

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E BIOFÍSICA  
LABORATÓRIO DE ELETROFISIOLOGIA CELULAR

Márcia Netto Magalhães Alves

Cardiomiócitos, na presença de ácidos graxos, apresentam disfunção na sinalização de cálcio: reversão pelo treinamento físico.

BELO HORIZONTE

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Márcia Netto Magalhães Alves

Cardiomiócitos, na presença de ácidos graxos, apresentam disfunção na sinalização de cálcio: reversão pelo treinamento físico.

Tese apresentada ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Doutor em Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Silvia Guatimosim  
Fonseca

Belo Horizonte  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2010

Alves, Márcia Netto Magalhães

Cardiomiócitos, na presença de ácidos graxos, apresentam disfunção na sinalização de cálcio: reversão pelo treinamento físico. [manuscrito] / Márcia Netto Magalhães Alves. – 2010  
84 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Silvia Guatimosim Fonseca

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais,  
Departamento de Fisiologia e Biofísica.

1. Fisiologia – Teses. 2. Ácidos graxos – Teses. 3.  
Treinamento físico – Teses. 4. Miócitos cardíacos. 5. Sinais  
de cálcio intracelulares. I. Fonseca, Silvia Carolina Guatimosim.  
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de  
Fisiologia e Biofísica. III. Título.

CDU: 612.1

## DEDICATÓRIA

A meus pais, Jane e Herbert, por todo o apoio e carinho ao longo da vida.

A Bina e Benê, exemplos de bondade.

*“Do not lose hold of your dreams or aspirations. For if you do, you may still exist but you have ceased to live.”*

Henry David Thoreau (1817-1862)

## AGRADECIMENTOS:

À Professora Sílvia Guatimosim, por me ter apresentado aos cardiomiócitos, células mais encantadoras do corpo humano; e ter permitido que usasse meus conhecimentos da intervenção não farmacológica mais importante para a saúde futura mundial, o treinamento físico, para desvendar possíveis alterações intracelulares a partir do treinamento. Aprendi muito com sua dedicação, seriedade, imensa atenção e preocupação com a qualidade do nosso trabalho.

Ao professor Ulrik Wisløff, colega da área de Educação Física, entusiasta do treinamento físico, mundialmente conhecido pelos estudos que desenvolve nas duas áreas principais deste estudo. O professor Ulrik me acolheu com muita simpatia no seu laboratório em Trondheim, Noruega proporcionando excelentes condições de trabalho e de convivência.

A minha mãe, Jane Magalhães Alves, pela preciosa assistência durante a elaboração e revisão dos textos; e pela sua alegria nordestina no dia a dia.

Ao professor Jader Cruz por sua amizade, incentivo e suporte teórico, ao longo de muitos anos de convivência; e também pelos inúmeros momentos de descontração.

À professora Patrícia Brum, um exemplo de dedicação e entusiasmo que, em um mês de muito trabalho e camaradagem em Trondheim, mostrou que o espírito de equipe e de confiança nos alunos pode alcançar grandes objetivos, de forma prazerosa.

À amiga Natale Rolim, que me recebeu em Trondheim como se fôssemos 'amigas de infância' e foi uma das pessoas que mais me inspiraram seriedade, dedicação e entusiasmo pela pesquisa.

Aos professores Maria Aparecida Vieira, Leida Botion, Paulo Sérgio Beirão, Umeko Marubayashi, Jorge Pesquero, Emerson Silami Garcia, Ângela Maria Ribeiro, Luiz Oswaldo Carneiro Rodrigues, Wilson Beraldo (*in memoriam*), Ênio Cardillo Vieira, Virgínia Lemos, Maria de Fátima Leite, Alvaír Pinto de Almeida, Fernando Reis, pelo apoio de sempre.

A Ana Paula, Cláudio e ao professor Álvaro Dias Azevedo (*in memoriam*) pela ajuda no desenvolvimento do projeto da esteira rolante para animais e à empresa Gaustec Magnetismo Ltda, pela execução do projeto.

À professora Jaqueline Alvarez-Leite que disponibilizou camundongos ApoE KO para o nosso trabalho.

Aos amigos e colegas Leonardo, Pedro, Danilo, Luciano e Vitor, que foram fundamentais em algumas etapas deste estudo.

Aos amigos Ricardo Lima, Fabiano Condé, Denise e Élide, que me deram muita força e ânimo para enfrentar novos estudos, novas cirurgias, novos animais...

Aos amigos do laboratório de 'Cardiomiócitos', que me ajudaram em vários momentos: Marina, Amanda, Mariana, Maura, Sasha, Ai Ai Ai (Fabrício), Enéas, Cibele, Aline, Luciana e todos os outros que passaram por nosso lab.

Aos amigos e colegas de laboratório de Trondheim: Øivind, Kristine, Raghild, Trine, Anne Berit, Guri, Tomas Stølen, Anja, Morten. Tussen takk!

Aos muitos amigos dos vários anos de ICB que me ajudaram em diversos momentos: Paulinha, Ana Rosa, Fernando, Jamil, Adaliene, Érica, Laura, Sandra, Aninha, Letícia, Darcy, Zezé, Alécio, Bebê, Samuel, Najara, Virgínia, Andréa, Vivi, Carla, Lídia, Jimena, Matheus, Aline, Emerson, Dayse, Mércia, Maura, Kinulpe, Rubens, Heveline, Felipe, Cris, turma do café e da cerveja, do NNC, Gonzaga, Rodrigo e muitos outros, com os quais convivi nos últimos anos.

Aos amigos do laboratório de Eletrocel: Anita, Éder, Flaviana, Felipe, Adriano, Priscila, Chris, Lúgia, Miguel, Rose, Nayara.

A Celinha e Cynthia, pelo auxílio nas questões burocráticas.

Aos funcionários e técnicos que permitem o bom funcionamento dos nossos experimentos.

À Chefia do Departamento de Fisiologia e Biofísica e à Chefia do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia, pelo apoio necessário.

A meu pai, Herbert Magalhães Alves, uma das influências fundamentais no meu interesse pela Ciência, de quem sempre recebi muito apoio.

Aos meus irmãos Lalu e Jorge e aos meus queridos sobrinhos Vitor (um profundo conhecedor desta tese) e Danilo, pelos momentos de descontração e carinho.

Aos meus amigos que não participaram diretamente deste trabalho, pelos ótimos momentos de descontração e por toda a força nos momentos difíceis.

A Cleusa, Lili, Maria, Rosália e Assis, que possibilitam uma tranquilidade diária na nossa vida.

Ao CNPq e à CAPES, pelo auxílio financeiro ao longo destes 4 anos.

A NTNU, que disponibilizou equipamentos e materiais, em seus vários laboratórios, para nossos experimentos; e, ainda, possibilitou a prorrogação da minha estada em Trondheim, Noruega.

## RESUMO

Estilo de vida sedentário e a ingestão de dietas pouco saudáveis são considerados fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas, como as relacionadas à diabetes tipo 2 e à síndrome metabólica, ambas associadas a um aumento na resistência à insulina. Relações entre a doença cardiovascular e a disfunção na sinalização de cálcio da célula cardíaca são observadas nos cardiomiócitos em várias patologias; submeter animais ao treinamento físico aeróbio melhora a contratilidade e leva a aumento da liberação intracelular de  $Ca^{2+}$  dos cardiomiócitos. Neste estudo nosso objetivo foi investigar o efeito de tratamentos *in vivo* ou *in vitro*, com ácidos graxos, na sinalização intracelular de cálcio de camundongos treinados ou não. Inicialmente, usamos cardiomiócitos de camundongos ApoE KO tratados com dieta rica em gorduras *trans* e carboidratos simples (GC) e camundongos C57/BL6 controle que, com a mesma dieta, apresentaram valores altos de colesterol, glicose e menor sensibilidade à insulina; os cardiomiócitos dos camundongos ApoE KO e C57/BL6 tratados com a dieta GC, apresentaram disfunção na sinalização intracelular de cálcio, caracterizada por redução na amplitude e aumento do tempo de decaimento do transiente de  $Ca^{2+}$ . O treinamento físico aeróbio, por 6 semanas, reverteu a disfunção na sinalização intracelular de cálcio dos camundongos controle e ApoE KO, tratados com a dieta GC, atenuou a resistência à insulina em camundongos C57/BL6 mas não induziu outras melhoras metabólicas. Em uma segunda etapa, cardiomiócitos de camundongos diabéticos (*db/db*) e controle foram incubados com o ácido graxo saturado palmitato e o insaturado (EPA). As células de *db/db* apresentaram disfunções na sinalização de cálcio e isto não foi agravado pelos ácidos graxos; por outro lado, em cardiomiócitos do grupo controle, a sinalização de cálcio era normal, mas apresentava disfunções na presença destes ácidos graxos. Comparamos os efeitos destas incubações em cardiomiócitos de camundongos controle submetidos ou não a um programa de treinamento físico aeróbio. Células de camundongos treinados apresentaram um aumento da liberação global de  $Ca^{2+}$  que não foi alterada pela exposição ao palmitato ou ao EPA. Além disso, em cardiomiócitos de camundongos controle não treinados, a incubação com o palmitato levou a maior produção de ROS, fato que foi completamente revertido quando usados cardiomiócitos dos camundongos treinados. A disfunção na sinalização de  $Ca^{2+}$

observada nas células de camundongos controle não pôde ser explicada por uma alteração na duração do potencial de ação, uma vez que esta não se mostrou diferente nas células de treinados, ou não treinados, na presença ou ausência dos ácidos graxos. Concluimos que o aumento de ácidos graxos está relacionado com uma disfunção na sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  no cardiomiócito ventricular e o treinamento físico aeróbio melhora a sinalização de cálcio, mesmo na presença de doses altas de ácidos graxos saturados ou *trans*, tidos como não saudáveis, provavelmente por redução na produção de superóxidos pelas mitocôndrias.

**PALAVRAS-CHAVE:** camundongos; cardiomiócitos; cálcio intracelular; treinamento físico; ácidos graxos; dieta

## ABSTRACT

Sedentary lifestyle and unhealthy diets are considered as risk factors for many cardiac diseases, as diabetes type 2 and metabolic syndrome; both related to enhanced insulin resistance. Relationship between cardiovascular diseases and intracellular calcium dysfunction is seen in cardiomyocytes; this is reverted by physical training. We investigated the effect of various *in vivo* or *in vitro* treatments with fatty acids in ventricular myocyte  $Ca^{2+}$  signaling of mice submitted to physical training or not. In the first part of this study we have used cardiomyocytes from ApoE KO and control (C57/BL6) mice submitted to a high *trans* fatty, high sugar diet (HF). C57/BL6 and ApoE KO mice with HF diet presented high cholesterol levels. C57/BL6 mice presented high glucose values and insulin resistance. Cardiomyocytes from all these mice submitted to HF diet showed calcium signaling dysfunction characterized by a reduced and slower  $Ca^{2+}$  transient, which was reverted by 6 weeks of aerobic training. Training also attenuated insulin resistance but did not have any other effects on metabolic parameters. In the second part, we have studied cardiomyocytes from a diabetic model (*db/db*) and C57/BL6 mice acutely treated with saturated fatty acid palmitate and unsaturated fatty acid (EPA); cardiac cells from *db/db* presented calcium signaling dysfunction but this was not worsen by palmitate or EPA; on the other hand, cells from C57/BL6 group presented dysfunction in the presence of palmitate. We then compared the effects of incubation with EPA and palmitate in cardiomyocytes from C57/BL6 submitted or not to physical training. As expected, trained cardiomyocytes treated with palmitate presented an improvement in calcium signaling. Greater production of ROS after palmitate treatment in cardiomyocytes from C57/BL6 untrained mice was almost completely reverted by physical training. Action potential, as seen by patch clamp technique, was not different after the treatment with fatty acids, independent of training state. Our conclusions are that increased fatty acid levels are related to  $Ca^{2+}$  signaling dysfunction in ventricular myocytes and aerobic physical training improves calcium intracellular signaling in the presence of high levels of unhealthy saturated or *trans* fatty acids, and this is probably due to reduced production of superoxides by mitochondria.

