.* (2017) correlacionam hipertrofia ventricular esquerda (HVE) diretamente com o aumento do IMC e a incidência de hipertensão arterial, todavia também mostra que essa adaptação cardíaca não depende somente dessas patologias, porém quando se apresentam de forma concomitante, a possibilidade de desfecho cardiovascular aumenta. De Simone *et al.* (2011) apontaram outras alterações morfofisiológicas já bem conhecidas na literatura: o aumento do volume e débito cardíaco, observado com mais frequência em obesidade visceral. Também está associado à esse tipo de adiposidade o prolongamento do relaxamento do ventrículo esquerdo.

Além das modificações observadas inerentes a morfologia ventricular esquerda, Ramirez *et al.* (2016) constataram o acúmulo ectópico de triglicerídeos no miocárdio, causa de esteatose miocárdica, estresse oxidativo mitocôndrial, resultando na queda do nível de ATP local e insuficiência cardíaca em indivíduos obesos e diabéticos.

Essas mudanças que ocorrem no indivíduo com acúmulo excessivo de gordura são decorrentes em parte da influência da ação endócrina através da secreção de seus componentes bioativos. Dentre esses componentes observa-se a leptina e a adiponectina com muita influência sobre a função e o remodelamento cardíaco. Estando diretamente relacionadas com o desenvolvimento de doenças do coração (BAIRWA *et al.*, 2016).

Indubitavelmente, os pacientes acima do peso têm aumento de risco de eventos cardiovasculares. Sabe-se que a obesidade aumenta o risco também de hipertensão e doença cardíaca coronária, que são as principais causas da insuficiência cardíaca. Lavie *et al.* (2014) apontaram que a gravidade do grau de

insuficiência cardíaca e de hipertensão arterial são diretamente proporcionais ao ganho progressivo de peso. Esses mesmos estudos acharam a correlação entre obesidade e fibrilação atrial.

Dentre as adaptações cardíacas à obesidade, observa-se também o desenvolvimento de fibrose cardíaca. Essas alterações fibróticas decorrem da remodelação guiada pelos cardiócitos através de interação com células intersticiais e secreção de citocinas inflamatórias (CLEVA *et al.*, 2017; KOITABASHI *et al.*, 2011).

Não obstante a hipertrofia de cardiomiócitos seja encontrada com muita frequência em modelos experimentais de estudos em obesidade e alterações de ordem metabólica, este processo fisiológico ainda não foi bem esclarecido. Todavia, estudos já mostram que a deposição de ácidos graxos e triglicerídeos locais podem ocasionar resultados tóxicos, induzindo à disfunção celular ou até mesmo apoptose (CAVALERA *et al.*, 2014).

A presença de fibrose no miocárdio está também relacionada ao espessamento das artérias intramiocárdicas e o aumento da pós-carga, condição comum em indivíduos hipertensos (EBONG *et al.*, 2014).

As pesquisas dedicadas ao entendimento do funcionamento do coração na população com excesso de peso são de grande importância, pois estudos epidemiológicos mostram que as mortes por doenças cardíacas crônicas ocorrem principalmente por acometimentos coronarianos, acidente vascular cerebral e infarto do miocárdio. Sendo estas, responsáveis por 75% de mortes por doenças não transmissíveis no mundo (SHI *et al.*, 2016).

2.6. MÚSCULO ESQUELÉTICO

2.6.1. MORFOLOGIA

- **Localização:** Existem cerca de 434 músculos no corpo humano, que correspondem a 40-45% de um adulto eutrófico. Os músculos esqueléticos estão presentes em todas as articulações do corpo, mesmo naquelas que são fixas, ou seja, não apresentam movimento. Geralmente são fixados nos ossos, ao menos em uma das partes, muitas vezes cruzam as articulações (SOBOTTA, 2009).

Muitos músculos apresentam a mesma origem ou inserção, formando os grupamentos musculares, como o quadríceps que se insere na tuberosidade tibial através do tendão patelar, mas é composto por quatro porções distintas: reto femoral, vasto medial, vasto intermediário e vasto lateral (HALL, 2009).

- **Estrutura:** A estrutura clássica do músculo esquelético é constituída por: corpo ou ventre muscular, tendão, capsula muscular e tecido subjacente.

1) Corpo ou ventre muscular: É a porção carnosa do músculo, constituído por fibras musculares contráteis. São responsáveis pela contração muscular em si e por gerar força.

2) Tendão: É constituído por fibras colágenas e tem função de fixação em ossos, cápsulas articulares e tecido subjacente; formado também por tecido conjuntivo.

3) Capsula muscular e tecido subjacente: É uma membrana que funciona como envoltório de grupos musculares.

4) Fibra muscular: É assim denominada por ser similar ao formato de um fio. Em termos gerais, as fibras musculares percorrem toda extensão do músculo diagonalmente. A membrana que envolve a fibra é denominada sarcolema e o citoplasma especializado sarcoplasma. As fibras musculares são revestidas por uma bainha de tecido conjuntivo dita endomísio. São células multinucleadas e ricas em mitocôndrias. Outro componente importante da fibra muscular são as miofibrilas, que estão organizadas paralelamente e compostas por filamentos de actina e miosina, os quais garantem o aspecto estriado do músculo. Esses filamentos deslizam uns sobre os outros no processo de contração muscular.

Cada miofibrila apresenta uma rede de retículo sarcoplasmático e túbulos T, que funcionam como reservatórios, se estendendo da membrana sarcoplasmática para o meio interno da célula. Nessa estrutura, que recebe o nome de tríade, fica armazenado cálcio, bem como auxiliam na transmissão de impulsos elétricos da membrana para a miofibrila, sendo fundamental na contração muscular (CINDY, 2013).

5) Placa motora ou unidade motora: É constituída por um neurônio motor e uma fibra motora por ele inervada, alguns estudos apontam fibras multi inervadas, de acordo com sua função ou adaptação ao treinamento neuromuscular.

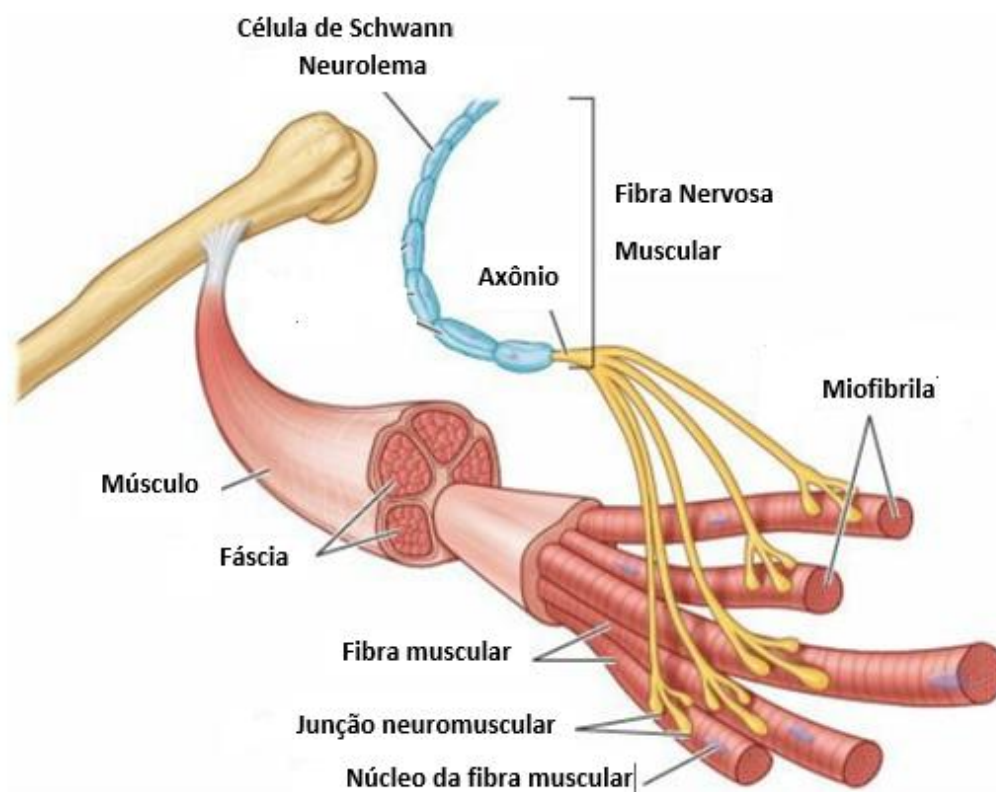


Fig. 05. Unidade motora. A unidade motora consiste em um neurônio e uma fibra muscular por ele inervada (MOORE et al., 2014).

2.6.2. FISILOGIA MUSCULAR

Os músculos esqueléticos exercem várias funções na manutenção da homeostase do corpo humano: Produção dos movimentos, manutenção da postura, proteção visceral e produção de calor (POWERS & HOWLEY, 2009).

CONTRAÇÃO MUSCULAR:

A contração muscular é um processo complexo, que envolve várias proteínas celulares e sistemas de produção de energia, dentre essas proteínas, destaca-se o papel da troponina e tropomiosina, que estabelecem a interação entre os principais filamentos contráteis. No entanto, o resultado final é o deslizamento do filamento de que compõem a miofibrila: actina, onde o primeiro

desliza sobre o segundo durante a contração, gerando tensão e encurtamento muscular.

Cada miofibrila é constituída por cerca de 1500 filamentos de miosina (mais espesso) e 3000 de actina (mais delgado), conferindo a essas proteínas quase toda parte sólida constituinte do músculo esquelético.

Quando observadas em microscopia, vê-se que as faixas que contém actina são claras e por isso chamadas de I, que significa isotrópica à luz polarizada. No entanto, as faixas escuras são compostas por miosina e ditas A, pois são anisotrópicas à luz polarizada. Essa alternância de coloração confere ao músculo esquelético o aspecto estriado.

Além das estruturas supracitadas, existe nas extremidades dos filamentos de actina, a linha ou disco Z, composto por proteína filmentosa, funciona como delimitação de uma porção de estruturas que se repetem organizadamente ao longo da miofibrila, denominada **sarcômero**.

A força muscular gerada em um músculo está relacionada a dois fatores: força gerada em fibras musculares isoladas e o número de fibras musculares envolvidas em uma contração. (CINDY, 2013).

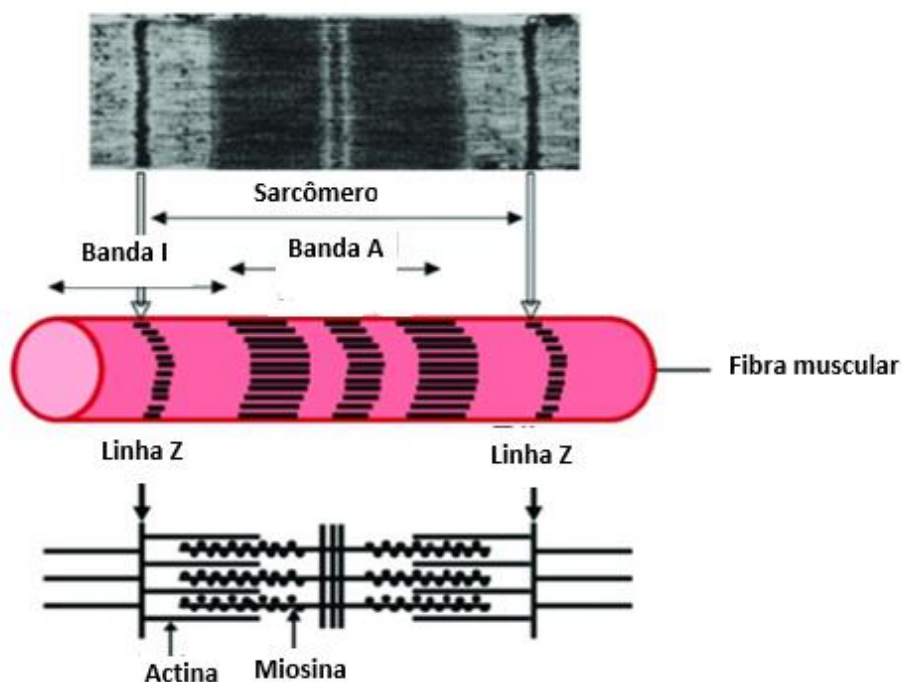


Fig. 06. Anatomia do músculo esquelético e estrutura do sarcômero (OSTROVIDOV *et al.*, 2014).

2.6.3. TIPOS DE FIBRA MUSCULAR

As fibras musculares são classificadas de acordo com suas características histológicas e bioquímicas. As fibras são classificadas em três tipos distintos em humanos:

A) FIBRAS I: São fibras de contração lenta, de coloração avermelhada e caracterizadas como oxidativas.

B) FIBRAS IIa E IIx: São fibras de contração rápida, de coloração esbranquiçada e caracterizadas como glicolíticas (DANTAS, 2014).

2.7. OBESIDADE RELACIONADA AO MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

Kalvani *et al.*, 2014 relataram que indivíduos obesos têm a força corporal relativamente depressiada, levando em consideração sua dimensão corporal. Esse mecanismo pode ser explicado pelo infiltrado de gordura e tecido conjuntivo intramuscular nessa população, devido a presença de fatores pró-inflamatórios no tecido adiposo, podendo inclusive causar dano mitocondrial na célula muscular. Dietas ricas em gordura podem ocasionar a redução da expressão do PGC-1 α (*Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* relacionado à biogênese mitocondrial).

