



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**

PÂMELA SANTANA DALTRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FATOR ESTIMULADOR DE
COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS (G-CSF) SOBRE AS
ALTERAÇÕES DE FUNÇÃO CARDÍACA INDUZIDAS POR
DIETA HIPERGORDUROSA EM CAMUNDONGOS C57BI/6**

Feira de Santana, BA
2013

PÂMELA SANTANA DALTRO

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO FATOR ESTIMULADOR DE
COLÔNIAS DE GRANULÓCITOS (G-CSF) SOBRE AS
ALTERAÇÕES DE FUNÇÃO CARDÍACA INDUZIDAS POR
DIETA HIPERGORDUROSA EM CAMUNDONGOS C57BI/6**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Garcia Macambira.

Feira de Santana, BA
2013

Dedico este trabalho a toda minha família, ao meu namorado e a minha orientadora por terem acreditado na minha capacidade para a realização do mesmo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela graça do término desse trabalho e por ter acalmado meu coração diante às adversidades encontradas.

Gostaria de agradecer a minha família (Clélia, Gerson, Ana, Quesa, Roger e Amália) por existirem em minha vida, agradeço por toda força e incentivos doados, bem como ao exemplo de vida que eu encontro na história de cada um.

Ao meu namorado João Jr. amigo e companheiro de todas as horas, por toda compreensão e dedicação a mim prestada, por cada conselho que me ajuda a crescer não só no perfil profissional mas também no pessoal, uma pessoa do qual me orgulho muito.

Agradeço ao Ká (Katsuiko Oida) pela presença em minha vida, um anjo inigualável que passou e deixou muito da sua caridade, carinho e amor estando guardados em mim até o fim dos meus dias.

Agradeço a minha orientadora Dra. Simone Macambira, que não só me orientou durante toda a realização desse trabalho, como também participou de todas as peripécias que me aconteceram durante esses dois anos de pesquisa, que me exigiram amadurecimento para aceitar e superar.

Agradeço a Dra. Milena Botelho e ao Dr. Luis Freitas que acreditaram e incentivaram a realização dessa pesquisa.

Sra. Lucyvera Imbroinise, que sempre esteve disponível para atender às nossas solicitações desesperadas, à toda equipe de profissionais do LETI e CBTC, pessoas de extrema importância para o início e andamento deste trabalho, que disponibilizaram tempo e espaço para a coleta de informações, e em especial à Murilo Castro, Alberto Neto, Paula Alves, Juliana Vasconcelos, Cristina Aragão, Nanashara Coelho, Renato, Fagner, Rose e Edlúcia, só tenho a agradecer a ajuda de vocês que foram imprescindíveis.

Por um momento eu me perdi e não me encontrava, já quando a dor não mais cabia em minha alma, sem rancor nem ódio, foi com amor próprio que eu ganhei impulso, com o que vem do mais profundo.

Elba Ramalho

RESUMO

Hábitos alimentares de altos teores de gordura são fatores desencadeantes da obesidade. Essa pandemia está envolvida com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, devido a alterações estruturais e hemodinâmicas no coração. O G-CSF surge como um tratamento em potencial para a terapia de diversas doenças degenerativas, destacando-se seu efeito benéfico na regeneração estrutural e funcional do coração nas cardiomiopatias isquêmica e chagásica crônica com diminuição de inflamação e fibrose, e melhora na geração e condução do impulso cardíaco. Utilizou-se camundongos C57Bl/6 machos alimentados com dieta hipergordurosa (high-fat HF) que desenvolveram obesidade, hiperglicemia e intolerância à glicose. As alterações funcionais cardíacas foram avaliadas por eletrocardiograma, ecocardiograma e ergometria. Os animais foram separados em 2 grupos experimentais: dieta padrão (n=8) e dieta HF (n = 16) para indução da obesidade. 37 semanas após a introdução da HF, os animais foram separados em 3 grupos: tratado com G-CSF (n=8) + dieta padrão; não tratado com G-CSF (n=8) + dieta padrão, e o terceiro grupo somente com dieta padrão (n=8). Resultados mostraram que a substituição da dieta HF pela dieta padrão foi responsável pelo retorno ao nível basal dos valores bioquímicos e antropométricos, que apresentavam-se elevados. Apenas a substituição da dieta não reverteu à intolerância ao exercício nem preveniu as alterações cardíacas, como bradicardia, aumento da amplitude de QRS e aumento da espessura das paredes septal e posterior do ventrículo esquerdo. A substituição da dieta e o tratamento com G-CSF reverteram as alterações estruturais do coração e recuperaram a capacidade física.

Palavras-chave: Obesidade. Doenças cardiovasculares. G-CSF.

ABSTRACT

Dietary habits composed of high levels of fat are a trigger for obesity. This pandemic is involved with the development of cardiovascular diseases, due to structural and hemodynamic changes in the heart. The G-CSF has emerged as a potential treatment for many degenerative diseases, emphasizing its beneficial effect on the structural and functional regeneration of the heart in ischemic cardiomyopathy and Chagas disease, with diminished inflammation and fibrosis, and improvement of cardiac impulse generation and conduction. We used C57BL/6 mice fed a high-fat (HF) diet that developed obesity, hyperglycemia and glucose intolerance. The changes in cardiac function were assessed by electrocardiogram, echocardiogram and treadmill. The animals were divided into two groups: standard diet (n = 8) and HF diet (n = 16) to induce obesity. 37 weeks after HF protocol, the animals were divided into three groups: treated with G-CSF (n = 8) + standard diet, not treated with G-CSF (n = 8) + standard diet, and the third group with standard diet only (n = 8). Results showed that replacing the standard diet following HF diet was responsible for the return to baseline of anthropometric and biochemical values, which were significantly elevated. Diet replacement alone did not reverse exercise intolerance or prevent cardiac abnormalities, such as bradycardia and increases in QRS amplitude, septal wall thickness and left ventricular posterior thickness. Diet replacement and treatment with G-CSF reversed structural changes in the heart and recovery of physical capacity.

Keywords: Obesity. Cardiovascular diseases. G-CSF

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Átrio esquerdo
AGL	Ácidos graxos livres
AmpQRS	Amplitude do QRS
B-MODE	Modo bidimensional
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CSF	Fatores estimuladores de colônias
DAC	Doença arterial coronariana
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência cardíaca
G-CSF factor)	Fator estimulador de colônias granulocitárias (Granulocyte colony-stimulating
G-CSFR	Receptor do fator estimulador de colônias granulocitárias
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HF	High-fat
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
IC	Insuficiência cardíaca
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IPR	Intervalo PR
IQT	Intervalo QT

IRR	Intervalo RR
M-MODE	Modo unidimensional
NAC	Neuropatia autonômica cardíaca
PI3-quinase	Via fosfatidilinositol 3-quinase
TE	Teste ergométrico
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TTG	Teste de tolerância à glicose
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	CORAÇÃO E OBESIDADE	15
2.1.1	Disfunção endotelial na obesidade	17
2.1.2	Doença arterial coronariana (DAC) na obesidade	18
2.1.3	Hipertensão arterial sistêmica na obesidade	19
2.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE OBESIDADE	20
2.3	FATOR ESTIMULADOR DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS (G-CSF)	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	ANIMAIS	25
3.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	25
3.3	MENSURAÇÕES DE GLICEMIA EM JEJUM E PESO CORPORAL	27
3.4	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	28
3.5	COLETA DE SANGUE	28
3.6	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO	29
3.7	QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE ADIPONECTINA	29
3.8	ANÁLISE FUNCIONAL CARDÍACA	29
3.8.1	Análise ecocardiográfica	30
3.8.2	Análise eletrocardiográfica	31
3.8.3	Análise ergométrica	32
3.9	SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS	32
3.10	PCR EM TEMPO REAL	33
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4	RESULTADOS	34
4.1	PESO CORPÓREO E GLICEMIA DE JEJUM	34
4.2	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (TTG)	35
4.3	COLESTEROL TOTAL	37
4.4	DOSAGEM SÉRICA DE INSULINA	37

4.5	QUANTIFICAÇÃO DE ADIPONECTINA NO SORO	38
4.6	ANÁLISE FUNCIONAL CARDÍACA	39
4.6.1	Eletrocardiografia	39
4.6.2	Frequência cardíaca	39
4.6.3	Teste ergonômico	43
4.7	Ecocardiografia	44
4.8	Análise molecular	50
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

O coração é o órgão muscular central do sistema circulatório, composto por quatro câmaras que se contraem, impulsionando como uma bomba o sangue aos órgãos periféricos através dos vasos sanguíneos. Quando uma dessas câmaras falha como bomba, não sendo capaz de ejetar todo o sangue que recebe, complicações hemodinâmicas iniciam-se devido à disfunção cardíaca, bem como uma série de mecanismos compensatórios que a princípio teriam efeitos benéficos, irão contribuir para a progressão contínua do processo de deterioração da função cardíaca. Este quadro clínico pode ser observado em consequência de diversas enfermidades, como a obesidade, o diabetes, e doenças valvulares cardíacas (BREDE et al., 2002; SILVERTHORN, 2010).

A obesidade é uma doença endócrino-metabólica de origem multifatorial, caracterizada pelo excesso de tecido adiposo, decorrente do desequilíbrio no metabolismo energético celular, associado ao consumo desenfreado de alimentos ricos em gorduras e carboidratos (CALLE et al., 2003), levando ao balanço energético positivo, promovendo o aumento nos estoques de energia e peso corporal (MARTINEZ, 2000).

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a prevalência de indivíduos adultos com sobrepeso é de aproximadamente 1,6 bilhões e de 400 milhões de obesos. No ano de 2015 estima-se que o número de adultos com sobrepeso será de 2,3 bilhões, e de obesos passará para cerca de 700 milhões (VIGITEL Brasil, 2006). Atualmente a obesidade se tornou uma pandemia que acomete desde os países desenvolvidos, até os países de baixa renda, que chegam a possuir níveis de obesidade iguais ou maiores aos encontrados nos Estados Unidos e em outros países desenvolvidos (OPAS, 2003).

A elevada prevalência da obesidade na população mundial tem sido relacionada a vários fatores, como ao crescimento populacional associado aos padrões da vida moderna, ao consumo exagerado de gorduras e alimentos calóricos, e a inatividade física (ZAUPA; ZANONI, 2000; WILD et al., 2004). A transição nos padrões de vida dos brasileiros foram ocorrendo ao longo do tempo, devido às mudanças demográficas, sócio-econômicas e epidemiológicas, que levaram à diminuição progressiva da desnutrição e ao aumento da obesidade (MONTEIRO et al., 1995).

Dentre as co-morbidades presentes na obesidade, as doenças cardiovasculares são as principais causas de mortalidade evidenciadas nessa doença, a sua associação com o diabetes e hipertensão, colaboram para o desenvolvimento da disfunção endotelial, doenças arteriais coronarianas, e insuficiência cardíaca, responsáveis por elevados custos de internações e despesas públicas (MURPHY et al., 2006). A obesidade constitui um fator de risco importante para o

desenvolvimento do diabetes mellitus tipo 2 (DM2), sendo responsável por até 80% dos casos, possuindo a resistência à insulina como fator que relaciona essas duas patologias (ECKEL et al., 2011). Nos indivíduos obesos é observado uma elevada incidência de intolerância à glicose e resistência à insulina, principalmente nos tecidos periféricos, devido às alterações metabólicas e moleculares da fibra muscular, o que favorece o surgimento do DM2 (GUEDES; GUEDES, 1998).

A obesidade por si só, na ausência de fatores de riscos está correlacionada com alterações cardíacas específicas, como o aumento da massa ventricular, aumento da câmara atrial, disfunção sistólica e diastólica, que quando sustentados por um longo período levam à progressão de uma insuficiência cardíaca (IC) e consequente aumento da morbi-mortalidade (MELANSON et al., 2001). Fato demonstrado pelo estudo Framingham, que objetivou identificar a prevalência de IC em pacientes obesos de ambos os sexos, e constatou que a IC aumentava de acordo com o índice de massa corporal (IMC), independente de outros fatores de risco (ABEL; LITWIN; SWEENEY, 2008; KENCHIAIAH et al., 2002).

A reversão parcial das alterações estruturais do coração após a perda de peso, foram demonstradas à curto prazo em observações através da ecocardiografia (KANOUPAKIS et al., 2001). O tratamento da obesidade consiste na mudança do estilo de vida, com dietas e hábitos alimentares saudáveis e na realização regular de atividades físicas. Fatores que contribuem para prevenção das complicações cardiovasculares advindas da obesidade, porém não são capazes recuperar a função cardíaca de um coração já insuficiente devido à progressão da obesidade para o seu estado crônico. Conseqüentemente, a mudança no estilo de vida já em fases pré-clínicas da doença são muito importantes para melhora da qualidade de vida e da sobrevida dos indivíduos obesos (KENCHIAIAH et al., 2002).

Recentemente, a terapia baseada na utilização de fatores de crescimento, tais como o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), vêm sendo proposta para o tratamento de várias doenças degenerativas e cardíacas. O G-CSF é uma glicoproteína que atua, principalmente, promovendo a maturação dos neutrófilos, estimulando sua atividade fagocítica e quimiotática, e promovendo a segmentação nuclear dos neutrófilos maduros. Além disso, o G-CSF também apresenta importante papel na mobilização de células-tronco hematopoéticas da medula óssea para a circulação (BARREDA; HANINGTON; BELOSEVIC, 2004), e na capacidade de modular a resposta inflamatória, reduzindo a liberação das citocinas pró-inflamatórias por monócitos e macrófagos ativados (BONEBERG; HARTUG, 2002).

Diversos trabalhos na literatura apontam o papel benéfico desta citocina em cardiomiopatias de diversas etiologias. Estes efeitos incluem a regeneração da estrutura cardíaca, a recuperação da função mecânica do miocárdio, o restabelecimento das junções comunicantes entre os miócitos,

favorecendo a reversão das arritmias (HARADA et al., 2005; HASEGAWA et al., 2006). Outros estudos têm evidenciado que o G-CSF auxilia na neovascularização cardíaca e pode atuar como fator protetor de cardiomiócitos (TATSUMI et al., 2008).

No caso específico do infarto do miocárdio, altos níveis circulantes de G-CSF foram detectados pós-infarto, sugerindo um papel deste fator no reparo cardíaco (SHIM et al., 2011). Modelos experimentais demonstram que o G-CSF é um potente agente terapêutico para o reparo cardíaco, devido à sua atuação na mobilização das células de medula óssea, para o local da lesão cardíaca, o que promove a redução do remodelamento ventricular e a melhora da função cardíaca (OTT; TAYLOR, 2006). Os efeitos benéficos do G-CSF sobre a regeneração do miocárdio englobam, também, a aceleração do processo de cicatrização tecidual, prevenção da apoptose do miocárdio e redução de fibrose miocárdica (LI et al., 2006; MINATOGUCHI et al., 2004).

Em estudo recente, foi demonstrado que a utilização do G-CSF no tratamento de camundongos chagásicos crônicos tem demonstrado efeitos benéficos sobre a estrutura cardíaca, tais como redução da inflamação e fibrose, que revelaram a melhora da função cardíaca através de uma maior distância percorrida no teste ergométrico e prevenção do agravamento dos distúrbios cardíacos após o tratamento de G-CSF (MACAMBIRA et al., 2009). O efeito benéfico do G-CSF também foi evidenciado em modelo experimental de enfisema pulmonar, onde foi observado não apenas a regeneração tecidual, mas também a recuperação da função pulmonar (FORTUNATO et al., *in press*).

No caso específico das disfunções cardíacas associadas à obesidade temos como agravante o fato de que a obesidade como morbidade isolada é de difícil tratamento. A obesidade quando não tratada ou não controlada está associada a diversos comprometimentos cardíacos, cujas mudanças de hábitos alimentares e a prática de atividade física na fase tardia, não revertem a cardiomiopatia instalada (NONINO-BORGES; BORGES; SANTOS, 2006).

