

Obesidade não Acarreta Desequilíbrio entre Fosforilação e Desfosforilação da Fosfolambam Miocárdica

Obesity does not Lead to Imbalance Between Myocardial Phospholamban Phosphorylation and Dephosphorylation

Paula Paccielli Freire¹; Carlos Augusto Barnabe Alves¹; Adriana Fernandes de Deus¹; Ana Paula Lima Leopoldo²; André Soares Leopoldo²; Danielle Cristina Tomaz da Silva¹; Loretta Casquel de Tomasi¹; Dijon Henrique Salomé Campos¹; Antônio Carlos Cicogna¹

Departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista¹, Botucatu, SP; Centro de Educação Física e Desportos - Universidade Federal do Espírito Santo², Vitória, ES - Brasil

Resumo

Fundamento: A ativação do sistema beta-adrenérgico promove a estimulação da proteína G, que, via adenosina monofosfato cíclico (AMPC), altera a estrutura da proteína quinase A (PKA) e acarreta a fosforilação da fosfolambam (PLB). Essa proteína participa do sistema envolvido no controle de cálcio intracelular, em células musculares, sendo a principal reguladora da atividade da bomba de cálcio do retículo sarcoplasmático. Na obesidade ocorre ativação do sistema beta-adrenérgico por influência do aumento da leptina, acarretando, conseqüentemente, maior fosforilação da fosfolambam miocárdica, via AMPC-PKA.

Objetivo: Investigar, na obesidade, o envolvimento das proteínas que regulam o grau de fosforilação do PLB decorrente da ativação beta-adrenérgica. A hipótese do estudo é que há desequilíbrio entre a fosforilação e a desfosforilação da fosfolambam, com predomínio da fosforilação da proteína.

Métodos: Ratos Wistar machos foram randomizados e distribuídos em dois grupos: controle (n = 14), alimentado com dieta normocalórica, e obeso (n = 13), com um ciclo de quatro dietas hiperlipídicas insaturadas. A obesidade foi determinada pelo índice de adiposidade, e as expressões proteicas de fosfatase 1 (PP-1), PKA, PLB, fosfolambam fosforilado na serina 16 (pPLB-ser16) foram realizadas por Western Blot.

Resultados: A obesidade acarretou intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, hiperleptinemia e não alterou a expressão proteica de PKA, PP-1, PLB, pPLB-ser16.

Conclusão: A obesidade não promove desequilíbrio entre a fosforilação e a desfosforilação, via beta-adrenérgica, do PLB miocárdico. (Arq Bras Cardiol. 2014; 103(1):41-50)

Palavras-chave: Obesidade; Fosforilação; Ratos; Leptina; Adiposidade.

Abstract

Background: The activation of the beta-adrenergic system promotes G protein stimulation that, via cyclic adenosine monophosphate (cAMP), alters the structure of protein kinase A (PKA) and leads to phospholamban (PLB) phosphorylation. This protein participates in the system that controls intracellular calcium in muscle cells, and it is the primary regulator of sarcoplasmic reticulum calcium pump activity. In obesity, the beta-adrenergic system is activated by the influence of increased leptin, therefore, resulting in higher myocardial phospholamban phosphorylation via cAMP-PKA.

Objective: To investigate the involvement of proteins which regulate the degree of PLB phosphorylation due to beta-adrenergic activation in obesity. In the present study, we hypothesized that there is an imbalance between phospholamban phosphorylation and dephosphorylation, with prevalence of protein phosphorylation.

Methods: Male Wistar rats were randomly distributed into two groups: control (n = 14), fed with normocaloric diet; and obese (n = 13), fed with a cycle of four unsaturated high-fat diets. Obesity was determined by the adiposity index, and protein expressions of phosphatase 1 (PP-1), PKA, PLB, phosphorylated phospholamban at serine16 (PPLB-Ser16) were assessed by Western blot.

Results: Obesity caused glucose intolerance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia, hyperleptinemia and did not alter the protein expression of PKA, PP-1, PLB, PPLB-Ser16.

Conclusion: Obesity does not promote an imbalance between myocardial PLB phosphorylation and dephosphorylation of via beta-adrenergic system. (Arq Bras Cardiol. 2014; 103(1):41-50)

Keywords: Obesity; Phosphorylation; Rats; Leptin; Adiposity.

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

Correspondência: Paula Paccielli Freire •

Rua Joaquim Francisco de Barros, Bairro Alto, CEP 18600-380, Botucatu, SP - Brasil

E-mail: freirepp@hotmail.com; freirepp2@gmail.com

Artigo recebido em 26/11/2013; revisado em 27/1/2014; aceito em 18/2/2014.

DOI: 10.5935/abc.20140083

Introdução

O sistema beta-adrenérgico (SBA) modula o desempenho cardíaco via receptor beta, proteína G, adenilciclase e adenosina monofosfato cíclico (AMPc). A AMPc altera a proteína quinase A (PKA), liberando a subunidade catalítica, ativando a fosforilação de proteínas miocárdicas^{1,2} envolvidas no trânsito de cálcio (Ca^{2+}) - Figura 1.

A fosfolambam (PLB) participa do controle do cálcio intracelular miocárdico; é a proteína reguladora da atividade da bomba de Ca^{2+} do retículo sarcoplasmático (SERCA2a)^{1,3-5}. o PLB desfosforilado forma o complexo PLB-SERCA2a, que, inibindo a bomba, não permite transferência de Ca^{2+} citosólico para o retículo sarcoplasmático; a fosforilação desacopla o complexo PLB-SERCA2a, aumentando a recaptura do cálcio pela SERCA2a³.

A ligação PLB-SERCA2a é controlada por ciclos de fosforilação e desfosforilação, por ação da PKA e fosfatase 1 (PP-1), respectivamente. O predomínio da fosforilação do PLB, sítio da serina 16, ocorre com a ativação da PKA. Simultaneamente, a PKA fosforila a proteína inibitória 1 (I-1), formando o complexo I-1/PP-1, impedindo a desfosforilação do PLB pela PP-1.

Há predomínio da desfosforilação quando a PKA é desativada, não havendo fosforilação do PLB e da I-1; a não adição do fosfato na I-1 impede a formação do I-1/PP-1, permitindo que a PP-1, em estado ativo, possa desfosforilar o PLB⁶⁻⁸ (Figura 2).