**KEYWORDS:** mice; cardiomyocytes; intracellular calcium; physical training; fatty acids; diet.

## 1 INTRODUÇÃO

O número de mortes em consequência de doenças cardíacas multiplicou-se por um fator de 29, de 1900 a 1996; parece evidente que este aumento é decorrente de mudanças relacionadas ao ambiente e não a alterações referentes ao genoma humano (BOOTH et al., 2000). Até 2020, estima-se que um terço de todas as mortes no mundo serão devidas a doenças cardíacas (KATZ, 2006). Estilo de vida sedentário e dietas poucos saudáveis são considerados fatores de risco para o desenvolvimento destas doenças e, na presença da obesidade, este quadro pode ser agravado. Em pacientes obesos, a combinação de condições como diabetes tipo 2, hipertensão e doença cardíaca, tem a denominação de síndrome metabólica e está associada a um aumento na resistência à insulina; acredita-se que esta resistência seja resultante da lipotoxicidade (YE, 2007).

Uma intervenção eficiente para melhorar a ação da insulina em indivíduos obesos e/ou com síndrome metabólica, é o treinamento físico de resistência aeróbia, planejado e praticado de forma regular (HOUMARD, 2007). No músculo esquelético, as adaptações incluem geração de mitocôndrias e maior capacidade de oxidar substratos como glicose e gorduras; e têm uma relevância científica e clínica muito importante, devido à relação do aumento da prática de atividade física com a melhoria da saúde metabólica e redução de diversas doenças crônicas, incluindo obesidade, resistência à insulina, diabetes tipo 2 e hipertensão (LITTLE et al., 2010; RONDON e BRUM, 2003). Juntos, atividade física e dieta podem reduzir o risco de um grande número de doenças crônicas, inclusive a doença cardíaca, hipertensão, diabetes e síndromes metabólicas, vários tipos de câncer, e, em muitos casos, podem até mesmo reverter o curso de uma doença pré-existente

Os mecanismos moleculares pelos quais a atividade física e/ou a dieta atuam na proteção contra doenças não são completamente conhecidos; em particular, no que diz respeito às funções da célula cardíaca (ROBERTS e BARNARD, 2005).

Em estudos recentes têm sido verificadas, no plano celular, relações entre a doença cardiovascular e a disfunção na sinalização de cálcio da célula cardíaca (VASANJI et al., 2006; GUATIMOSIM et al., 2002). A disfunção na sinalização de cálcio pode interferir na contração e no relaxamento da célula cardíaca e, conseqüentemente, na função do músculo cardíaco. Por outro lado, cardiomiócitos de animais submetidos ao treinamento físico aeróbio apresentam melhor

contratilidade e um aumento da liberação intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (KEMI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009).

A contração da célula cardíaca inicia-se com a chegada de um potencial de ação que leva à despolarização do sarcolema e consequente abertura de canais de cálcio tipo L (dependentes de voltagem), resultando em um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca,L}}$ ). Este  $\text{Ca}^{2+}$ , por sua vez, é capaz de ativar canais de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares do retículo sarcoplasmático (RS), os receptores de rianodina (RYR) (BERS, 2002).

Localizados na superfície do RS, os RYR são sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e, quando estimulados, abrem-se e provocam um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) e consequente ativação da maquinaria contrátil. Neste contexto, o  $\text{Ca}^{2+}$  liberado do retículo sarcoplasmático constitui a principal fonte de  $\text{Ca}^{2+}$  na contração celular (MARKS, 2000). O aumento transitório do  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da célula recebe o nome de transiente de cálcio.

Cada onda de excitação elétrica espalha-se rapidamente pela membrana plasmática de células adjacentes; o cálcio liberado a partir do RS ativa a contração das miofibrilas (SEVERS, 2000) e, simultaneamente, das câmaras cardíacas. Este processo é denominado acoplamento excitação-contração (AEC), pois a partir da excitação elétrica, na forma do potencial de ação, ocorre desenvolvimento da força mecânica, contração do coração (BERS, 2002).

Corações de modelos animais que tenham sido submetidos a dietas ricas em gorduras, carboidratos simples, ou ambos, ou que foram geneticamente desenvolvidos para que se tornassem obesos ou diabéticos tipo 2, apresentam disfunções cardíacas graves. Estas disfunções são também evidentes na avaliação da contração do músculo cardíaco *in vitro*, ou na contração da célula cardíaca avaliada por técnicas que permitem estudar a sinalização intracelular de cálcio e/ou expressão de proteínas envolvidas no processo excitação-acoplamento. Diversos estudos têm sugerido que tais disfunções ocorrem devido à presença de excesso de ácidos graxos saturados na célula cardíaca. O palmitato, por exemplo, induz a apoptose em células de ratos adultos e neonatos pela ativação da via *de novo* para formação de ceramida e ativação da via apoptótica da mitocôndria; o acúmulo da ceramida leva à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela cadeia de transporte de elétrons das mitocôndrias. Desta forma, os ácidos graxos são oxidados com menor eficiência, e têm efeitos lipotóxicos nos cardiomiócitos (SPARAGNA, et al., 2000; DYNTAR et al., 2006).

Por outro lado, verificou-se que células de músculo esquelético de humanos obesos treinados, de forma semelhante ao observado em corações isolados de ratos treinados (BURELLE et al., 2004; TURCOTTE e FISCHER, 2008) apresentam, mesmo na presença de excesso de ácidos graxos, maior eficiência na produção energética. Isto parece ocorrer devido à melhor regulação do transporte de ácidos graxos para dentro das mitocôndrias, onde serão oxidados (SCHENK e HOROWITZ, 2006; GOODPASTER et al., 2001).

No presente estudo, elaboramos a hipótese de que células cardíacas de modelos de camundongos com alterações no conteúdo de ácidos graxos sofrem disfunções na sinalização intracelular de cálcio; e que estas disfunções poderão ser revertidas com um programa de treinamento físico aeróbio.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 DOENÇAS CARDIOVASCULARES, OBESIDADE E DIABETES

Na primeira década do século 21, as doenças crônicas - e nestas se incluem as doenças cardiovasculares – lideram as causas de morte na sociedade ocidental. Há evidências claras de que a maior parte das doenças crônicas está associada à inatividade física e ao consumo de dietas inadequadas (ROBERTS et al., 2005).

A obesidade tem se tornado um problema crescente no mundo e no Brasil. Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares realizada nos anos de 2002 a 2003, um total de 40% da população adulta do Brasil apresenta excesso de peso (dados do IBGE). A obesidade é um fator independente para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (BOUDINA et al., 2005). Existem bastantes evidências de que dietas ricas em gorduras provocam obesidade e resistência à insulina, causas fundamentais e líderes no desencadeamento da diabetes, hiperlipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares. No Japão, o rápido aumento de consumo de gorduras tem relação direta com o aumento de casos de diabetes, que alcançou valores próximos de 6.9 milhões de pessoas, segundo pesquisa nacional realizada em 1997. No entanto, os mecanismos moleculares através dos quais as dietas ricas em gorduras induzem a obesidade e esta provoca resistência à insulina e diversas outras desordens metabólicas, ainda devem ser estudados (KADOWAKI et al., 2003).

Estudos clínicos e experimentais sugerem que a diabetes leva a anormalidades funcionais, bioquímicas e morfológicas que independem da isquemia do miocárdio. Estudos realizados nos anos 50 já mostravam que a utilização de gorduras é aumentada e a de glicose reduzida, em corações de pacientes com diabetes (BOUDINA e ABEL, 2005).

O metabolismo cardíaco depende da disponibilidade de substrato, podendo adaptar-se oxidando mais glicose ou ácidos graxos de cadeia longa (Ciclo de Randle). Um desequilíbrio na oxidação de substratos está associado com vários estados patológicos. Durante a obesidade, a elevação da concentração de ácidos graxos circulantes, a partir dos depósitos de gordura, aumenta sua utilização pelos músculos cardíacos ou esqueléticos; isto aumenta os depósitos de gordura em tecidos não adiposos e inibe a oxidação de glicose, reduzindo a sensibilidade à

insulina (MARIN-GARCIA e GOLDENTHAL, 2002). A insulina, normalmente, aumenta a utilização e oxidação de glicose que, por sua vez aumenta as concentrações de malonil CoA; esta CoA reduz a oxidação de ácidos graxos por inibição alostérica da palmitoiltransferase da carnitina do músculo (CPT-1) (MAZUMDER et al., 2004). Desta forma, a deficiência ou resistência crônica à insulina reduz drasticamente a utilização cardíaca de glicose, de forma que o coração pode contar apenas com os ácidos graxos para a produção energética (FINCK et al., 2003). Apesar dos ácidos graxos produzirem mais ATP, durante a oxidação aeróbia, do que a glicose, isto ocorre com um consumo aumentado de oxigênio; assim, o fornecimento de oxigênio pode ser um determinante importante na utilização de substratos pelo miocárdio (MARIN-GARCIA e GOLDENTHAL, 2002).

Sempre que a utilização e/ou a produção de ácidos graxos excede a capacidade oxidativa das células, os ácidos graxos não utilizados podem entrar em vias deletérias, tais como formação, *de novo*, de ceramida; o que resulta em apoptose, que causa a perda de cardiomiócitos e de células  $\beta$ , havendo, no coração, redução na eficiência cardíaca e surgimento da cardiomiopatia lipotóxica e da diabetes mellitus não insulino-dependente (MARIN-GARCIA e GOLDENTHAL, 2002; PARK et al., 2004; BOUDINA et al., 2005). A perda de miócitos não apenas reduz as unidades contráteis como também leva à remodelação das células sobreviventes, o que pode ter uma responsabilidade direta na deterioração da função cardíaca (TRIVEDI e BAROUCH, 2008). Desta forma, a alteração do metabolismo de glicose/ácidos graxos é vista como um fator para o aumento do número de pacientes obesos, com diabetes tipo 2 e com doenças cardiovasculares, em países do oeste (MARIN-GARCIA e GOLDENTHAL, 2002).

Na diabetes, um desvio na utilização de substrato cardíaco está associado com a ativação do receptor  $\alpha$  ativado pelos proliferadores dos peroxissomos (PPAR $\alpha$ ). O PPAR $\alpha$  é um receptor nuclear que regula a transcrição de uma gama de genes envolvidos nas vias de utilização dos ácidos graxos, incluindo transporte, esterificação e oxidação (FINCK et al., 2002); entre outros: genes alvo codificados pelas enzimas do metabolismo dos ácidos graxos ( $\beta$  oxidação) e dos transportadores de ácidos graxos, tais como a proteína de ligação de ácidos graxos, a CPT-I, a sintase de acil-CoA, a hidroxiacil CoA desidrogenase.(HAD) e as apolipoproteínas. Estes dados sugerem que os PPAR $\alpha$  têm papel importante na

homeostase metabólica de ácidos graxos (IEMITSU et al., 2002). A expressão cardíaca e a atividade do PPAR $\alpha$  e do seu co-ativador PGC-1 $\alpha$  estão aumentadas em modelos de roedores, com diabetes, que apresentam deficiência de insulina e resistência à insulina. Camundongos transgênicos que super expressam PPAR $\alpha$  especificamente no coração apresentam muitas das anormalidades metabólicas do coração diabético, incluindo maior utilização de ácidos graxos e redução na utilização de glicose. O desenvolvimento da cardiomiopatia neste modelo indicou que, inicialmente, a utilização de gorduras pode ter um papel compensatório para manter a produção de ATP; mas desajustes crônicos no metabolismo do miocárdio podem ter conseqüências deletérias, incluindo anormalidades funcionais (FINCK et al., 2002).

Em estudos recentes, tem sido observado que a quantidade de transportadores de substratos, no sarcolema, tem papel regulatório importante no uso de glicose ou ácidos graxos de cadeia longa. Modular seletivamente a distribuição de tais transportadores pode ser um meio efetivo de normalizar o metabolismo no coração doente (SCHEWENK et al., 2008).

É interessante observar que, apesar de muitos estudos mostrarem que o aumento da oxidação de ácidos graxos resulta em ações deletérias no coração, pesquisa recente (YAN et al., 2009) revelou que a inibição da oxidação de ácidos graxos, em camundongos que super expressavam GLUT1 e eram alimentados com uma dieta rica em gordura, não estava relacionada a um papel protetor, e sim associada à disfunção cardíaca.

Uma das características da diabetes, e de muitas das suas complicações, é a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS). As mitocôndrias do músculo cardíaco geram radical superóxido continuamente, como um subproduto do transporte de elétrons; desequilíbrio entre a produção de ROS e sua neutralização por antioxidantes, resulta em estresse oxidativo. Vários pesquisadores encontraram evidências de que as ROS, a partir das mitocôndrias, ativam vias patológicas que levam a complicações da diabetes. Alterações na estrutura e função das mitocôndrias, no coração diabético, parecem ser causados pelas ROS derivadas das mitocôndrias; foi visto que o uso de um antioxidante mitocondrial (MnSOD) é capaz de proteger as mitocôndrias e os cardiomiócitos da cardiomiopatia diabética (SHEN et al., 2006). O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), por exemplo, pode induzir morte

celular por mecanismos que incluem a peroxidação lipídica, alteração das proteínas celulares, e início de várias vias sinalizadores de estresse (GHOSH et al., 2005).