A partir dessas evidências pode-se considerar, portanto, que o uso do G-CSF pode ser uma estratégia terapêutica eficaz para o tratamento das complicações cardiovasculares e alterações bioquímicas associadas à obesidade.

Neste sentido pode-se levantar a hipótese de que, em indivíduos obesos o comprometimento cardíaco será pronunciado, evidenciando alterações elétricas e morfofuncionais que serão revertidas quando administrado o G-CSF, devido ao seu potencial protetor e regenerativo.

O objetivo geral deste estudo é avaliar os efeitos do G-CSF sobre as alterações bioquímicas e cardíacas associadas a obesidade induzida por dieta hipergordurosa em camundongos C57Bl/6.

Os objetivos específicos do presente estudo incluem (i) caracterizar as alterações cardíacas decorrentes de uma dieta hipergordurosa através de exames seriados de ecocardiografia,

eletrocardiografia e ergometria. (ii) caracterizar os perfis bioquímicos e antropométricos dos camundongos C57BL/6 alimentados com a dieta hipergordurosa; (iii) avaliar o padrão de expressão da citocina adiponectina e do fator de transcrição GATA-4 envolvidos no comprometimento da função cardíaca; (iv) avaliar o potencial terapêutico da administração do G-CSF sobre as alterações cardíacas, antropométricas, bioquímicas, na expressão da adiponectina e do fator de transcrição GATA-4, nos camundongos alimentados com a dieta hipergordurosa.

2 REVISÃO DA LITERATURA

No Brasil ao longo das últimas três décadas, alterações dos padrões do estilo de vida e do consumo alimentar indicam um aumento do teor excessivo de açúcar na dieta e um aumento no aporte relativo de gorduras em geral, destacando-se as gorduras saturadas, sem evidências de qualquer tendência de superação dos níveis insuficientes do consumo de frutas e hortaliças (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). A adoção de estilo de vida sedentária e transtornos alimentares são considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento da obesidade e diabetes, consideradas epidemias mundiais (WHO, 1998; POPKIN; DOAK, 1998).

2.1 CORAÇÃO E OBESIDADE

Define-se a obesidade por um estado de acúmulo excessivo de gordura nos tecidos adiposos, resultante de um desequilíbrio energético crônico, no qual o consumo elevado e contínuo de calorias é responsável por ocasionar prejuízos à saúde. Fatores biológicos (predisposição genética), comportamentais e ambientais interagem na regulação do balanço energético positivo e na manutenção das reservas de gordura (WHO, 2000).

Uma das preocupações com a crescente epidemia da obesidade é a sua frequente associação com o aumento do risco de doenças como dislipidemias, DM2, cardiopatias e HAS, as quais lesam o sistema vascular e favorecem a ocorrência de eventos cardiovasculares, em particular os coronarianos (CORMICK; CLARKE, 2004; COOPER; FAIRBURN, 2001).

Em 1983 iniciou-se a investigação sobre a correlação entre o grau de obesidade e a incidência de doenças cardiovasculares, quando foram publicados os resultados da avaliação em 5209 homens e mulheres participantes do Estudo de Framingham. As conclusões desse estudo, relativas a um período de 26 anos, revelaram que a obesidade é um fator de risco independente para a ocorrência de doenças cardiovasculares (ZANELLA, 2005), e a sua prevenção tende reduzir em 30% a incidência dessas doenças cardíacas, que atualmente constituem a primeira causa de óbitos no país (MANSUR et al., 2001).

A obesidade pode levar a anormalidades como a resistência à insulina, definida pela ineficácia da insulina em estimular a utilização de glicose pela célula (ADA, 1997). A resistência é decorrente da secreção anormal de citocinas pelos adipócitos, que normalmente promovem o controle

hormonal e neural, e na obesidade estão desreguladas pela alteração morfofuncional nessas células. A produção desregulada dessas citocinas, resultam em respostas antagonistas à ação da insulina, devido às suas altas concentrações de TNF- α (fator de necrose tumoral alfa), interleucina 6 (IL-6), leptina, e resistina (ROSMOND, 2004; CAMPOS et al., 2006). Reciprocamente a resistência à insulina primária também leva ao excesso de gordura (COUTINHO; BANDEIRA, 2003), resultante das elevadas concentrações de ácidos graxos livres (AGL) na circulação, que levam à modificações na ação e na dinâmica da insulina nos tecidos do músculo esquelético, fígado e pâncreas (FONTES, 2003; MANCO; CALVANI; MINGRONE, 2004).

A ocorrência da obesidade está relacionada ao desenvolvimento de várias patologias associadas a disfunções no sistema cardiovascular, o que provoca um aumento considerável dos níveis de morbimortalidade, devido a modificações estruturais e hemodinâmicas frequentes, e muitas vezes precoces (MELANSON et al., 2001; POIRIER; ECKEL, 2002).

Nos indivíduos com sobrepeso, a volemia aumentada leva a uma série de mecanismos compensatórios, relacionados à hipertrofia cardíaca e ao comprometimento da circulação coronariana (OLIVEIRA, 2005; SANTOS, 2005). A hipertrofia cardíaca pode ser definida como o aumento da massa cardíaca, devido ao crescimento do miócito e/ou do tecido conjuntivo (MORGAN; BAKER, 1991), que surge como um remodelamento cardíaco, devido a uma resposta compensatória do miocárdio ao trabalho aumentado. Ao estar relacionada a condições fisiopatológicas, como a hipertensão arterial, desencadeia um elevado risco de morbimortalidade, predispondo à ocorrência de morte súbita, arritmias ventriculares, isquemias miocárdicas e disfunção ventricular sistólica e diastólica (SARAIVA, 1997; FRIMM, 1998). A hipertrofia cardíaca pode ser identificada pelos seus padrões geométricos de adaptação, como concêntrica ou excêntrica, considerando o nível de massa tecidual e a relação entre a espessura da parede e o tamanho da câmara cardíaca. As hipertrofias concêntricas caracterizam-se por um aumento da resistência à ejeção ou à sobrecarga de pressão, resultando em uma maior espessura da parede e redução dos diâmetros ventriculares. As hipertrofias excêntricas surgem em provimento da sobrecarga de volume sanguíneo, levando a um aumento da espessura da parede e dos diâmetros ventriculares (MILL; VASSALLO, 2001).

2.1.1 Disfunção endotelial na obesidade

O armazenamento do excesso de lipídios circulantes aos adipócitos para posterior lipólise, leva ao aumento da massa de gordura, hiperplasia e hipertrofia dessas células. Essas alterações por sua vez, provocam anomalias no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias, que contribuem para distúrbios intracelulares e sistêmicos, tais como a estimulação de um estado pró-inflamatório, resistência à insulina, e a alta produção de AGL, ocasionando em uma produção excessiva de toxinas metabólicas, que comprometem a sensibilidade à insulina e, conseqüentemente, a disfunção endotelial (GILL et al., 2005; de FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008;).

A disfunção endotelial pode ser caracterizada como um comprometimento da regulação do tônus vascular, associada ao relaxamento do endotélio, decorrentes do desequilíbrio na produção endotelial de mediadores vasoativos, destacando-se entre estes o óxido nítrico. Alterações na agregação plaquetária, na coagulação e fibrinólise, são fatores que também podem ajudar no comprometimento da regulação do tônus vascular (MOMBOULI; VANHOUTE, 1999).

A disfunção endotelial não é exclusividade da obesidade, e está presente em diversas doenças metabólicas e/ou cardiovasculares, como no diabetes mellitus, HAS e dislipidemia. A resistência à insulina aparece como um ponto em comum em todas essas doenças, apresentando-se fortemente associada à disfunção endotelial, que pode ser explicada pelo comprometimento da mesma via de metabolização, independente da doença de base (FERRANNINI et al., 1997; HSUEH; LYON; QUIÑONES, 2004; MEYERS; GOKCE, 2007) .

A via fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-quinase) é a responsável pela promoção da captação de glicose nos tecidos-avos, como também está relacionada à regulação da produção endotelial de óxido nítrico, que se difunde através das membranas celulares das paredes arteriais, afim de promover o relaxamento do músculo liso dos vasos sanguíneos, reduzindo a resistência vascular. Com a resistência à insulina a via PI3-quinase fica comprometida, resultando em restrição da captação de glicose, redução da vasodilatação e desenvolvimento de vasoconstrição, aderência de leucócitos nos vasos, e a ativação de plaquetas e posterior trombose, fatores estes que conduzem à disfunção endotelial e HAS. No indivíduo obeso com resistência à insulina, a dosagem requerida desse hormônio para que seja desencadeante de uma redução da resistência vascular, acaba sendo quatro vezes superior à aquela necessária em um indivíduo de menor peso (SUTHERLAND; MCKINLEY; ECKEL, 2004; de FERRANTI; MOZAFFARIAN, 2008; CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006).

Outros possíveis mecanismos que podem favorecer a elevação da resistência vascular são a glicação de proteínas e o aumento de produtos finais de glicação avançada. Estes podem formar ligações com as moléculas de colágeno na parede arterial, levando à uma menor distensibilidade vascular (SCHRAM *et al.*, 2004).

2.1.2 Doença arterial coronariana (DAC) na obesidade

As doenças cardiovasculares representam a principal causa de mortalidade nos países industrializados, sendo a DAC a mais frequente. O desenvolvimento da DAC relaciona-se com a obesidade, o diabetes, a hipertensão arterial e as dislipidemias, problemas reforçados por hábitos alimentares inadequados e sedentarismo. Entre estes, a obesidade é um preditor independente para a DAC (SILVA *et al.*, 2012).

A obesidade resulta no aumento da deposição de gordura perivascular em torno do coração e dos seus ramos principais. Este tecido adiposo aumentado em torno dos vasos sanguíneos, faz com que o excesso de produção de citocinas pró-inflamatórias e profibróticas, desencadeiem em inflamações relacionadas à aterogênese, com conseqüente aumento da espessura da camada íntima-média, e diminuição da distensibilidade arterial (GUSTAFSON, 2010).

Nas últimas duas décadas, o crescente desenvolvimento no campo da biologia vascular, tem esclarecido que as lesões ateroscleróticas compreendem em uma série de respostas celulares e moleculares, altamente específicas, dinâmicas, e essencialmente inflamatórias (ROCHA; LIBBY, 2009).

O processo aterosclerótico apresenta vários marcadores inflamatórios em concentrações aumentadas, sendo mais evidentes em indivíduos obesos e dislipidêmicos. Esses marcadores são substâncias bioativas com ação local ou sistêmica, chamadas de adipocinas, na qual englobam todas as proteínas ou peptídeos secretados pelos adipócitos (SANTOS *et al.*, 2008).

Dentre as suas funções, as adipocinas aumentam a migração dos monócitos circulantes nos vasos sanguíneos, que se diferenciam em macrófagos ao aderirem ao endotélio da parede vascular. Esses macrófagos migram para o interstício e fagocitam as partículas de colesterol de baixa densidade (LDL), resultando nas células espumosas, que se acumulam dentro das paredes dos vasos, formando estrias gordurosas, que por último transformam-se em placas ateroscleróticas (van LEEUWEN *et al.*, 2008).

As lesões avançadas decorrente desses processos obstruem a luz do vaso, reduzindo o raio e a passagem de sangue por essa artéria, que com menor aporte de oxigênio, predispõe a eventos de isquemias agudas, que compreendem os quadros de DAC e doença vascular periférica (FRANCOSO; COATES, 2002). Com a ruptura das placas de ateroma, fatores vaso-ativadores do tecido endotelial são expostos na circulação sistêmica, ativando a cascata de coagulação e causando a formação de trombos (DARVALL et al., 2007).

2.1.3 Hipertensão arterial sistêmica na obesidade

A HAS, definida como uma condição de origem multifatorial, caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial, constitui um importante fator de risco para a morbimortalidade cardiovascular. São observados que pelo menos, 50% dos pacientes hipertensos não-tratados, são portadores de uma insuficiência cardíaca (HIMMELMANN, 1999; SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA, 2010).

A prevalência da HAS associada ao excesso de peso, apresenta-se três a cinco vezes maior em comparação com indivíduos dentro da faixa de peso ideal (PARVING et al., 2008). Em 2007, Chiolero e colaboradores, conduziram um estudo de prevalência de hipertensão, e concluíram que esta condição é atribuída ao excesso de peso ou obesidade em 37% dos casos. Na Suíça, Maggio e seus colaboradores (2008), apontaram uma associação entre crianças obesas e hipertensão sistólica em 47,6% dos pacientes, bem como um aumento parcial da massa ventricular esquerda, causada pela pressão arterial sistêmica.

Devido aos elevados níveis de AGL e ao metabolismo anormal da glicose, acompanhados da resistência à insulina, o aumento da pressão arterial pode surgir, devido ao resultado tanto da sua associação com a rigidez da parede arterial nas disfunções endoteliais, como na formação de placas aterogênicas nas doenças arteriais coronarianas e aórticas, que impõem ao coração sobrecargas mecânicas, que resultam na hipertrofia ventricular (CASTRO CABEZAS et al., 1993).

O mecanismo compensatório da hipertrofia nos hipertensos decorre do persistente aumento da pós-carga ventricular, esta se associa a alterações estruturais e funcionais do miocárdio, promovendo espessamento absoluto ou relativo das paredes das câmaras. Esse processo acontece devido ao aumento nas dimensões dos cardiomiócitos, a expansão da massa mitocondrial, multiplicação em paralelo do número de miofibrila, e o aumento de deposição da matriz extracelular (BRISTOW, 1999; MACIEL, 2001).

As alterações ocasionadas através dos mecanismos adaptativos, têm por função atenuar o efeito da sobrecarga de pressão, que a hipertensão promove sobre a parede do ventrículo esquerdo, para preservar a função sistólica global do coração. Contudo, esse mecanismo provoca também uma concomitante redução na contratilidade de fibras miocárdicas, deliberando em alterações na expressão gênica de proteínas contráteis cardíacas, o que aumenta o risco cardiovascular, expresso pela insuficiência cardíaca e morte súbita (BRISTOW, 1999; DUNN, 1999; SWYNGHEDAUW, 1999).

2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE OBESIDADE E DIABETES

Em estudos experimentais a indução da obesidade pode ser realizada em animais, através de alterações nos mecanismos neuroendócrinos, alimentares e na manipulação genética (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

A administração de glutamato monossódico tem sido muito usado na indução da obesidade em ratos recém-nascidos, por provocar a destruição do hipotálamo ventromedial, desencadeando numa falta de controle do eixo hipotálamo-pituitária, que estão relacionados com a absorção e gasto de energia, além da hipofagia e hipoatividade. Em um estudo foi demonstrado que o glutamato induziu distúrbios metabólicos associados com o stress oxidativo, mesmo na ausência da obesidade, além de promover o aumento da glicose, insulina e de triacilgliceróis, o que resultou numa resistência periférica aumentada, e nos altos níveis de leptina (MORENO et al., 2005).

A obesidade induzida através da lesão neuroendócrina, foi primariamente descrita por Saito e colaboradores (1985) e, recentemente aprimorada, é utilizada com a ajuda de uma corrente elétrica de 1,2 mA com a duração de 4 segundos, sendo repetidas 3 vezes em intervalos de 30 segundos, o que causa a destruição bilateral dos núcleos hipotalâmicos, que conduzem a obesidade através da hiperfagia. O mecanismo envolvido neste processo ainda não é conhecido. Mas a teoria inicial dessa técnica, é que as deposições de íons de ferro, causadas pelas introduções dos eletrodos no hipotálamo, leva a destruição do núcleo hipotalâmico a longo prazo.