A obesidade — excesso de tecido adiposo em relação à massa magra⁹ — produz adipocinas que interferem em processos biológicos, incluindo ativação do SBA pela leptina^{4,10}. A estimulação do SBA fosforila o PLB miocárdico via AMPc-PKA. Não há estudos que tenham analisado o balanço entre a fosforilação e a desfosforilação do PLB via SBA na obesidade. Relling e cols.¹¹, utilizando ratos obesos por 12 semanas, mostraram aumento da expressão do PLB e diminuição de PLB fosforilado (pPLB). Lima-Leopoldo¹² verificou diminuição do pPLB via AMPc na serina 16 em ratos obesos durante 15 semanas. Esses autores não avaliaram as proteínas quinase e fosfatase nos animais.

A inexistência de trabalhos analisando a ativação e a desativação do PLB na obesidade induziu a investigação do envolvimento das proteínas reguladoras da fosforilação do PLB via SBA. A hipótese deste estudo é que a obesidade promove desbalanço entre fosforilação e desfosforilação da fosfolambam, com predomínio da fosforilação.

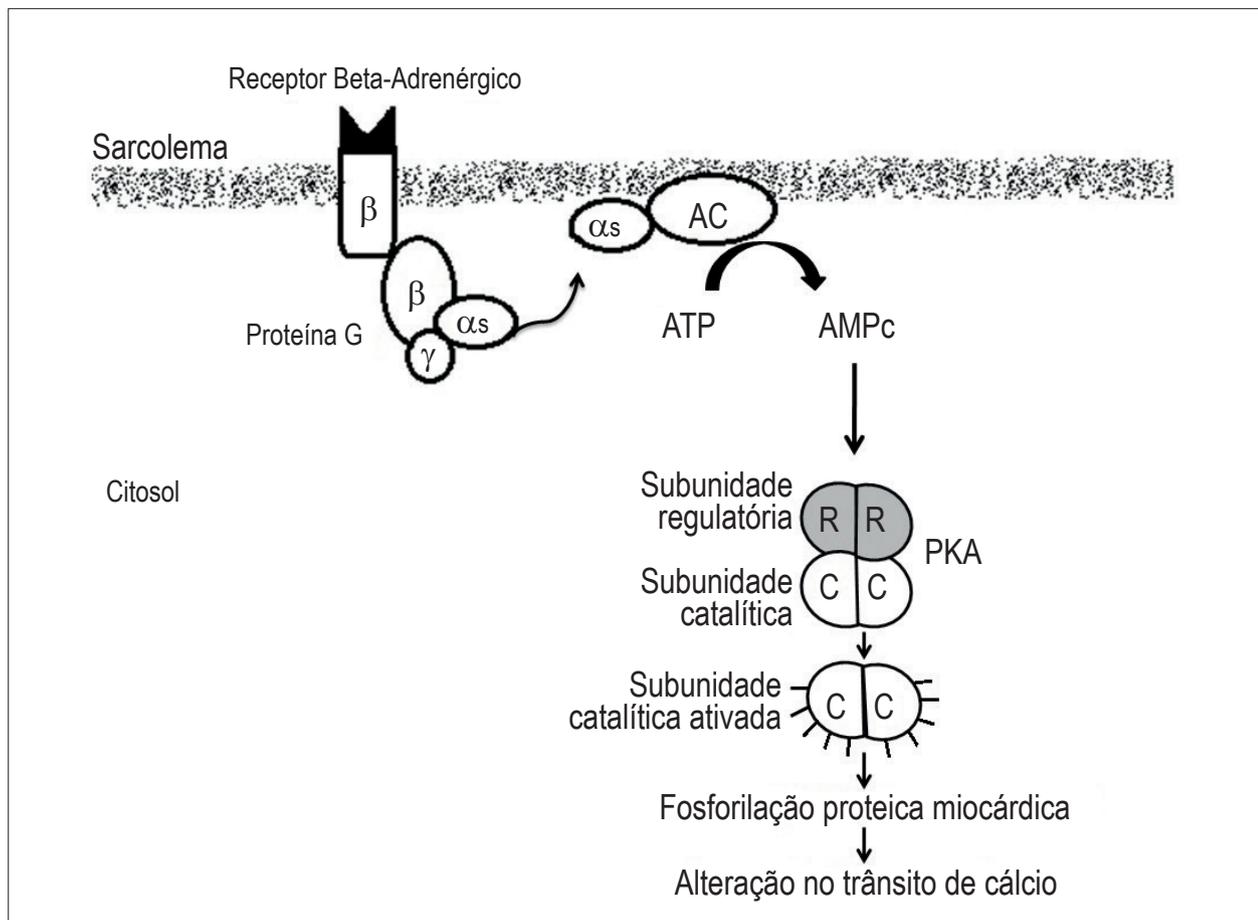


Figura 1 – A ativação do sistema beta-adrenérgico, por meio do receptor beta, acarreta estimulação da proteína G que, via subunidade alfa, aciona AC, promovendo a transformação de ATP em AMPc. Esta altera a conformação da PKA liberando e estimulando a subunidade catalítica da PKA, que desencadeia fosforilação de diferentes proteínas envolvidas no trânsito de cálcio. AC: adenilciclase; AMPc: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina; ATP: adenosina trifosfato; PKA: proteína quinase A.