Em estudo realizado com ratos submetidos à dieta hiperlipídica, foi observado uma redução na capacidade oxidativa do músculo esquelético de captação e utilização de lipídios circulantes juntamente com atividade enzimática oxidativa atenuada, bem como o aumento teor de lipídio muscular ectópico e diminuição do tamanho da fibra (MATSAKAS *et al.*, 2015).

Kalinkovich & Livshits (2017) apontam que o estado metainflamação (crônica e branda) encontrado em indivíduos com IMC elevado, tem impacto sobre o músculo esquelético, pois são encontrados infiltrados inflamatórios nesse tecido citocinas pró-inflamatórias em concentração elevada e anti-inflamatória, em concentração baixa, nesse caso, essas citocinas são denominadas miocinas. Ainda nesse estudo, atribuiu-se a perda parcial da capacidade da contratilidade muscular, à presença de inflamação metabólica,

bem como a resistência à ação local a insulina. (Handschin & Spiegelman (2008), Observou-se a presença de TNF α e IL-6, curiosamente apresentando papéis distintos em situações diferentes. Em sedentários a IL-6 apresenta papel pró-inflamatório, como já mencionado e ocorre o aumento da expressão do TNF α , porém em indivíduos praticantes de atividade física, a IL-6 se comporta de maneira anti-inflamatória e o TNF α é reduzido.

CLEASBY *et al.* (2016) apontou a ocorrência do acúmulo de gordura intermuscular, além de no citoplasma das células em questão. Essas condições estão relacionadas e diminuição da capacidade contrátil das proteínas musculares, fatores que provavelmente contribuem para o desenvolvimento da sarcopenia.

A resistência à ação de insulina, observada na diabetes tipo 2 e em muitos casos de obesidade, prejudica notoriamente o metabolismo da glicose no músculo esquelético. A diminuição da absorção desse substrato se dá pela deteriorização da sinalização da insulina, redução do transporte da glicose, bem como pela síntese de glicogênio (MUHAMMAD *et al.*, 2010).

Contudo, o aumento da gordura intramiocelular também estabelece papel na alteração da resistência à ação da insulina no músculo esquelético (LETTNER & RODEN, 2008). Alterações na fosforilação oxidativa mitocondrial nessas células está diretamente relacionada essa deposição de gordura local (MUHAMMAD *et al.*, 2010).

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O propósito deste trabalho foi avaliar as possíveis alterações morfológicas ocorridas no coração de ratos Wistar submetidos à dieta hiperlipídica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a morfologia celular, através coloração de Hematoxilina e Eosina das biópsias cardíacas e de quadríceps;
2. Determinar a deposição de colágeno, através da coloração de PicroSirius Red, para as biópsias cardíacas e de quadríceps;
3. Comparar a Morfometria das áreas do tecido cardíaco e muscular nas colorações H/E e PicroSirius Red. Análise das áreas ocupadas por fibras entre animais Controle e Hiperlipídica;
4. Imunomarcagem das proteínas conexina e actina para músculo cardíaco; e actina para músculo estriado esquelético.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Todos os procedimentos envolvendo animais estão de acordo com as recomendações nacionais sobre o uso de animais em experimentação conforme o Conselho Nacional de Controle em Experimentação Animal (CONCEA) e Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFRJ n. 01200.001568/2013-87 –Anexo 01 e 02).

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados 12 ratos *Wistar* machos, mantidos no biotério do Instituto Carlos Chagas Filho (Departamento de Biofísica, UFRJ) em temperatura ambiente ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$), em ciclo padrão claro/escuro (12h/12h). A subdivisão dos animais em grupos se deu aleatoriamente em: Grupo Controle (GCT) e Grupo Dieta Hiperlipídica (GHL). Os animais foram submetidos às intervenções nutricionais da 3ª semana (após desmame) até a 13ª semana de vida (ratos considerados adultos jovens).

Aleatoriamente, os animais foram acondicionados em gaiolas (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil), medindo 49 x 34x 16 cm.

4.2. DIETA CONTROLE E HIPERLIPÍDICA

As dietas controle e hiperlipídica, foram elaboradas pela empresa Prag Soluções Serviços e Comércio Ltda (São Paulo). A dieta controle foi produzida segundo Reeves *et al.* (1993), adequada para o crescimento e o desenvolvimento normal de roedores e apresenta a seguinte composição: 23% de proteínas, 67% de carboidratos e 10% de lipídios. Já dieta hiperlipídica, segundo Sinitskaya *et al.* (2007), apresentou elevada quantidade de lipídios, baixa concentração de carboidratos, com níveis de proteínas dentro de valores considerados normais (24% de proteínas, 9% de carboidratos e 67% de lipídios).

Aleatoriamente, os animais foram divididos em dois grupos: Grupo Controle e Grupo Dieta Hiperlipídica os quais receberam água e alimento, de acordo com a dieta, a vontade.

4.3. EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais utilizados neste estudo foram concomitantemente utilizados no estudo “Obesidade associada à hipertensão arterial – avaliação dos

mecanismos moleculares que levam à maior reabsorção renal de sódio”, coordenado pelo Prof. Dr. Adalberto Vieyra (Anexo 01). O anexo 02 evidencia que a aluna Lorena Rosa e seus orientadores são parte integrante do projeto central do Prof. Dr. Adalberto Vieyra.

De acordo com as Diretrizes de Eutanásia de Animais, preconizada pela pelo CONCEA, quando há fatores que impeçam o uso de anestésicos como forma de eutanisiar os animais, pode-se utilizar métodos alternativos para a morte dos animais. Devido aos animais também serem parte integrante da pesquisa citada acima, que analisa fatores cardiovasculares e renais, onde o uso de anestésicos poderia interferir na mensuração de tais fatores (KUTCHAI *et al.*,1999; GOMEZ & GUATIMOSIM, 2003), os animais foram decaptados através de guilhotina. Ressalta-se que um estudo não produz interferência em outro e que segue-se a normativa NCR3 (Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research).

A eutanásia foi realizada no Laboratório de Físico-Química “Bióloga Aída Hasson Voloch” (Instituto Carlos Chagas Filho, Departamento de Biofísica, UFRJ). Após a morte do animal, o sangue (5mL) foi retirado da artéria jugular, utilizando-se seringa Luer Lock –SR de 5mL (Sigma Audrich, St Louis, USA). Em seguida, o sangue foi acondicionado em um tubo Falcon de 15mL (TPP, Piracicaba, São Paulo, Brasil), acrescido do anti-coagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA, Sigma Aldrich, St Louis, Missouri, EUA) e centrifugado (centrífuga Excelsa Baby1 Fanem, São Paulo, São Paulo, Brasil) a 10 mil rpm por 2 minutos. O plasma, ou seja, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e armazenado em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) à temperatura de -20°C em freezer convencional.

As biópsias musculares foram realizadas e fixadas em formol 10% tamponado, em tubos Falcon de 15 ml (TPP, Piracicaba, São Paulo, Brasil). Os tecidos musculares coletados foram: 1) Estriado cardíaco (ventrículo esquerdo) e; 2) Estriado esquelético (quadríceps direito).

4.4 FASES EXPERIMENTAIS

4.4.1. MICROSCOPIA DE LUZ CONVENCIONAL

Os cortes de parte do ventrículo esquerdo cardíaco e das fibras estriadas musculares esqueléticas foram coradas com os corantes Hematoxilina e Eosina,

no laboratório de fisiologia de terapia celular no intuito de analisarmos o perfil morfológico das fibras e possível presença de infiltrado inflamatório. O protocolo detalhado para esta análise encontra-se descrito no Anexo 03: Protocolo Operacional Padrão (POP). Os cortes de parte do ventrículo esquerdo cardíaco e das fibras estriadas musculares esqueléticas foram corados também para Picrosírius, onde as fibras foram analisadas bem como a presença de deposição de colágeno, . O protocolo detalhado encontra-se descrito no Anexo 04: Protocolo Operacional Padrão (POP).

A quantificação das análises com coloração HE e Picrosírius red foram realizadas com 10 campos de cada amostra, sendo 3 animais de cada grupo. As imagens foram geradas em microscópio de luz invertido (Zeiss). As análises histomorfométricas foram efetuadas através do uso de programas de imagem Image Pro Plus 4 (Corporate Headquarters, Rockville, Maryland, EUA) e Graph Pad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, EUA).

A quantificação realizada através do corante hematoxilina/ eosina, mensurou a área das imagens constituídas por fibra muscular de forma automática pelo programa Image Pro Plus 4. As análises foram realizadas em uma imagem de cada vez. Após essa etapa, utilizando o programa Excel 2013, foi efetuada a soma dos percentuais individuais por animal (10 campos), em seguida a média dos resultados dos três animais por grupos, obtendo-se o resultado do grupo controle e dieta hiperlipídica.

A quantificação feita pela coloração *Picrosírius Red*, mediu a área das imagens cobertas por fibra colágena automaticamente pelo programa Image Pro Plus 4. As análises foram realizadas em uma imagem de cada vez. Após essa etapa, utilizando o programa Excel 2013, foi efetuada a soma dos percentuais individuais por animal (10 campos), em seguida a média dos resultados dos três animais por grupos, obtendo-se o resultado dos grupos.

4.4.3. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os tecidos dos animais foram congelados em Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura® Finetek, Torrance, Califórnia, EUA) e cortados em criostato a -22°C. Os cortes obtidos foram fixados por 30 minutos em paraformaldeído 4% a 25° C. Em seguida foram lavados 3 vezes por 10 minutos com PBS-Triton X100R a 0,5% e após essa etapa, incubados por 30 minutos com albumina

sérica bovina (BSA- Bovine Serum Albumin, Sigma, St Louis, Missouri, EUA) diluída à 0,5% em PBS, isenta de imunoglobulinas. Adicionou-se anticorpos primários específicos: para Actina e Conexina 43, sendo o último somente para tecido cardíaco. As lâminas foram incubadas em câmara úmida na estufa por 2h à 37°C.

Tabela 03: Especificações dos reagentes utilizados na Imuno-histoquímica

Anticorpos	Especificação	Dados comerciais
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride	ROCHE (Cod.: 10236276001)
Anti- esqueleto de alfa actina muscular [Alpha Sr-1]	Monoclonal (Mouse)	Abcam (Cod:ab28052)
Anti-Connexin 43	Policlonal (Rabbit)	Abcam (Cod: ab11370)
Alexa Fluor 488	Goat anti-Mouse IgG	ThermoFisher (Cod.: A-11029)
Alexa Fluor 488	Goat anti-Rabbit IgG	ThermoFisher (Cod.: A-11029)

Os tecidos foram colocados na geladeira *over night* (12 horas). Em seguida, foram lavadas com PBS por 3 vezes de 10 minutos e inserido o anticorpo secundário (Alexa 488 anti-Mouse referente ao anticorpo primário anti-Actina e; Alexa 488 Anti-Rabbit para anticorpo primário anti-Cx43), as lâminas foram incubadas em câmara úmida na estufa por 2h à 37°C. Os tecidos foram novamente lavados com PBS por 5 vezes de 10 minutos cada. Após a lavagem com PBS, como descrito anteriormente, as lamínulas foram marcadas com DAPI por 10 min a 25°C para marcar o núcleo das células e lavadas 3 vezes com PBS. A montadas foram feitas com 10 µL de Prolong Gold^R (ThermoFisher Cientific, Waltham, Massachusetts, EUA) por corte, uma solução que reduz o decaimento da fluorescência.

As marcações nas lâminas foram observadas em um microscópio de epifluorescência Axiovert 40 Plus (Photo microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), excitadas com iluminação por lâmpada de mercúrio de alta pressão, HBO 50W ($\lambda = 490$ nm) sendo a emissão monitorada utilizando um conjunto de filtros de emissão para fluorescência de fluoresceína ($\lambda = 525$ nm). A

especificidade da imuno reatividade foi avaliada na ausência do anticorpo primário. Os experimentos foram submetidos à observação e análise simples ou de secções no plano Z (reconstrução tridimensional) utilizando o microscópio confocal LSM 710 Quasa (Carl Zeiss Oberkochen, Alemanha).

A especificidade das imuno marcações foi avaliada utilizando o mesmo protocolo acima, substituindo os anticorpos primários nas incubações por soluções de PBS com albumina sérica bovina a 0,1%. Nenhuma marcação foi observada nestas condições.

4.4.4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados para a quantificação das proteínas actina e conexina foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e para detecção de diferenças entres os grupos foi usado o teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1. PESO DOS ANIMAIS

Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com as dietas submetidas aos animais. A dieta controle, convencional e adequada para o desenvolvimento normal de roedores e apresenta a seguinte composição: 23% de proteínas, 67% de carboidratos e 10% de lipídios; enquanto que a dieta hiperlipídica objetivava a engorda dos animais. Para tal, esta dieta apresentou-se elevada quantidade de lipídios, baixa concentração de carboidratos, com níveis de proteínas dentro de valores considerados normais (24% de proteínas, 9% de carboidratos e 67% de lipídios de origem vegetal). Os animais foram eutanaziados para as análises. No gráfico 01, evidencia-se o aumento de peso dos animais (grupo experimental-dieta hiperlipídica) em comparação ao grupo controle.