Outros estudos experimentais trazem a dieta hipercalórica como o modelo mais simples de indução da obesidade, e que comprovadamente leva ao excesso de gordura corporal em macacos, cães, suínos, esquilos, hamsters e ratos (WILLET, 1998; KATAN, 1999). Existem vários tipos de dietas para induzir obesidade, sendo as mais eficazes, aquelas que contém a adição de hidratos de carbono ou gordura, acredita-se que essas dietas conduzam a hiperfagia, ou causem alterações

metabólicas independentemente (WEST; YORK, 1998), como por exemplo, a redução na secreção de leptina ou limitação na sua capacidade de atuação (AINSLIE et al., 2000). A grande similaridade e homologia entre os genomas de roedores e humanos acabam tornando esses modelos animais, numa importante ferramenta para o estudo da obesidade.

Nos últimos anos, animais geneticamente modificadas ou animais knockout têm sido produzidos para o estudo de novos genes que são candidatos para influenciar a taxa de obesidade, camundongos geneticamente ob-/ob- (deficiência de leptina) e db-/db- (deficiência de receptores de leptina) são utilizados para o desenvolvimento do modelo de obesidade e também de DM2, onde os animais desenvolvem resistência à insulina com hiperinsulinemia e hiperglicemia (POORNIMA; PARIKH; SHANNON, 2006).

Modelos experimentais utilizando camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hipergordurosa têm demonstrado um desenvolvimento da obesidade, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, dislipidemia, intolerância à glicose e resistência à insulina, caracterizando corretamente a condição de obesidade em humanos (COLLINS et al., 2004; GALLOU-KABANI et al., 2007). As manifestações cardíacas desses modelos de obesidade e DM2, ainda não foram bem estudadas, porém são encontrados indícios do desvio de substratos metabólicos no início da administração da dieta hipergordurosa, progredindo posteriormente para a obesidade (WRIGHT et al., 2009).

Experimentos com ratos Zucker são utilizados por desenvolverem uma predisposição genética à hiperglicemia, à hiperleptinemia levando a uma conseqüente obesidade, bem como a hiperlipidemia, e hiperinsulinemia. Ratos Zucker hiperinsulinêmicos exibem hipertrofia miocárdica, e graus variáveis de anormalidades diastólica (YOUNG; MCNULTY; TAEGTMEYER, 2002; FANG; PRINS; MARWICK, 2004; ANEJA et al., 2008).

A obesidade aumenta o volemia sanguínea e o débito cardíaco, propiciando uma carga de trabalho cardíaco maior, devido ao aumento da ativação simpática, a frequência cardíaca é ligeiramente aumentada também, sendo os pacientes obesos mais prováveis de serem hipertensivos do que os pacientes magros (MESSERLI et al., 1987). Porém independente da pressão arterial e da idade, a obesidade por si só aumenta o risco de Hipertrofia Ventricular Esquerda (HVE), incluindo a remodelação concêntrica (LAVIE et al., 2007). Alterações no átrio esquerdo também aparecem conseqüentes ao aumento do volume sanguíneo circulante, bem como o enchimento diastólico anormal do VE. Além de desencadear anormalidades estruturais no VE e a propensão para arritmias ventriculares, a obesidade também tem efeitos adversos sobre a função diastólica e sistólica (ALPERT, 2001).

Contudo, existem importantes ressalvas ao traduzir descobertas observadas em modelos animais, para os seres humanos, uma vez que meio hormonal e fisiologia cardíaca não são os mesmos. A frequência cardíaca é diferente em roedores e seres humanos, e os modelos de roedores são menos prováveis de desenvolver doença das artérias coronárias e isquemia cardíaca.

2.3 FATOR ESTIMULADOR DE CÉLULAS GRANULOCÍTICAS (G-CSF)

Em 1960, dois grupos de pesquisa desenvolveram simultaneamente, métodos para proporcionar o crescimento de colônias de granulócitos e monócitos, a partir da medula óssea de rato ou células de baço em ágar semi-sólido. Foi observado que o crescimento dessas colônias eram dependentes da presença de fatores até então desconhecidos, denominados como fatores estimuladores de colônias (CSF). Muitos laboratórios trabalharam até meados da década de 1980, a fim de identificar e purificar bioquimicamente esses CSF, revelando a existência de não apenas um único CSF, mas sim quatro tipos bioquimicamente diferentes, e com atividades colônia-estimuladoras diferentes. Esses fatores foram classificados como citocinas indutoras da granulopoiese, e foram apresentadas como: Fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófagos (GM-CSF); fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF); fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos (MG-CSF) e algumas interleucinas (IL-1, IL-3, IL-5 e IL-6), capazes de regular respostas imunológicas e inflamatórias, além de participarem ativamente dos processos de cicatrização e hematopoiese através da estimulação do processo mitótico, diminuição do tempo de maturação e maior liberação de granulócitos para o sangue periférico (FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000; STOCKHAM; SCOTT, 2002; METCALF, 2010).

O G-CSF é uma glicoproteína produzida por células da medula óssea, que encontra-se em baixos níveis circulantes sob condições fisiológicas, porém em condições patológicas, citocinas pró-inflamatórias e inúmeros outros fatores associados ao processo inflamatório, podem elevar as concentrações desse fator, aumentando a comunicação do G-CSF com o seu receptor (G-CSFR), o que promove a modulação da resposta imune e o reparo tecidual (DEMETRI; GRIFFIN, 1991; STTITES; TERR; PARSLOW, 2004).

As células de defesa leucocitárias são produzidas na medula óssea e dividem-se em granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos). Todos eles se originam da mesma célula tronco pluripotencial, que tem capacidade de se auto-replicar e de

se diferenciar nas unidades formadoras de colônia específicas, dependendo do fator estimulador ao qual forem submetidos (JAIN, 1993).

Os neutrófilos constituem a primeira linha de defesa do organismo, participando de processos inflamatórios, infecções, principalmente bacterianas, e lesões teciduais, com a utilização dos seus grânulos e enzimas proteolíticas que atuam no processo da digestão de antígenos. A cinética dos neutrófilos dentro dos vasos se constitui basicamente de rolamento pelo tecido endotelial, adesão à célula endotelial do local envolvido na quimiotaxia, migração para o tecido lesado e fagocitose de substâncias estranhas ao organismo (STOCKHAM; SCOTT, 2002).

O G-CSF desenvolve importante papel na granulopoiese, estimulando a medula óssea a aumentar a liberação de neutrófilos maduros do compartimento de reserva para a circulação, à proliferação e maturação de precursores granulocíticos e aumentar a função dos neutrófilos, através da sua capacidade de fagocitose, quimiotaxia e degranulação (HENRY; BUSS; LOTHROP, 1998; REWERTS; HENRY, 1998; FELDMAN; ZINKL; JAIN, 2000). Além do G-CSF agir em precursores granulocíticos aumentando o número e a função dos neutrófilos, também está associado à supressão da apoptose, levando ao aumento da vida média destas células (MISHU et al., 1992; HENRY; BUSS; LOTHROP et al., 1998).

Na prática clínica o G-CSF é uma droga de uso difundido para o tratamento de neutropenia induzida por agentes quimioterápicos, ou transplante de medula óssea. Novas pesquisas no campo da medicina regenerativa utilizam o G-CSF no tratamento das doenças cardíacas e pulmonares, sobretudo nas cardiomiopatias de diversas etiologias e infarto agudo do miocárdio, devido às suas propriedades como agente mobilizador de células precursoras e de regeneração tecidual (FUKUHARA et al., 2004; MACAMBIRA et al., 2009; FORTUNATO et al., 2013).

Uma das hipóteses para a regeneração do miocárdio induzida pelo G-CSF é que as células da medula óssea recrutadas por este fator migrariam para o miocárdio lesionado e se diferenciariam em cardiomiócitos e células vasculares, contribuindo não apenas para regeneração do tecido cardíaco como também para a neovascularização deste tecido (BALSAM et al., 2004; MURRY et al., 2004). Além disso, o aumento da expressão de conexina 43 contribuiria diretamente para a redução das arritmias cardíacas (MILBERG et al., 2011).

Dentre os resultados observados em cima das ações regenerativas na estrutura cardíaca, a restauração da função mecânica do miocárdio, redução do tamanho da área infartada, e o restabelecimento das junções comunicantes entre os miócitos, são alguns dos resultados que favorecem a redução nas alterações elétricas cardíacas como as arritmias. Outros estudos evidenciam que o GCS-F auxilia na neovascularização cardíaca, tornando-o um fator protetor dos cardiomiócitos (ADACHI et al., 2004; HASEGAWA et al., 2006; TATSUMI et al., 2008). Embora

o mecanismo exato ainda não seja completamente compreendido, presume-se que o G-CSF atue diretamente em seu receptor específico expresso nos cardiomiócitos, ativando a via da Jak/Stat o que proporcionaria a regeneração tecidual (HARADA et al., 2005).

Apesar destes resultados promissores com G-CSF, não há estudos específicos sobre o potencial terapêutico do uso desta citocina no tratamento da obesidade, e das complicações cardíacas advindas dessa patologia de difícil tratamento. Portanto, torna-se de grande relevância a investigação de uma nova estratégia terapêutica, baseada no uso do G-CSF sobre as disfunções cardíacas e metabólicas decorrentes da obesidade, induzida por uma dieta hipercalórica em camundongos C57Bl/6, visando o desenvolvimento de alterações cardíacas, a fim de avaliar os efeitos do GCS-F sobre o miocárdio destes animais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Nesse estudo foram utilizados 30 camundongos machos da linhagem C57BL/6, provenientes e mantidos no biotério do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular - Hospital São Rafael/Ba. Durante a realização desse estudo 6 animais vieram a óbito, sendo excluídos nas análises dos testes experimentais, restando 24 camundongos que foram utilizados até o final do estudo. Os procedimentos experimentais realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA- 017/2012) da Fiocruz/BA.

3.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os 24 camundongos C57Bl/6 machos com 5 meses de idade e com uma média de peso de 31g, foram submetidos a testes bioquímicos, antropométricos e funcionais cardíacos a fim de caracterizar os valores encontrados nesses animais antes da indução da obesidade com uma dieta hipergordurosa.

Os animais foram separados em dois grupos, o grupo dos camundongos alimentados com a ração hipergordurosa ou *high fat* (HF) (n=16) que na sua composição possuía 58% kcal de gordura, desenvolvida pela Research Diets (New Brunswick, NJ, EUA), durante 38 semanas, período no qual desenvolveram obesidade, e o grupo dos animais controle (CTRL) (n=8), que foram alimentados com uma dieta balanceada através da ração padrão comercial Nuvilab CR1 produzida pela Nuvital[®] (Paraná, Brasil) administrada *ad libitum* em comedouros suspensos.

Tabela 1. Composição das rações padrão e hipergordurosa

Produto	Padrão	Produto	Hipergordurosa
	Kcal %		Kcal %
Proteína	30.13		16.4
Carboidrato	57.54		25.5
Gordura	12.33		58.0
Total	100		100

Fonte: www.researchdiets.com e www.nuvital.com.br

Após 38 semanas de indução, o grupo dos camundongos que receberam a ração hipergordurosa (HF) foram divididos de maneira aleatória em dois grupos experimentais: (i) tratado com G-CSF recombinante (G-CSF) (Filgrastim - 200 ug/kg/dia) via intraperitoneal durante 5 dias por 3 ciclos com intervalo de 7 dias entre cada ciclo (n= 8) e (ii) administrado salina (Salina) (100µl) via intraperitoneal durante 5 dias por 3 ciclos com intervalo de 7 dias entre cada ciclo (n= 8). Nesse período o grupo tratado e não tratado tiveram a dieta hipergordurosa substituída pela ração padrão comercial, a fim de avaliar os possíveis efeitos benéficos apenas com a retirada de uma dieta altamente gordurosa.

A indução da obesidade foi monitorada através de medições mensais do peso corpóreo, glicemia de jejum, e também por testes de tolerância à glicose trimestrais que são indicativos de resistência à insulina. A análise bioquímica do colesterol total e a concentração sérica da adiponectina foram realizadas no 9º mês de indução, ao fato de que alterações metabólicas instaladas são melhores observadas com maiores tempos de indução e 2 meses (13º mês) após o término do tratamento com G-CSF e concomitante retirada da indução. Nos períodos da pré-indução (T0), no 3º, 6º e 9º mês de indução com a dieta hipergordurosa e após o tratamento no 13º mês, os animais de ambos os grupos foram submetidos a análise funcional cardíaca (eletrocardiograma, ecocardiograma e ergometria), a fim de verificar o comprometimento cardíaco nesse modelo. Ao final do experimento os animais foram submetidos a eutanásia.

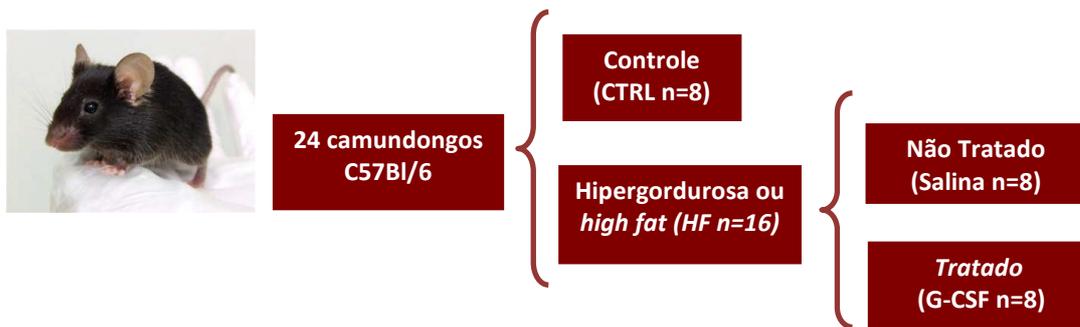


Figura 1. Representação dos grupos experimentais.

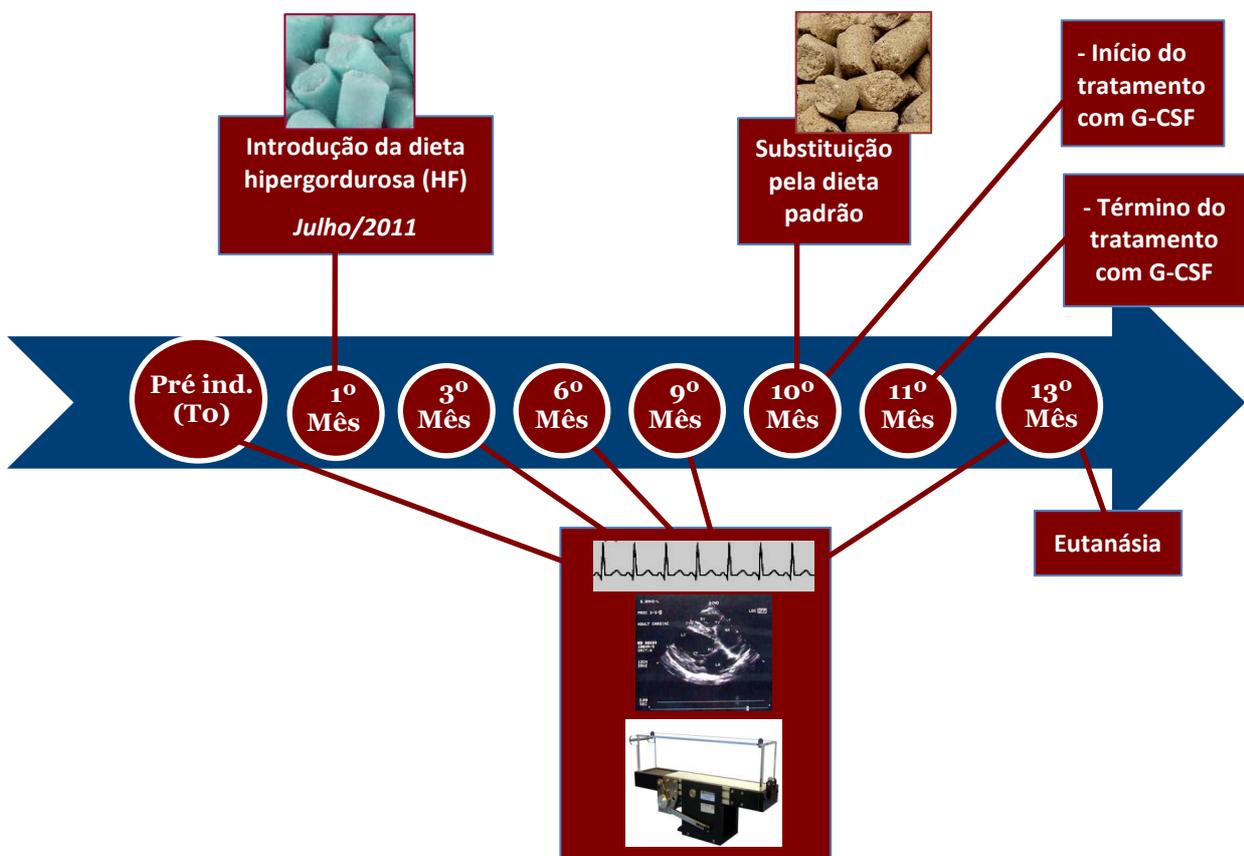


Figura 2. Representação esquemática do desenho experimental.