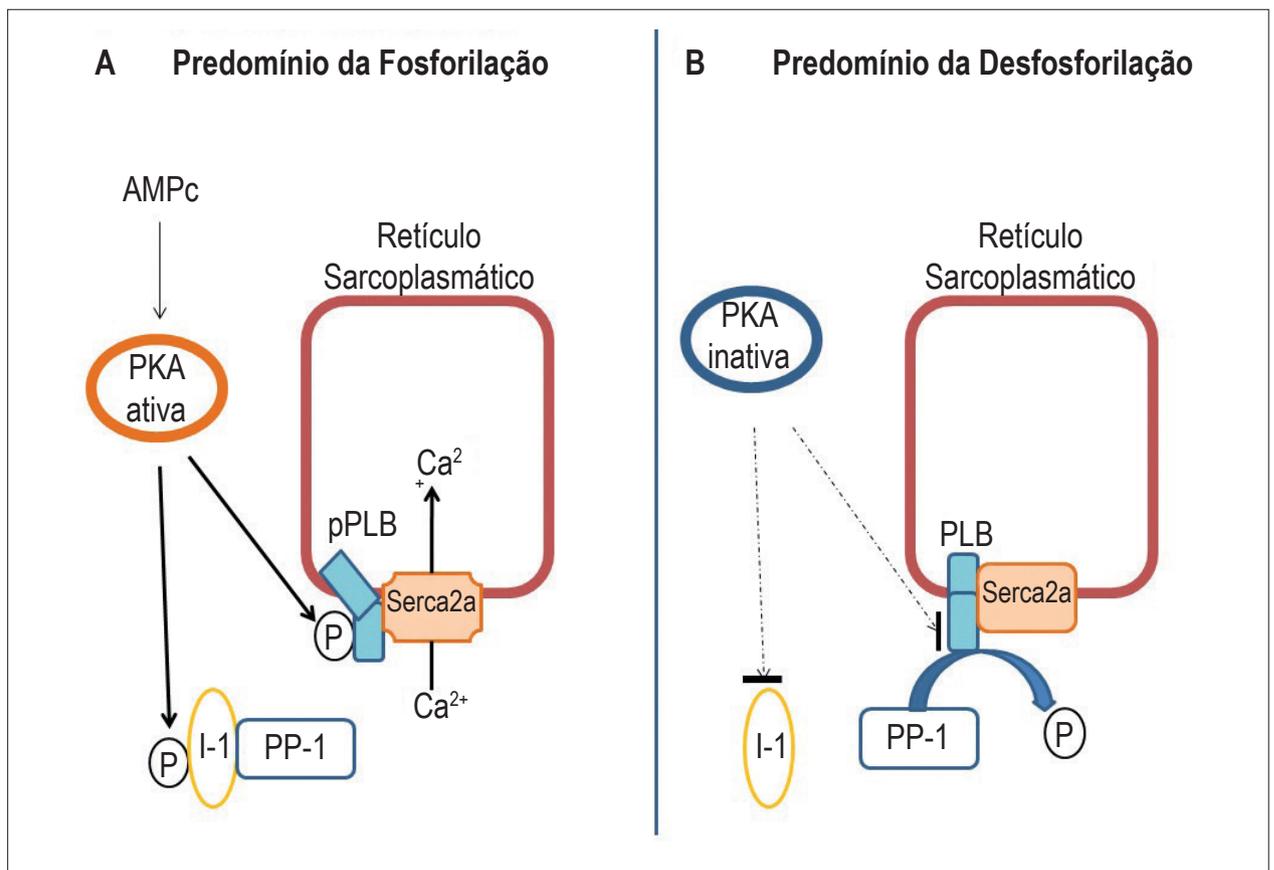


Figura 2 - A. O predomínio da fosforilação ocorre quando a PKA é ativada, ao mesmo tempo em que fosforila a I-1, impedindo a desfosforilação do PLB. **B.** O predomínio da desfosforilação ocorre quando a PKA não está ativada. Não há a fosforilação do PLB e da I-1, mantendo PP-1 em seu estado ativo. AMPc: 3',5' monofosfato cíclico de adenosina; I-1: proteína inibitória 1; P: fosfato; PKA: proteína quinase A; pPLB: fosfolambam fosforilado; PLB: fosfolambam desfosforilado; PP-1: fosfatase-1; Serca2a: bomba de Ca²⁺.

Métodos

Animais e protocolo experimental

Foram utilizados 27 ratos Wistar machos, com 30 dias de idade, provenientes do Biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Botucatu (SP) - Unesp, mantidos nas seguintes condições: gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado forradas com maravalha de pínus esterilizada; temperatura ambiente de 24°C e ciclos de iluminação de 12 horas. Todos os procedimentos foram realizados em acordo com o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*¹³ e foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Botucatu (Unesp, Botucatu), protocolo número 765.

Os animais foram randomizados em dois grupos: controle (C) e obeso (Ob). Os animais C (n = 14) receberam dieta normocalórica RC Focus 1765, Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil (22% de proteína, 42,7% de carboidrato, 4% de gordura, 9% de minerais, 8% de fibras, 12% de umidade, 1,5% de cálcio, 0,8% de fósforo), e o grupo Ob recebeu um ciclo de quatro dietas hiperlipídicas Agrocere[®], Rio Claro, São Paulo, Brasil (20% de proteína,

26,4% de carboidrato, 20% de gordura, 10% de minerais, 9% de fibras, 12,5% de umidade, 1,4% de cálcio, 0,7 de fósforo), as quais se sucederam de forma rotativa por um período de 15 semanas. A análise do perfil dos ácidos graxos da dieta mostrou que os insaturados correspondem a 80%, e os saturados, a 20%. A ingestão alimentar dos animais foi aferida diariamente, e o consumo de água, *ad libitum*. Os animais foram pesados semanalmente, utilizando-se balança digital Mettler[®] modelo Spider 2. Ao final das 15 semanas de tratamento, todos os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg/ip; Cristália[®] Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil) e eutanasiados por decapitação.

Constituição dos grupos controle e obeso

Na experimentação biológica, em especial em estudos experimentais, mesmo quando mantidas as condições laboratoriais semelhantes, não está assegurada a homogeneidade de resposta. Nesse sentido, os ratos submetidos a ração-padrão e hiperlipídica podem apresentar, em maior ou menor escala, características comuns, como, por exemplo, o índice de adiposidade. Estudo publicado previamente¹⁴ mostrou que esse fato pode conduzir a um erro de classificação, ou seja,

animais submetidos a ração-padrão poderiam ser classificados como controle, quando na realidade exibem características de animais obesos ou vice versa. Por essa razão, tornou-se necessário estabelecer um critério que separasse os animais em dois grupos distintos de acordo com o índice de adiposidade. Com essa finalidade, foi construído um intervalo de 95% de confiança (IC) para a média do índice de adiposidade dos ratos controle e obeso. Foi adotado como ponto de separação (PS) entre os grupos o ponto médio entre o limite superior do grupo C e o limite inferior do grupo Ob; a partir desse ponto foram excluídos do grupo C os animais com índice de adiposidade acima do PS, e do grupo Ob, os animais com índice de adiposidade abaixo do PS.