## 2.2 MODELOS ANIMAIS

Atualmente existe uma gama de modelos experimentais de síndrome metabólica. Nos próximos tópicos vamos discutir alguns desses modelos.

### 2.2.1 DIETA RICA EM GORDURAS E CARBOIDRATOS SIMPLES

O uso de alterações dietéticas em modelos animais permite o estudo da relação entre a dieta e as doenças cardiovasculares. Tem sido verificado que dietas ricas em gorduras e carboidratos simples podem provocar, em camundongos, aumento de colesterol, de lipoproteínas de baixa e de muito baixa densidade (LDL e VLDL, respectivamente) e lesões aórticas (NISHINA, VERSTUYFT e PAIGEN, 1990), além de, em humanos, induzir resistência à insulina, hipertensão, disfunção endotelial, levar ao estresse oxidativo e reduzir a disponibilidade de óxido nítrico (NO) (ROBERTS et al., 2005; ROBERTS, VAZIRI e BARNARD, 2002). Este tipo de dieta, em coelhos, foi considerado diabetogênico, e foi sugerido que induz a aterosclerose, em consequência da alteração do metabolismo de lipídios e de glicídios (YIN et al., 2002). Verificou-se, também, que o uso excessivo de sacarose na água ingerida por ratos provocou disfunção contrátil cardíaca (VASANJI et al., 2006; DAVIDOFF et al., 2004).

A dieta descrita por (NISHINA, VERSTUYFT e PAIGEN, 1990), rica em colesterol (1.25%), gordura (15%), açúcar simples (50%) e colato (0.5%), tem sido usada para induzir mudanças pro-inflamatórias na microvasculatura, aumentar a produção de ROS, aumentar a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais; somando-se a isto, esta dieta leva a hipercolesterolemia, aterogênese e formação de pedras de colesterol nas vesículas. Camundongos submetidos à dieta de Paigen (como é conhecida), por 3 semanas, apresentam valores plasmáticos de colesterol total aumentados e menores valores de colesterol HDL (DESAI et al., 2008). A dieta de Paigen foi testada através do uso de diferentes tipos de gorduras e foi também observado desenvolvimento de lesões por acúmulo de gordura na aorta proximal, o que revelou-se estar relacionado com o percentual de ácidos graxos

saturados na gordura experimentada e inversamente proporcional à quantidade presente de gordura monoinsaturada (GETZ e REARDON, 2006).

### 2.2.2 CAMUNDONGOS ApoE KO

Entre os modelos animais com modificações genéticas, desenvolvidos para o estudo da síndrome metabólica, está o camundongo 'nocaute' para apolipoproteína E (ApoE KO). A apolipoproteína E medeia a interação da lipoproteína com vários receptores e está presente na superfície de quilomicrons, partículas de VLDL e HDL; sua deficiência leva a hiperlipidemia e aumento de partículas VLDL. Estes animais desenvolvem hipercolesterolemia grave e lesões ateroscleróticas que muito se assemelham às aquelas observadas em humanos (MEIR e LEITERSDORF, 2004).

A aterosclerose é definida como uma doença inflamatória, pois as lesões conjuntas observadas nesta doença representam uma série de respostas celulares e moleculares altamente específicas. Um dos principais fatores de risco é o colesterol plasmático elevado, principalmente o LDL, que leva a disfunção endotelial (ROSS, 1999). As lesões da aterosclerose ocorrem principalmente nas artérias musculares e elásticas, médias e grandes, e podem levar a isquemia cardíaca, cerebral, ou das extremidades, resultando no infarto.

### 2.2.3 CAMUNDONGOS DIABÉTICOS *db/db*

O modelo de camundongo com deficiência do receptor de leptina (*db/db*), desenvolvido inicialmente a partir do camundongo C57BL/Ks; é um modelo de obesidade e diabetes tipo 2 que não possui a ação hipotalâmica da leptina. Este camundongo é hiperfágico e obeso porque o receptor para leptina é, normalmente, responsável pela regulação da alimentação, ganho de peso e gasto energético. Por volta da oitava semana de vida, o *db/db* desenvolve diabetes grave, tem hiperinsulinemia precoce e, na maior parte dos estudos, apresenta níveis séricos aumentados de ácidos graxos e triglicérides (BUGGER e ABEL, 2009). A

FIGURA 1, abaixo, mostra, de forma esquemática, os possíveis mecanismos pelos quais ocorrem a cardiomiopatia diabética.

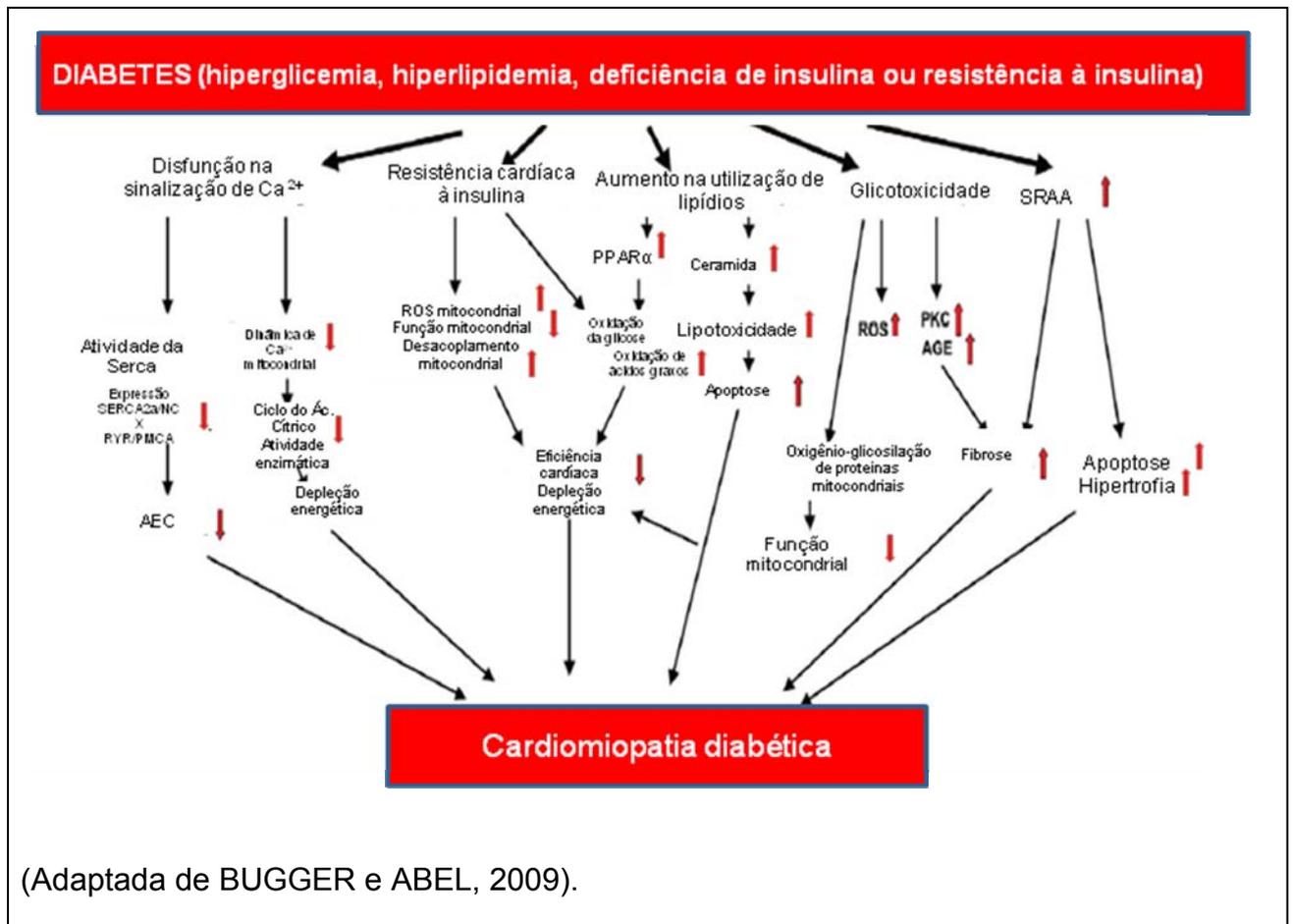


FIGURA 1 - Esquema representativo dos diferentes mecanismos envolvidos no desenvolvimento da cardiomiopatia diabética. Os cinco mecanismos principais e suas consequências são resumidos: disfunção na sinalização de cálcio, resistência à insulina do miocárdio, maior utilização de lipídios, glicotoxicidade e ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Os mecanismos que ligam a diabetes a estas vias não são completamente conhecidos e não se sabe se estas vias compartilham uma fisiopatologia comum. Além disso, estes mecanismos estão interrelacionados e podem exacerbar uns aos outros. SERCA2a,  $Ca^{2+}$ -ATPase 2a do retículo sarcoendoplasmático; NCX, trocador sódio cálcio; PMCA,  $Ca^{2+}$ ATPase da membrana plasmática; RyR, receptor da rianodina; AEC, acoplamento excitação-contração; ciclo do ácido tricarbóxico; PPAR $\alpha$ , receptor  $\alpha$  ativado pelos proliferadores dos peroxissomos; ROS, espécie reativa de oxigênio; PKC, proteína quinase C; AGE, produtos finais glicosilados avançados.

A perfusão de corações isolados de camundongos de *ob/ob* (que são obesos, resistentes à insulina e tem concentrações séricas aumentadas de ácidos graxos livres), com o palmitato, ácido graxo saturado, levou a efeitos de aumento no consumo de oxigênio e de redução no débito cardíaco. Além disso, os corações dos *ob/ob* apresentam uma redução na capacidade oxidativa mitocondrial e

desacoplamento mitocondrial induzido por excesso de ácidos graxos (MAZUMDER et al., 2004).

Os distúrbios contráteis são mais pronunciados nos *db/db* quando comparados aos *ob/ob*, provavelmente devido à hiperglicemia aparecer quando eles estão mais novos e por ser de maior gravidade. Estes camundongos desenvolvem hipertrofia cardíaca, observada através da técnica de IRM, por aumento da massa do ventrículo esquerdo e dalargura da parede. Através da ecocardiografia tem sido observado, nos *db/db*, redução na fração de encurtamento. Em corações isolados de *db/db*, há redução do débito cardíaco e da força cardíaca; além disto, tem sido observado aumento da pressão diastólica e do ventrículo esquerdo (BUGGER e ABEL, 2009).