3.3 MENSURAÇÕES DE GLICEMIA EM JEJUM E PESO CORPORAL

A glicemia de jejum e o peso corpóreo dos animais foram monitorados mensalmente. As medições individuais de peso foram acompanhadas com o auxílio de uma balança semi-analítica

(Tepron – Equipamentos, São Paulo, Brasil), de forma a acompanhar o desenvolvimento da obesidade. A glicose sanguínea foi mensurada após um período de 7 horas de jejum, com amostras de sangue coletadas da extremidade da cauda do camundongo e leitura feita em glicosímetro Accu-check (Roche diagnostics, Mannheim, Alemanha).

3.4 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Os testes de tolerância à glicose (TTG) foram realizados no 3^o, 6^o, e 9^o mês de indução com a dieta, e 2 meses (13^o mês) após o tratamento com G-GSF e concomitante retirada da indução, a fim de avaliar a intolerância à glicose, característica da obesidade. Para tal, os camundongos foram mantidos em jejum durante 4 horas, sendo retirada uma amostra de sangue da ponta da cauda para caracterizar a glicemia após o jejum (tempo 0), em seguida foi injetada uma solução contendo 2g de glicose (Sigma, St. Louis, MO, EUA)/kg de peso do animal, diluída em salina e administrada via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram novamente colhidas nos períodos de 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção de glicose, para a medição dos níveis de glicemia em glicosímetro Accu-check (Roche diagnostics, Mannheim, Alemanha). Os valores obtidos foram utilizados na construção da curva de tolerância, no software Graph Pad Prism 5.0.

3.5 COLETA DE SANGUE

As coletas sanguíneas foram realizadas nos animais antes da indução com a dieta (T0), nos períodos de 3, 6, e 9 meses de indução, com amostras retiradas pelo plexo retro-orbital dos camundongos com o auxílio da pipeta Pasteur contendo heparina, e 2 meses após o tratamento com G-GSF, onde as amostras foram colhidas do plexo braquial. As amostra de sangue total foram centrifugadas e separadas para o isolamento do soro que possibilitou as avaliações bioquímicas do colesterol total e insulina sérica, bem como a avaliação da concentração de adiponectina pelo método de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA).

3.6 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DO SORO

Para tal, foi utilizado o equipamento Celm SBA 200 (CELM – Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, Barueri - SP, BRA) da Clínica veterinária CITIVET, Salvador – Bahia. Foram mensurados os níveis de colesterol total a fim de avaliar uma possível hipercolesterolemia, e a insulina sérica com o intuito de captar a presença de hiperinsulinemia, achados característicos da obesidade.

3.7 QUANTIFICAÇÃO SÉRICA DE ADIPONECTINA

A adiponectina foi quantificada no soro dos camundongos pela técnica de ELISA sanduíche usando kits Duoset ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para adiponectina. Resumidamente, placas de 96 poços (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50 µL do anticorpo de captura (anticorpo monoclonal purificado anti-adiponectina), diluído em PBS, a 4°C durante a noite.

Após lavagens, a reação é revelada com 50 µL/poço de solução reveladora contendo 10 mL de tampão citrato-fosfato 1 M, 2 µL de H₂O₂ e uma pastilha TMB (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O bloqueio da reação é feito através da adição de 50 µL/poço de ácido fosfórico diluído 1:20. A leitura da densidade óptica é determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 - Molecular Devices, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450 nm. As análises são realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

3.8 ANÁLISE FUNCIONAL CARDÍACA

As análises funcionais cardíacas foram realizadas nos animais nos seguintes períodos: antes da introdução da dieta (T₀), no 3^o, 6^o, e 9^o mês de indução com a dieta, e 2 meses (13^o mês) após o tratamento com G-GSF.

3.8.1 Análise ecocardiográfica

Para o exame ecocardiográfico os animais foram anestesiados com isofluorano de ação geral administrado por via inalatória, em concentrações variando de 0,5 a 2%, de forma a manter a frequência cardíaca acima de 350 bpm (STYPMANN, 2007). Logo após o animal foi colocado em decúbito dorsal numa mesa móvel aquecida a 37° C, para a aquisição das imagens nas diferentes janelas acústicas. As patas dos camundongos foram fixadas nos sensores correspondentes à aquisição do traçado eletrocardiográfico e, em seguida, foi realizada a tricotomia do tórax.

As imagens do coração foram obtidas com a utilização do equipamento Vevo 770 (Visual Sonics, Toronto, Canadá), com o transdutor de 30Mhz modelo RMV 707B (Visual Sonics) desenhado especificamente para pequenos roedores, propiciando um elevado detalhamento da anatomia cardíaca e quantificação dos parâmetros hemodinâmicos. As vistas obtidas foram as vistas longitudinais e transversais do paraesternal e vista apical das 4 câmaras do coração para avaliação do fluxo mitral e da velocidade da fração de ejeção do VE através do Doppler. Os exames foram gravados no disco rígido do próprio equipamento para posterior medição e obtenção dos resultados, imagens, vídeos e tabelas.

A avaliação ecocardiográfica transtorácica foi realizada utilizando como ferramentas de estudo: o modo unidimensional (M-Mode), que possibilitou a visualização e mensuração da mobilidade da parede ventricular detectando anormalidades mecânicas; com o bidimensional (B-Mode) visualizou-se estruturas anatômicas que detectaram alterações morfológicas; e o Pulse Wave Doppler Mode que quantificam a hemodinâmica do sistema cardiovascular através da mensuração do fluxo sanguíneo.

A função sistólica do VE foi avaliada utilizando as janelas paraesternal longitudinal, paraesternal transversal e a paraesternal direita. Para a captação da imagem no eixo longo do coração, o transdutor era disposto longitudinalmente ao corpo do animal, nas mediações da região esternal, com o animal em posição supina e paralelo ao solo. Na imagem era possível visualizar ventrículo direito (VD), septo interventricular, VE, parede posterior do VE, átrio esquerdo (AE), via de saída do VE e a artéria pulmonar. Nesta janela foi traçado o encurtamento do eixo maior de VE, responsável por cerca de 20% da fração de ejeção, para posterior cálculo da função cardíaca pelo método de Simpson.

Após a aquisição desta imagem, o transdutor foi girado de forma a ficar com seu maior eixo perpendicular ao maior eixo do animal. Um corte axial do coração foi obtido, sendo possível visualizar o septo interventricular, VE, parede posterior e VD. Nesta janela, foi traçado o modo-M

na altura do músculo papilar. O diâmetro ventricular e as paredes septal e posterior foram mensurados em cinco ciclos cardíacos seguidos, sendo estes valores também utilizados no cálculo da massa de VE. Entre a valva mitral e o músculo papilar, ao nível deste, abaixo, e próximo ao ápice do VE foram adquiridas imagens do ciclo cardíaco, que possibilitaram o delineamento do endocárdio, na diástole e na sístole. Esses valores de diástole e sístole do eixo curto, agregados aos valores relativos ao encurtamento do eixo longo, entraram na fórmula de Simpson para cálculo dos volumes diastólico e sistólico finais.

Volume sistólico, fração de encurtamento, fração de ejeção e débito cardíaco foram calculados a partir dos valores de volumes diastólico e sistólico finais. Com o transdutor disposto novamente de forma longitudinal, agora com a mesa inclinada para esquerda (animal em decúbito esquerdo relativo), foi captada imagem da via de saída de VE, aorta ascendente, porção inicial da aorta descendente e artéria pulmonar direita. Nesta janela, colocou-se o cursor do doppler pulsátil paralelo ao fluxo, na via de saída de VE, captando, desta forma, a integral velocidade-tempo do fluxo aórtico. O Volume sistólico foi obtido pelo produto da área de secção transversa e integral velocidade-tempo (QUINONES et al., 2002).

3.8.2 Análise eletrocardiográfica

Após a indução de anestesia geral por isoflurano nas mesmas concentrações de 0,5 a 2%, foram iniciadas a aquisição dos registros eletrocardiográficos com equipamento Bio Amp PowerLab (PowerLab, ADInstruments, Austrália), que permite registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os dados foram adquiridos, armazenados em computador e analisados no programa Chart 5 for Windows (Power Lab; ADInstruments, Castle Hill, Australia). A fim de minimizar as interferências do ambiente sobre os registros foi utilizado um filtro de corte de 1 a 100 Hz. Os registros foram obtidos na derivação D1.

As análises de ECG incluíram as seguintes medidas: Frequência cardíaca (FC); intervalo PR (IPR); intervalo RR (IRR), amplitude do QRS (AmpQRS); duração de onda P (P); amplitude da onda P (AmpP); intervalo QT (IQT) e presença de arritmias.

A frequência cardíaca foi calculada diretamente pelo programa usando o algoritmo de detecção derivado do complexo QRS no qual o pico da onda R pode ser identificando automaticamente. O IPR foi mensurado do início da onda P até o início do complexo QRS. O IRR foi medido a partir da distância entre o início de duas ondas R. A AmpQRS foi medida do início do

complexo, a partir da linha isoeétrica, até o pico do QRS. O comprimento da onda P foi medido do início até o ponto do retorno à linha isoeétrica. A AmpP foi mensurada a partir da linha isoeétrica do início da onda P até o pico de onda. O IQT foi medido do início do complexo QRS até o final da onda T.

Os cálculos das durações das ondas foram realizados automaticamente colocando-se o cursor ao longo do registro em um ponto de escolha do observador e as medidas dos valores das médias foram determinadas em 14 ciclos cardíacos consecutivos ao longo do registro de ECG.

3.8.3 Análise ergométrica

Individualmente os camundongos foram colocados em uma esteira própria para pequenos roedores, dentro de uma câmara de acrílico munida de estímulo elétrico (modelo LE 8700, Panlab, Barcelona, Espanha) para incitar o exercício nos camundongos. A velocidade da esteira e a amplitude do choque foram controladas pelo equipamento LE 8700 – Treadmill Control (Panlab), assim como o fluxo de ar na câmara foi controlado por um trocador de gases (LE 400, Panlab).

O animal foi colocado na esteira 30 minutos antes de iniciar o exercício para adaptação ao ambiente. A velocidade inicial foi de 6 cm/s com incrementos iniciais de 6 cm/s a cada 5 minutos, aumentando os incrementos para 12 cm/s a cada 10 minutos. O teste foi terminado no momento que o animal entrava em exaustão, isto é, permanecia por 10 segundos na área de choque (0,8A). O parâmetro avaliado foi a distância total percorrida pelo camundongo.

Os dados foram enviados ao computador através de um amplificador contendo uma placa analógico-digital conectado ao computador (ML 820, PowerLAB, ADInstruments, Austrália), e armazenados em computador para análise no programa Chart 5 for Windows (Power Lab; ADInstruments, Castle Hill, Australia).

3.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Os animais foram submetidos à eutanásia 2 meses após a retirada da dieta hipergordurosa e terapia com G-CSF, com a administração de cetamina (Ketamin-S; Cristália, Itapira-SP, Brasil) e

xilazina (Amesadan, Vetbrand, Jacareí-SP, Brasil) em dose três vezes superior à indicada para anestesia (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente).

No momento da eutanásia os corações foram retirados, colocados em tubos de criopreservação estéreis, congelados imediatamente com nitrogênio líquido e armazenado em freezer -70°C, para ser utilizado na análise de Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (PCR real-time).

3.10 PCR EM TEMPO REAL

O RNA foi extraído a partir das amostras de tecidos do coração de acordo com o protocolo de extração de Chomczynski e Sacchi (1987) modificado, e previamente padronizado pelo laboratório, sendo as amostras logo após armazenadas a -20°C. Para síntese de cDNA e para análise da expressão do RNA por PCR em tempo real, utilizou-se o kit TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e termociclador (Applied Biosystems) com etapas de 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C e 5 minutos a 85°C. As sondas utilizadas pelo cDNA foram desenhadas pela empresa (Applied Biosystems) e marcadas com o fluoróforo FAM na extremidade 5'. A emissão da fluorescência emitida através da ativação da sonda durante a amplificação do molde na reação de PCR foi captada pelo equipamento, e as suas concentrações eram diretamente proporcionais à quantidade de cDNA da amostra. Esses valores foram levados a um software específico que traduziu e plotou em um gráfico a representação da intensidade da fluorescência versus o número de ciclos da amostra.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) para o número (n) de animais de um grupo.

Inicialmente para comparar as variáveis quantitativas dos dois grupos em um ponto, foi utilizado o teste t de Student para amostras independentes. Dois ou mais grupos foram comparados através de análise de variância (ANOVA), pós-teste Bonferroni e Newman-Keuls.

O nível de significância utilizado foi de 5%. A análise estatística foi realizada no software Graph Pad Prism 5.0 para Windows (San Diego-CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 PESO CORPÓREO, GLICEMIA DE JEJUM

Camundongos C57Bl/6 machos alimentados com a ração hipergordurosa apresentaram aumento do peso corpóreo e glicemia de jejum quando comparados aos controles. A avaliação do peso e glicemia em jejum entre os grupos experimentais no período da pré-indução (T0) não apresentaram diferenças estatísticas. A diferença entre os grupos tornou-se significativa ($p < 0,001$) a partir da 8ª semana de indução para o peso corpóreo (figura 3A) e na 4ª semana ($p < 0,001$) para a glicemia de jejum (figura 4A) com variações nas taxas glicêmicas.

Após a retirada da dieta hipergordurosa e o término do tratamento com o G-CSF (44 a 54 semanas) o grupo ao qual foi administrado salina, obteve peso acima do grupo controle, porém a longo prazo (52 e 54 semanas) esse grupo se assemelhou ao grupo tratado e ao controle (figura 3B). A glicemia em jejum na 44ª semana não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos dos animais tratados e não tratados e nem com o grupo controle, demonstrados na figura 4B.