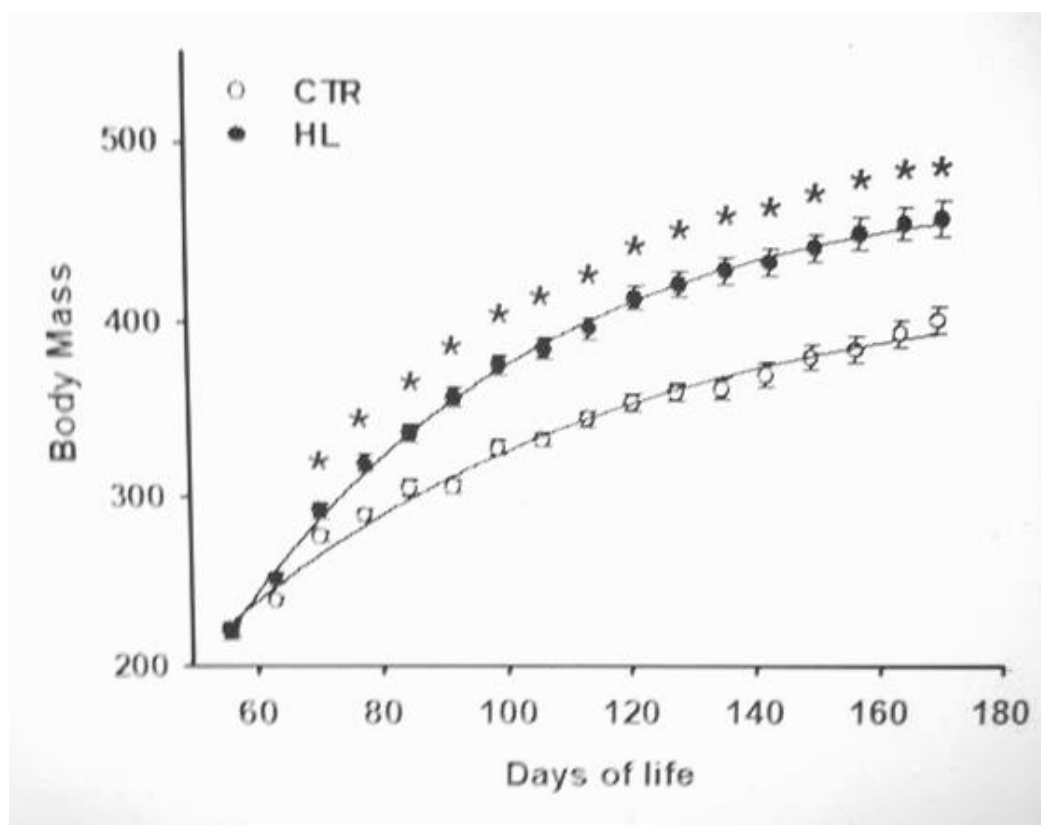


Gráfico 01: Aumento de peso dos animais durante a administração de diferentes dietas ao longo dos dias. CTR: Grupo Controle: Dieta Convencional. HL: Grupo Experimental: Dieta Hiperlipídica.

5.2. MICROSCOPIA DE LUZ CONVENCIONAL

Os resultados abordam a microscopia de luz utilizando as técnicas de coloração Hematoxilina e Eosina; e Picrosirius (protocolos: Anexo 03 e 04) em ambos os tecidos, e as respectivas morfometrias. Os resultados foram divididos de acordo com o órgão e respectivo músculo: A) Músculo estriado cardíaco (ventrículo esquerdo) e B) Músculo estriado esquelético (quadríceps).

A) MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO

Observa-se na Fig. 07, a coloração de Hematoxilina e Eosina permite observar a morfologia tecidual do grupo controle (imagem A e B) e Dieta Hiperlipídica (imagem C e D). Nas fotomicrografias do grupo controle (A/B, mostra a integridade do miocárdio pode ser vista. No grupo experimental Dieta Hiperlipídica (C/D) observa-se com clareza o aumento da distância entre as f

A coloração de Picrosirius pode ser utilizada a fim de analisar o perfil morfológico das fibras e uma possível presença de deposição de colágeno, . Esta coloração corroborou com os resultados encontrados na morfologia vista através da H/E, onde havia integridade de fibras no grupo de animais controle (Fig. 08 A/B) e aumento da distância entre as fibras no grupo experimental (Dieta Hiperlipídica: Fig 08 C/D).

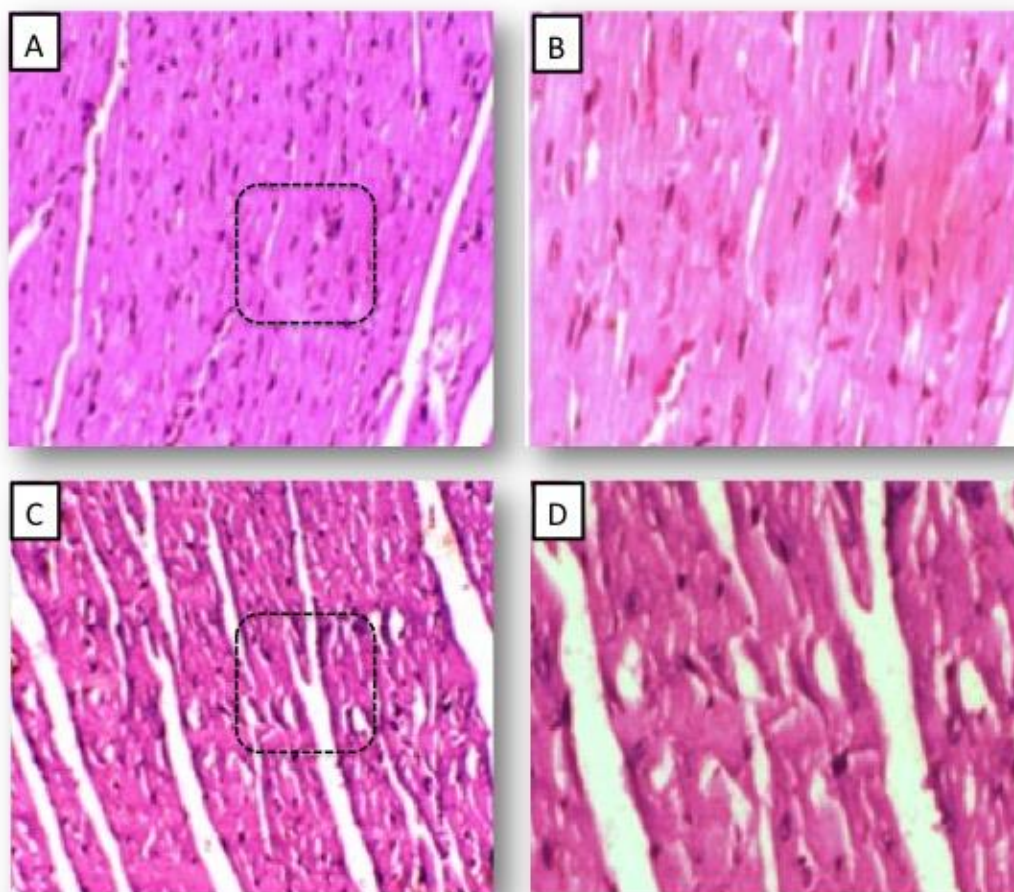


Fig. 07: Fotomicrografias de tecido muscular estriado cardíaco. Coloração Hematoxilina e Eosina. **Grupo Controle:** Em A) observa-se a integridade do músculo cardíaco e em destaque pontilhado a área em magnitude representada em B) **Grupo Dieta Hiperlipídica:** Observa-se em C) o aumento da distância entre as fibras cardíacas e em destaque pontilhado a área em magnitude representada em D. A/C: Objetiva de 20x. B/D: Objetiva de 40x. Colocar aqui o tempo de dieta dos animais.

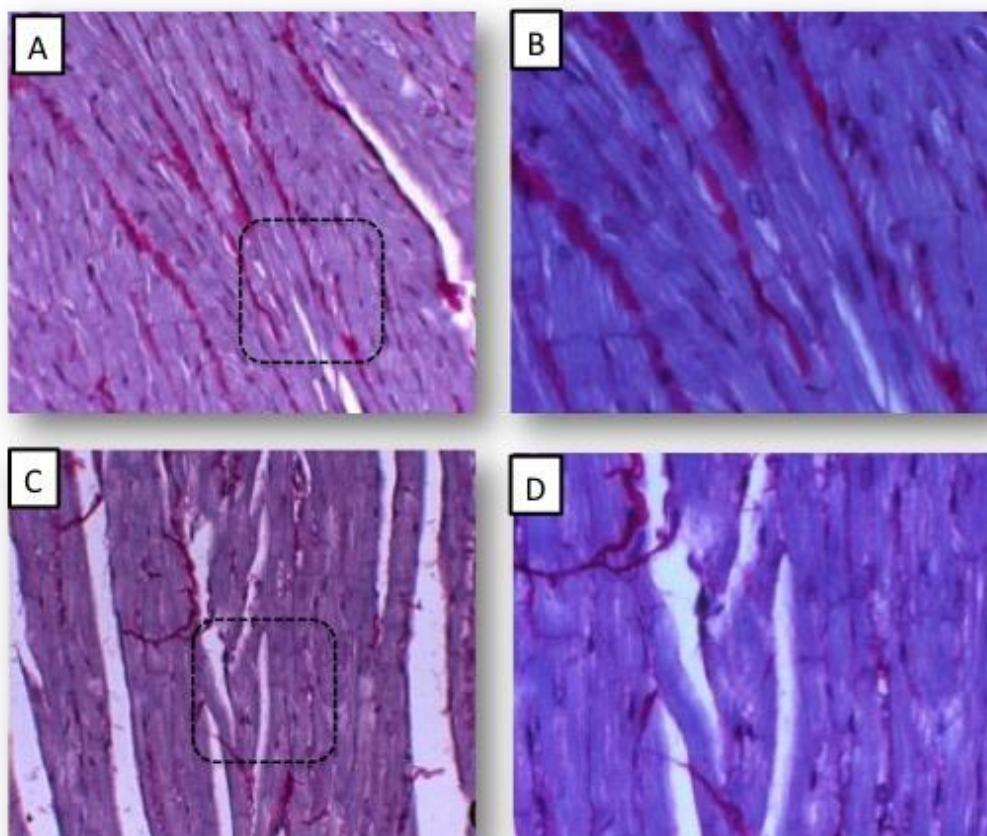


Fig. 08: Fotomicrografias de tecido muscular estriado cardíaco. Coloração PicroSirius Red. **Grupo Controle:** Corroborando com a coloração de H/E, observa-se em A) integridade das fibras miocárdicas e em destaque pontilhado a área em magnitude representada em B) **Grupo Dieta Hiperlipídica:** fibras cardíacas mais espaçadas e em destaque pontilhado a área em magnitude representada em D. A/C: Objetiva de 20x. B/D: Objetiva de 40x. (não consigo identificar o aumento do colágeno nessa imagem).

Para o tecido cardíaco, foram observadas diferenças relevantes entre os grupos através da morfometria. Através da coloração hematoxilina/eosina percebeu-se a menor quantidade de fibra muscular no grupo submetido à intervenção dietética. Sugerindo a perda de massa muscular e possivelmente diminuição da capacidade contrátil do miocárdio. Ainda na biópsia cardíaca, através da coloração PicroSÍrius Red, constatou-se um resultado expressivo na quantificação de fibra colágena local, mostrando índices que chegam atingir o dobro no grupo de Dieta Hiperlipídica.

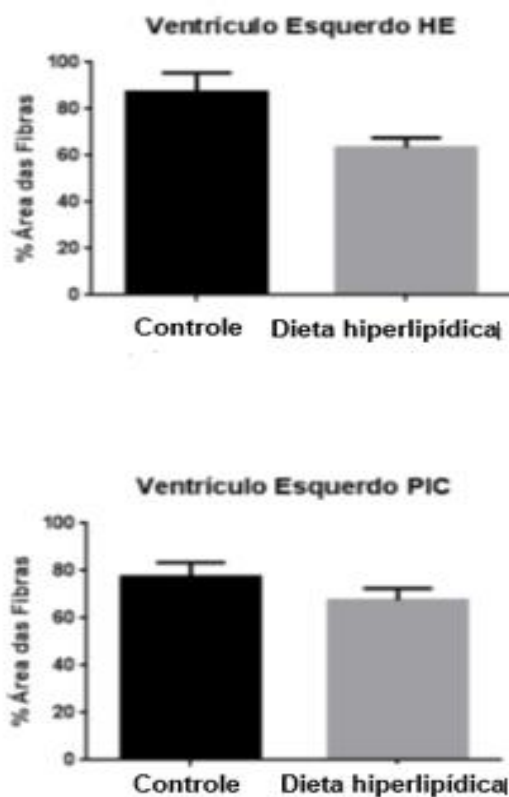


Gráfico 02. Morfometria do tecido muscular estriado cardíaco. As colunas representam a área ocupada pelas fibras nos animais controle (Controle) e experimental (Dieta Hiperlipídica). A) Coloração Hematoxilina/ Eosina. Os dados foram analisados no teste T não pareado, houve diferença significativa. $P=0,04908$. B) Coloração PicroSirius Red. Os dados foram analisados no teste T não pareado, não houve diferença significativa. $P=0,3507$.

B) MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO

O músculo estriado esquelético escolhido para a biópsia foi o quadríceps direito do animal.

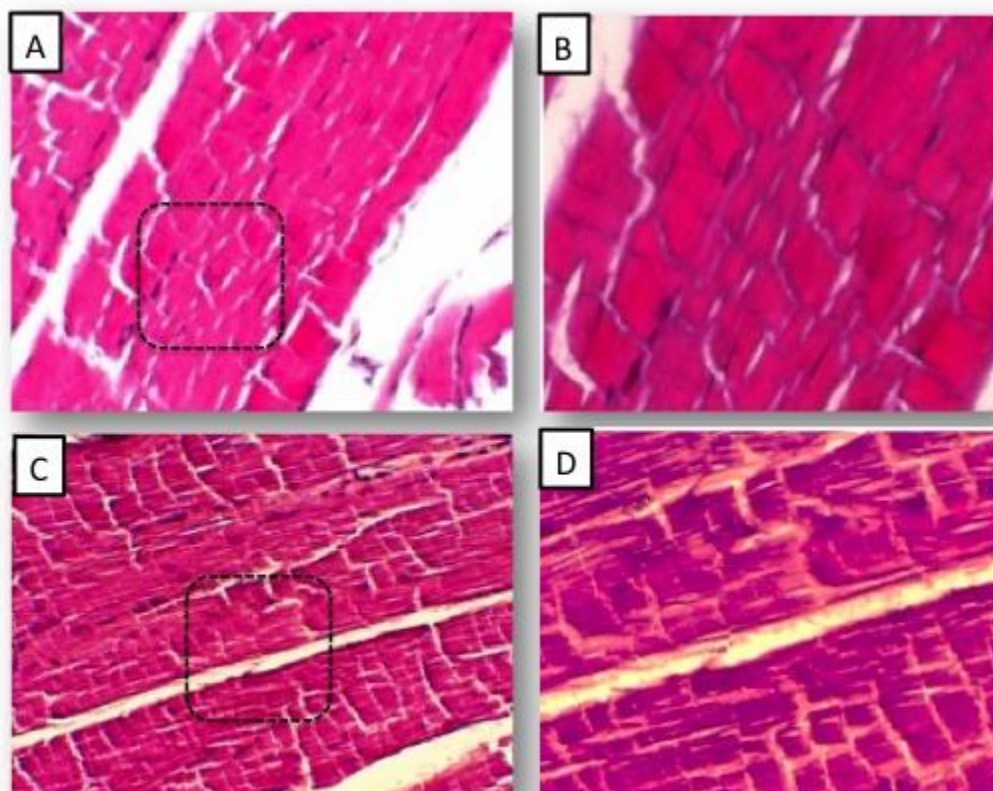


Fig. 09: Fotomicrografias de tecido muscular estriado esquelético. Coloração Hematoxilina e Eosina. **Grupo Controle:** Em A) observa-se em destaque pontilhado a área em magnitude representada em B) **Grupo Dieta Hiperlipídica:** em C) observa-se em destaque pontilhado a área em magnitude representada em D. A/C: Objetiva de 20x. B/D: Objetiva de 40x.

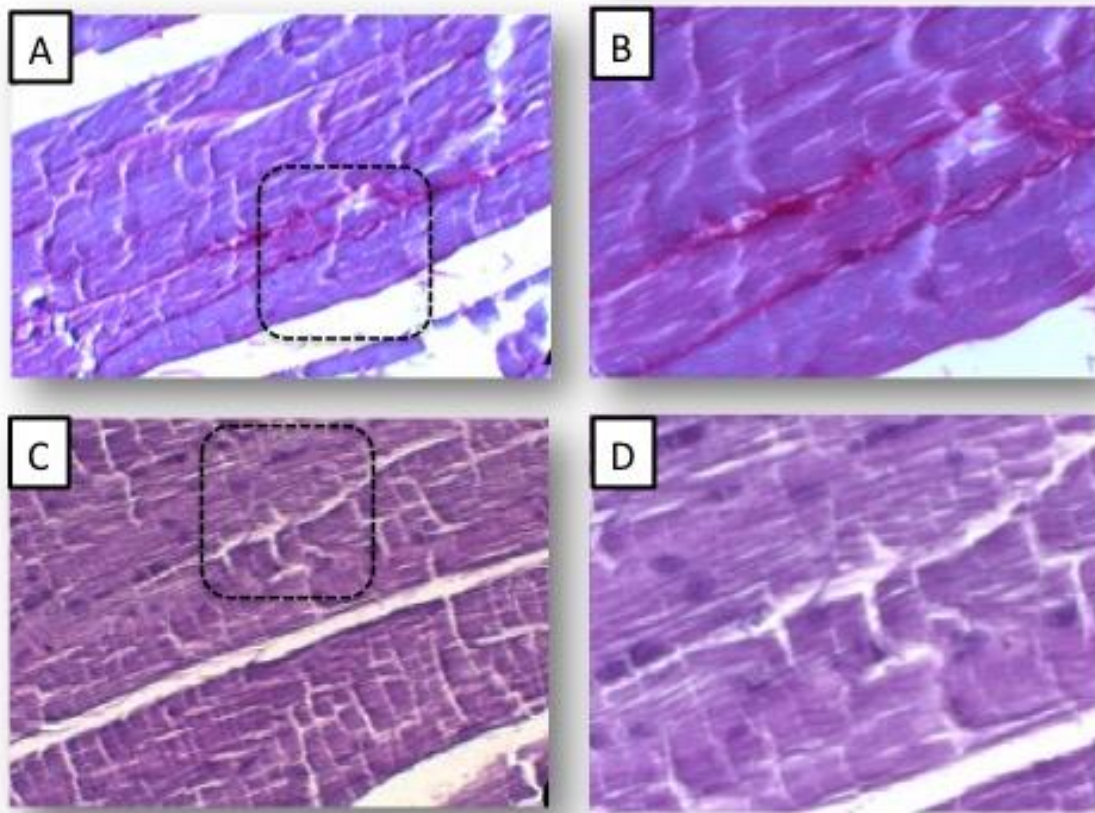


Fig. 10: Fotomicrografias de tecido muscular estriado esquelético. Coloração PicroSirius Red. **Grupo Controle:** Em A) observa-se em destaque pontilhado a área em magnitude representada em B) **Grupo Dieta Hiperlipídica:** em C) observa-se em destaque pontilhado a área em magnitude representada em D. A/C: Objetiva de 20x. B/D: Objetiva de 40x.

Na morfometria do músculo estriado esquelético (quadríceps), a quantificação através da coloração de Hematoxilina/Eosina não apresentou diferença significativa entre os grupos, indicando a discreta perda das proteínas contráteis. As possíveis alterações fisiológicas permanecem indeterminadas. Da mesma forma, a quantificação das fibras colágenas pela coloração PicroSírius Red mostrou não ter diferença significativa entre os grupos.

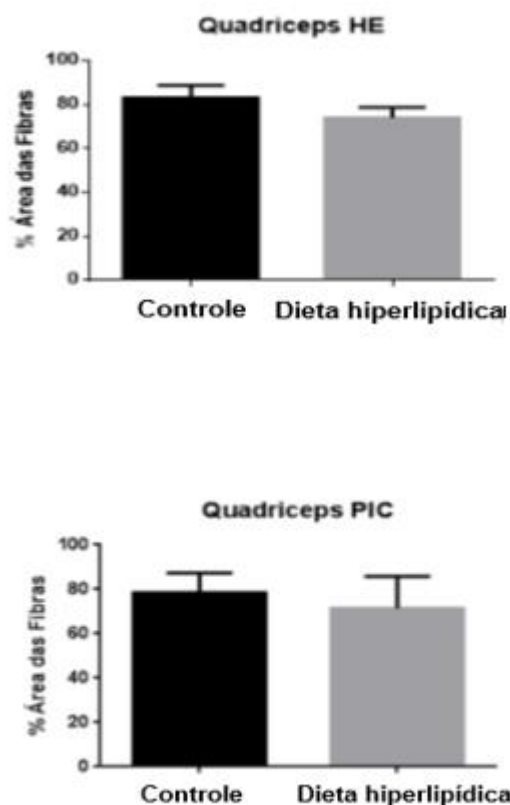


Gráfico 03: Morfometria do tecido muscular estriado esquelético. As colunas representam a área ocupada pelas fibras nos animais controle (Controle) e experimental (Dieta Hiperlipídica). A) Coloração Hematoxilina/Eosina. Os dados foram analisados no teste T não pareado, não houve diferença significativa. $P=0,0530$. B) Coloração PicroSirius Red. Os dados foram analisados no teste T não pareado, não houve diferença significativa. $P=0,4453$.

5.4. IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os resultados abordam a Imunofluorescência, observada em Microscopia Confocal (LSM710, Zeiss, Alemanha), para animais do grupo Controle e Dieta Hiperlipídica. No músculo estriado cardíaco foi imunomarcada a proteína conexina 43 e actina, enquanto que para o músculo estriado esquelético foi realizada a imunomarcagem de actina.

A) MÚSCULO ESTRIADO CARDÍACO

Em animais controle, ou seja alimentados com dieta convencional, pode-se observar uma marcação específica para Conexina 43 (Fig.11-C setas) nas regiões de discos intercalares. Já no grupo submetidos à dieta hiperlipídica, a imunomarcação para Conexina 43 apresenta-se em regiões dispersas (Fig 12-C).

Para a proteína Actina, observa-se uma imunomarcação específica ao longo das fibras tanto para o grupo controle como para o grupo hiperlipídica (Figura 13).

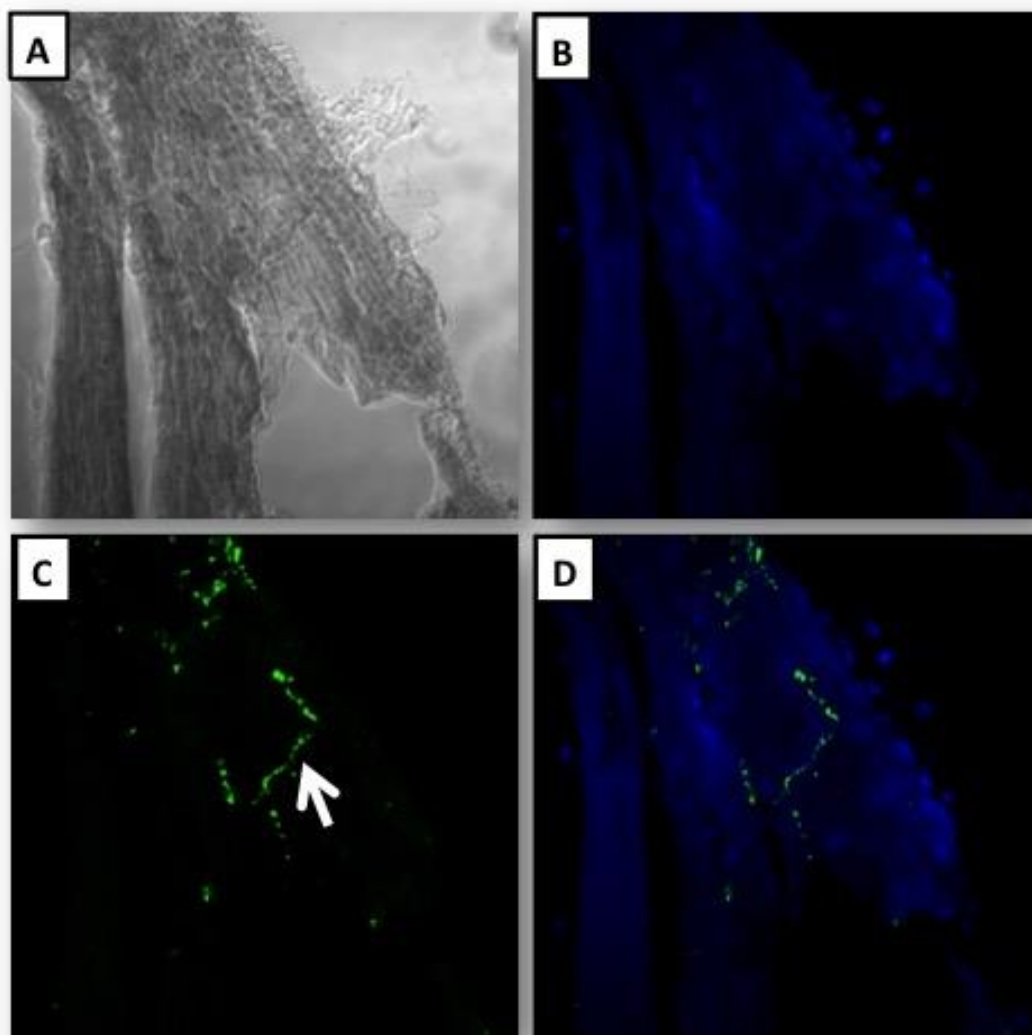


Fig.11: Fotomicrografias da imunofluorescência do tecido estriado cardíaco de animais controle. Imunomarcação para proteína Conexina 43. Podemos

observar a marcação específica para Cx43 (verde) nas regiões de discos intercalares (C) (Setas). Em A podemos observar o campo claro da imagem e em B o núcleo das células marcado com o corante nuclear DAPI (azul). Na micrografia D é demonstrada a sobreposição de imagens B e C. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