Perfil nutricional dos animais

Para avaliar se a obesidade alterou o perfil nutricional, foi analisada a ingestão alimentar, o consumo calórico, a eficiência alimentar, a massa corporal, a gordura corporal e o índice de adiposidade. A ingestão alimentar foi calculada diariamente a partir da sobra individual de ração. O consumo calórico foi calculado pela seguinte fórmula: ingestão alimentar semanal multiplicada pelo valor energético de cada dieta ($g \times kcal$). Com a finalidade de analisar a capacidade de conversão de energia alimentar consumida em peso corporal foi calculada a eficiência alimentar, dividindo-se o ganho total de peso corporal dos animais (g) pela energia total ingerida ($kcal$).

Caracterização da obesidade

A caracterização da obesidade, ao final do período de 15 semanas, foi realizada pelo índice de adiposidade. Os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral dos animais foram dissecados para a quantificação da gordura corporal. O índice de adiposidade foi mensurado pela soma dos depósitos de gordura normalizada pelo peso corporal final multiplicado por 100. Esse método permite analisar os depósitos de gordura corporal de maneira consistente¹⁵.

Comorbidades associadas à obesidade

Como a obesidade pode acarretar comorbidades cardiovasculares, metabólica e hormonal, como hipertensão arterial sistêmica, intolerância à glicose, resistência sistêmica à insulina, dislipidemias, hiperglicemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia^{16,17}, as seguintes variáveis foram analisadas:

a) Pressão arterial sistêmica

A pressão arterial foi avaliada pela mensuração da pressão arterial sistólica (PAS). A PAS foi aferida por plestímetrografia, utilizando-se eletroesfigmomanômetro, Narco Bio-System®, modelo 709-0610 (International Biomedical, Austin, TX, Estados Unidos). Os ratos foram previamente aquecidos à temperatura de 40°C por cinco minutos, em uma caixa de madeira (50 × 40 cm) forrada com maravalha autoclavada, com a finalidade de produzir vasodilatação da artéria caudal. Em seguida, o manguito foi conectado a um transdutor de pulso colocado em torno da cauda do animal e insuflado até atingir 200 mmHg e,

posteriormente, desinsuflado. O registro das pulsações arteriais foi coletado em polígrafo Gould RS 3200 (Gould Instrumenta Valley View, Ohio, Estados Unidos).

b) Teste de tolerância à glicose

Os animais foram submetidos a um período de jejum de seis horas. As coletas de sangue, na artéria caudal, foram realizadas na condição basal e após administração intraperitoneal de glicose 25% (Sigma®-Aldrich, Saint Louis, MO, Estados Unidos) equivalente a 2,0 g/kg. As amostras sanguíneas foram coletadas nos momentos 0 (condição basal), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. O glicosímetro ACCU-CHEK GO KIT (Roche Diagnostic Brazil Ltda., São Paulo, Brasil) foi utilizado para mensuração dos níveis glicêmicos.

c) Perfil hormonal: insulina e leptina sérica

As concentrações séricas desses hormônios foram determinadas pelo método de ELISA utilizando-se kits específicos (Linco Research Inc, St. Louis, MO, Estados Unidos). A leitura foi realizada com auxílio de leitor de microplaca (Spectra MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Estados Unidos).

d) Perfil glicêmico e lipídico

Os perfis lipídico e glicêmico foram avaliados por meio de análises séricas de glicose, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteína de alta e baixa densidades e ácidos graxos não esterificados (NEFA). Os animais foram colocados em jejum por 12 a 15 horas, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg/IP, Cristália® Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil) e eutanasiados. A seguir, as amostras de sangue foram coletadas em tubos Falcon com heparina, centrifugadas (3.000 rpm; 10 minutos; Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburgo, Alemanha) e armazenadas a -80°C. As concentrações séricas de glicose, triacilglicerol, colesterol total, lipoproteína de alta e baixa densidades foram determinadas por meio de kits específicos (CELM, Barueri, São Paulo, Brasil) e analisadas pelo método enzimático colorimétrico automatizado (Technicon, RA-XTTM System, Global Medical Instrumentation, Minnessota, Estados Unidos). Os níveis de NEFA foram determinados pelo método Johnson & Peters¹⁸ utilizando kit colorimétrico (WAKO NEFA-C, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japão).

Caracterização da remodelação cardíaca

Como a obesidade pode acarretar remodelação cardíaca, a mesma foi estudada por meio de avaliação estrutural *post mortem* e por análise da expressão das proteínas quinase e fosfatases que regulam o grau de fosforilação do PLB decorrente da ativação beta-adrenérgica miocárdica.

a) Análise estrutural cardíaca

Os animais foram submetidos a jejum de 12 a 15 h, anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg/ip; Cristália® Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda., Itapira, São Paulo, Brasil) e sacrificados por decapitação.

O coração dos animais foi removido e dissecado, e as seguintes determinações foram realizadas: peso total do coração, do ventrículo esquerdo, direito e átrio, e suas respectivas relações com o peso corporal e o comprimento da tibia no momento do sacrifício. Essas análises podem indicar a presença de remodelação cardíaca em níveis atrial e ventricular.

b) Análise da expressão proteica

A expressão proteica de PLB total, pPLB(ser-16), PKA e PP-1 foi realizada pela técnica de Western Blot.

Técnica de Western Blot

a) Extração das proteínas

Fragmentos do ventrículo esquerdo foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a -80°C . A amostra congelada foi homogeneizada em aparelho Polytron (Ika Ultra Turrax™ T25 Basic, Wilmington, Estados Unidos) com tampão de lise hipotônico (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, sucrose 0,3 M, DTT 0,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,0, PMSF 0,3 mM, NaF 10 mM e inibidor de fosfatase). O processo foi realizado três vezes durante 10 segundos a 4°C , com intervalos de 20 segundos. O produto da homogeneização foi centrifugado (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemanha) a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C , e o sobrenadante foi transferido para tubos *eppendorfs* e armazenados em freezer a -80°C . A concentração de proteína foi analisada pelo método de Bradford¹⁹, utilizando as curvas de BSA Protein Standard (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) como padrão.