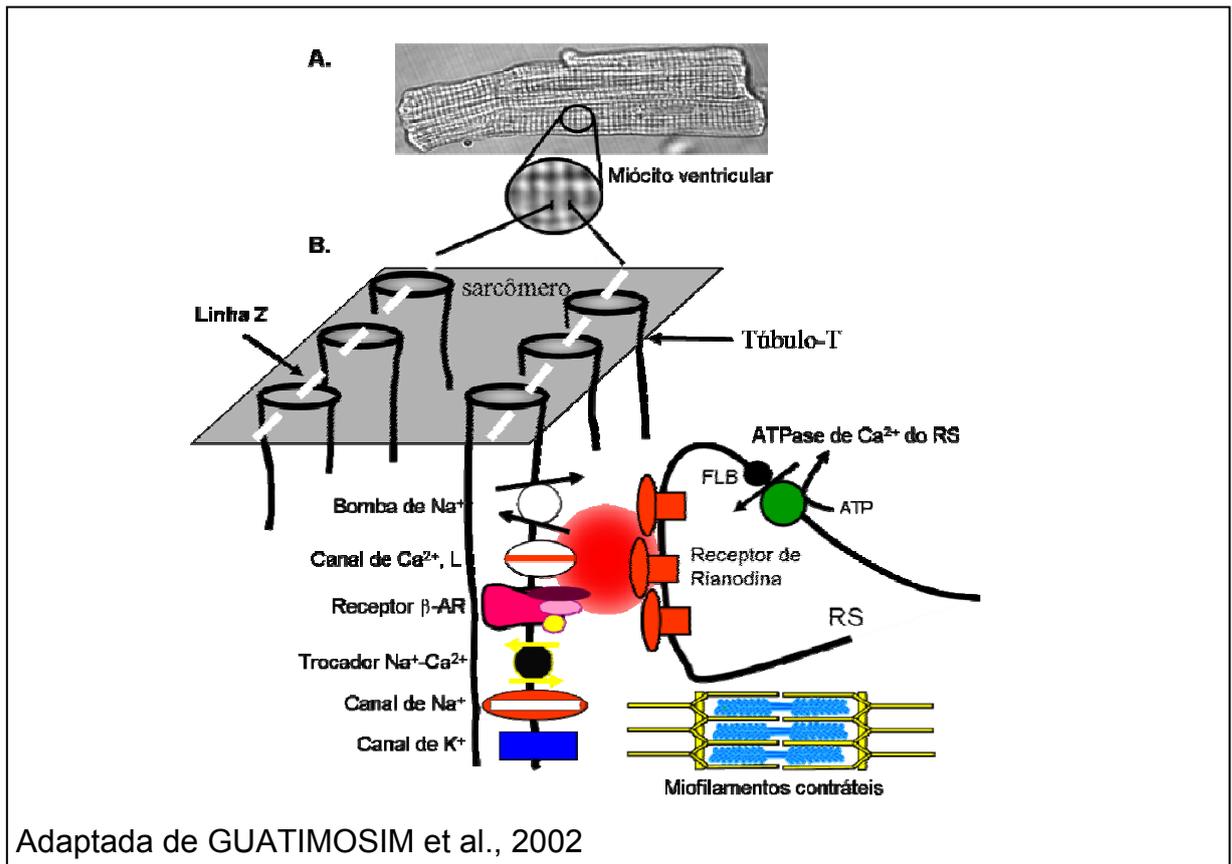
## 2.3 CÉLULA CARDÍACA:

A contração do músculo cardíaco é resultante da contração simultânea de todas as células musculares cardíacas. Cada célula se contrai em um único momento devido às características da estrutura da célula (KATZ, 2006).

### 2.3.1 SINALIZAÇÃO DE CÁLCIO NA CÉLULA CARDÍACA

Na célula muscular cardíaca (FIGURA 2), ou cardiomiócito, estão as unidades contráteis que são denominadas sarcômeros. Estes são delimitados pelas linhas Z. Entre as linhas Z existem invaginações da membrana plasmática, ou sarcolema, denominadas sistema tubular transverso, ou túbulos T. Ao longo do túbulo T estão os principais meios de entrada e saída do cálcio no citosol, o canal de cálcio tipo L e o trocador sódio/cálcio, respectivamente (KATZ, 2006).

A principal organela responsável por armazenar e liberar cálcio no interior do cardiomiócito, o retículo sarcoplasmático (RS), apresenta uma rede de membranas intracelulares. Durante a contração o RS serve como um dissipador de  $Ca^{2+}$  e, quando em relaxamento, serve como um reservatório. Nesta organela estão situados os canais de cálcio denominados receptores de rianodina (RYR), que liberam o cálcio para o citosol, e a ATPase de  $Ca^{2+}$  do RS (SERCA2a), que leva o cálcio de volta para o RS (SEVERS, 2000).



Adaptada de GUATIMOSIM et al., 2002

FIGURA 2 - Organização dos elementos envolvidos no acoplamento excitação-contracção no cardiomiócito. A. Imagem da célula cardíaca de mamíferos, mostrando as linhas Z delimitando a unidade funcional da célula cardíaca, o sarcômero. O espaço entre as linhas Z é de 1.8  $\mu\text{m}$ . B. Representação esquemática dos principais componentes do acoplamento excitação-contracção, incluindo os túbulos T e os diversos canais iônicos, transportadores, receptores e ATPases de  $\text{Ca}^{2+}$ . A organização da junção túbulo-T-retículo sarcoplasmático, do sub-espaço (15 nm) e a localização dos receptores de rianodina e canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo-L também estão representadas. O aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no sub-espaço (vermelho) é responsável pela ativação coordenada dos receptores de rianodina e conseqüente ativação da contracção celular.

A contracção da célula cardíaca inicia-se com a chegada de um potencial de acção que leva à despolarização do sarcolema e conseqüente abertura de canais de cálcio tipo L (dependentes de voltagem), também conhecidos como receptores de dihidropiridinas, resultando em um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca,L}}$ ). Este  $\text{Ca}^{2+}$ , por sua vez, é capaz de ativar canais de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares do RS, os RYR (BERS, 2002).

Localizados na superfície do RS, os RYR são sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e, quando estimulados, abrem-se e provocam um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ) e conseqüente ativação da maquinaria contrátil. O aumento transitório do  $\text{Ca}^{2+}$  no interior da célula recebe o nome de transiente de cálcio. A marcação do miócito ventricular cardíaco com uma sonda fluorescente sensível ao  $\text{Ca}^{2+}$  (Flúor-4) permite a visualização deste transiente através da técnica de microscopia confocal (KNOT et al., 2005).

Alguns fatores influenciam o transiente de  $\text{Ca}^{2+}$  como, por exemplo, as proteínas envolvidas na liberação e na recaptção de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para que a célula cardíaca relaxe, íons  $\text{Ca}^{2+}$  têm que se dissociar de seus sítios de ligação na troponina C e a concentração intracelular de cálcio deve ser reduzida (KNOT et al., 2005). A SERCA2a é a principal proteína responsável pela retirada de cálcio do citosol para o RS, facilitando, assim, o relaxamento cardíaco, sua função é, portanto, considerada fator determinante da contratilidade cardíaca. A função da SERCA2a é modulada por sua interação com a fosfoproteína fosfolambam. Esta fosfoproteína, quando não está fosforilada, inibe a SERCA2a. A fosforilação da fosfolambam pela proteína quinase, dependente de AMPc, associada ao RS, (PKA), ou pela proteína quinase II dependente de cálcio/calmodulina, (CaMKII), alivia esta inibição e aumenta a atividade da SERCA2a (VASANJI et al., 2006).

O cálcio é também retirado do citosol através do trocador sódio cálcio (NCX). O NCX pode trabalhar em dois sentidos, levando ao efluxo de cálcio ou ao influxo. Em condições normais, há predomínio do efluxo de cálcio pelo NCX mas, na doença cardíaca, pode haver um aumento na entrada de cálcio por esta proteína, para disponibilizar mais cálcio para a contração celular (BERS, 2002).

Em modelos de animais com insuficiência cardíaca, diabetes e hipertensão já foram relatados redução na expressão da SERCA2a, na fosforilação da fosfolambam, ou na função da proteína CaMKII, além de aumento na expressão do NCX (NATTEL et al., 2007, CHOI et al., 2002; VASANJI et al., 2006; SONG et al., 2005).

### 2.3.2 EFEITOS DAS DOENÇAS E DIETAS RICAS EM GORDURAS E CARBOIDRATOS SIMPLES NA FUNÇÃO DA CÉLULA CARDÍACA

Diversos estudos têm constatado a ocorrência de alterações na sinalização de cálcio, na célula cardíaca de modelos de animais que se alimentam de dietas ricas em gorduras e carboidratos simples (NISHINA, VERSTUYFT e PAIGEN, 1990), ou apenas de gorduras ou de carboidratos simples (WOLD et al., 2005).

Em estudo realizado por WOLD et al. (2005), observou-se um intervalo de tempo maior para retirada do  $\text{Ca}^{2+}$  do citosol e também para o relaxamento da célula; isto não foi relacionado com variação do conteúdo de SERCA2a, ou NCX ou do fosfolabam (que também não apresentou diferença na extensão da fosforilação). Os autores sugeriram que alterações funcionais observados no  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, precedem mudanças nas expressões destas proteínas.

Estudos com animais têm mostrado que a diabetes crônica está também associada com a redução da  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase das miofibrilas cardíacas, o que pode reduzir a capacidade do coração para gerar força para contração (DHALLA, LIU, PANAGIA e TAKEDA, 1998).

Cardiomiócitos de *ob/ob* e de *db/db* (FENG e JUN, 2007) apresentaram aumento de fluorescência quando foram incubados com a sonda DHE, que é sensível à produção de  $\text{O}_2^-$ ; indicando aumento na produção de superóxidos nestas células.

Recentemente, STØLEN et al., 2009, verificaram que a cardiomiopatia presente em modelo de diabetes (*db/db*) era evidenciada por redução na fração de encurtamento e no débito cardíaco in vivo, além de ser observada redução na contratilidade celular, disfunção na sinalização de cálcio, indução de hipertrofia patológica, falta de sincronia no processo AEC, associada com a redução na densidade de túbulos T. O estudo também observou maior liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo RS que, por sua vez, estava associado a maior fosforilação da CaMKII $\beta$  citosólica.

## 2.4. TRATAMENTO DE CÉLULAS CARDÍACAS COM ÁCIDOS GRAXOS

A apoptose da célula cardíaca está, frequentemente, associada à presença de ácidos graxos. No entanto, são observados efeitos diferenciados entre ácidos graxos saturados e não saturados.

### 2.4.1 ÁCIDO GRAXO SATURADO (PALMITATO)

Células cardíacas saudáveis usam glicose e ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) para suas necessidades energéticas. No processo de isquemia e reperfusão, há aumento dos níveis de AGCL no plasma e também nos tecidos locais. No processo de reperfusão do tecido isquêmico, cresce a utilização de AGCL para produção energética, em detrimento da glicose, o que leva a maior dano ao coração; o aumento da glicose na reperfusão previne, parcialmente, este dano. Os ácidos graxos circulantes são compostos principalmente do AGCL saturado palmitato e do não saturado oleato. No coração isolado de rato, o aumento na utilização de ácidos graxos no processo de isquemia e reperfusão produz ceramida, em associação com indicadores de morte celular programada. A elevação crônica de ácidos graxos séricos, em ratos geneticamente obesos, (*fa/fa*) também leva ao acúmulo de ceramida dependente da idade, e '*downregulation*' de uma das isoformas cardíaca da CPT-I e apoptose (SPARAGNA et al., 2000).

A sinalização de  $Ca^{2+}$  é alterada no diabetes tipo 2, sendo a cardiomiopatia diabética caracterizada por defeito na função do RS, o que resulta em transientes de  $Ca^{2+}$  menores e mais lentos. As mitocôndrias têm um papel no desenvolvimento das complicações da diabete; uma disfunção mitocondrial inclui redução na capacidade de utilizar  $Ca^{2+}$  e aumento na produção de ROS. Uma maior quantidade de ROS pode alterar a sinalização de  $Ca^{2+}$ , por interferir em uma ampla variedade de proteínas que estão implicadas no processo AEC. Foi verificado recentemente que um defeito na utilização de  $Ca^{2+}$  pelas mitocôndrias, em cardiomiócitos ventriculares de camundongos diabéticos *ob/ob*, estava associado com disfunções celulares globais na homeostase de  $Ca^{2+}$  (FAUCONNIER et al., 2007)

Em estudo realizado por FAUCONNIER et al. (2007), o uso do ácido graxo saturado palmitato reduziu, em células cardíacas de camundongos controle, a amplitude do transiente citosólico de  $Ca^{2+}$ , o armazenamento de  $Ca^{2+}$  no RS e

também o encurtamento celular, em 20%. Estas reduções foram prevenidas pelo uso do anti-oxidante N-acetilcisteína. Ao contrário, o palmitato melhorou a sinalização intracelular de  $Ca^{2+}$  em modelos de camundongos diabéticos *ob/ob*. Além disto, o mesmo estudo revelou que a incubação com o palmitato levava à dissipação do potencial de membrana mitocondrial e ao aumento da produção de ROS pelas mitocôndrias, em células cardíacas de camundongos controle, mas não nas de *ob/ob*. Os autores (FAUCONNIER et al., 2007) sugeriram que níveis altos de ácidos graxos podem ser vitais para a manutenção da sinalização de  $Ca^{2+}$ , e da contração celular, em condições de obesidade e resistência à insulina.