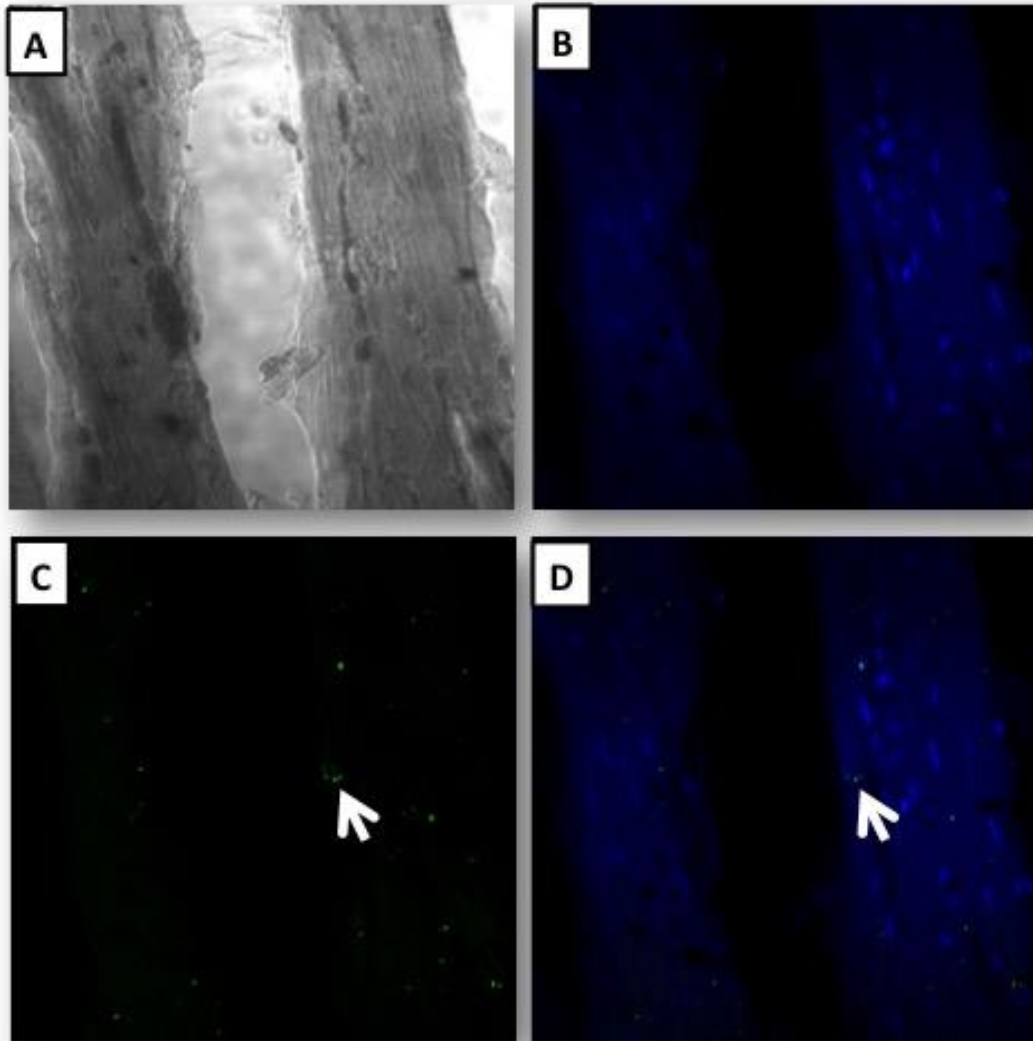


Fig.12: Fotomicrografias da imunofluorescência de tecido estriado cardíaco de animais do grupo Dieta Hiperlipídica. Imunomarcção para proteína Conexina 43. É possível observar a marcação para Cx43 (verde) em regiões dispersas (C) (Setas). Em A podemos observar o campo claro da imagem e em B o núcleo das células marcado com o corante nuclear DAPI (azul). Na fotomicrografia D é demonstrada a sobreposição de imagens B e C. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

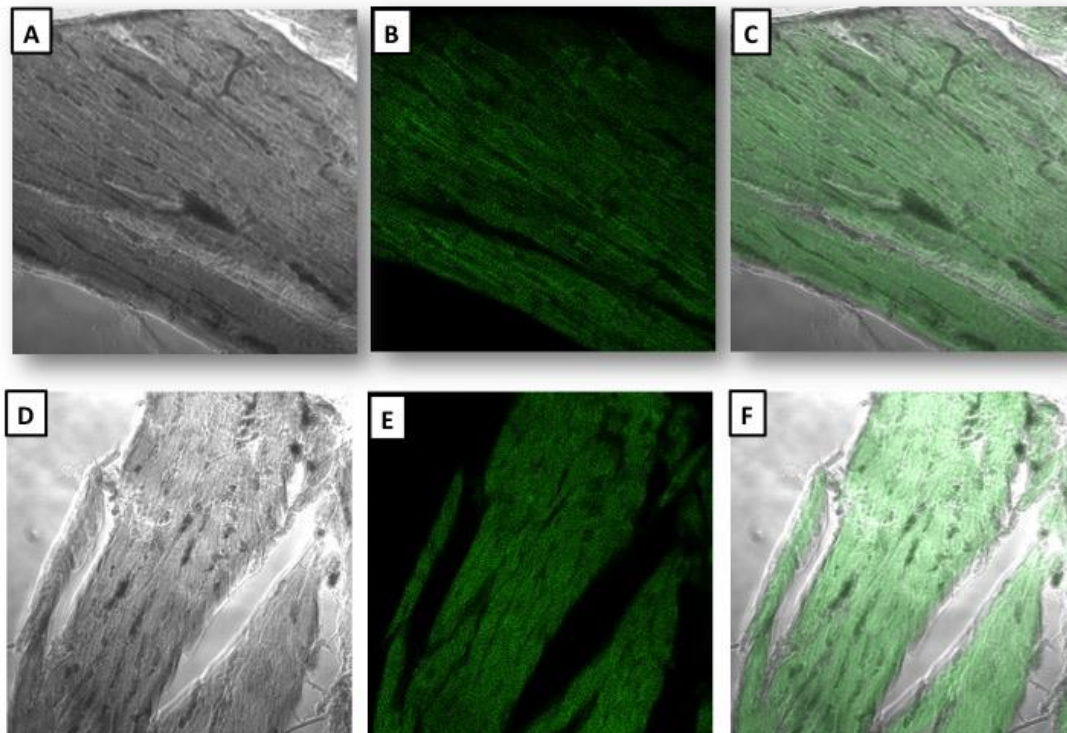


Fig.13: Fotomicrografias de imunofluorescência de tecido muscular estriado cardíaco. Imunomarcção para proteína Actina. **Grupo Controle:** Podemos observar a marcação específica para Actina (verde) ao longo das fibras (B). Em A podemos observar a imagem de campo claro e em C a sobreposição de imagens A e B. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X). **Grupo Dieta Hiperlipídica:** Observa-se a marcação específica para Actina (verde) ao longo das fibras (E), demonstrando um padrão semelhante de marcação em relação aos animais controle. Em D podemos observar a imagem de campo claro e em F a sobreposição de imagens A e B. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

B) MÚSCULO ESTRIADO ESQUELÉTICO (QUADRÍCEPS)

O músculo estriado esquelético escolhido para a biópsia foi o quadríceps direito do animal. A imunomarcagem de actina observada foi específica ao longo das fibras tanto para o grupo controle como para o grupo Dieta Hiperlipídica (Figura 14).

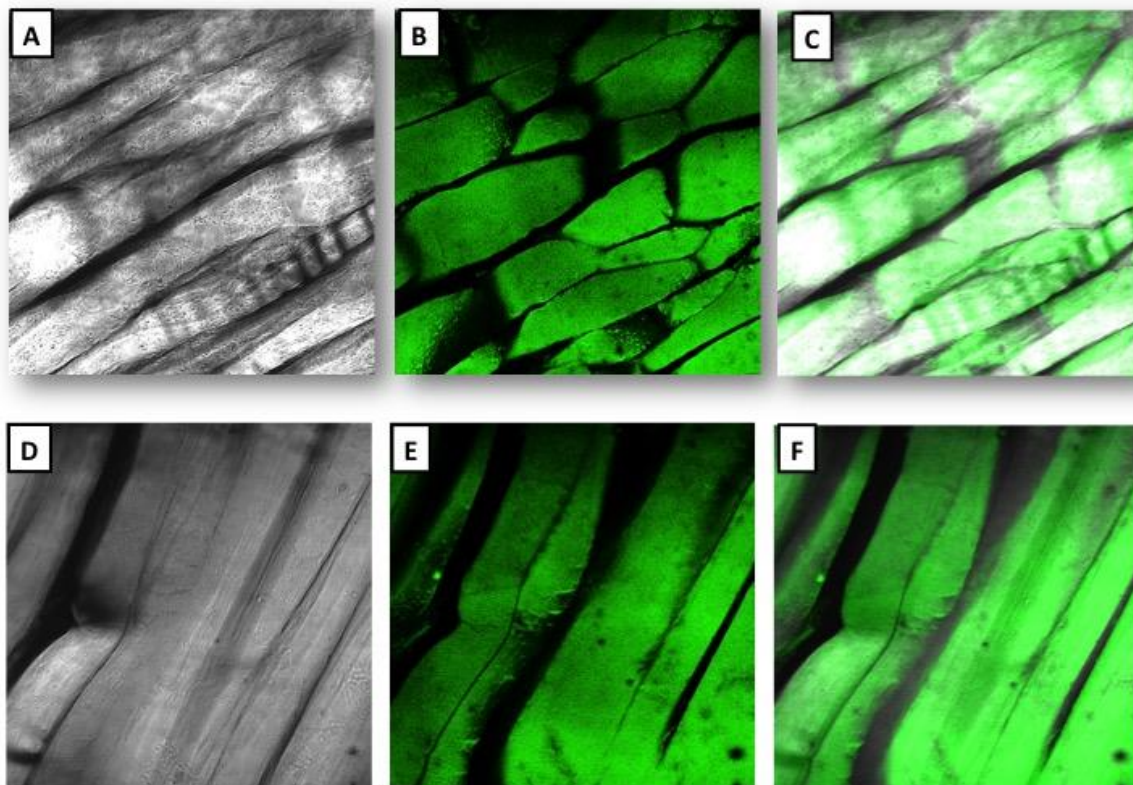


Fig.14: Fotomicrografias de imunofluorescência de tecido muscular estriado esquelético. Imunomarcagem para proteína Actina. **Grupo Controle:** Podemos observar a marcação específica para Actina (verde) ao longo das fibras (B). Em A podemos observar a imagem de campo claro e em D a sobreposição de imagens A e B. **Grupo Dieta Hiperlipídica:** Observa-se a marcação específica para Actina (verde) ao longo das fibras (B), demonstrando um padrão semelhante de marcação em relação aos animais controle. Em A podemos observar a imagem de campo claro e em D a sobreposição de imagens A e B. Aumentos de 400X (Objetiva de 40X).

6. DISCUSSÃO

A escolha do modelo animal deste estudo, ratos Wistar, recai na eficácia do uso de roedores como escolha para ensaios *in vivo* no estudo de obesidade. Normalmente, a dieta a ser submetido o animal, apresenta-se rica em lipídeos, glicídeos ou a combinação de ambos (RENUKA *et al.*, 2014). Entretanto Panchal *et al.*, 2009, apresentam que a dieta hiperlipídica se mostra mais eficaz em estudo de possíveis alterações inflamatórias relacionadas à obesidade quando comparada à dieta hiperglicêmica. Isto devido ao fato de que à obesidade advinda da dieta hiperglicêmica relaciona-se ao acúmulo de gordura central, dito obesidade abdominal ou visceral. Ainda em relação ao mesmo modelo de estudo, pesquisas também foram dedicadas a observação do músculo estriado esquelético, em especial o quadríceps, devido a natureza de fibras mistas (tipo I e II) e ser de fácil remoção pela localização e tamanho do mesmo (TANAKA *et al.*, 2017).

O propósito principal deste trabalho busca avaliar possíveis alterações inflamatórias e morfológicas em músculo estriado esquelético e cardíaco de ratos obesos. Para tal a morfologia e deposição de colágeno foi avaliada e quantificada através da coloração de Hematoxilina e Eosina; e PicroSirius Red respectivamente (Fig. 07,08, 09,10)

Os resultados morfológicos, para o musculo cardíaco, apontam para um aumento da distância entre fibras no grupo de ratos submetidos à Dieta Hiperlipídica) (Fig.07,08) em relação à integridade de fibras do miocárdio observadas no grupo controle (Fig. 07,08).