As amostras das proteínas foram diluídas em tampão Laemmli (Tris-HCL 240mM, SDS, 0,8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02% e beta-mercaptoetanol 200 mM) e separadas por eletroforese utilizando sistema Mini-Protean 3 Electrophoresis Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos). A corrida eletroforética foi realizada em gel bifásico, de empilhamento (Tris-HCL 240mM pH 6,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed) e de resolução (Tris-HCL 240mM pH 8,8, poliacrilamida 30%, APS e Temed), na concentração de 6% a 12%, dependente do peso molecular da proteína analisada. No primeiro poço do gel foi aplicado um padrão de peso molecular, Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos), para identificação do tamanho das bandas. A corrida eletroforética foi efetuada a 120 V (Power Pac HC 3.0A, Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos), por aproximadamente três horas, com tampão de corrida (Tris 0,25M, glicina 192 mM e SDS 1%). Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) utilizando-se tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,1%). As membranas foram lavadas duas vezes com tampão TBS (Tris-HCL 20mM pH 7,6 e NaCl 137mM). Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução a 0,5% de leite em pó desnatado, dissolvido em tampão TBS-T pH 7,4 (Tris-HCL 20mM, NaCl 137mM e detergente Tween

20 0,1%) por 120 minutos à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi lavada três vezes em solução basal (Tris 1M pH2,8, NaCl 5M e Tween 20) e incubada com o anticorpo primário diluído na solução bloqueadora, sob agitação constante por 12 horas. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal e incubada com o anticorpo secundário em solução bloqueadora por duas horas sob agitação constante. Para remover o excesso de anticorpo secundário, a membrana foi lavada três vezes em solução basal. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência, de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ, Estados Unidos). As membranas de nitrocelulose foram expostas a filmes radiográficos X-Omat AR (Eastman Kodak Co., Estados Unidos), nos tempos padronizados para cada proteína estudada.

b) Anticorpos

- PLB mouse IgG (Thermo Scientific, Golden, CO, Estados Unidos, MA3-922). Concentração utilizada: 1:5.000.
- Phospho-Phospholamban (Ser16), rabbit IgG (Badrilla, Leeds, West Yorkshire, Reino Unido, A010-12). Concentração utilizada: 1:5.000.
- PKA rabbit IgG (Abcam Inc, MA, Estados Unidos, AB71764). Concentração utilizada: 1:500.
- PP1 rabbit IgG (Abcam Inc, MA, Estados Unidos, AB16446). Concentração utilizada: 1:1.000.
- β -Actin, rabbit IgG1 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, Estados Unidos, SC81178). Concentração utilizada: 1:1.000.

As análises quantitativas dos *blots* foram realizadas pelo programa Scion Image (Scion Corporation, Frederick, Maryland, Estados Unidos), *software* livre, disponível no endereço: <http://www.scioncorp.com/>

Análise estatística

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. O perfil nutricional, as comorbidades associadas à obesidade, os dados anatômicos e a expressão proteica cardíaca foram analisados pelo teste *t* de Student para amostras independentes. O teste de tolerância à glicose foi examinado por meio da análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementado com o teste de Bonferroni²⁰. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o Sigma Plot 3.5 para Windows (Systat Software Inc., San Jose, CA, Estados Unidos). Os dados foram apresentados em média \pm desvio-padrão. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

Resultados

Composição dos grupos controle e obeso

Após aplicação do critério estabelecido para a composição dos grupos experimentais, 27 animais permaneceram no

estudo, constituindo o grupo controle (C, n = 14) e o grupo obeso (Ob, n = 13).

Perfil nutricional

A Tabela 1 mostra o perfil nutricional dos animais C e Ob. O peso corporal final, o ganho de peso, os depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral, a gordura corporal total e o índice de adiposidade foram maiores no grupo obeso em relação ao grupo controle. Os animais Ob ingeriram menor quantidade de ração que os C. Não houve diferença na ingestão calórica entre os grupos.

Análise das comorbidades

a) Perfil hormonal e pressão arterial sistólica

A Figura 3 ilustra o resultado dos valores séricos de insulina (A) e leptina (B); a obesidade acarretou aumento nas concentrações desses hormônios. O resultado da pressão arterial sistólica final (C) não apresentou diferença significativa entre os grupos.

b) Teste de tolerância à glicose

A Figura 4 mostra o resultado do teste de tolerância à glicose realizado nos grupos C e Ob. Os níveis glicêmicos foram semelhantes no momento basal entre os grupos. Após a administração intraperitoneal de glicose, a glicemia foi elevada no grupo Ob nos momentos 15, 30, 60 e 90 em relação ao grupo C.

c) Perfil glicêmico e lipídico

A Tabela 2 mostra as análises bioquímicas séricas dos animais dos grupos C e Ob. As concentrações plasmáticas de glicose, colesterol, HDL e NEFA não foram diferentes entre os tratamentos; a concentração de triglicérides foi maior, significativamente, no Ob em relação ao C.

Remodelação cardíaca

a) Estrutura macroscópica cardíaca

A Tabela 3 mostra a estrutura macroscópica cardíaca *post mortem* dos ratos C e Ob. Após 15 semanas de obesidade, houve diferença significativa no peso dos átrios.

Tabela 1 – Perfil nutricional

Variáveis	Grupos	
	C (n = 14)	Ob (n = 13)
PCI (g)	290 ± 13	308 ± 23*
PCF (g)	445 ± 39	486 ± 45*
Ganho de peso (g)	300 ± 16	342 ± 16*
Ingestão alimentar (g/dia)	26,0 ± 2,1	22,0 ± 2,4*
Ingestão calórica (kcal/dia)	76,7 ± 6,2	80,3 ± 8,7
Eficiência alimentar (%)	2,05 ± 0,30	2,33 ± 0,25*
Epididimal (g)	8,4 ± 1,7	14,2 ± 4,4*
Retroperitoneal (g)	7,3 ± 1,9	14,4 ± 4,7*
Visceral (g)	4,80 ± 1,20	8,10 ± 1,80*
Gordura corporal total (g)	20,5 ± 4,1	36,7 ± 7,1*
Índice de adiposidade (%)	4,61 ± 0,85	7,55 ± 1,36*

C: controle; Ob: obeso; PCF: peso corporal final; PCI: peso corporal inicial. Dados expressos em média desvio-padrão. Teste t de Student para amostras independentes, *p < 0,05 × C.