A participação do palmitato na morte celular é particularmente relevante, pois este ácido graxo produz efeitos deletérios na recuperação funcional do miocárdio e no processo de reperfusão, além de contribuir para arritmias fatais em crianças que nasceram com problemas na oxidação de ácidos graxos e em pacientes com doença cardíaca isquêmica. Por outro lado, a disfunção cardíaca na obesidade é causada por “lipoapoptose” que, por sua vez, pode ser prevenida reduzindo a gordura da dieta. Parece que o palmitato, ou seus metabólitos, atuam numa fase inicial da cascata apoptótica, que desencadeia a morte da célula cardíaca, aumentando a liberação de citocromo C. Isto leva à disfunção mitocondrial, por aumentar a permeabilidade mitocondrial e reduzir a atividade da CPT-I, ao mesmo tempo em que provoca o acúmulo de ceramidas e inibe o complexo mitocondrial (SPARAGNA et al., 2000; BUJA e McMILLINA, 2000).

Ácidos graxos, incluindo palmitato, estão presentes em altos níveis no sangue de pacientes que sofreram infarto agudo do miocárdio e são responsáveis por aumento na extensão da lesão miocárdica (KONG e RABKIN, 2000); sua ocorrência está relacionada ao aparecimento de arritmias cardíacas e liberação de enzimas a partir do miocárdio (OSTRANDER et al., 2001).

A natureza da morte celular induzida pelo palmitato, no entanto, não está bem caracterizada. Recentemente, foi demonstrada apoptose em linhagens de células murinas hematopoiéticas, astrócitos embrionários de galinha, células neuronais e beta-pancreáticas e cardiomiócitos de ratos neonatos. Os ácidos graxos estão também relacionados à indução da necrose; e o palmitato induz alterações das membranas, que são consistentes com a necrose. Não está claro, ainda, se a morte celular induzida pelo palmitato envolve a cascata das caspases, endonucleases e fatores que caracterizam o programa genético de morte celular por apoptose. Há

também a possibilidade de envolvimento dos mecanismos que levam à destruição da membrana celular e, conseqüentemente, à necrose (KONG e RABKIN, 2000).

O palmitato é incorporado na síntese *de novo* de ceramida, que é uma molécula sinalizadora de lipídio, relacionada à indução da apoptose. Tem sido proposto que o excesso de palmitato pode levar à morte celular por aumentar a concentração intracelular de ceramida (KONG e RABKIN, 2000) e por reduzir o metabolismo oxidativo de ácidos graxos (por exemplo, levando à queda da atividade da CPT-I e das atividades do complexo III da mitocôndria) (MARIN-GARCIA e GOLDENTHAL, 2002). Uma hipótese interessante é a de que o excesso de palmitato pode provocar outras mudanças nas mitocôndrias (que têm papel central no metabolismo do palmitato), que levariam à morte do cardiomiócito. Tais mudanças incluem alteração na respiração e produção de ATP, alteração da permeabilidade das mitocôndrias e formação de poros, sequestro de cálcio pelas mitocôndrias, geração de espécies reativas de oxigênio e ativação da cascata de caspases (KONG e RABKIN, 2000).

Um dos efeitos observados no início da indução de apoptose no cardiomiócito pelo palmitato é uma forte redução na síntese de cardiolipina mitocondrial; tal redução parece estar relacionada ao decréscimo da liberação de citocromo C e sugere uma modulação, pela cardiolipina, da associação de citocromo C com a membrana mitocondrial interna. A redução do metabolismo de ácidos graxos pelo palmitato, previamente mencionada, pode ser consequência deste efeito (MARIN-GARCIA e GOLDENTHAL, 2002).

Com o envelhecimento, ocorrem mudanças na composição de ácidos graxos na membrana: os níveis de ácidos graxos insaturados diminuem e os de saturados crescem. Diversos estudos têm demonstrado também que há redução nos níveis de cardiolipina, o que está associado com impacto na função de transporte, fluidez e estabilidade na membrana mitocondrial (MARIN-GARCIA e GOLDENTHAL, 2002).

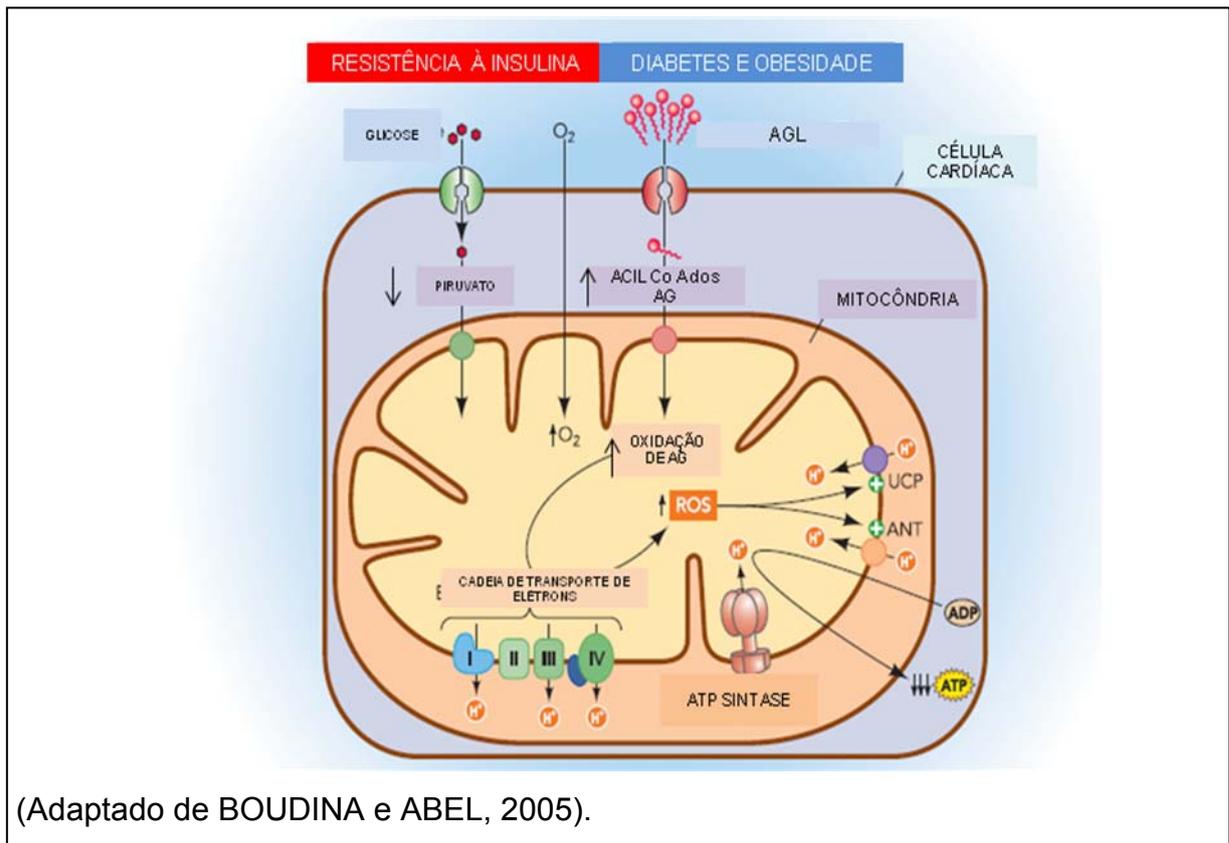


FIGURA 3 - Mecanismo proposto para a redução da eficiência cardíaca em corações diabéticos. No diabetes aumenta a liberação de ácidos graxos para o coração. Diversos mecanismos mantêm o crescimento da utilização miocárdica de ácidos graxos e da oxidação mitocondrial de ácidos graxos. A utilização da glicose é reciprocamente reduzida. Intensificação da oxidação de ácidos graxos aumenta o número de equivalentes de redução da cadeia de transporte de elétrons, o que leva a aumento de superóxidos (ROS) e peróxidos de lípidios, que ativam proteínas de desacoplamento e translocador de nucleotídeo de adenina (ANT). Desacoplamento mitocondrial leva a aumento no consumo de oxigênio no coração diabético e pode aumentar a oxidação de ácidos graxos ainda mais. Maior consumo de oxigênio, sem que haja aumento na produção de trabalho, reduz a eficiência do miocárdio. A ativação da UCP e/ou perda de prótons, mediada por ANT, reduz a força motiva de prótons que produz a síntese de ATP. A redução da síntese de ATP irá contribuir para a redução das reservas de alta energia e, potencialmente, contribuir para a disfunção contrátil

#### 2.4.2 ÁCIDO GRAXO INSATURADO, ÁCIDO EICOSAPENTAENÓICO (EPA)

Aumento do consumo de ácidos graxos poliinsaturados (EPA e docosahexanóico), por ingestão de peixe, reduz o risco de morte súbita em pacientes que já sofreram infarto do miocárdio. Como a morte súbita é precedida de arritmias ventriculares, estas observações sugerem efeito anti-arrítmico destes ácidos graxos. Os mecanismos para estas ações ainda são pouco conhecidos. Em experimentos com cardiomiócitos, a incubação com os ácidos graxos poliinsaturados leva à redução do potencial de ação, em consequência do remodelamento iônico de várias correntes iônicas, como a corrente de sódio ( $I_{Na}$ ) e a do tipo L de cálcio ( $I_{Ca,L}$ ).

Um menor potencial de ação previne a sobrecarga de cálcio e a pós-despolarização tardia, havendo maior intervalo diastólico e maior tempo para retirada do cálcio. Além disto, este tipo de tratamento agudo de incubação de cardiomiócitos de ratos adultos e neonatos com ácidos graxos poliinsaturados está associado à redução do transiente de cálcio e à inibição de sparks (DEN RUIJTER et al., 2008).

Na presença de ácidos graxos insaturados não são observados efeitos de apoptose, como os causados pela oxidação de ácidos graxos saturados durante a isquemia, ou pela exposição de cardiomiócitos de neonatos a concentrações elevadas de palmitato. O tratamento com palmitato ativa a caspase-3, translocação do Bax para a mitocôndria e leva a liberação do citocromo C; ações que são prevenidas pelo EPA (LEROY et al., 2008).

## 2.5 TREINAMENTO FÍSICO AERÓBIO

### 2.5.1 EFEITOS GERAIS

A inatividade física é reconhecida como um problema de saúde pública. Incentivos tecnológicos e econômicos tendem a desencorajar a prática de atividade física, por proporcionarem redução da energia necessária às atividades diárias e por valorizarem mais o trabalho sedentário. Em 1995, o Colégio Americano de Medicina Esportiva elaborou um guia que, em síntese, propunha à população americana que acumulasse, no mínimo, 30 minutos por dia de atividade física de intensidade moderada, de preferência em todos os dias da semana. Passados mais de 10 anos, poucas alterações foram observadas e diversas doenças estão evidenciadas como inversamente relacionadas à prática de atividade física (HASKELL et al., 2007).

O treinamento de resistência aeróbia induz diversas adaptações morfológicas e metabólicas no músculo esquelético, que incluem geração de mitocôndrias e maior capacidade de oxidar substratos como glicose e gorduras. Estas adaptações ao treinamento físico têm grande relevância científica e clínica por causa da conexão entre aumento da atividade física e melhora de saúde, relacionada a metabolismo, redução do risco de diversas doenças crônicas, incluindo obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 (LITTLE et al., 2010)

O fenótipo obeso/resistente à insulina, além de apresentar acúmulo de lipídios, é caracterizado por uma falha na capacidade de oxidar ácidos graxos, que

está associado a uma redução na atividade da CPT1, o passo limitante da oxidação mitocondrial de ácidos graxos. É possível que a incapacidade de transportar e oxidar ácidos graxos nas mitocôndrias dos músculos esqueléticos seja um fator agravante do acúmulo de lipídios. Com base nesta possibilidade, tem sido proposto que intervenções (como, por exemplo, o treinamento aeróbio) que aumentem a oxidação de ácidos graxos, exerçam um efeito exacerbador da sensibilidade à insulina no músculo esquelético, reduzindo o acúmulo de lipídios citosólicos (BRUCE et al., 2006).

Em estudo realizado para decifrar os mecanismos que aumentaram a sensibilidade à insulina, em homens treinados aerobiamente, HARDIN et al., 1995, verificaram que, no músculo treinado, estimulado por uma solução hiperinsulinêmica, houve um aumento em torno de 30% do fluxo sanguíneo. Os autores também verificaram um aumento acentuado na expressão do transportador de glicose: GLUT-4. Em outro estudo, GOODPASTER et al., 2001, verificaram que músculos esqueléticos de atletas treinados aerobiamente, além de apresentarem uma sensibilidade elevada à insulina, possuem uma alta capacidade oxidativa, independente de ter conteúdo lipídico elevado. Eles sugeriram que a capacidade para oxidar lipídios pode ter um papel mediador importante na associação entre excesso de acúmulo de lipídios no músculo e resistência à insulina.