Koncsos *et al.* (2016), com uso de metodologia similar, apresentaram uma discreta perda no número de cardiomiócitos em animais submetidos à dieta hiperlipídica, bem como acréscimo de tamanho no diâmetro da fibra muscular no ventrículo esquerdo de ratos pré-diabéticos. Ainda como resultados corroborativos aos nossos, os autores relatam fibrose cardíaca, o que pode ratificar a hipertrofia de miocárdio.

Tais achados podem ser ratificados pela fisiopatologia cardíaca da obesidade, que está associada a uma série de adaptações cardíacas e hemodinâmicas, especialmente: o aumento do volume de troca, frequência cardíaca, atividade simpática, bem como o aumento da massa ventricular

esquerda para acomodar todas essas alterações. A maioria dos indivíduos obesos têm sistema ventricular com função hiperdinâmica (VEST & PATEL, 2017). Ainda Abassi *et al.* (2015) apontam que o grau de obesidade central ou visceral está associado proporcionalmente com o aumento da massa ventricular cardíaca e alterações fisiológicas locais.

Em relação ao músculo estriado esquelético (quadríceps direito), a morfometria, através da coloração de Hematoxilina/Eosina (Fig. 09) não apresentou diferença significativa entre os grupos, indicando a discreta perda das proteínas contráteis. Da mesma forma, a quantificação das fibras colágenas pela coloração PicroSírius Red (Fig. 10) mostrou não ter diferença significativa entre os grupos. Sugere-se que não houve diferença entre os grupos para o músculo estriado esquelético como ocorrido no miocárdio, devido a sua alta habilidade de regeneração, sendo um músculo com frequente adaptação plástica. Tal hipótese corrobora com os estudos de Batsis *et al.*, em 2013.

Em contraponto a estes resultados Denis *et al.* (2014) mostraram que em camundongos submetidos a dieta hiperlipídica, houve redução da massa muscular. Os autores sugeriram possibilidade da troca do tipo de fibra devido a obesidade, por falta de contratilidade, porém esse resultado não foi conclusivo para tal afirmação.

Nakanishi & Kato (2014) observaram através da técnica de imuno-histoquímica observou a diminuição da concentração da actina no miocárdio de ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Tal achado foi atribuído a também diminuição da quantidade de cardiomiócitos. Em pesquisa que corrobora com os achados supracitados, Aquinali *et al.* (2014) observaram a perda considerável de actina, juntamente com miosina. Considera a dificuldade de contratilidade devido à sobrecarga cardíaca, como fator responsável por esse estado catabólico. Ainda utilizando a técnica de imuno-histoquímica, foi observado em ratos induzidos ao infarto agudo do miocárdio através de intervenção dietética, a perda considerável de actina associada a diminuição da contratilidade muscular, bem como a redução da área de secção transversal dos cardiomiócitos (CHENG *et al.*, 2011).

Entretanto, estudos realizados por Xiao *et al.* (2013) acharam resultados contrários, onde ratos induzidos ao ganho de peso apresentaram hipertrofia

cardíaca considerável, mas o padrão de apresentação da actina permaneceu inalterado.

Korkmaz-Icoz *et al.* (2016) também observaram no presente estudo, alterações quantitativas em miosina e actina no músculo cardíaco, todavia notoriamente houve hipertrofia ventricular no grupo de ratos submetidos à dieta hiperlipídica. Essas alterações metabólicas foram associadas também ao aumento do número de cardiomiócitos. Atribui-se a adaptação fisiológica dessa forma devido a presença de inflamação, caracterizada por citocinas e resistência à ação da insulina.

Ainda acerca de observações do padrão muscular cardíaco, torna-se muito importante a observação do padrão de outra proteína fundamental na homeostase local, especialmente em relação a contratilidade do miocárdio. A conexina 43 compõe o conexon, estrutura que interliga as células cardíacas do mesmo sincício, facilitando o transporte de íons entre elas, garantindo a capacidade do coração em se contrair simultaneamente (LILY, 2016).

Susane *et al.* (2014) relatam em seus achados em humanos obesos, que conforme ocorreu o remodelamento cardíaco foi também percebido o prolongamento do ritmo cardíaco e a migração das conexinas para a lateral do miocárdio, fenômeno dito lateralização. Parece que esse fato se associa a tentativa de se manter a homeostase dos batimentos. Observou-se também o restabelecimento do comportamento dessa proteína em caso de perda de peso. Salameh *et al.* (2013) também observaram a lateralização da conexina em pacientes com IMC elevado, porém sem alterações do ritmo do coração.

Todavia, foi observado em estudo que associa técnicas de imuno-histoquímica que a conexina 43 apresentou-se na membrana celular, todavia ocorreu a diminuição da condução via junções gap, esse fato foi associado a presença de fibrose cardíaca local (AXELSEN, *et al.*, 2015). Lin *et al.* (2011) também observaram resultados similares, com padrão de conexina 43 inalterado, porém com alterações eletrofísicas e com prejuízos no ritmo cardíaco.

Szczseny *et al.* (2013) observaram através de técnica de imuno-histoquímica realizada em biópsia do músculo quadríceps de humano com IMC > 40, que os sarcômeros apresentavam-se alterados em relação ao grupo de eutróficos, as alterações ocorreram em especial nos filamentos de actina, que se apresentaram ainda mais finos.

Stuart *et al.* (2013), em análise de biópsia do músculo vasto lateral de humanos com IMC elevado, encontraram diferença significativa no diâmetro das fibras, não obstante o tipo (I ou II), ou mesmo em relação ao gênero. No entanto, notou-se uma alteração na posição do sarcômero, em especial da actina e miosina e uma considerável diminuição da força de contração local, que nesse caso, atribuiu-se a diminuição dos receptores de insulina.

Contudo em outra pesquisa também realizada com biópsia do vasto lateral de humanos com IMC elevado, observou-se na população obesa a diferença não significativa na estrutura das proteínas miofibrilares contráteis. Todavia, percebeu-se através de testes de força, o prejuízo dessa função, atribuindo-se nesse caso, ao acúmulo de lipídio intracelular (SEUNG *et al.*, 2016).

Collins *et al.* (2017) não observaram diferença significativa em ratos obesos quando comparados aos animais controle. A ênfase desse estudo foi a observação da proteínas contráteis miofibrilares, em especial a miosina de cadeia pesada. Atribuiu-se esse resultado à natureza do músculo, pois o solear se caracteriza como predominantemente oxidativo, ou seja composto em sua maioria por fibras aeróbicas, o que representa menor possibilidade de sofrer danos metabólicos.

Em estudo também realizado com ratos submetidos à dieta hiperlipídica por 12 semana, foi percebido a diminuição da força contrátil em muscular. Todavia o peso muscular foi mantido após a intervenção dietética. Também não foram observadas alterações significativas quantitativas, nem qualitativas por imuno-histoquímica de actina e miosina. Atribuindo-se o resultado a alterações na natureza das fibras musculares (ESHIMA *et al.*, 2017).

7. CONCLUSÕES

As conclusões deste trabalho, de acordo com o modelo animal utilizado, foram:

1. Para o músculo cardíaco, a coloração de Hematoxilina/Eosina e PicroSirius Red evidenciaram uma integridade do miocárdio no grupo controle e aumento da distância entre as fibras cardíacas para os animais alimentados com Dieta Hiperlipídica.
2. A imunomarcagem da conexina 43, apresentou-se de forma difusa no miocárdio do grupo experimental, determinando processo inflamatório.
3. A dieta hiperlipídica interfere na morfologia das fibras cardíacas em ratos Wistar, aumentando a distância entre elas.

8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASI AS; HUNDLEY WG; BLUEMKE DA, *et al.* Visceral adiposity and left ventricular remodeling: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2015; 25: 667-76.
- AKHMEDOV D; BERDEAUX R. The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. *Front. Physiol.* 2013; 4: 371.
- ALBERTI, FRCP; ECKEL RH; GRUNDY SM *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome. *Circulation.* 2009; 20: 1640-5.
- ALPERT MA; LAVIE CJ; AGRAWAL H *et al.* Obesity and heart failure: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations and management. *Translational Res.* 2014; 164: 345-56.
- ALPERT MA; OMRAN J; BOSTICK BP. Effects of Obesity on Cardiovascular Hemodynamics, Cardiac Morphology, and Ventricular Function. *Curr Obes Rep.* 2016; 5: 424-34.
- AMANO SU; COHEN JL; VANGALA P, *et al.* Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation *Cell Metab* 2014; 19:162-71.
- AQUILANI R; LA ROVERE MT; BAIARDI P; *et al.* Myofibrillar protein overdegradation in overweight patients with chronic heart failure: the relationship to serum potassium levels. *Nutrition.* 2014. 30 (4); 436-9.
- ARRUDA; AP; HOTAMILISGIL GS. Calcium homeostasis and organelle function in the pathogenesis of obesity and diabetes. *Cell Metab.* 2015; 22: 381-97.
- AXELSEN LN, Calloe K, Braunstein TH. Diet-induced pre-diabetes slows cardiac conductance and promotes arrhythmogenesis. *Cardiovasc Diabetol.* 2015. 14;14-87.
- AZEVEDO P S; POLEGATO FB; MINICUCCI FM; *et al.* Cardiac Remodeling: Concepts, Clinical Impact, Pathophysiological Mechanisms and Pharmacologic Treatment. *Arq Bras Cardiol.* 2016 Jan; 106(1): 62–69.
- BAIRWA SC; RAJAPUROHITAM V; GAN XT; *et al.* Cardiomyocyte antihypertrophic effect of adipose tissue conditioned medium from rats and its abrogation by obesity is mediated by the leptin to adiponectin ratio. *PLoS One.* 2016; 11(1):e0145992.

BATSIS JA; BARRIE LK; MACKENZIE TA; et al. Variation in the prevalence of sarcopenia and sarcopenic obesity in older adults associated with different research definitions: dual-energy X-ray absorptiometry data from the National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2004. J Am Geriatr Soc. 2013; 61: 974-80.

BATSIS JA; MCKENZIE TA; JOHN JD; et al. Sarcopenia, sarcopenic obesity and inflammation: results from the 1999-2004. National Health and Nutrition Examination Survey. Clin Nutr. 2016; 35: 1472-83.

BERDAH, J. Staying fit after fifty. Gynécologie Obstétrique & Fertilité. 2006; 10: 920-6.

BOGACKA I, UKROPCOVA B, MCNEIL MET AL. STRuctural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. J Clin Endocrinol Metab. 2005; 12: 6650-6.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytic Biochem 1976; 72:248-54.

BUETTNER R; PARHOFER KG; WOENCKHAUS M et al. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. J Mol Endocrinol. 2006; 36(3): 485-501.

CALVO MC, Lacerda JT, Colussi CF et al Municipalities Stratification for Health Performance Evaluation. Epidemiol Serv Saude. 2016; 25:767-76.

CARROLL JF; ZENEBE WJ; STRANGE TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. Hypertension. 2006; 48: 65–72.

CAVALERA M; WANG J; NIKOLAOS G. Obesity, metabolic dysfunction and cardiac fibrosis: pathophysiologic pathways, molecular mechanisms and therapeutic opportunities. Transl Res. 2014; 164(4): 323–35.

CHENG Y; LI W; MCELFRISH T A. Changes in myofilament proteins, but not Ca²⁺ regulation, are associated with a high-fat diet-induced improvement in contractile function in heart failure. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Oct; 301(4).

CINDY, L. Fisiologia humana. 5ª Edição. Editora Pearson. 2014.

CLEASBY, M. E; JAMIELSON, P. M; ATHERTON, P. J. Insulin resistance and sarcopenia: mechanistic links between common co-morbidities. *J Endocrinol*, 2016; 2: 67-81.

CLEUTJENS JP, VERLUYTEN MJ, SMITHS JF, *et al.* Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol*. 1995; 147: 325–38.

CLEVA R; ARAUJO VA; BUCHALLA CCO *et al.* Cardiac Remodeling Patterns in Severe Obesity According to Arterial Hypertension Grade. *Obes Surg*. 2017; Oct 23. doi: 10.1007.

COLLINS KH; HART DA; REIMER RA *et al.* High-fat high-sucrose diet leads to dynamic structural and inflammatory alterations in the rat vastus lateralis muscle. *J Orthop Res*. 2016; 34 (12): 2069- 78.

CONCEA. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Diretrizes da Prática da Eutanásia. 2013.

D'SOUZA A; HOWARTH FC, YANNI J, *et al.* Left ventricle structural remodelling in the prediabetic Goto-Kakizaki rat. *Exp Physiol*, 2011; 96: 875–88.

DANTAS H.M.E. A prática da preparação física. 6ª Edição. Editora Roca- Brasil, 2014

DE SIMONE G; DEVEREUX RB; CHINALI M *et al.* Sex differences in obesity-related changes in left ventricular morphology: the Strong Heart Study. *J Hypertension*. 2011; 29(7):143-38.

DRAKE R. L; VOGL W; MITCHELL A *et al.* Gray'S - Anatomia Clínica Para Estudantes. 3ª Edição. Editora Elsevier, 2015.