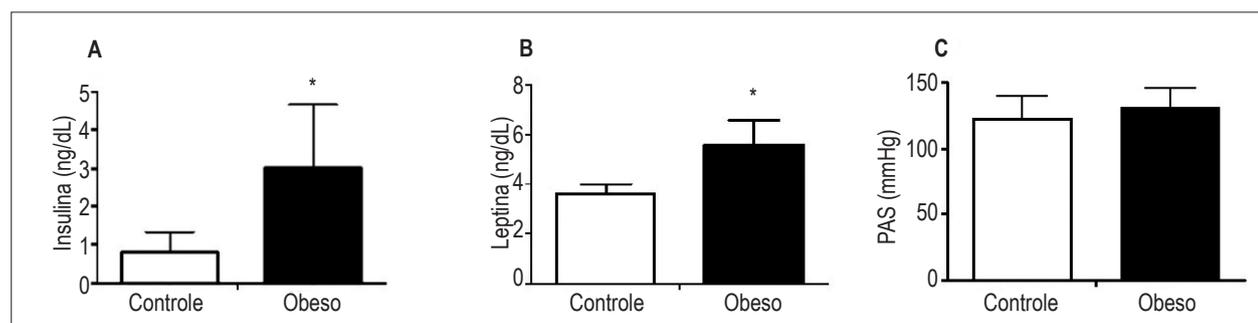


Figura 3 – Níveis séricos de insulina (A) e leptina (B) dos animais controles (n = 8) e obesos (n = 8). Pressão arterial sistólica (C) dos animais controles (n = 14) e obesos (n = 13). Dados expressos em média ± desvio-padrão. Teste t de Student para amostras independentes, *p < 0,05 × C.

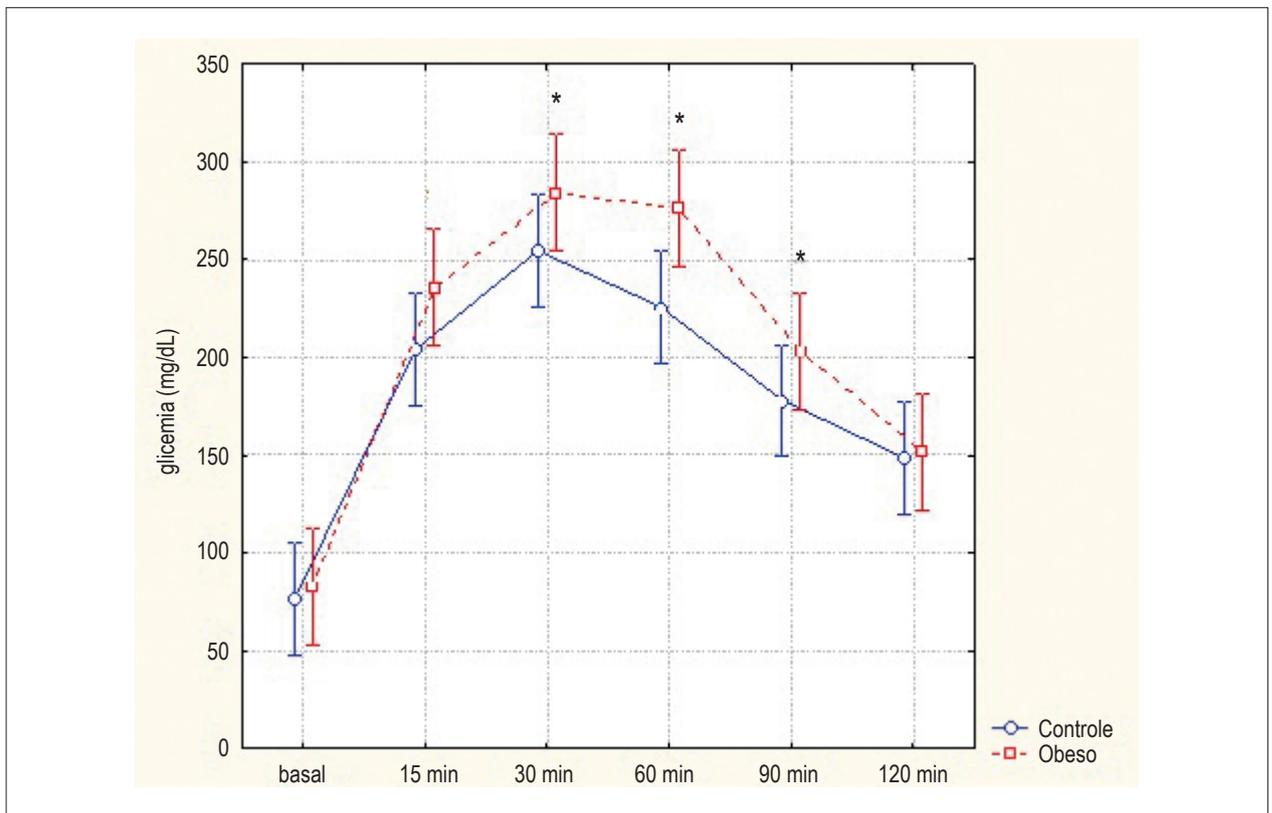


Figura 4 – Teste de tolerância à glicose dos animais controles ($n = 14$) e obesos ($n = 13$). Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de medidas repetidas em grupos independentes e complementada com o teste de Bonferroni. * $p < 0,05 \times C$.

Tabela 2 – Perfil glicêmico e lipídico

Variáveis	Grupos	
	C ($n = 14$)	Ob ($n = 13$)
Glicose (mg/dL)	125 \pm 16	138 \pm 14
Triglicérides (mg/dL)	43,3 \pm 10,3	82,1 \pm 15,7*
Colesterol (mg/dL)	62,4 \pm 11,5	67,5 \pm 18,0
HDL (mg/dL)	23,5 \pm 3,0	26,6 \pm 5,8
NEFA (mmol/L)	0,42 \pm 0,10	0,43 \pm 0,10

HDL: lipoproteína de alta intensidade; NEFA: ácidos graxos não esterificados. Dados expressos em média \pm desvio-padrão. Teste t de Student para amostras independentes, * $p < 0,05 \times C$.

b) Análise da expressão proteica

De acordo com a Figura 5, não verificamos diferença significativa nas expressões proteicas de PLB (A), pPLB Ser-16 (B), PKA (C) e PP-1 (D) entre os grupos controle e obeso.