Estudos recentes sugerem que o treinamento físico (TR) aeróbio, em pacientes com insuficiência cardíaca, aumenta a capacidade cardiovascular, leva à redução de deposição de gordura nas artérias e à hipertrofia cardíaca fisiológica compensatória, garantindo maior força de contração e melhor débito cardíaco (WISLØFF et al., 2001). O TR é utilizado para melhorar, e manter, a capacidade física para o exercício; deve ser realizado de forma gradativa, com intensidades determinadas através de testes de capacidade física máxima (FERREIRA et al., 2007).

Além disto, de acordo com estudo de ROBERTS e BARNARD (2005), há cada vez maior evidência de que a atividade física e a dieta podem reduzir o risco de um grande número de doenças crônicas, inclusive a doença cardíaca, hipertensão, diabetes e síndromes metabólicas, vários tipos de câncer, e, em muitos casos, podem até reverter o curso de uma doença pré-existente. Por outro lado, os mecanismos moleculares pelos quais a atividade física, e/ou a dieta, atuam na proteção contra doenças, não são completamente conhecidos; em particular, os

mecanismos moleculares envolvidos na função da célula cardíaca. A compreensão destes mecanismos pode identificar alvos moleculares. ROBERTS e BARNARD (2005) sugerem como possíveis mecanismos para a redução do risco de doença cardíaca coronariana (DCC) pela atividade física, efeitos induzidos nos lipídios plasmáticos, na função endotelial, na sensibilidade à insulina, e na pressão arterial. Além disto, o exercício aumenta os níveis de enzimas antioxidantes, como a dismutase de superóxidos e peroxidase de glutathione. Também relatam que já foi comprovada redução na produção de citocinas aterogênicas e aumento na produção de citocinas ateroprotetivas, pelo treinamento físico.

Em animais *apoe KO* (semelhantes aos que foram utilizados no nosso estudo, que desenvolvem hipercolesterolemia) foi observado que o treinamento físico aeróbio crônico revertia a aterogênese crônica induzida por um antagonista da NO sintase (NIEBAUER et al., 2003).

### 2.5.2 EFEITOS ESPECÍFICOS NO CORAÇÃO

As células cardíacas, tanto de ratos saudáveis, quanto de ratos com insuficiência cardíaca, submetidos ao treinamento físico aeróbio, apresentam expressões aumentadas da SERCA2a (KEMI et al., 2007; MEDEIROS, 2008). Foi visto também que cardiomiócitos de ratos que ingeriram sacarose na água apresentaram disfunção contrátil, e que esta disfunção foi revertida pela prática de exercício livre em roda presa à gaiola (DAVIDOFF et al, 2004).

Em estudo recente com camundongos *db/db*, STØLEN et al., 2009, observaram que a reversão, pelo treinamento físico, da função contrátil da célula cardíaca estava associada com a normalização da sincronicidade na liberação de  $Ca^{2+}$  pelo RS, a densidade de túbulos T, a amplitude de encurtamento, as atividades da SERCA e do NCX e com o vazamento de  $Ca^{2+}$  pelo RS. No entanto, naquele estudo, a biogênese mitocondrial do co-ativador alfa 1 do receptor gama ativado pelo proliferador do peroxissomo (PGC-1 $\alpha$ ) não foi modificada e o treinamento físico não alterou as concentrações séricas de glicose e insulina.

Um dos efeitos benéficos mais relatados do treinamento físico, no desempenho do miocárdio, é o de aumentar a expressão do transportador de glicose (GLUT-4) em células cardíacas de animais diabéticos e normais; o que sugere maior capacidade de utilizar glicose e exercer um efeito protetor, no caso de um episódio

de isquemia (OSBORN et al., 1997). Além disto, antagonistas de  $\text{Ca}^{2+}$ , intervenções metabólicas e exercício físico, aumentam a função contrátil do coração diabético, por aumentar a expressão da  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase das miofibrilas (DHALLA, et al., 1998).

Em condições fisiológicas, os ácidos graxos são responsáveis por 60 a 80% do consumo de oxigênio para produção energética cardíaca. Estudos mostram que o treinamento físico reduz a perda da capacidade de metabolizar ácidos graxos no coração, no processo de envelhecimento (IEMITSU et al., 2002). No entanto, os mecanismos responsáveis por este benefício ainda não são claros; IEMITSU et al., 2002 demonstraram que o treinamento físico atenua a redução, induzida pela idade, do percentual de expressão do RNAm do gene que codifica o PPAR $\alpha$  e da expressão protéica de PPAR $\alpha$ , que é um regulador transcricional dos genes das enzimas metabólicas de ácidos graxos no coração

Em estudo inédito e importante, BURELLE et al. (2004) verificaram aumento na taxa de oxidação de palmitato em corações de ratos treinados, antes e após a isquemia. Naquele estudo, eles relatam já ter sido constatado que o treinamento em esteira aumenta a oxidação da palmitoil-carnitina em homogenato de camadas sub-endocárdias de ventrículo esquerdo; aumenta a atividade da CPT-1 do miocárdio e reduz a sensibilidade do miocárdio a alterações de pH

A utilização celular representa outro ponto importante do controle da oxidação de ácidos graxos que pode ser afetado pelo treinamento. No estudo mencionado no parágrafo anterior (BURELLE et al., 2004), não foram verificadas alterações, em coração de ratos treinados, na expressão de duas proteínas envolvidas no transporte de ácidos graxos pelo sarcolema (FAT/CD36 e FABPpm). No entanto, a oxidação de ácidos graxos aumentou com o treinamento e os autores sugerem que pode ter havido uma translocação na distribuição subcelular do FAT/CD36 para o sarcolema.

A constatação de que o aumento da taxa de oxidação de ácidos graxos de ratos treinados está associado a uma resposta cardíaca melhor após a isquemia, reforça a hipótese de que o aumento na oxidação de ácidos graxos, pelo treinamento, protege o coração de efeitos nocivos dos ácidos graxos após a isquemia, principalmente em concentrações elevadas de ácidos graxos, como as utilizadas no trabalho do grupo. O aumento das taxas de oxidação de ácidos graxos dos corações treinados pode, parcialmente, prevenir o acúmulo de ácidos graxos e limitar seus efeitos tóxicos no citosol e nas mitocôndrias. As observações já

realizadas sugerem que estas hipóteses venham a ser mais investigadas. Além disto, a oxidação fracional da glicose foi maior nos corações de ratos treinados, antes e após a isquemia, apesar do aumento verificado nas taxas de oxidação de ácidos graxos nestes corações. Esta observação sugere que os efeitos deletérios decorrentes dos altos níveis de ácidos graxos que podem ocorrer no metabolismo da glicose, durante a reperfusão, foram reprimidos nos corações de ratos treinados, possibilidade que também requer mais estudos no futuro (BURELLE et al., 2004).

Outra observação interessante feita por BURELLE et al.(2004) é a de que avaliar o conteúdo de proteínas, ou enzimas relevantes, em um via metabólica, é insuficiente para tirar conclusões sobre fluxo metabólico no órgão intacto e sobre como este fluxo é controlado.

Neste trabalho nós nos propusemos a investigar a relação entre o aumento de ácidos graxos, a sinalização de  $Ca^{2+}$  e sua interação com o treinamento físico, tendo como foco principal, o cardiomiócito ventricular.

### 3 OBJETIVOS

Estudar os efeitos de tratamentos *in vivo* ou *in vitro*, com ácidos graxos, na sinalização intracelular de cálcio de camundongos treinados ou não.

### 4 RESULTADOS

Cardiomiócitos de camundongos ApoE KO tratados com dieta rica em gorduras *trans* e carboidratos simples (GC) e camundongos C57/BL6 controle que, com a mesma dieta, apresentaram valores altos de colesterol, glicose e menor sensibilidade à insulina; os cardiomiócitos dos camundongos ApoE KO e C57/BL6 tratados com a dieta GC, apresentaram disfunção na sinalização intracelular de cálcio, caracterizada por redução na amplitude e aumento do tempo de decaimento do transiente de  $Ca^{2+}$ . O treinamento físico aeróbio, por 6 semanas, reverteu a disfunção na sinalização intracelular de cálcio dos camundongos controle e ApoE KO, tratados com a dieta GC, atenuou a resistência à insulina em camundongos C57/BL6 mas não induziu outras melhoras metabólicas. Em uma segunda etapa do estudo, cardiomiócitos de camundongos diabéticos (*db/db*) e controle foram incubados com o ácido graxo saturado palmitato e o insaturado (EPA). As células de *db/db* apresentaram disfunções na sinalização de cálcio e isto não foi agravado pelos ácidos graxos; por outro lado, em cardiomiócitos do grupo controle, a sinalização de cálcio era normal, mas apresentava disfunções na presença destes ácidos graxos. Comparamos os efeitos destas incubações em cardiomiócitos de camundongos controle submetidos ou não a um programa de treinamento físico aeróbio. Células de camundongos treinados apresentaram um aumento da liberação global de  $Ca^{2+}$  que não foi alterada pela exposição ao palmitato ou ao EPA. Além disso, em cardiomiócitos de camundongos controle não treinados, a incubação com o palmitato levou a maior produção de ROS, fato que foi completamente revertido quando usados cardiomiócitos dos camundongos treinados. A disfunção na sinalização de  $Ca^{2+}$  observada nas células de camundongos controle não pôde ser explicada por uma alteração na duração do potencial de ação, uma vez que esta não se mostrou diferente nas células de treinados, ou não treinados, na presença ou ausência dos ácidos graxos.

## 5 CONCLUSÕES

As principais conclusões do presente estudo foram:

1) a presença de altas doses de ácidos graxos saturados, nos cardiomiócitos, está associada à disfunção da sinalização intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  e ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS);

2) os cardiomiócitos de camundongos *db/db* são refratários às alterações na sinalização intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  induzidas por altas doses de ácidos graxos saturados e insaturados;

3) a presença de altas doses de ácidos graxos insaturados, nos cardiomiócitos, leva à redução da amplitude do transiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , sugerindo que as melhoras observadas por ação deste ácido graxo envolvam outros mecanismos no cardiomiócito, como por exemplo, a redução na produção de ROS;

4) o treinamento físico aeróbio melhora a sinalização de cálcio, mesmo na presença de doses altas de ácidos graxos saturados e *trans*, tidos como não saudáveis, provavelmente por induzir a redução da produção de superóxidos pelas mitocôndrias e aumentar a capacidade oxidativa da célula.

## REFERÊNCIAS

- ABEL, E.D.; LITWIN, S.E. e SWEENEY, G. Cardiac remodeling in obesity. **Physiol. Rev.**, v. 88, p. 389 - 419, 2008.
- ADES, P. A. e SAVAGE, P.D. The Obesity Paradox: perception vs. knowledge. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 85, n. 2, p. 112-114, 2010.
- ARTHAM, S.M., LAVIE, C.J., PATEL, H.M. e VENTURA, H.O. Impact of obesity on the risk of heart failure and its prognosis. **J. Cardiometab. Syndr.**, v.3, n.3, p.155-161, 2008.
- BERS, D.M. Cardiac excitation-contraction coupling. **Nature**, n. 415, p.198-205, 2002.
- BOOTH, F.W.; GORDON, S.E.; CARLSON, C.J. e HAMILTON, M.T. Waging war on modern chronic diseases: primary prevention through exercise biology. **J. Appl. Physiol.**, v. 88, p.:774-787, 2000.
- BOUDINA, S e ABEL, E.D. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. **Physiology**, v.21, p. 250–258, 2005.
- BOUDINA, S.; SENA, S.; O'NEILL, B.T.; TATHIREDDY, P.; YOUNG, M.E. e ABEL, E.D. Reduced mitochondrial oxidative capacity and increased mitochondrial uncoupling impair myocardial energetics in obesity. **Circulation**, v. 112, p. 2686-2695, 2005.
- BRUCE, C.R.; THRUSH, A.B.; MERTZ, V.A.; BEZAIRE, V.; CHABOWSKI, A.; HEIGENHAUSER, G.J.F. e DYCK, D.J. Endurance training in obese humans improves glucose tolerance and mitochondrial fatty acid oxidation and alters muscle lipid content. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 291, p. E99–E107, 2006.
- BUGGER, H e ABEL, E.D. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. **Disease Models e Mechanisms**, v.2, p. 454-466, 2009.
- BUJA, L.M. e MCMILLINA, J.B. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v.279, p. H2124–H2132, 2000.
- BURELLE, Y.; WAMBOLT, R.B.; GRIST, M.; PARSONS, H.L.; CHOW, J.C.F.; ANTLER, C.; BONEN, A.; KELLER, A.; DUNAWAY, G.A.; POPOV, K.M.; HOCHACHKA, P.W. e ALLARD, M.F. Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 287, p.H1055–H1063, 2004.
- CARLEY, A.N.; ATKINSON L.L.; BONEN, A.; HARPER, M.E.; KUNNATHU, S.; LOPASCHUK, G.D. e SEVERSON D.L. Mechanisms responsible for enhanced fatty acid utilization by perfused hearts from type 2 diabetic db/db mice. **Arch. Physiol. Biochem.**, v. 113, n. 2, p. 65-75, 2007.