EBONG A; GOFF DC; RODRIGUES CJ *et al.* Mechanisms of Heart Failure in Obesity. *Obes Res Clin Pract*. 2015; 8: 540-48.

ESHIMA H, TAMURA Y, KAKEHI S *et al.* Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. *Physiol Rep*. 2017.5, 5-7.

ESSOP MF; ANNA CHAN WY; VALLE A; *et al.* Impaired contractile function and mitochondrial respiratory capacity in response to oxygen deprivation in a rat model of pre-diabetes. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009; 197: 289 – 96.

FRANCO R; FONOFF ET; ALVARENGA P *et al.* DBS for Obesity. *Brain Sci*. 2016; 18: p. 6-3.

GOMES A; ALMEIDA RM; BRAILE DM. Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. *Arq Bras Cardiol*. 2010; 94:273- 9.

GONZÁLEZ-MUNIESA P; MÁRTINEZ-GONZÁLEZ MA; HU F *et al*. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*. 2017; 14(9):17034- 55.

GREGOR MF; HOTAMISLIGIL GS. Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 415-45.

GUIDO MC; MARQUES AF; TAVARES ER *et al*. Effects of Diabetes Induction on the Rat Heart: Differences in Oxidative Stress, Inflammatory Cells, and Fibrosis between Subendocardial and Interstitial Myocardial Areas. *Oxid Med Cell Longev*. 2017; 2017:5343972.

GUYTON, A. C ; HALL, J. E. Tratado de Fisiologia Médica. 13ª Edição. Editora Elsevier, 2014.

HALEY M.J ; LAWRENCE CB. Obesity and stroke: Can we translate from rodents to patients? *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2016; 2016:1-15.

HALL, S. Biomecânica básica. 5ª Edição. Editora Guanabara Koogan, 2009.

HANDSCHIN, C; SPIEGELMAN, B. M. The role of exercise and PGC1alpha in inflammation and chronic disease. *Nature*. 2008; 7203: 463- 69.

HARLEY T. Emerging complexities of lipid regulation of potassium channels. *J.Gen Physiol*. 2016; 148(3): 201– 5.

HOTAMISLIGIL GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017; 542: 177-85.

HUA N; TAKAHASHI H; YEE GM *et al*. Influence of muscle fiber type composition on early fat accumulation under high-fat diet challenge. *PLoS One*. 2017; 12(8):e0182430.

IBGE. Pesquisa nacional de Saúde. Acesso e Utilização dos Serviços de Saúde, Acidentes e Violência. Brasil, Grandes Regiões e Unidades de Federação. 2015.

JUNQUEIRA, L C & CARNEIRO, J Histologia básica. 10ª Edição. Editora. Guanabara Koogan, 2013.

KALINKOVICH A; LIVSHITS G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing Res Rev*. 2017; 35: 200-21.

KALVANY R. R; CORRIERI, M; FERRUCCI, L. Age-related and disease-related muscle loss: the effect of diabetes, obesity, and other diseases. *Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2014; 10: 819-29.

KARPE, F; PINNICK, K. E. Biology of upper-body and lower-body adipose tissue — link to whole-body phenotypes. *Nat. Rev. Endocrinol.* 2015; 11: 90-100.

KELLEY KM; SCHMIDT KE; BERG L, *et al.* Comparative endocrinology of the insulin-like growth factor-binding protein. *J Endocrinol.* 2002; 1: 3-18.

KOITABASHI N; KASS D A. Reverse remodeling in heart failure--mechanisms and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cardiol.* 2011; 6:147-57.

KONCSOS G, VARGA ZV, BARANYAI T *et al.* Diastolic dysfunction in prediabetic male rats: Role of mitochondrial oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016; 311(4): 927-43.

KONG P; CHRISTIA P; FRANGIGIANNIS NG. The pathogenesis of cardiac fibrosis. *Cell Mol Sci.* 2014; 71: 549- 74.

KORKMAZ-ICÖZ S; LEHNER A; LI S. Left ventricular pressure-volume measurements and myocardial gene expression profile in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2016. 1; 311- 4.

LAVIE CJ; ARENA R; ALPERT AM *et al.* Management of cardiovascular diseases in patients with obesity. *Nature Reviews Cardiology.* 2017; Jul 27. doi: 10.1038/nrcardio.2017.108

LAVIE CJ; MILANI RV; VENTURA, HO. Effects of obesity and weight changes on cardiac and vascular structure and function: does the clinical impact carry any weight? *JACC Heart Fail.* 2014; 5: 509-11.

LEOPOLDO AS; SUGIZAKI MM; LIMA-LEOPOLDO AP *et al.* Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol.* 2010; 26(8): 423-9.

LETTNER A; RODEN M. Ectopic fat and insulin resistance. *Current Diabetes Reports.* 2008; 8(3):185–91.

LEV-RAN, S; NITZAN U; FENNIG S. Human obesity: an evolutionary approach to understanding our bulging waistline. *Diabetes Metab Res Rev.* 2011; 5: 347-62.

LIN YK, CHEN YC, CHEN JH *et al.* Adipocytes modulate the electrophysiology of atrial myocytes: implications in obesity-induced atrial fibrillation. *Basic Res Cardiol* 2012; 107(5):293 26

LOBATO NS; FILGUEIRA FP; HAGIHARA GN *et al.* Improvement of metabolic parameters and vascular function by metformin obese non-diabetic rats. *Life Sciences*. 2012; 90: 228-35.

MANCUSO P. The role of adipokines in chronic inflammation. *Immuno targets Ther*. 2016; 5: 47-56.

MARTIN SS; QASIM A; REILLY MP. Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52: 1201–10.

MARTINEZ, J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. *Proc. Nutr. Soc*. 2000; 59: 337–45.

MARTY E; LUI Y; SAMUEL A; *et al.* A review of sarcopenia: Enhancing awareness of an increasingly prevalent disease. *Bone*. 2017; 105: 276-86.

MATSAKAS A, *et al.* Investigating mechanisms underpinning the detrimental impact of a high fat diet in the developing and adult hypermuscular myostatin null mouse. *Skelet Muscle*. 2015; 7: 5- 38.

MATSUZAWA Y; SVEDLUND S; AOKI T *et al.* Peripheral endothelial function and cardiovascular events in high-risk patients. *J Am Heart Assoc*. 2013; 25: 2-6.

MCALLISTER EJ; DHURANDHAR NV; KEITH SW *et al.* Ten putative contributors to the obesity epidemic. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2009; 49: 868–913.

MOHAN S. Textbook of pathology. 6^a Edition. Jaypee Brother Medical Publishers. 2010.

MOORE, K. L; DALLEY, A. F; AGUR, A. M. R. Clinically Oriented Anatomy. 7^a Edition; 2014.

MUHAMMAD A. A; RALPH A. D. Pathogenesis of Insulin Resistance in Skeletal Muscle. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 10:19.

NAKANISHI T; KATO S. Impact of diabetes mellitus on myocardial lipid deposition: an autopsy study. *Pathol Res Pract*. 2014 Dec;210(12):1018-25.

NISHIDA K; OTSU K. Inflammation and metabolic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2017; 113: 389-98

NORDESTGAARD BG; PALMER TM; BENN M, *et al.* The effect of elevated body mass index on ischemic heart disease risk: causal estimates from a Mendelian randomisation approach. *PLoS Med*. 2012, v. 9(5): :e1001212.

NOVELLI EL; DINIZ YS; GALHARDI CM *et al.* Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*. 2007; 1:111- 9.

ORIO F; TAFURI D; ASCIONE A, *et al.* Lifestyle changes in the management of adulthood and childhood obesity. *Minerva Endocrinol*. 2016; 41: 509-15.

PANCHAL SK; WONG WY; KAUTER K; *et al.* High-carbohydrate, high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. [Cardiovasc Pharmacol](#). 2011; 57(5): 611-24.

PATEL, V.B; BASU, R; OUDIT, G.Y. Ace2/ang 1-7 axis: a critical regulator of epicardial adipose tissue inflammation and cardiac dysfunction in obesity. *Adipocyte*. 2016; 3: 306-11.

PEDERSEN BK; FEBBRAIO MA. Muscles, exercise and obesity: skeletal muscle as a secretory organ. *Nat Rev Endocrinol*. 2012; 8, :457-65.

PERIASAMY M, HERRERA JL, REIS FCG. Skeletal Muscle Thermogenesis and Its Role in Whole Body Energy Metabolism. *Diabetes Metab J*. 2017; 41(5): 327-36.

PINHO RA, SEPA-KISHI DM, BIKOPOULOS G *et al.* High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. *Free Radic Biol Med*. 2017; 110: 381-89.

POWERS, K.S; HOWLEY, E.T. *Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho*. 2ª Edição, Editora. Manole 2009.

PRODHOMME H; OGNARD J; ROBIN P *et al.* Imaging and identification of brown adipose tissue on CT scan. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2016; 1: 24- 8.

RAMIREZ, A. R; LÓPEZ-ACOSTA O; BARRIOS-MAYA MA *et al.* Cell Death and Heart Failure in Obesity: Role of Uncoupling Proteins *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016; 2016:1-11.

RAO, T.B; KESAVA, V. *Badside Cardiology*. Preventive cardiology. 1st Edition. Jaypee Brothers Medical. 2011.

REEVES, P. G.; ROSOW, K. L. E; LINDLAUF, J. Development and testing of the AIN-93 purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *Journal of Nutrition*. 1993; 123: 1923 -31.

RENUKA P. MUNSHI; SAMIDHA G. JOSHI; BHAGYESHRI N. Development of an experimental diet model in rats to study hyperlipidemia and insulin resistance, markers for coronary heart disease. *Indian J Pharmacol*. 2014; 46(3): 270–6.

ROMIEU I; DOSSUS L; BARQUERA S *et al.* Energy balance and obesity: what are the main drivers? *Cancer Causes Control.* 2017; 28(3): 247-58.

SABIO G; VARGAS-HITOS JA; MARIO J. Role of muscle c-Jun NH2-terminal kinase 1 in obesity-induced insulin resistance. *Molecular and Cellular Biology.* 2010; 1: 106-15.

SACKS H; SYMONDS ME. Anatomical locations of human brown adipose tissue: functional relevance and implications in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* 2013; 62: 1783-90.

SALAMEH A, WUSTMANN A, KARL S, *et al.* Cyclic mechanical stretch induces cardiomyocyte orientation and polarization of the gap junction protein connexin43. *Circ Res* 2013;106(10):1592–1602.

SANTHANAM P; SOLNES L; HANNUKAINEN JC; *ET AL.* ADIPOSITY-RELATED CÂNCER AND FUNCTIONAL IMAGING OF brown adipose tissue. *Endocr Pract.* 2015; 11:1282-90.

SCHIPKE J BANMANN E; NIKAN S *et al.* The number of cardiac myocytes in the hypertrophic and hypotrophic left ventricle of the obese and calorie-restricted mouse heart. *J Anat.* 2014; 225(5): 539-47.

SELLAYAH, D; CAGAMPANG, F. R; COX, R. D. On the evolutionary origins of obesity: a new hypothesis. *Endocrinology.* 2014; 155: 1573–88.

SEUNG J. C; CLARK F, ZHANG T, Intramyocellular Lipid and Impaired Myofiber Contraction in Normal Weight and Obese Older Adults. *J Gerontol A Biol Sci Med.* 2016. 4. 71-4.

SEVEN E; THUESEN BH; LINNEBERG A *et al.* Abdominal adiposity distribution quantified by ultrasound imaging and incident hypertension in a general population. *Hypertension.* 2016; 68 (5): 1-8

SHI A; TAO Z; WEI P *et al.* Epidemiological aspects of heart diseases. *Experimental and therapeutic medicine,* 2016; 12: 1645- 50.

SINITSKAYA N; GOURMELEN S; SCHUSTER-KLEIN C *et al.* Increasing the fat-to-carbohydrate ratio in a high-fat diet prevents the development of obesity byt not a prediabetic state in rats. *Clinical Science.* 2007; 113: 417- 25.

SOBOTTA, J; PAULSEN, F; WASCHKE, J. Sobotta: Atlas de Anatomia Humana. Editora Guanabara Koogan; 25^a Edição. 2009.

STUART CA, MCCURRY MP, MARINO A Slow-twitch fiber proportion in skeletal muscle correlates with insulin responsiveness. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 ;98(5):2027-36

SUN K; TORDJMAN J; CLÉMENT K, *et al.* Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab.* 2013; 18(4): 470-7.

SUSANNE R, ANDREA B, HARTMUTH B. Body Mass Index Affects Connexin43 Remodeling in Patients with Atrial Fibrillation *Thorac Cardiovasc Surg* 2014;62:547–553.

SZCZESNY W; BODNAR M; DABROWIECKI S Histologic and immunohistochemical studies of rectus sheath in obese patients. *J Surg Res.* 2013;180(2):260-5

TANAKA SM; YOROZUYA Y; TAKATSU D Random electromyostimulation promotes osteogenesis and the mechanical properties of rat bones. [Ann Biomed Eng.](#) 2017 Dec;45(12):2837-2846.

TERNACLE J; WAN F, SAWAKI D, *et al.* Short-term high-fat diet compromises myocardial function: a radial strain rate imaging study. *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 2017; 6: 10.1093.