Discussão

O principal achado deste estudo foi que a obesidade induzida por dieta rica em gordura insaturada não induziu alteração no balanço entre fosforilação e desfosforilação no coração; os comportamentos das proteínas quinase e fosfatase foram semelhantes nos dois grupos analisados.

A indução da obesidade por dieta se assemelha à encontrada na população humana, e vem sendo utilizada para reproduzir possíveis alterações moleculares, estruturais, metabólicas e funcionais em diferentes órgãos do corpo humano²¹. O alto teor calórico da dieta utilizada neste experimento, suficiente para promover a obesidade em ratos, foi devido ao elevado teor de gorduras insaturadas. Neste trabalho, os resultados mostraram que o índice de adiposidade foi significativamente maior nos obesos (controle = 4,61 \pm 0,85; obeso = 7,55 \pm 1,36; $p < 0,005$) em relação aos controles. Esse resultado está de acordo com trabalhos (realizados em roedores) que classificam a obesidade utilizando esse índice²².

Tabela 3 – Estrutura macroscópica cardíaca e tibia

Variáveis	Grupos	
	C (n = 14)	Ob (n = 13)
Tíbia (cm)	4,30 ± 0,07	4,30 ± 0,10
VE (g)	0,79 ± 0,06	0,85 ± 0,09
VD (g)	0,23 ± 0,02	0,25 ± 0,03
AT (g)	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01*
Coração total (g)	1,11 ± 0,09	1,20 ± 0,14
VE/tíbia (g/cm)	0,18 ± 0,01	0,19 ± 0,02
VD/tíbia (g/cm)	0,050 ± 0,005	0,060 ± 0,008
AT/tíbia (g/cm)	0,020 ± 0,002	0,020 ± 0,003
Coração/tíbia (g/cm)	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,02

C: controle; Ob: obeso; AT: peso do átrio; VD: peso do ventrículo direito; VE: peso do ventrículo esquerdo; AT/tíbia: relação AT pelo comprimento da tíbia; VD/tíbia: relação VD pelo comprimento da tíbia; VE/tíbia: relação VE pelo comprimento da tíbia; Dados expressos em média ± desvio padrão. Teste "t" de Student para amostras independentes. *p < 0,05 vs C

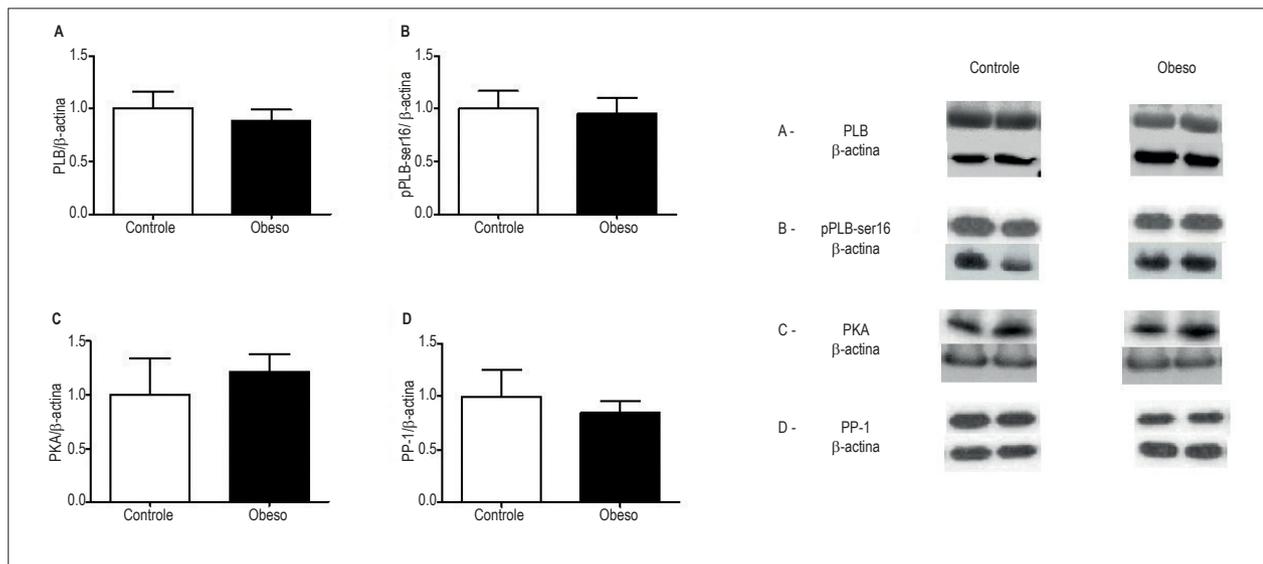


Figura 5 - Expressões de PLB (A), pPLB-ser16 (B), PKA (C) e PP-1(D) normalizadas pela beta-actina. PKA: proteína quinase A; PLB: fosfolambam desfosforilado; pPLB-ser16: fosfolambam fosforilado na serina16; PP-1: fosfatase-1. Controle (n = 6) e obeso (n = 6). Os dados estão expressos em média ± desvio-padrão. Teste t de Student * p < 0,05 × C.

A obesidade vem sendo caracterizada por várias comorbidades, como intolerância à glicose, resistência à insulina, hipertensão arterial sistêmica, dislipidemias, hiperinsulinemia e hiperleptinemia^{11,23,24}. Neste estudo, os animais obesos apresentaram as seguintes comorbidades: intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hiperleptinemia. A intolerância à glicose associada ao aumento de insulina sérica mostrou que os animais apresentaram resistência à ação da insulina. O aumento nos níveis de insulina nos obesos não foi capaz de manter a homeostasia dos carboidratos frente à suplementação desse substrato nos animais obesos. O aumento dos níveis de triglicérides nos ratos com obesidade pode ser

consequência da elevada captação dos triglicérides na forma de quilomícrons e/ou diminuição da absorção dos triglicérides pelos tecidos periféricos²⁵. A elevação da leptina foi devida aos maiores depósitos de gordura, já que há correlação entre os níveis de leptina e o tecido adiposo^{14,26}. A leptina, por ser um hormônio derivado do tecido adiposo, participa do balanço energético, regulando o consumo alimentar e a oxidação dos lipídeos^{27,28}. A redução da ingestão de alimentos pelos obesos sugere que o aumento da leptina foi efetivo no controle do apetite. Os dados relativos às comorbidades observados neste trabalho estão de acordo com outros trabalhos que induziram a obesidade experimentalmente^{14,17,29,30}.