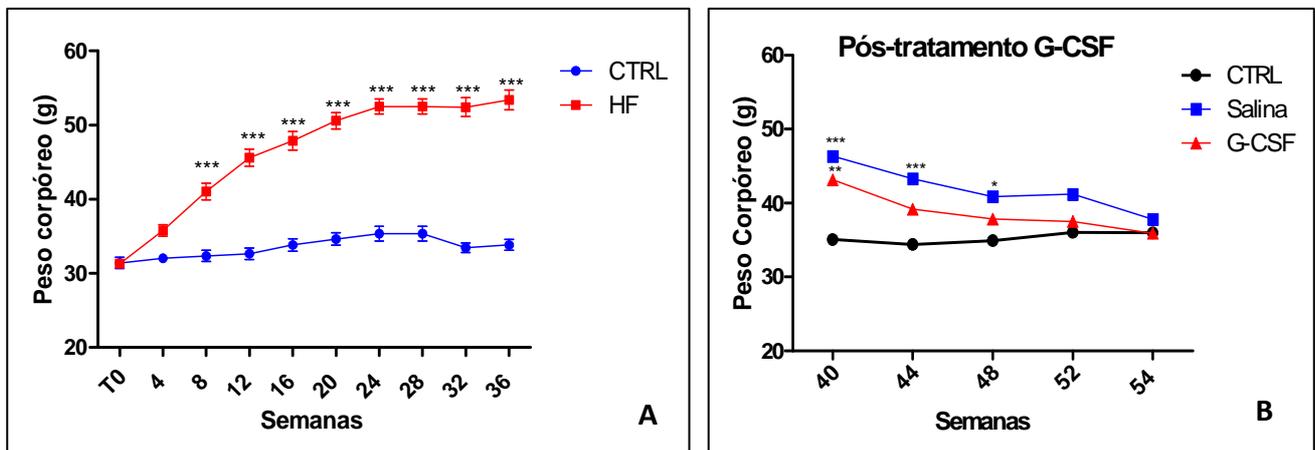


Figura 3. Pesagem dos camundongos. A pesagem foi realizada no período antes da indução (T0), durante a indução (4ª a 36ª semana), retirada da indução e tratamento com G-CSF (39ª a 43ª) e pós-tratamento (44ª a 54ª semana). (A) Os valores representam a média \pm SEM, 8 animais do grupo controle (CTRL), 16 animais induzidos com a ração hipergordurosa à obesidade no grupo *high fat* (HF), do T0 até 36 semanas de indução, sendo $***p < 0,001$. (B) A partir da 40ª semana o grupo HF foi dividido em dois grupos com 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF que receberam apenas salina (Salina), sendo $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

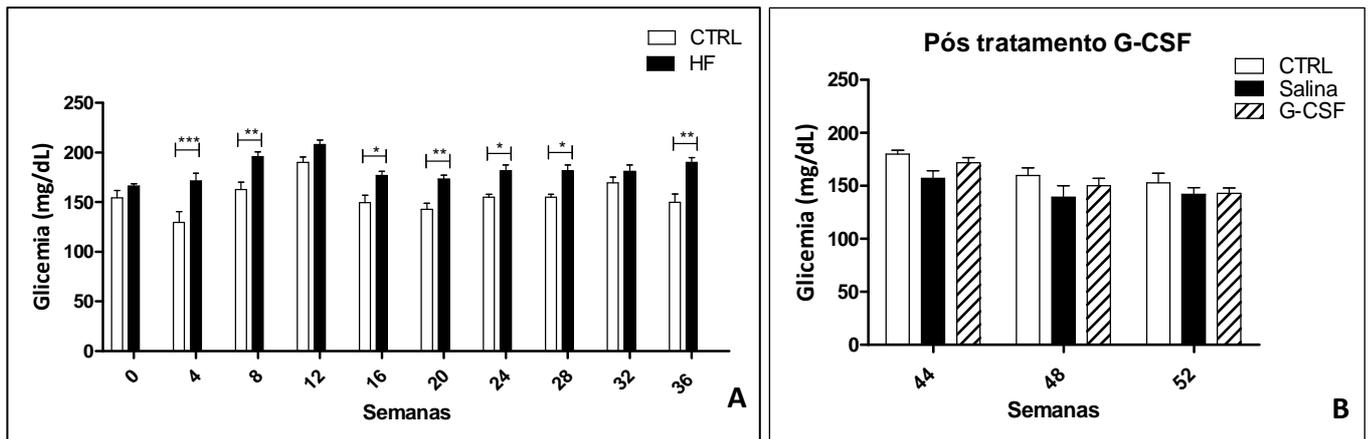


Figura 4. Glicemia de jejum nos camundongos. Dosagem realizada no período antes da indução (T0), durante a indução (4ª a 36ª semana), pós-tratamento com G-CSF e retirada da ração HF (44ª a 52ª semana). (A) Os níveis de glicose dos animais alimentados com a ração hipergordurosa após 7 horas de jejum foram significativamente superiores àqueles mantidos em dieta controle a partir da quarta semana de indução. Os valores representam a média ± SEM, 8 animais do grupo controle (CTRL), 16 animais do grupo HF, do T0 à 36ª semana de indução, sendo *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. (B) A partir da 44ª até a 52ª semana, os grupos HF foram divididos em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina).

4.2 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

O Teste de Tolerância à Glicose (TTG) foi realizado nos períodos de pré-indução (T0), no 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade com a dieta hipergordurosa, e 2 meses após o tratamento com G-CSF e concomitante retirada da dieta (13º mês), visando identificar se os camundongos apresentavam resistência à insulina. Os gráficos revelaram uma intolerância à glicose significativa dos animais submetidos à dieta hipergordurosa a partir do 3º mês de indução da obesidade quando comparados ao grupo controle (Figura 5B), que continuou a aumentar com o decorrer da indução (Figura 5C-D), demonstrando dificuldade em reduzir os níveis de glicose plasmáticos. Nos animais induzidos os valores glicêmicos abrangentes após duas horas (120 minutos) da administração da injeção da glicose intraperitoneal, apresentaram-se superiores em relação aos valores basais (Tempo 0), refletindo numa dificuldade de retomada da concentração inicial de glicose, devido a redução da captação e utilização de glicose pelas células dos animais obesos.

Após os 2 meses do término do tratamento com G-CSF e retirada da indução, os animais de dos grupos (G-CSF e Salina) mostravam uma tolerância normal à glicose, reduzindo o nível plasmático de glicose rapidamente após a administração da mesma (Figura 5E), assemelhando-se ao grupo controle.

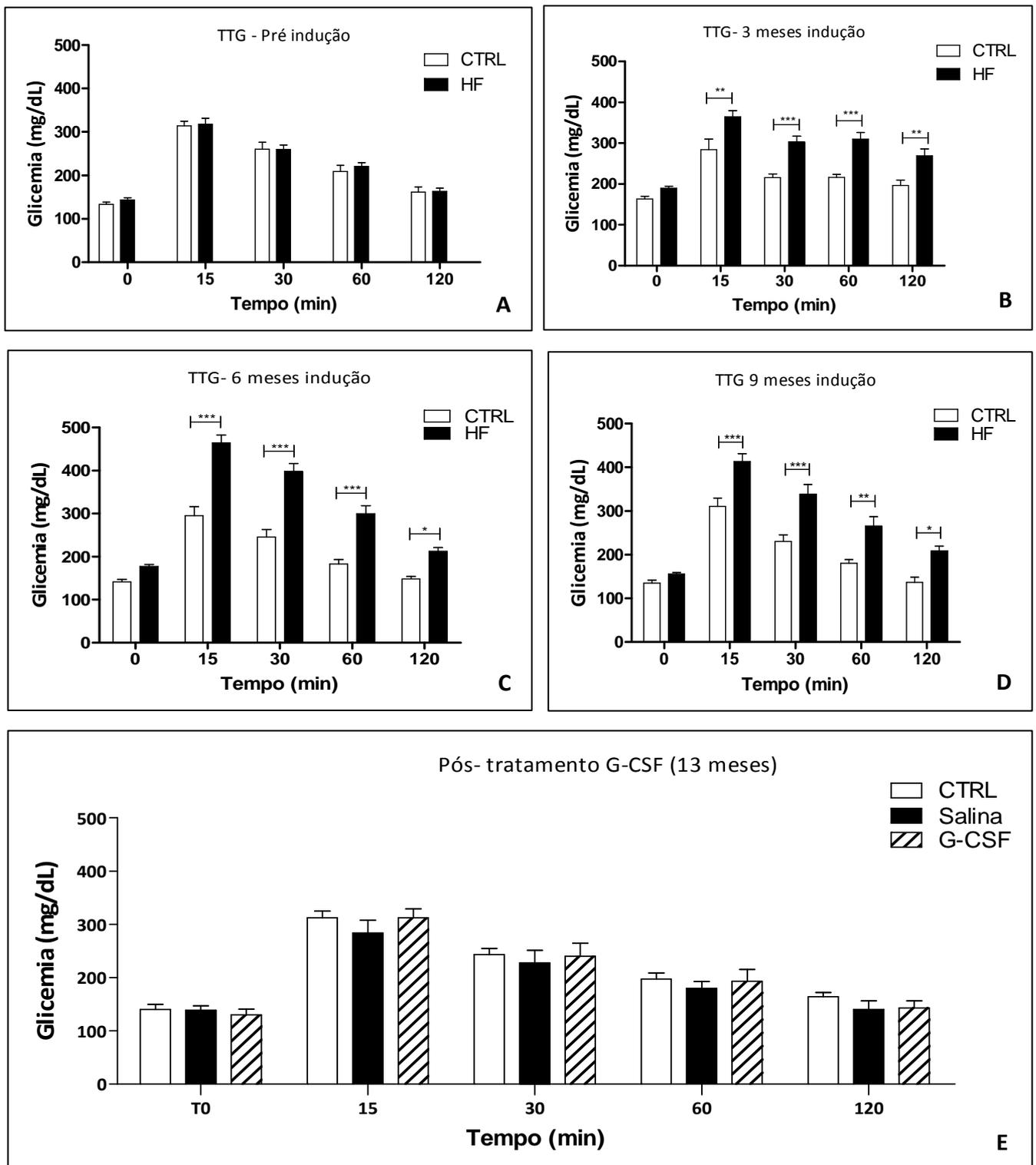


Figura 5. Tolerância à glicose. (A) Representação dos valores glicêmicos no período da pré-indução (T0), e desenvolvimento de uma intolerância à glicose nos animais do grupo HF nos períodos 3 (B), 6 (C), e 9 (D) meses de indução com a dieta hipergordurosa, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle (CTRL) e 16 animais do grupo *high-fat* (HF), sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. (E) Dois meses após o tratamento com G-CSF e retirada da dieta hipergordurosa (13 meses), não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CTRL, tratados com G-CSF (G-CSF), e não tratados (Salina).

4.3 COLESTEROL TOTAL

Foram realizadas análises bioquímicas do soro dos camundongos a fim de avaliar a concentração de colesterol total sérico no período pré-indução (T0), durante a indução (9º mês) e no período pós-tratamento e pós-indução com dieta hipergordurosa (13º mês). Os resultados apresentados apontaram para um aumento significativo no grupo HF, indicando um aumento das lipoproteínas plasmáticas, característica da dislipidemia e conseqüentemente da obesidade (Figura 6A). No 13º mês, ou seja, 2 meses após a retirada da dieta houve uma redução significativa nos níveis de colesterol independente do tratamento com G-CSF (Figura 6B), não havendo diferenças entre o grupo CTRL, o grupo Salina e o grupo G-CSF.

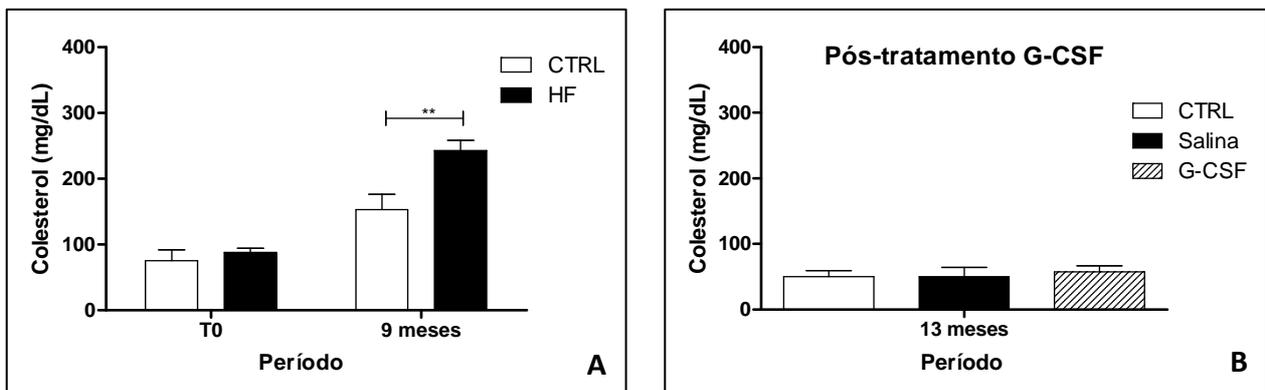


Figura 6. Dosagem do colesterol total sérico. Os níveis de colesterol foram mensurados na pré-indução (T0), aos 9 meses da indução e 2 meses após o término do tratamento e retirada da dieta hipergordurosa (13 meses). (A) O grupo dos animais HF foram significativamente superiores ao grupos dos animais CTRL no 9º mês de indução, os valores representam a média \pm SEM, 8 animais do grupo CTRL e 16 animais do grupo HF, sendo $**p < 0,01$. (B) Dois meses após o tratamento (13º mês) com G-CSF e retirada da dieta hipergordurosa, o grupo HF foi separado em dois grupos com 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), não demonstrando diferenças estatísticas entre os grupos experimentais.

4.4 DOSAGEM SÉRICA DE INSULINA

A quantificação da insulina no soro dos camundongos foi realizada no 9º mês de indução da obesidade com o uso da dieta hipergordurosa, onde não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos experimentais (Figura 7A) e 2 meses após o término do tratamento

com G-CSF e concomitante retirada da dieta hipergordurosa (13º mês) (Figura 7B), apresentando o grupo salina um aumento significativo ($p < 0,001$) comparado ao grupo controle e ao grupo G-CSF.

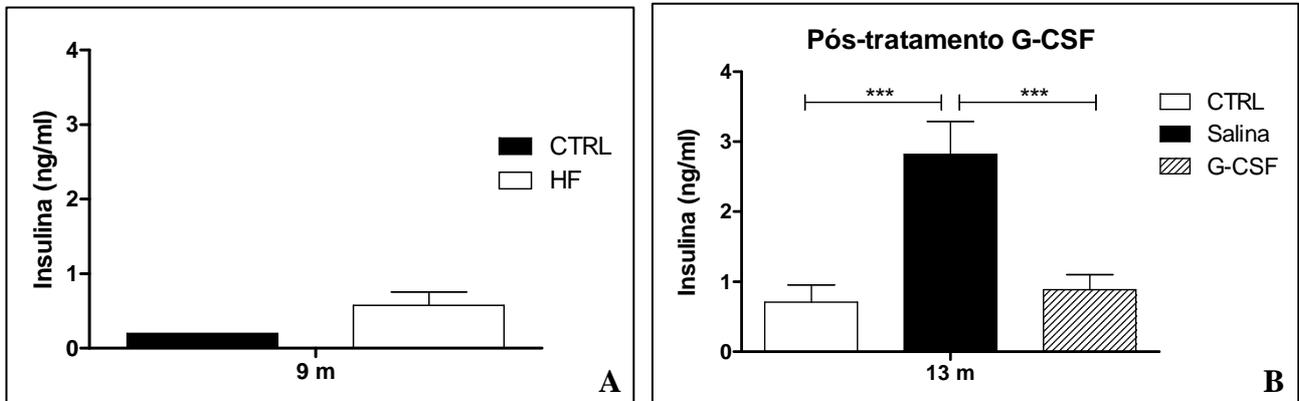


Figura 7. Dosagem sérica de insulina. (A) Representação dos valores no período do 9º mês de indução, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo CTRL e 16 animais do grupo HF, não apresentando diferença entre os dois grupos. (B) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido, em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, sendo *** $p < 0,001$.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE ADIPONECTINA NO SORO

A adiponectina foi quantificada no soro dos camundongos no 9º mês de uso da dieta hipergordurosa e 2 meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês). Os valores encontrados nas dosagens de adiponectina no plasma não demonstraram diferenças significantes (Figura 8A e 8B).