CASSAGNO, N.; PALOS-PINTO, A.; COSTET, P.; BREILH, D.; DARMON, M. e BÉRARD, A.M. Low amounts of trans 18 : 1 fatty acids elevate plasma triacylglycerols but not cholesterol and alter the cellular defence to oxidative stress in mice. **British Journal of Nutrition**, v.94, p.346-352, 2005.

CHOI, K.M.; ZHONG Y.; HOIT, B.D.; GRUPP, I.L.; HAHN, H.; DILLY, K.W.; GUATIMOSIM, S.; LEDERER, W.J. e MATLIB, M.A. Defective intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling contributes to cardiomyopathy in Type 1 diabetic rats. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, n.4, p. H1398-408, 2002.

CRIMI, E.; IGNARRO, L.J.; CACCIATORE, F. e NAPOLI, C. Mechanisms by which exercise training benefits patients with heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, v.6, p. 292-300, 2009.

DAVIDOFF, A.J.; MASON, M.M.; DAVIDSON, M.B.; CARMODY, M.W.; HINTZ, K.K.; WOLD, L.E., PODOLIN, D.A. e REN, J. Sucrose-induced cardiomyocyte dysfunction is both preventable and reversible with clinically relevant treatments. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 286: p. E718–E724, 2004.

DAVIDOFF, A.J. Convergence of glucose- and fatty acid-induced abnormal myocardial excitation-contraction coupling and insulin signalling. **Proceedings of the Australian Physiological Society**, v. 36, p. 45-53, 2006.

DELICHEV, S.D.; GEORGIEVA, K.N.; KOEVA, Y.A. e ATANASSOVA, P.K. Bcl-2/Bax ratio, mitochondrial membranes and aerobic enzyme activity in cardiomyocytes of rats after submaximal training. **Folia Med.**, v.48, n.2, p.50-6, 2006.

DEN RUIJTER, H.M.; BERECKI, G.; VERKERK, A.O.; BAKKER, D.; BAARTSCHEER, A.; SCHUMACHER, C.A.; BELTERMAN, C.N.W.; DE JONGE, N.; FIOLET, J.W.T.; BROUWER, I.A. e CORONEL, R. Acute administration of fish oil inhibits triggered activity in isolated myocytes from rabbits and patients with heart failure. **Circulation**, v.117, p.536-544, 2008.

DESAI, M.S.; MARISCALCO, M.M.; TAWIL, A.; VALLEJO, J.G. e SMITH, C.W. Atherogenic diet-induced hepatitis is partially dependent on murine TLR4. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p.1336-1344, 2008.

DHALLA, N.S.; LIU, X.; PANAGIA, V. e TAKEDA, N. Subcellular remodeling and heart dysfunction in chronic diabetes. **Cardiovascular Research**, v. 40, p. 239 –247, 1998.

DYNTAR, D.; SERGEEV, P.; KLISIC, J.; AMBUHL, P.; SCHAUB, M.C. e DONATH, M.Y. High glucose alters cardiomyocyte contacts and inhibits myofibrillar formation. **The Journal of Clinical Endocrinology e Metabolism**, v. 91, n.5, p.1961–1967, 2006.

FAUCONNIER, J.; ANDERSSON, D.C.; ZHANG, S.J.; LANNER, J.T.; WIBOM, R.; KATZ, A.; BRUTON, J.D. e WESTERBLAD, H. Effects of palmitate on Ca<sup>2+</sup> handling in adult control and ob/ob cardiomyocytes. Impact of mitochondrial reactive oxygen species. **Diabetes**, v.56, p.1136–1142, 2007.

FENG, D. e JUN, R. Fidarestat improves cardiomyocyte contractile function in db/db diabetic obese mice through a histone deacetylase Sir2-dependent mechanism. **Journal of Hypertension**, v. 25, n.10, p. 2138-2147, 2007.

FERREIRA, J.C.; ROLIM, N.P.; BARTHOLOMEU, J.B.; GOBATTO, C.A.; KOKUBUN, E. e BRUM, P.C. Maximal lactate steady state in running mice: effect of exercise training. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.34, n.8, p. 760-5, 2007:

FINCK, B.N.; HAN, X.; COURTOIS, M.; AIMOND, F., NERBONNE, J.M.; KOVACS, A.; GROSS, R.W. e KELLY, D.P. A critical role for PPAR $\alpha$ -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content. **PNAS**, v.100, n. 3, 1226-1231, 2003.

GETZ, G.S. e REARDON, C.A. Diet and murine atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.26, p.242-249, 2006.

GHOSH, S.; PULINILKUNNIL, T.; YUEN, G.; KEWALRAMANI, G.; AN, D.; QI, D.; ABRAHANI, A. e RODRIGUES, B. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 289, p. H768-H776, 2005.

GOODPASTER, B.H.; HE, J.; WATKINS, S. e KELLEY, D.E Skeletal muscle lipid content and insulin resistance: evidence for a paradox in endurance-trained athletes. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, n.12, p.5755-61, 2001.

GUATIMOSIM, S.; SOBIE, E. A.; DOS SANTOS CRUZ, J.; MARTIN, L.A.; e LEDERER, W.J. Molecular identification of a TTX-sensitive Ca(2<sup>+</sup>) current. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 280, n.5:p. C1327-39, 2001.

GUATIMOSIM, S.; DILLY, K.; SANTANA, L.F.; JAFRI, M.S.; SOBIE, E.A. e LEDERER, W.J. Local Ca(2<sup>+</sup>) signaling and EC coupling in heart: Ca(2<sup>+</sup>) sparks and the regulation of the [Ca(2<sup>+</sup>)]<sub>i</sub> transient. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 34, n.8, p. 941–950, 2002.

HAFSTAD, A.D.; SOLEVÅG, G.H.; SEVERSON, D.L.; LARSEN, T.S. e AASUM, E. Perfused hearts from Type 2 diabetic (db/db) mice show metabolic responsiveness to insulin. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 290, p. H1763-H1769, 2006.

HAIM, T. E.; WANG, W; FLAGG, T. P.; TONES, M. A.; BAHINSKI, A.; NUMANN, R. E.; NICHOLS, C. G. e NERBONNE, J. M. Palmitate attenuates myocardial contractility through augmentation of repolarizing Kv currents. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 2, p. 395-405, 2010.

HALLAQ, H; SMITH, T.W., e LEAF, A. Modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in heart cells by fish oil fatty acids. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.89, p. 1760-1764, 1992.

HARDIN, D.S.; AZZARELLI, B.; EDWARDS, J; WIGGLESWORTH, J.; MAIANU, L.; BRECHTEL, G.; JOHNSON, A.; BARON, A. e GARVEY, W.T. Mechanisms of enhanced insulin sensitivity in endurance-trained athletes: effects on blood flow and differential expression of GLUT 4 in skeletal muscles. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.80, p. 2437-2446, 1995.

HARMANCEY, R.; WILSON, C.R. e TAEGTMEYER, H. Adaptation and Maladaptation of the Heart in Obesity. **Hypertension**, v. 52 n. 2, p. 181-187, 2008.

HASKELL, W.L.; LEE, I.M.; PATE, R.R.; POWELL, K.E.; BLAIR, S.N.; FRANKLIN, B.A.; MACERA, C.A.; HEATH, W.; THOMPSON, P.D. e BAUMAN, A. Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. **Med. Sci. Sports Exerc.**, v. 39, n. 8: p. 1423–1434, 2007.

HOUWARD, J.A. Do the mitochondria of obese individuals respond to exercise training? **J. Appl. Physiol.**, v. 103, p. 6-7, 2007.

IEMITSU, M.; MIYAUCHI, T.; MAEDA, S.; TANABE, T.; TAKANASHI, M.; IRUKAYAMA-TOMOBE, Y., SAKAI, S.; OHMORI, H.; MATSUDA, M. e YAMAGUCHI, I. Aging-induced decrease in the PPAR- $\alpha$  level in hearts is improved by exercise training. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 283, p H1750-H1760, 2002.

IKEMOTO, S.; TAKAHASHI, M.; TSUNODA, N.; MARUYAMA, K.; ITAKURA, H.; KAWANAKA, K.; TABATA, I.; HIGUCHI, M.; TANGE, T.; YAMAMOTO, T.T. e EZAKI, O. Cholate inhibits high-fat diet-induced hyperglycemia and obesity with acyl-CoA synthetase mRNA decrease. **Am. J. Physiol.**, v. 273, n. 1Pt.1, p. E37-45, 1997.

JAHANGIRI, A.; LEIFERT, W.R.; KAREN L. KIND, K.L.; e MCMURCHIE, E.J. Dietary fish oil alters cardiomyocyte  $Ca^{2+}$  dynamics and antioxidant status. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1592-1602, 2006.

KADOWAKI, T.; HARA, K.; YAMAUCHI, T.; TERAUCHI, Y.; TOBE, K. e NAGAI, R. Molecular mechanism of insulin obesity. **Exp. Biol. Med.**, v. 228, p.1111–1117, 2003

KATZ, A. **Physiology of the heart**. Lippincott Williams e Wilkins, 4<sup>th</sup> ed. 2006.

KEMI, O.J.; ELLINGSEN, O.; CECI, M.; GRIMALDI, S.; SMITH, G.L.; CONDORELLI, G. e WISLØFF, W. Aerobic interval training enhances cardiomyocyte contractility and  $Ca^{2+}$  cycling by phosphorylation of CaMKII and Thr-17 of phospholamban. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.43, p.354–361, 2007.

KIEN, C.L.; BUNN, J. Y. e UGRASBUL, F. Increasing dietary palmitic acid decreases fat oxidation and daily energy expenditure **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 2, p. 320-326, 2005.

KONG, J.Y. e SIMON W. RABKIN, S.W. Palmitate-induced apoptosis in cardiomyocytes is mediated through alterations in mitochondria: prevention by cyclosporin A. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1485, p. 45-55, 2000.

KREGE, J.H.; HODGIN, J.B.; HAGAMAN, J.R. e SMITHIES, O. A Noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. **Hypertension**, v. 25, p. 1111-1115, 1995.

KNOT, H.J.; LAHER, I.; SOBIE, E.A.; GUATIMOSIM, S.; GOMEZ-VIQUEZ, L.; HARTMANN, H.; SONG, .L.; LEDERER, W.J.; GRAIER, W.F.; MALLI, R.; FRIEDEN, M. e PETERSEN, O. Twenty years of calcium imaging: cell physiology to dye for. **Molecular Interventions**, v.5, p.112-127, 2005.

KOVES, T.R.; LI, P., AN J.; AKIMOTO, T.; SLENTZ, D.; ILKAYEVA, O.; DOHM, G.L.; YAN, Z.; NEWGARD, C.B. e MUOIO, D.M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1alpha-mediated metabolic remodeling of skeletal myocytes mimics exercise training and reverses lipid-induced mitochondrial inefficiency. **J. Biol. Chem.**, v.30, n. 39, p 33588-98, 2005

LARSEN, T.S. e SEVERSON, D.L. Influence of exogenous fatty acids and ketone bodies on rates of lipolysis in isolated ventricular myocytes from normal and diabetic rats. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 68, n.9, p. 1177–1182, 1990.

LAVIE, C.J.; MILANI, R.V. e VENTURA, H.O. Obesity and cardiovascular disease: risk factor, paradox, and impact of weight loss. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 21, 2009.

LEAF A.; KANG, J.X.; XIAO, Y.F. e BILLMAN, G.E. Clinical prevention of sudden cardiac death by n–3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n–3 fish oils. **Circulation**, v.107, p. 2646–52, 2003.

LEBECHE, D.; KAPRIELIAN, R. e HAJJAR, R. Modulation of action potential duration on myocyte hypertrophic pathways. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 40, n. 5, p. 725-735, 2006.