A constatação mais importante deste estudo foi que a obesidade induzida por dieta insaturada não alterou a expressão do pPLB-ser16, e as proteínas responsáveis pelo balanço entre a sua fosforilação e a desfosforilação, PKA e PP-1, respectivamente. Sendo a via beta-adrenérgica a responsável pela fosforilação no sítio da serina 16 do PLB, podemos inferir que esse sistema não foi suficientemente estimulado para acarretar alteração na fosforilação do PLB miocárdico ou outro sistema se contrapôs a essa ativação. O comportamento do pPLB-ser16 neste trabalho está em discordância com o estudo anterior realizado em nosso laboratório¹², em que foi encontrada diminuição do PLB em seu estado fosforilado na serina 16 em ratos obesos tratados com a mesma dieta utilizada neste estudo. Não encontramos explicação para a diferença entre os resultados; essa divergência *poderia* estar relacionada com o nível do índice de adiposidade dos animais obesos, que foi 16% maior no estudo realizado por Lima-Leopoldo¹². Não há trabalhos na literatura que tenham analisado a relação entre as proteínas que interferem na fosforilação e desfosforilação do PLB miocárdico em ratos obesos submetidos a dieta hiperlipídica.

Conclusão

A hipótese inicial deste estudo não foi confirmada. A obesidade não promove desequilíbrio entre a fosforilação e a desfosforilação, via beta-adrenérgica, do PLB miocárdico.

Referências

1. Böhm M, Reiger B, Schwinger RH, Erdmann E. cAMP concentrations, cAMP dependent protein kinase activity, and phospholamban in non-failing and failing myocardium. *Cardiovasc Res*. 1994;28(11):1713-9.
2. Sugden PH, Bogoyevitch MA. Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res*. 1995;30(4):478-92.
3. Wang J, Liu X, Arneja AS, Dhalla NS. Alterations in protein kinase A and protein kinase C levels in heart failure due to genetic cardiomyopathy. *Can J Cardiol*. 1999;15(6):683-90.
4. Minhas KM, Khan SA, Raju SV, Phan AC, Gonzalez DR, Skaf MW, et al. Leptin repletion restores depressed {beta}-adrenergic contractility in ob/ob mice independently of cardiac hypertrophy. *J Physiol*. 2005;565(Pt 2):463-74.
5. Piddo AM, Sanchez MI, Sapag-Hagar M, Corbalan R, Fonseca R, Ebensperger R, et al. Cyclic AMP-dependent protein kinase and mechanical heart function in ventricular hypertrophy induced by pressure overload or secondary to myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;28(5):1073-83.
6. Huang B, Wang S, Qin D, Boutjdir M, El-Sherif N. Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle: role of beta-adrenergic pathway, G(i) protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circ Res*. 1999;85(9):848-55.
7. Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, Del Monte F, Sato Y, Lanner C, et al. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol*. 2002;22(12):4124-35.
8. Florea S, Anjak A, Cai WF, Qian J, Vafiadaki E, Figueria S, et al. Constitutive phosphorylation of inhibitor-1 at Ser67 and Thr75 depresses calcium cycling in cardiomyocytes and leads to remodeling upon aging. *Basic Res Cardiol*. 2012;107(5):279.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa: Freire PP, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DCT, Campos DHS, Cicogna AC; Obtenção de dados: Freire PP, Alves CAB, Deus AF, Campos DHS; Análise e interpretação dos dados: Freire PP, Alves CAB, Deus AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DCT, Tomasi LC, Campos DHS, Cicogna AC; Análise estatística: Freire PP, Alves CAB, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DCT, Tomasi LC, Campos DHS, Cicogna AC; Obtenção de financiamento: Freire PP, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Cicogna AC; Redação do manuscrito: Freire PP, Tomasi LC, Cicogna AC; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Freire PP, Alves CAB, Deus AF, Lima-Leopoldo AP, Leopoldo AS, Silva DCT, Tomasi LC, Cicogna AC.

Potencial conflito de interesse

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pela FAPESP.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de Conclusão de curso de Paula Paccielli Freire pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

18. Johnson MM, Peters JP. Technical note: an improved method to quantify nonesterified fatty acids in bovine plasma. *J Anim Sci*. 1993;71(3):753-6.
19. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
20. Bayley BJ. Tables of Bonferroni "t" statistic. *J Am Stat Assoc*. 1977;72(358):469-78.
21. Sowers JR, Whaley-Connell A, Hayden MR. The role of overweight and obesity in the cardiorenal syndrome. *Cardiorenal Med*. 2011;1(1):5-12.
22. Carroll JF, Zenebe WJ, Strange TB. Cardiovascular function in a rat model of diet-induced obesity. *Hypertension*. 2006;48(1):65-72.
23. Carroll JF, Tyagi SC. Extracellular matrix remodeling in the heart of the homocysteinemic obese rabbit. *Am J Hypertens*. 2005;18(5 Pt 1):692-8.
24. Smith AD, Brands MW, Wang MH, Dorrance AM. Obesity-induced hypertension develops in young rats independently of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006;231(3):282-7.
25. Schaalán M, El-Abhar HS, Barakat M, El-Denshary ES. Westernized-like-diet-fed rats: effect on glucose homeostasis, lipid profile, and adipocyte hormones and their modulation by rosiglitazone and glimepiride. *J Diabetes Complications*. 2009;23(3):199-208.
26. Frederich RC, Hamann A, Anderson S, Lollmann B, Lowell BB, Flier JS. Leptin levels reflect body lipid content in mice: evidence for diet-induced resistance to leptin action. *Nat Med*. 1995;1(12):1311-4.
27. Unger RH. Lipotoxic diseases. *Ann Rev Med*. 2002;53:319-36.
28. Ahima RS, Flier JS. Leptin. *Ann Rev Physiol*. 2000;62:413-37.
29. Akiyama T, Tachibana I, Shirohara H, Watanabe N, Otsuki M. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. *Diabetes Res Clin Pract*. 1996;31(1-3):27-35.
30. Leopoldo AS, Sugizaki MM, Lima-Leopoldo AP, do Nascimento AF, Luvizotto Rde A, de Campos DH, et al. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol*. 2010;26(8):423-9.