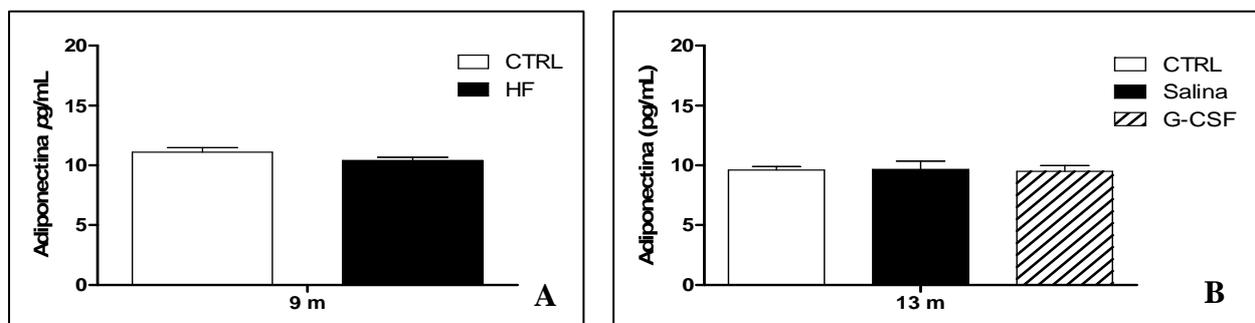


Figura 8. Adiponectina no soro dos animais. (A) Representação dos valores no período do 9º mês de indução, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo CTRL e 16 animais do grupo HF, não apresentando diferença entre

os dois grupos. (B) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, também não possuindo diferença estatística entre os grupos experimentais.

4.6 ANÁLISE FUNCIONAL CARDÍACA

4.6.1 Eletrocardiografia

Na figura 9, temos representado o traçado eletrocardiográfico de um camundongo do grupo controle alimentado com dieta padrão (A) e um camundongo alimentado com a dieta hipergordurosa (B) no 9º mês de indução.

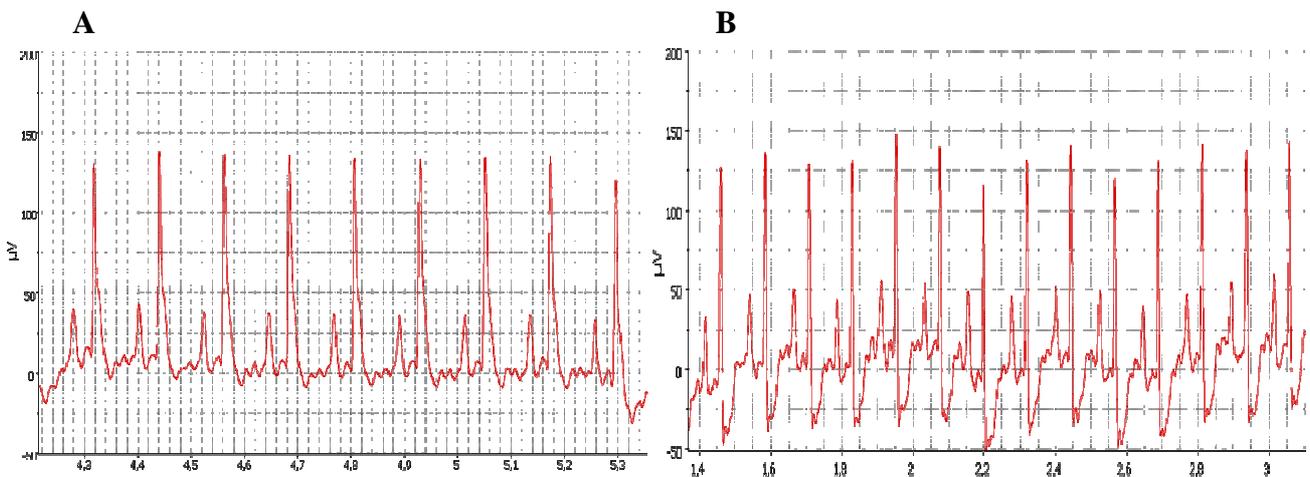


Figura 9. Traçado eletrocardiográfico de camundongo controle e HF no 9º mês de indução. (A) Camundongo do grupo controle: Ritmo sinusal normal. Frequência cardíaca - 490bpm. Intervalo PR - 40ms. Intervalo QT - 25ms. Intervalo RR - 122ms. (B) Camundongo do grupo HF: Ritmo sinusal normal. Infradesnivelamento do segmento ST. Frequência cardíaca - 485 bpm. Intervalo PR - 48ms. Intervalo QT- 54ms. Intervalo RR- 122ms.

4.6.1.1 Frequência cardíaca

Antes da introdução da dieta hipergordurosa não havia diferença entre os grupos experimentais em relação aos valores de frequência cardíaca. Contudo, a partir do 6º mês após a

introdução da dieta hipergordurosa, os animais deste grupo experimental reduziram a frequência cardíaca significativamente ($p < 0,05$) em relação aos animais controles (Figura 10A).

Dois meses após a retirada da dieta hipergordurosa o grupo administrado salina apresentou uma diminuição significativa ($p < 0,001$) da frequência cardíaca comparado ao grupo CTRL, bem como ao grupo G-CSF ($p < 0,05$) (Figura 10B). O grupo G-CSF retornou aos níveis da frequência cardíaca semelhantes àqueles observados no grupo controle.

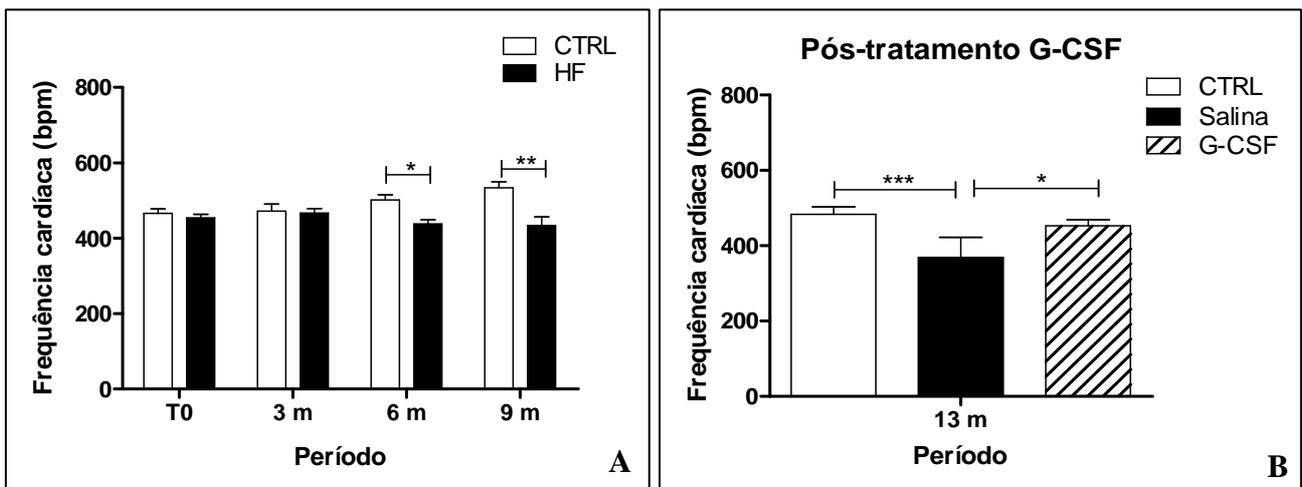


Figura 10. Frequência cardíaca. (A) Valores no período da pré-indução (T0), no 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle (CTRL) e 16 animais do grupo HF, sendo $*p < 0,05$. (B) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta hipergordurosa (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), que apresentaram diferença estatística entre eles, e entre o grupo Salina e CTRL, valores representam a média \pm SEM, sendo $*p < 0,05$; $***p < 0,001$.

Em relação aos parâmetros de tempo da condução do impulso elétrico ao longo das diferentes regiões do coração (intervalos PR RR e QT) e a amplitude de QRS (mv), observa-se que antes da introdução da dieta hipergordurosa não havia diferença entre estes parâmetros. Observou-se um aumento do IPR no 6º mês após a introdução da dieta, que coincidiu com o primeiro ponto de redução significativa da frequência cardíaca (Figura 11A). Em relação ao intervalo RR, a alteração mais acentuada foi no 9º mês após a introdução da dieta, período onde permanece a redução da frequência cardíaca (Figura 11C). A retirada da dieta hipergordurosa com ou sem o tratamento com G-CSF, não foi capaz de reverter às alterações nos IPR e IRR induzidas através da ração. O intervalo QT manteve-se constante ao longo do desenvolvimento deste estudo. Em relação a

amplitude do QRS só foi observada uma diferença significativa no 9º mês após a indução com a dieta, entre os grupos controle e alimentados com dieta HF. Dois meses após a remoção da dieta hipergordurosa e do tratamento com GCS-F, a amplitude do QRS permaneceu elevada somente no grupo Salina, enquanto os grupos controles e G-CSF mantiveram-se nos níveis observados antes da introdução da dieta.

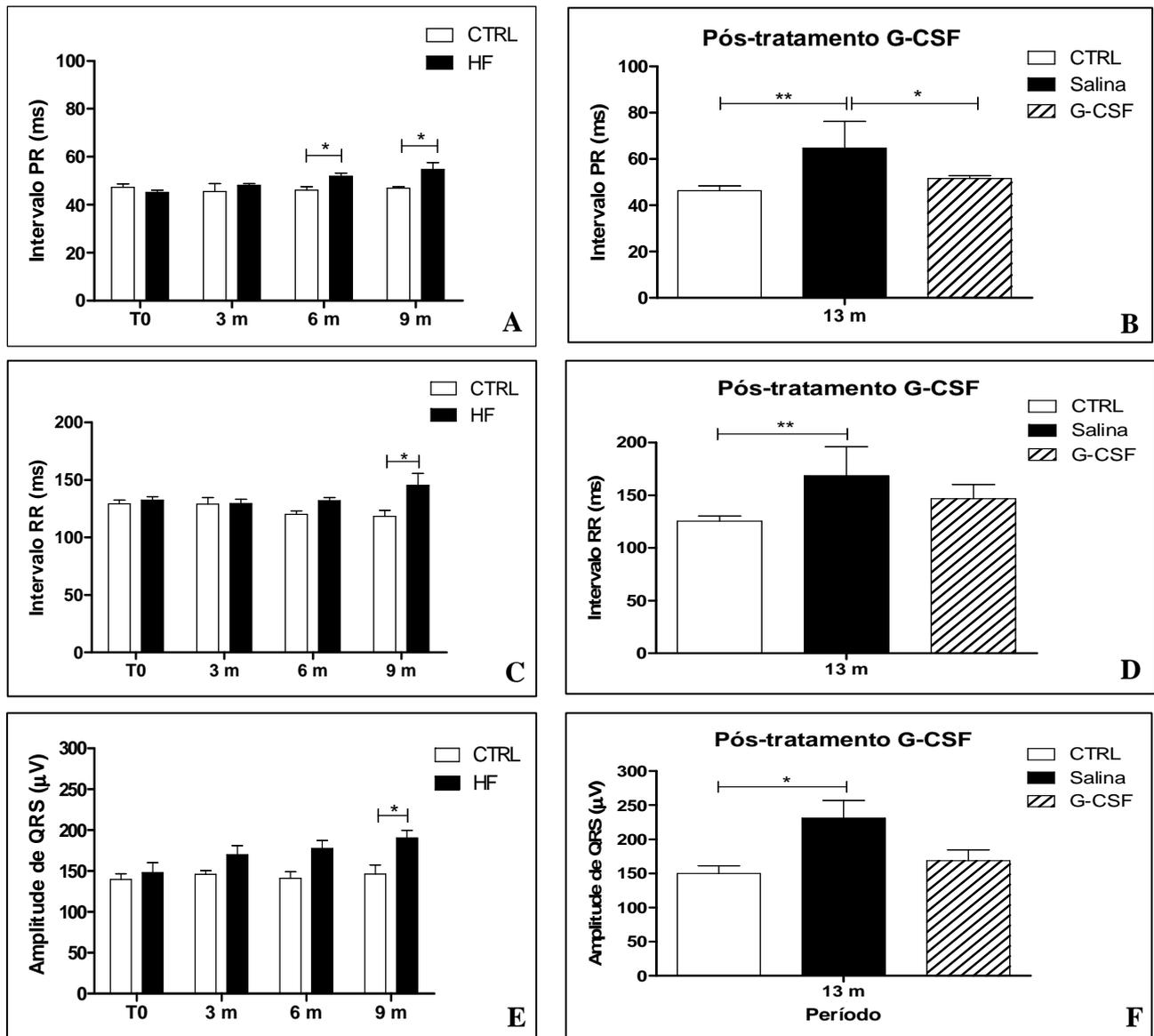


Figura 11. Parâmetros de tempo da condução do impulso elétrico no VE: (A-B) Intervalo PR, (C-D) intervalo RR e (E-F) amplitude do QRS. (A) (C) (E) Representação dos valores no período pré-indução (T0) e no 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle (CTRL) e 16 animais do grupo HF, sendo $*p < 0,05$. (B) (D) (F) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina). Valores representam a média \pm SEM, sendo $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

Para os parâmetros da condução do impulso elétrico atrial foram analisadas a amplitude e a duração da onda P. No período da pré-indução não houve diferença estatística significativa entre os grupos experimentais HF e CTRL para esses dois parâmetros, contudo a partir do 9º mês de indução, o grupo alimentado com a dieta hipergordurosa apresentou um aumento significativo da amplitude da onda P, efeito revertido apenas no grupo tratado com G-CSF no 13º mês de experimento. Na duração da onda P, o grupo HF apresentou um aumento estatisticamente significativo a partir do 6º mês de indução, 2 meses após o tratamento (13º mês), o grupo G-CSF voltou aos níveis controle, o que não foi observado no grupo dos animais ao qual teve a dieta substituída pela ração padrão e foi administrado salina.

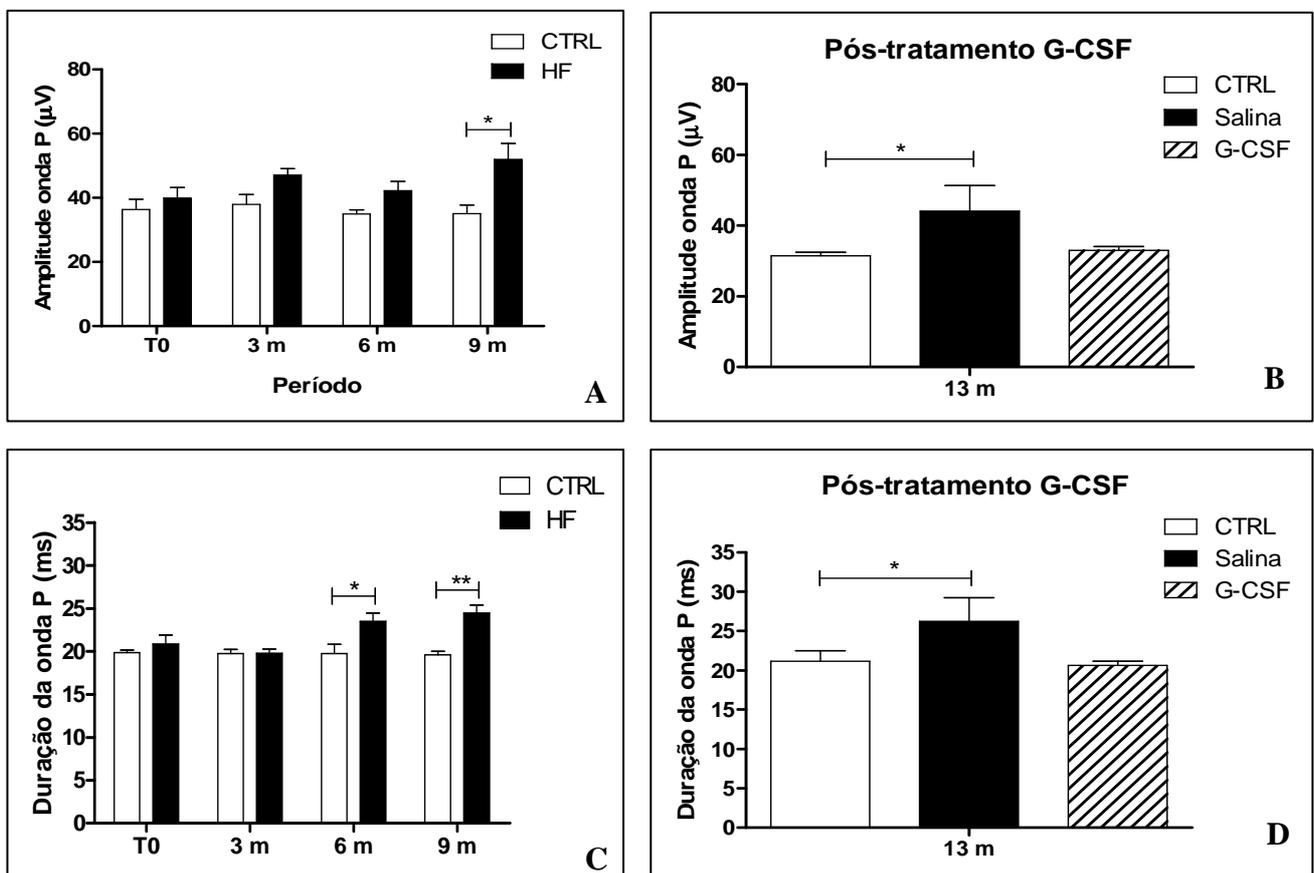


Figura 12. Parâmetros da condução do impulso elétrico atrial: (A-B) Amplitude da onda P, e (C-D) duração da onda P. (A) (C) Representação dos valores no período pré-indução (T0), o 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo CTRL e 16 animais do grupo HF, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. (B) (D) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta hipergordurosa (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, sendo * $p < 0,05$.