LEROY, C.; TRICOT, S.; LACOUR, B e GRYNBERG A. Protective effect of eicosapentaenoic acid on palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes. **Biochim Biophys Acta.**, v.1781, n.11-12, p.685-93, 2008.

LITTLE, J.P.; SAFDAR, A.; WILKIN, G.P. TARNOPOLSKY, M.A. e GIBALA, M.J. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms. **The Journal of Physiology**, v. 588, p. 1011-1022, 2010.

MACHADO, R.M.; STEFANO, J.T.; OLIVEIRA C.P.M.S.; MELLO, E.S.; FERREIRA, F. D.; NUNES, V.S.; LIMA, V.M.R.; QUINTÃO, E. C. R.; CATANOZI, S.; NAKANDAKARE, E.R. e LOTTENBERG, A.M.P. Intake of trans fatty acids causes nonalcoholic steatohepatitis and reduces adipose tissue fat content. **Journal of Nutrition**, v. 140, n. 6, p.1127-1132, 2010.

MARIN-GARCIA, J.M. e GOLDENTHAL, M.J. Fatty acid metabolism in cardiac failure: biochemical, genetic and cellular analysis. **Cardiovascular Research**, n.54, p. 516–527 2002.

MARKS, A. Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. **Circ. Res.**, n. 87, p.8-11, 2000.

MAZUMDER, P.K.; O'NEILL, B.T.; ROBERTS, M.W.; BUCHANAN, J.; YUN, U.J.; COOKSEY, R.C.; BOUDINA, S. e ABEL, E.D. Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. **Diabetes**, v. 53, p. 2366–2374, 2004.

McAULEY, P.A.; KOKKINOS, P.F.; OLIVEIRA, R.B.; EMERSON, B.T. e MYERS J.N. Obesity paradox and cardiorespiratory fitness in 12,417 male veterans aged 40 to 70 years. **Mayo Clin. Proc.**, v. 85, n.2, p. 115-121, 2010.

MEDEIROS, A.; ROLIM, N.P.L., OLIVEIRA, R.S.F; ROSA, K.T.; MATTOS, K.C.; CASARINI, D.E.; IRIGOYEN, M.C.; KRIEGER, E.M.; KRIEGER, J.E.; NEGRÃO, C.E. e BRUM, P.C. Exercise training delays cardiac dysfunction and prevents calcium handling abnormalities in sympathetic hyperactivity-induced heart failure mice. **J. Appl. Physiol.**, v. 104, p. 103-109, 2008.

MEIR, K.S. e LEITERSDORF, E. Atherosclerosis in the apolipoprotein E–deficient mouse: a decade of progress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, n. 24, p.1006-1014, 2004.

MITRA, R. e MORAD, M. A uniform enzymatic method for dissociation of myocytes from hearts and stomachs of vertebrates. **Am. J. Physiol.**, v. 249, n.5, Pt 2, p. H1056-60, 1985.

NAKASHIMA, Y.; PLUMP, A.S.; RAINES, E.W.; BRESLOW, J.L. e ROSS, R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. **Arterioscler. Thromb.**, v.14, p. 133-140, 1994.

NATTEL S.; MAGUY A.; LE BOUTER S. e YEH Y-H. Arrhythmogenic ion-channel remodeling in the heart: heart failure, myocardial infarction, and atrial fibrillation. **Physiol Rev.**, n.87, p.425–456, 2007.

NIEBAUER, J.; MAXWELL, A.J.; LIN, P.S.; WANG, D.; TSAO, P.S. e COOKE, J.P. NOS inhibition accelerates atherogenesis: reversal by exercise. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, n. 285, p.535-540, 2003.

NISHINA, P.M.; VERSTUYFT, J. e PAIGEN, B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. **J. Lipid Res.**, n.32, p.859-869, 1990.

OLIVEIRA, R.S.F.; FERREIRA, J.C.B.; GOMES, E.R.M.; PAIXÃO, N.A.; ROLIM, N.P.L.; MEDEIROS, A.; GUATIMOSIM, S. e BRUM, P.C. Cardiac anti-remodelling effect of aerobic training is associated with a reduction in the calcineurin/NFAT signalling pathway in heart failure mice. **The Journal of Physiology**, v.587, p. 3899-3910, 2009.

OPIE, L.E. e KNUUTI, J. The adrenergic-fatty acid load in heart failure **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 54, p., 1637-1646, 2009.

OSBORN, B.A; DAAR, J.T.; LADDAGA, R.A.; ROMANO, F.D. e PAULSON, D.J. Exercise training increases sarcolemmal GLUT-4 protein and mRNA content in diabetic heart. **Journal of Applied Physiology**, v. 82, n. 3, p. 828-834, 1997.

OSTRANDER, D.B; SPARAGNA, G.C.; AMOSCATO, A.A.; MCMILLIN, J.B. e DOWHAN, W. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrom c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, 2001.

PARK, B.H.; LEE, Y.; WALTON, M.; DUPLOMB, L. e UNGER, R.H. Demonstration of reverse fatty acid transport from rat cardiomyocytes. **Journal of Lipid Research**, v. 45, p. 1992-1999, 2004.

PAULINO, E.C. **Efeito do treinamento físico e da restrição alimentar na função cardíaca e resistência à insulina em ratos obesos**. 2009. 98 f. Tese (doutorado em Cardiologia). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.

RECTOR, R.S.; THYFAULT, J.P.; MORRIS, R.T.; LAYE, M. J.; BORENGASSER, S.J.; BOOTH, F.W. e IBDAH, J.A. Daily exercise increases hepatic fatty acid oxidation and prevents steatosis in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty rats. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 294, p. G619-G626, 2008.

REGENSTEINER J.D.; REUSCH, J.E.B; STEWART, K.J. e VEVES, A. **Diabetes and exercise**. EDIÇÃO HUMAN PRESS, 2009

ROBERTS C.K e BARNARD R.J. Effects of exercise and diet on chronic disease. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, n.1, p. 3-30, 2005.

ROBERTS C.K.; BARNARD, R.J.; SINDHU, R.K.; JURCZAK, M.; EHDAIE, A. e VAZIRI, N.D. A high-fat, refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. **J. Appl. Physiol.**, v. 98, p. 203–210, 2005.

ROBERTS, C.K.; VAZIRI, N.D. e BARNARD, R.J. Effect of diet and exercise intervention on blood pressure, insulin, oxidative stress, and nitric oxide availability. **Circulation**, v. 106, p. 106:2530-2532, 2002.

ROLIM, N.P.L.; MEDEIROS, A.; ROSA, K.T.; MATTOS, K.C.; IRIGOYEN, M.C.; KRIEGER, E.M.; KRIEGER, J.E.; NEGRÃO, C.E. e BRUM, P. Exercise training improves the net balance of cardiac Ca<sup>2+</sup> handling protein expression in heart failure. **Physiol. Genomics**, v.29, p.246-252, 2007.

RONDON, M.U.P.B. e BRUM, P.C. Exercício físico como tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. Revista Bras. **Hipertens.**, v.10, p. 134-139, 2003.

ROSS, R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. **New England Journal of Medicine**, n. 340, p.115-126, 1999.

SCHAFFER, J.E. Lipotoxicity: when tissues overeat. **Curr. Opin.Lipidol.**, v. 14, p.281–287, 2003.

SCHENK, S. e HOROWITZ, J.F. Coimmunoprecipitation of FAT/CD36 and CPT I in skeletal muscle increases proportionally with fat oxidation after endurance exercise training. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 291, p.E254–E260, 2006.

SCHWENK , R.W.; LUIKEN, J.J.F.P.; BONEN, A. e GLATZ, J.F.C. Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. **Cardiovascular Research**, v. 79, p. 249–258, 2008.

SEVERS, N.J. The cardiac muscle cell. **Bio Essays**, n. 22, p.188–199. 2000.

SHEN, X.; ZHENG, S.; METREVELI, N.S. e EPSTEIN, P.N. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 798-805, 2006.

SONG, L.S.; PI, Y.; KIM, S.J.; YATANI, A. ; GUATIMOSIM, S.; KUDEJ, R.K.; ZHANG, Q.; HITTINGER, L.; GHALEH, B.; VATNER, D.E., LEDERER, W.J. e VATNER, S.F. Paradoxical cellular Ca<sup>2+</sup> signaling in severe but compensated canine left ventricular hypertrophy. **Circulation Research**, v.97, p.457-464, 2005.

SPARAGNA, G.C.; HICKSON-BICK, D.L.; BUJA, L.M. e MCMILLIN, J.B. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 279, p. H2124–H2132, 2000.

STARNE, J.W.; BARNES, B.D. e OLSEN, M.E. Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca<sup>2+</sup>-induced dysfunction. **J. Appl. Physiol.**, v. 102, p. 1793-1798, 2007.

STØLEN, T.O.; HØYDAL, M.A.; KEMI, O.J.; CATALUCCI, D.; CECI, M.; AASUM, E.; LARSEN, T.; ROLIM, N.; CONDORELLI, G.; SMITH, G.L. e WISLØFF, U. Interval training normalizes cardiomyocyte function, diastolic Ca<sup>2+</sup> control, and SR Ca<sup>2+</sup> release synchronicity in a mouse model of diabetic cardiomyopathy. **Circulation Research**, v.105, p.527-536, 2009.

TRIVEDI, P.S e BAROUCH,L.A. Cardiomyocyte apoptosis in animal models of obesity. **Current Hypertension Reports**, v. 10, p. 454–460, 2008.

TURCOTTE, L.P. e FISHER, J.S. Skeletal muscle insulin resistance: roles of fatty acid metabolism and exercise. **Physical Therapy**, v. 88, n. 11, p.1279-1296, 2008.

VASANJI, Z.; CANTOR, E.J.F.; JURIC, D.; MOYEN, M. e NETTICADAN, T. Alterations in cardiac contractile performance and sarcoplasmic reticulum function in sucrose-fed rats is associated with insulin resistance. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 291: p. C772–C780, 2006.

VENABLES, M.C. e JEUKENDRUP, A.E. Endurance training and obesity: effect on substrate metabolism and insulin sensitivity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 40, n. 3, p. 495-502, 2008.

WANG, J.; SONG, Y.; WANG, Q.; KRALIK, P. M. e EPSTEIN, P.N. Diabetes-induced abnormalities in the myocardium. **Rev. Diabet. Stud.**, v. 3, n. 3, p. 108–117, 2006.

WATANABE, M.; HOUTEN, S.M.; WANG, L.; MOSCHETTA, A.; MANGELSDORF, D.J; HEYMAN, R.A.; MOORE, D.D. e AUWERX, J. Bile acids lower triglyceride levels via a pathway involving FXR, SHP, and SREBP-1c. **J. Clin. Invest.**, v.113, n. 10, p.1408–1418, 2004.

WISLØFF, U.; LOENNECHEN, J.P.; FALK, G.; BEISVAG, V.; CURRIE, S.; SMITH, G. L. e ELLINGSEN, O. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. **Cardiovasc Res.**, v.50, n.3, p.495-508, 2001.

WOLD, L.E.; DUTTA, K.; MASON M.M.; REN, J.; CALA, S.E.; SCHWANKE M.L e DAVIDOFF, A.J. Impaired SERCA function contributes to cardiomyocyte dysfunction in insulin resistant rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.39, p. 297–307, 2005.

YAN, J.; YOUNG, M.E.; CUI, L.; LOPASCHUK, G.D.; LIAO, R. e TIAN, R.. Increased glucose uptake and oxidation in mouse hearts prevent high fatty acid oxidation but cause cardiac dysfunction in diet-induced obesity. **Circulation**, v. 119, p. 2818-2828, 2009.

YIN, W,; YUAN, Z.; WANG, Z.; YANG, B e YANG, Y. A diet high in saturated fat and sucrose alters glucoregulation and induces aortic fatty streaks in New Zealand White rabbits. **Int. Jnl. Experimental Diab. Res.**, n.3, p.179–184, 2002.

YE, J. Role of insulin in the pathogenesis of free fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle endocrine, metabolic and immune disorders. **Drug Targets**, v. 7, p. 65-74, 2007.

YOUNG, M.E.; GUTHRIE, P.H.; RAZEGHI, P.; LEIGHTON, B.; ABBASI, S.; PATIL, S.; KEITH, A.; YOUKER, K.A. e TAEGTMEYER, H. Impaired long-chain fatty acid oxidation and contractile dysfunction in the obese Zucker rat heart. **Diabetes**, v. 51 n. 8, p. 2587-2595, 2002.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)