TIRZIU D; GIORDANO FJ; SIMONS M. Circulation. Cell communications in the heart. *Circulation.* 2010; .9:928-37.

TOUATI, S, MONTEZANO AC, MEZIRI F *et al.* Exercise reverses metabolic syndrome in high-fat diet-induced obese rats. *Medicine & Science in Sports & Exercise.* 2011; 30: 398-407

VASSALO D V; LIMA E G. Contratilidade miocárdica, aspectos básicos e clínicos. Editora BYK, 1º edição. 1993.

VEERANKI S; GIVVIMANI S, KUNDU S *et al.* Moderate intensity exercise prevents diabetic cardiomyopathy associated contractile dysfunction through restoration of mitochondrial function and connexin 43 levels in db/db mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2016; 92: 163-73.

VEST AR, PATEL AR. The heavy heart: metabolic mechanisms and myocardial mechanisms. 2017 May;10(5). pii: e00409.

Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL). Relatório Brasil- Fevereiro- Dezembro- 2016. Ministério da Saúde. Governo Federal do Brasil, 2016.

VIVODTZEV I; MONCHARMONT L; TAMISIER R *et al.* Quadriceps muscle fat infiltration is associated with cardiometabolic risk in COPD. Clin Physiol Funct Imaging. 2017; 3: 100- 111.

WANG YC; MCPHERSON K; MARSH T, *et al.* Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK, 2011; 378(9793); 815-25.

WATTS R; MCAINCH AJ; DIXON JB, *et al.* Increased Smad signaling and reduced MRF expression in skeletal muscle from obese subjects. Obesity 2013; 21(3): 525–8.

World Health Organization. Fact sheet October. 2017.

World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. World Health Organ Tech Rep Ser. 2000; 894: 1-253.

World Health Organization. Waist Circumference and Waist-Hip Ratio Report of a WHO Expert Consultation Geneva, 2008; 8-11.

World Health Organization. World Health Statistics 2016: Monitoring health for the SDGs. 2016

XIAO H; TRACEY G; GANJIAN Z *et al.* Identification of fat mass and obesity associated (fto) protein expression in cardiomyocytes: regulation by leptin and its contribution to leptin-induced hypertrophy. Published online 2013 Sep 3. doi: 10.1371/journal.pone.0074235.

ANEXOS

Anexo 01: Aprovação da CEUA- UFRJ (Projeto Central)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 13 de setembro de 2016

Prezado Professor Adalberto Vieyra

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sobre o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **“Obesidade associada à hipertensão arterial - avaliação dos mecanismos moleculares que levam à maior reabsorção renal de sódio.”, protocolo nº 101/16**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **16/08/2016**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 13/09/2020
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i>/ Wistar
Nº de animais	89 animais
Peso/idade	350-600g / 125 dias
Sexo	machos
Origem	Biotério de Doenças Negligenciadas e Desnutrição- CCS- Bloco G, sala 049 - UFRJ

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

Decania do CCS: Av. Carlos Chagas Filho, 373 Prédio do Centro de Ciências da Saúde, Bloco K, 2º andar -
Cidade Universitária - CEP 21941-590 – Rio de Janeiro – Brasil
Tel: (21) 2562.6705 - Fax: (21) 2270.1749 - www.ccsdecania.ufrj.br

Anexo 02: Carta CEUA- UFRJ, especificando que os animais do Projeto Central serão utilizados nestes estudo.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 19/09/2016

O subprojeto "Obesidade x lesão muscular: possíveis alterações inflamatórias e morfológicas em músculo estriado esquelético e cardíaco de ratos obesos adultos e idosos" da aluna Lorena Cristina Ribeiro da Rosa faz parte do projeto: "Obesidade associada à hipertensão arterial - avaliação dos mecanismos moleculares que levam à maior absorção renal de sódio" que foi aprovado pela CEUA/CCS com o protocolo 101-2016.

Atenciosamente,

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador CEUA/CCS

Anexo 03: Protocolos de Histologia: Hematoxilina & Eosina

1. Escopo: Os cortes histológicos, na maioria dos casos, são corados para permitir sua observação ao microscópio. Uma das técnicas de coloração mais utilizadas é a que reúne dois corantes, a hematoxilina e eosina, e a mistura é denominada H&E ou H/E. Os cortes são corados inicialmente com hematoxilina e, posteriormente, com eosina, corantes não vitais. A hematoxilina é um corante ácido, enquanto a eosina é um corante básico. Nessa coloração, os núcleos são corados pela hematoxilina, evidenciado em roxo, enquanto o citoplasma e os espaços intercelulares são corados pela eosina, sendo visualizado em rosa.

2. Princípios do Método e Especificações: Após processamento e inclusão dos tecidos em parafina, as lâminas são montadas com fatias dos blocos para, então, dar-se início ao processo de coloração. Cortes em criostato também podem ser corados, mas devem ser respeitados protocolos específicos de fixação, crioproteção e emblocamento.

3. Estabilidade e Armazenamento dos Reagentes: Reagentes armazenados a temperatura ambiente. Devem ser abertos para uso dentro da capela de exaustão, pois são voláteis e tóxicos.

4. Procedimentos Técnicos para Coloração: Após o tecido ser fixado, processado, emblocado e cortado em micrótomo (5 µm), as cestas contendo as lâminas devem ser colocadas na estufa por cerca de 1 hora, para retirada da parafina. Ao fim do período, inicia-se o processo de coloração, com as citadas lâminas imersas nas específicas banheiras com os diferentes reagentes, gerais e específicos de cada coloração.

5. Corantes

5.1 Corante Hematoxilina de Harris

Reagentes (para 1 L):

- Hematoxilina – 5 g
- Álcool Etílico Absoluto (100%) – 50 ml
- Sulfato de alumínio e amônio ou alúmen de potássio – 100 mg

- Óxido de mercúrio vermelho – 2,5 g
- Água destilada – para completar 1 L

Procedimentos:

1. Dissolver a hematoxilina no álcool e o alúmem em metade da quantidade de água (água quente, de 70 a 80°C);
2. Misturar as soluções;
3. Levar a solução e uma fonte de calor até atingir fervura;
4. Retirar da fonte de calor e adicionar o óxido de mercúrio;
5. Aquecer novamente a solução até ficar vermelho escuro;
6. Deixar no aquecimento por mais 1 minuto e retirar da fonte de calor;
7. Deixar esfriar em água fria ou geladeira;
8. Filtrar a solução e armazenar em recipiente âmbar (se for frasco claro, envolvê-lo no papel alumínio);
9. Dissolver a hematoxilina no álcool e o alúmem em metade da quantidade de água (água quente, de 70 a 80°C);
10. Misturar as soluções;
11. Levar a solução e uma fonte de calor até atingir fervura;
12. Retirar da fonte de calor e adicionar o óxido de mercúrio;
13. Aquecer novamente a solução até ficar vermelho escuro;
14. Deixar no aquecimento por mais 1 minuto e retirar da fonte de calor;
15. Deixar esfriar em água fria ou geladeira;
16. Filtrar a solução e armazenar em recipiente âmbar (se for frasco claro, envolvê-lo no papel alumínio).

5.3. Corante Eosina

Reagentes para **1 L** de eosina:

- Eosina amarela – 5 g
- Água destilada – 100 ml
- Álcool 95% – 900 ml
- Gotas de ácido acético

Procedimentos:

1. Dissolver a eosina em água destilada e depois juntar com o álcool 95%;
2. Adicionar o ácido acético na hora do uso (1 gota para cada 100

6. Coloração H&E (com Hematoxilina de Harris)

1. Xilol I – 2 minutos
2. Xilol II – 2 minutos
3. Xilol III – 2 minutos
4. Álcool Absoluto (Álcool 100%) – 2 minutos
5. Álcool 90% - 2 minutos
6. Álcool 80% - 2 minutos
7. Álcool 70% - 2 minutos
8. Água destilada – 2 minutos
9. Hematoxilina – de 2 a 10 minutos, dependendo da idade do corante
10. Diferenciação em álcool clorídrico 1% - 1 mergulho
11. Água corrente – 5 minutos
12. Eosina – 10 minutos
13. Água destilada – 1 mergulho
14. Álcool 70% - 2 minutos Álcool 80% - 2 minutos
15. Álcool 90% - 2 minutos
16. Álcool 100% - 2 minutos
17. Xilol I – 2 minutos
18. Xilol II – 2 minutos
19. Xilol III – 2 minutos
20. Xilol IV – 2 minutos
21. Cobrir o corte com Entellan (cerca de 100 µl) para colocação da lamínula
22. Deixar secar por, pelo menos, 2 horas

OBS: Dependendo do tecido a ser corado, o tempo de reação em cada um dos corantes pode variar.

Anexo 04: Protocolos de Histologia: PicroSirius Red

1. Escopo: Os cortes histológicos, na maioria dos casos, são corados para permitir sua observação ao microscópio. Para coloração Picrosirius red teremos, além da hematoxilina corando núcleos (estruturas ácidas), a melhor caracterização de fibras de colágeno.

Segundo Lemos, em 2010, na coloração Picrosirius red há afinidade de grupos catiônicos das proteínas pelos grupos aniônicos reativos do corante Sirius red. As moléculas do corante se dispõem paralelamente às moléculas de colágeno, que apresentam birrefringência, assumindo cores que variam desde o verde até o amarelo, conforme o grau de maturação dessas fibras. As diferentes birrefringências podem ser observadas em microscópio óptico de luz polarizada. As fibras de colágeno I (maduro) se apresentam espessas, fortemente birrefringentes, de tonalidade avermelhada; colágeno III é representado por fibras finas, fracamente birrefringentes, amarelo-esverdeadas.

2. Princípios do Método e Especificações: Após processamento e inclusão dos tecidos em parafina, as lâminas são montadas com fatias dos blocos para, então, dar-se início o processo de coloração.

3. Estabilidade e Armazenamento dos Reagentes: Reagentes armazenados a temperatura ambiente. Devem ser abertos para uso dentro da capela de exaustão, pois são voláteis e tóxicos. Caso ocorra manipulação de ácido pícrico em pó é preciso cuidado. Sua manipulação e armazenamento devem seguir orientações do Setor de Biossegurança local (Bloco K, CCS).

4. Procedimentos Técnicos para Coloração: Após o tecido de interesse ser fixado, processado, emblocado e cortado em micrótomo (5 µm), as cestas contendo as lâminas devem ser colocadas na estufa por cerca de 1 hora, para retirada da parafina. Ao fim do período, inicia-se o processo de coloração, com as citadas lâminas imersas nas específicas banheiras com os diferentes reagentes, gerais e específicos de cada coloração.

5. Corantes

5.1 Hematoxilina de Mayer

Como preparar a solução de hematoxilina de Mayer:

Reagentes (para 1 L):

- Hematoxilina – 1 g
- Água destilada – 1 L
- Sulfato de e amônio ou alúmen de potássio – 50 g
- Ácido cítrico – 1 g
- Hidrato de cloral – 50 g
- Iodato de sódio – 0,2 g

Procedimentos:

A hematoxilina o alúmen de amônio ou potássio são dissolvidos em água destilada. O hidrato de cloral e o ácido cítrico são adicionados e a mistura fervida por 5 minutos, esfriada e filtrada. A solução corante está pronta para uso imediato.

A solução deve ser filtrada todas as vezes que for utilizada.

5.2 Sirius red

Para 100 mL de solução:

- Sirius red – 0,1 g
- Solução saturada de ácido pícrico – 100 ml

Procedimentos:

3. Misturar com ajuda de placa agitadora;
4. Se possível, misturar e colocar um pouco de ácido pícrico (em pó), para que apareça um precipitado no fundo do frasco.

OBS: Solução saturada de ácido pícrico: solução aquosa de ácido pícrico na concentração de 1,4%.

6. Coloração Picrosirius red

1. Xilol I – 2 minutos
2. Xilol II – 2 minutos

3. Xilol III – 2 minutos
4. Álcool Absoluto (Álcool 100%) – 2 minutos
5. Álcool 90% - 2 minutos
6. Álcool 80% - 2 minutos
7. Álcool 70% - 2 minutos
8. Água destilada – 2 minutos
9. Sirius red 0,1% – 1 hora, temperatura ambiente
10. Solução aquosa de ácido acético a 1% - 30 minutos
11. Água destilada – mergulhar por 10 segundos, 3 vezes
12. Hematoxilina – 5 a 10 minutos
13. Diferenciação em ácido clorídrico a 1%, em álcool 70% - alguns segundos
14. Examinar a coloração dos núcleos no microscópio e, se estiverem claros, retornar as lâminas para a hematoxilina, repetindo o procedimento
15. Água corrente – 10 minutos
16. Álcool 70% - 2 minutos
17. Álcool 80% - 2 minutos
18. Álcool 90% - 2 minutos
19. Álcool 100% - 2 minutos
20. Xilol I – 2 minutos
21. Xilol II – 2 minutos
22. Xilol III – 2 minutos
23. Xilol IV – 2 minutos
24. Cobrir o corte com Entellan (cerca de 100 µl) para colocação da lamínula
25. Deixar secar por, pelo menos, 2 horas

OBS: Dependendo do tecido a ser corado, o tempo de reação em cada um dos corantes pode variar