4.6.2 Teste ergométrico

Através do teste ergométrico buscou-se avaliar o grau do comprometimento físico de camundongos submetidos à dieta hipergordurosa. Pôde-se observar que antes da introdução da dieta (T0), não havia diferença na distância percorrida entre os grupos experimentais, mas a partir do 3º mês após a introdução da dieta, os animais do grupo HF reduziram a sua distância percorrida em relação ao grupo controle, revelando um comprometimento do seu desempenho físico (Figura 13A). Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e concomitante retirada da indução da obesidade, pôde-se observar que o grupo G-CSF recuperou a capacidade física em realizar exercício na esteira ergométrica, comparáveis ao grupo salina ($p < 0,001$), que não recuperaram a capacidade de realizar o exercício físico (Figura 13B).

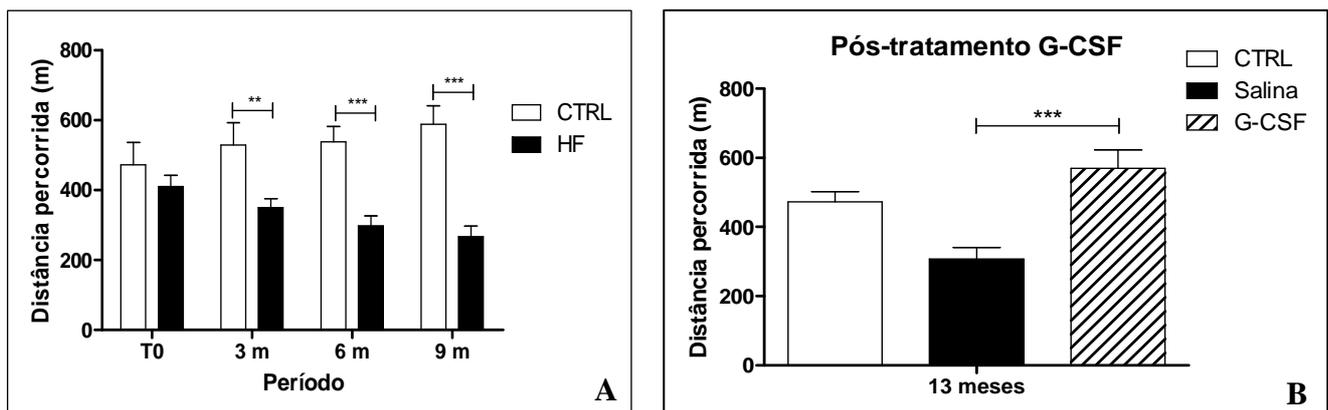


Figura 13. Desempenho dos animais submetidos à atividade física em esteira ergométrica. (A) Valores no período pré-indução (T0), no 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo CTRL e 16 animais do grupo HF, sendo $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. (B) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta hipergordurosa (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, sendo $***p < 0,001$.

4.6.3 Ecocardiografia

A ecocardiografia é em um método não invasivo que utiliza técnica por ultrassom para obter imagens do coração, buscando avaliar a presença e o grau de anormalidades morfológicas e funcionais, tanto a nível da mecânica quanto da hemodinâmica cardíaca.

Estruturalmente, pôde-se observar que antes da introdução da dieta, não havia diferença na espessura do septo interventricular na sístole entre os grupos experimentais. A partir do 6º mês de indução, o grupo alimentado com a dieta hipergordurosa apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle (Figura 14A). Dois meses após o final do tratamento (13º mês) observou uma diferença estatística entre os grupos Salina e G-CSF, no qual o grupo Salina apresentou-se com o septo na sístole espessado (Figura 14B). Analisando a espessura do septo na diástole, não foram observadas diferenças estatísticas significantes antes da introdução da dieta, ou ao longo da indução (Figura 14C), porém dois meses após o término do tratamento o grupo Salina apresentou um espessamento no septo interventricular estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do grupo HF (Figura 14D).

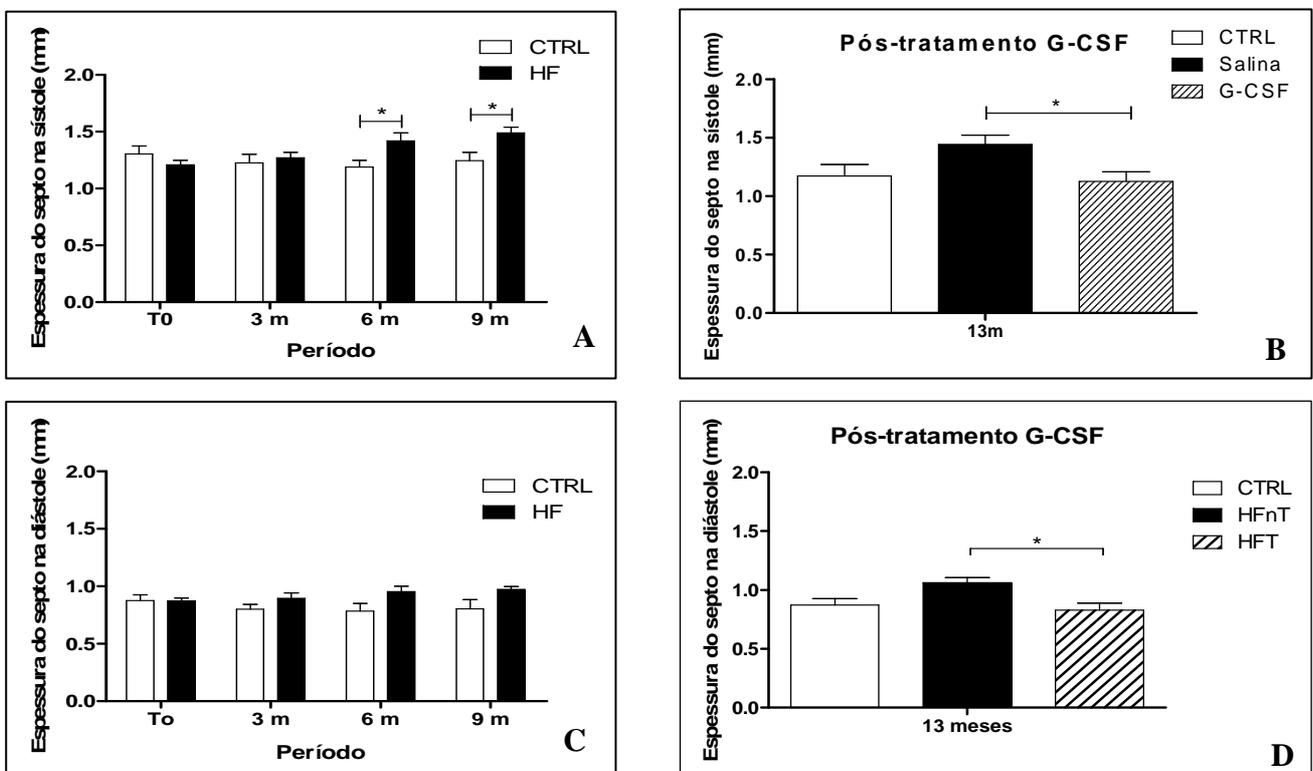


Figura 14. Espessura do septo interventricular. (A) (C) Representação dos valores no período pré-indução (T0) e no 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle

(CTRL) e 16 animais do grupo HF durante a sístole, sendo $*p < 0,05$ e durante a diástole. (B) (D) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, sendo $*p < 0,05$ durante a sístole e durante a diástole.

No estudo ecocardiográfico, observou-se também um aumento da espessura da parede posterior do VE, a partir do 6º mês de indução, tanto na sístole quanto na diástole dos animais do grupo HF quando comparados aos controles, sendo que no período da pré-indução não havia diferença entre esses grupos (Figuras 15A e 15C). Dois meses após o término do tratamento, os animais do grupo Salina mantiveram o aumento da espessura da parede posterior do VE, enquanto que no grupo G-CSF a espessura da parede retornou aos níveis encontrados no grupo controle (Figuras 15B e 15D).

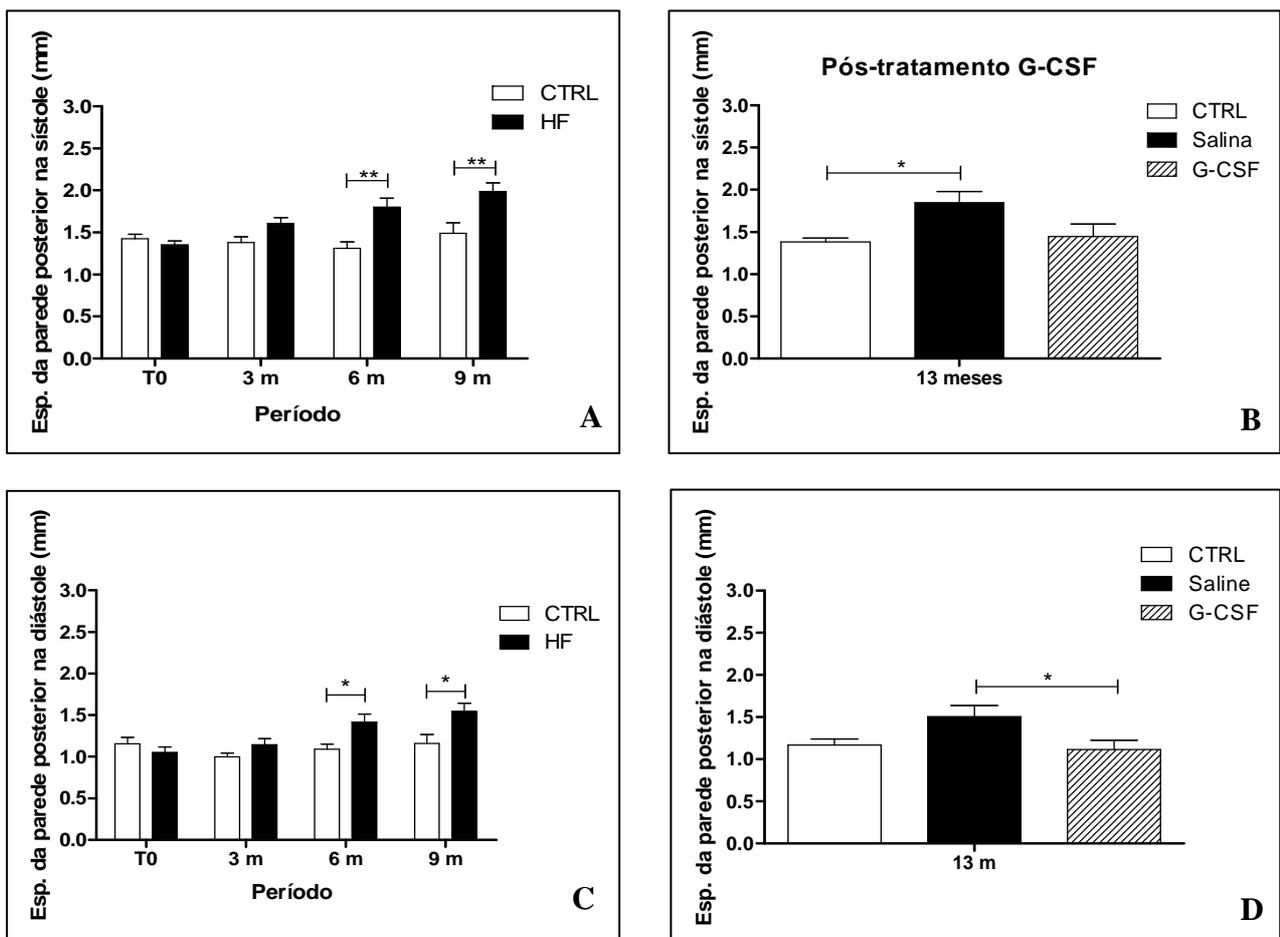


Figura 15. Espessura da parede posterior do VE. (A) (C) Representação dos valores no período pré-indução (T0) e no 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle

(CTRL) e 16 animais do grupo HF durante a sístole e a diástole, sendo $*p<0,05$; $**p<0,01$. (B) (D) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, sendo $*p<0,05$ durante a sístole e durante a diástole.

A análise do diâmetro cavitário do ventrículo esquerdo nos camundongos do grupo HF tanto na sístole quanto na diástole, revelou que antes da introdução da dieta, os grupos experimentais não diferiram estatisticamente, porém foram observadas reduções dos diâmetros ventriculares na sístole e na diástole, em relação ao grupo controle, respectivamente no 6º e 9º mês após a introdução da dieta hipergordurosa (Figuras 16A e 16C). Dois meses após o término do tratamento, o grupo Salina apresentou uma menor dimensão do diâmetro do VE estatisticamente ($p<0,05$) diferente dos demais grupos experimentais, enquanto que no grupo G-CSF os valores retornaram ao nível do grupo controle (Figuras 16B e 16D).

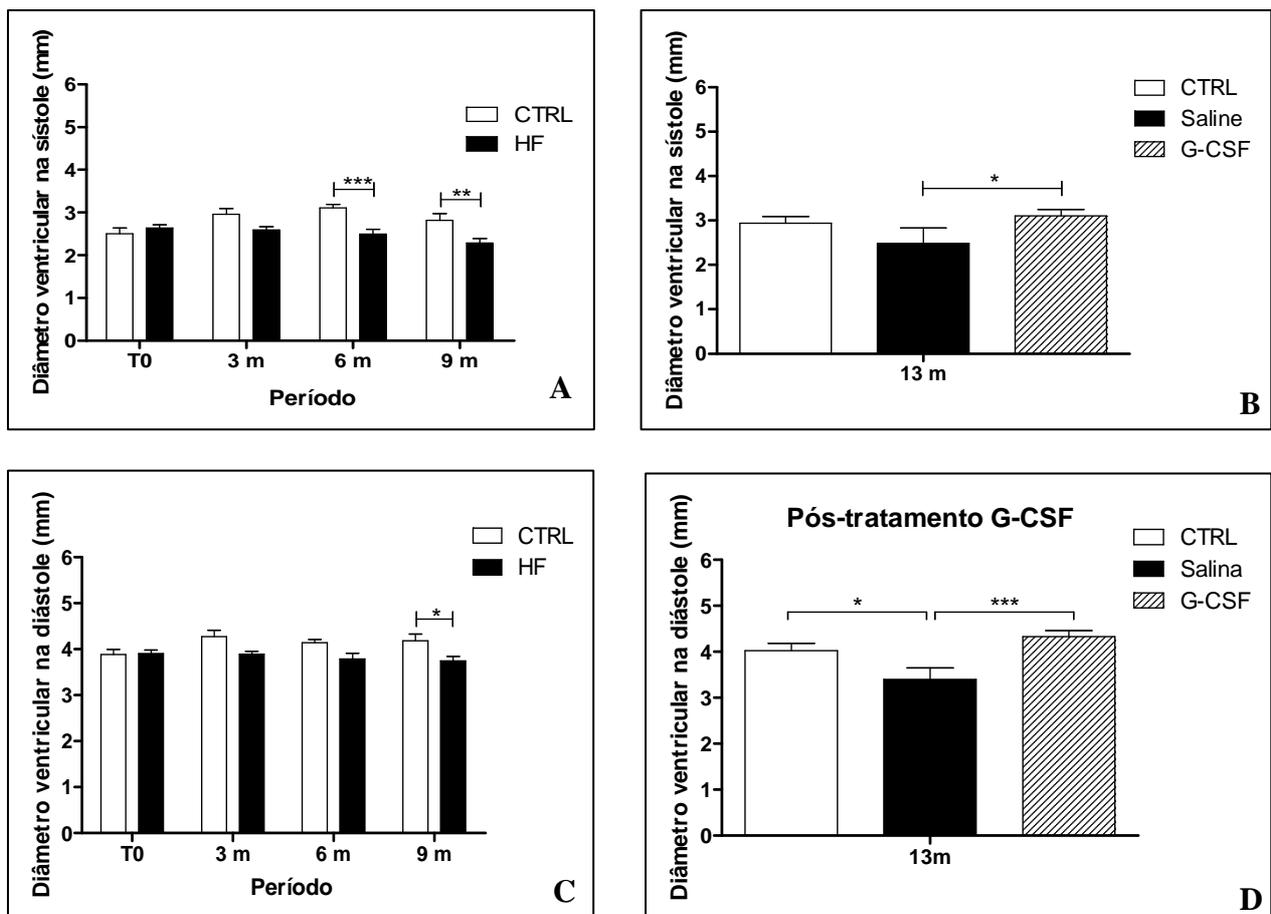


Figura 16. Diâmetro ventricular do VE. (A) (C) Representação dos valores no período pré-indução (T0) e no 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle (CTRL) e

16 animais do grupo HF durante a sístole e a diástole, sendo $*p<0,05$; $**p<0,01$; $***p<0,001$. (B) (D) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSG), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, sendo $*p<0,05$; $***p<0,001$, durante a sístole e durante a diástole.

A massa corrigida do VE foi também um dos padrões utilizados para avaliar a geometria do ventrículo esquerdo. No período pré-indução (T0) e no 9º de introdução com a dieta hipergordurosa foi observada um aumento significativo da massa corrigida ($p<0,05$) do grupo HF quando comparado ao grupo controle (Figura 17A). Aos 2 meses após o término do tratamento e concomitante retirada da dieta (13º mês), o grupo Salina manteve o aumento da massa do VE estatisticamente significante ($p<0,05$) (Figura 17B) tanto comparando-o ao grupo controle, como também ao grupo tratado G-CSF.

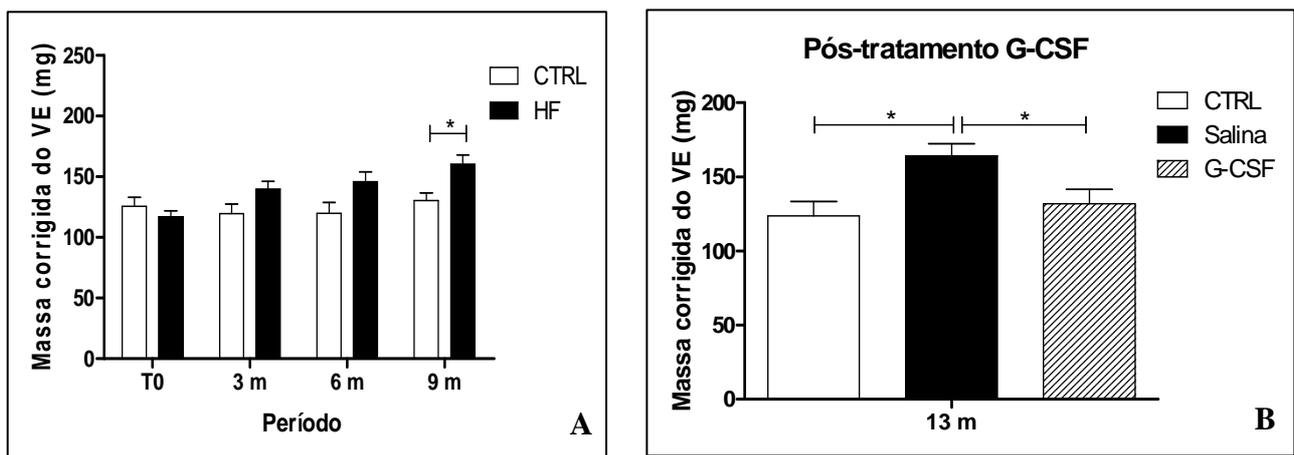


Figura 17. Massa corrigida do VE. (A) Representação dos valores no período pré-indução (T0) e no 3º, 6º e 9º mês de indução da obesidade, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle (CTRL) e 16 animais do grupo HF, sendo $*p<0,05$. (B) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, sendo $*p<0,05$.

Dentre os parâmetros empregados para a avaliação da contratilidade cardíaca, a fração de encurtamento baseia-se na relação entre os diâmetros transversais do ventrículo esquerdo, obtidos no final da diástole e final da sístole. A fração de ejeção segue o mesmo princípio da fração de encurtamento, porém o cálculo baseia-se nos volumes ventriculares, ou seja, na porcentagem do sangue bombeado pelo coração em cada batimento (GRAZIOSI, 1998). Observou-se que no período da pré-indução, os grupos experimentais não apresentaram diferenças estatísticas, mas a

partir do 6º meses de indução com a dieta hipergordurosa, a fração de encurtamento e a fração de ejeção foram significativamente maior no grupo HF quando comparado ao grupo controle (Figura 18A e 18C). Passado dois meses do tratamento e retirada da indução os grupos experimentais se igualaram, não apresentando diferenças estatísticas significantes entre eles (Figura 18B e 18D).

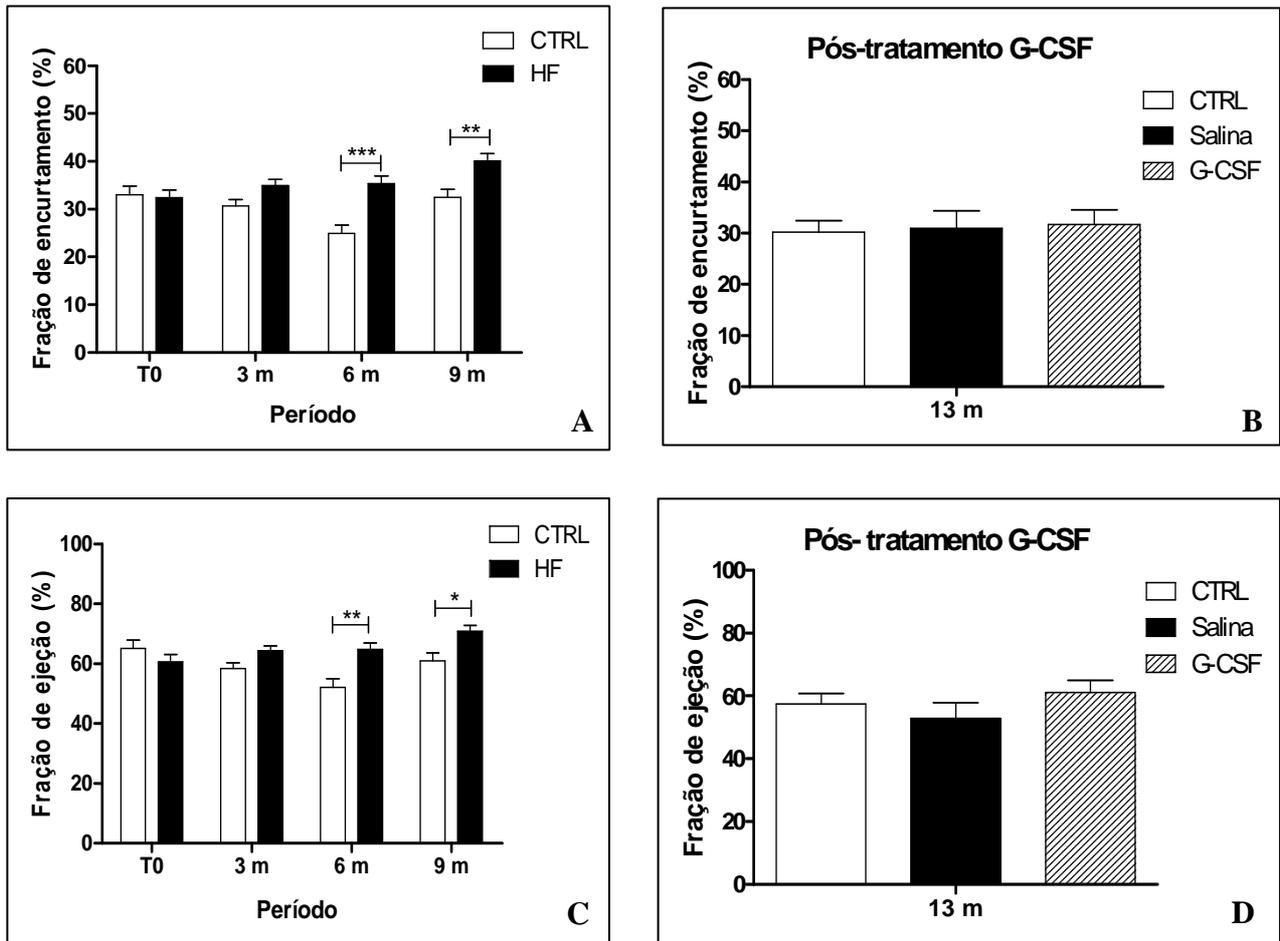


Figura 18. Fração de encurtamento e fração de ejeção. (A) (C) Representação dos valores no período pré-indução (T0) e ao longo da indução da obesidade no 3º, 6º e 9º mês, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle (CTRL) e 16 animais do grupo HF na fração de encurtamento e na fração de ejeção, sendo $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. (B) (D) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, porém não houve diferenças significantes na fração de encurtamento e ejeção nos três grupos experimentais.

Ainda avaliando a função sistólica do VE, o volume sistólico que corresponde ao volume de sangue ejetado pelo ventrículo esquerdo em cada batimento era o mesmo entre os grupos

experimentais no período da pré-indução, sendo evidenciado no 6º mês de indução uma diminuição do volume sistólico no grupo HF (Figura 19A). Contudo, dois meses após o término do tratamento e retirada da indução, o grupo que recebeu salina permaneceu com o volume sistólico reduzido, apresentando uma diferença estatística ($p < 0,05$) em comparação com o grupo tratado com G-CSF, que teve os valores semelhantes ao grupo CTRL (Figura 19B). A mesma tendência foi observada no volume diastólico final no período da pré-indução (T0), durante a indução no 9º mês de indução foi observada uma redução do volume diastólico em comparação ao grupo controle, após o tratamento (13º mês) o grupo Salina manteve essa redução, enquanto o grupo tratado recuperou esse parâmetro.

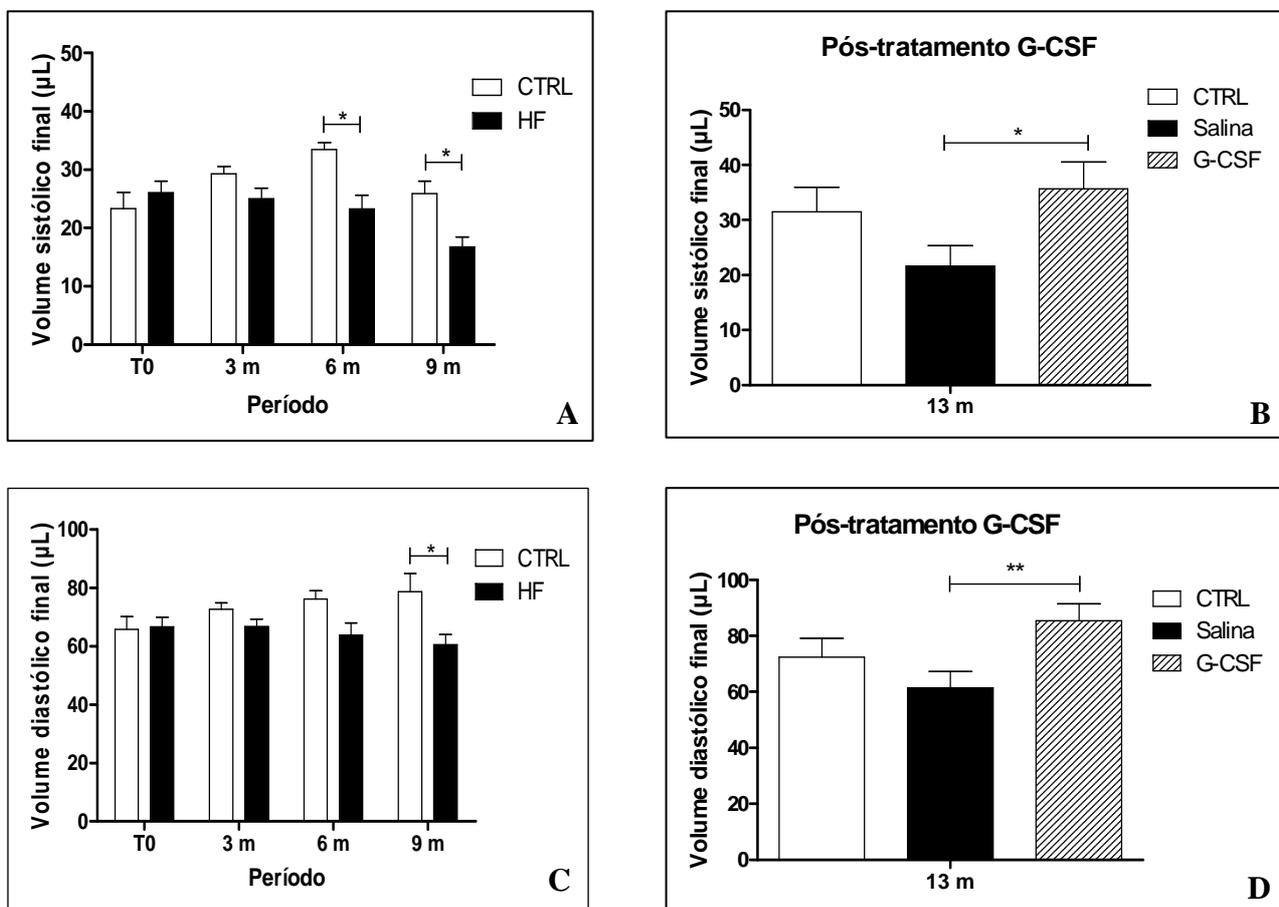


Figura 19. Volume sistólico e diastólico final. (A) (C) Representação dos valores no período pré-indução (T0) e ao longo da indução da obesidade no 3º, 6º e 9º mês, valores representam a média \pm SEM de 8 animais no grupo controle (CTRL) e 16 animais do grupo HF no volume sistólico final e no volume diastólico final, sendo $*p < 0,05$. (B) (D) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, apresentando diferença estatística entre os grupos Salina e G-CSF no volume sistólico final e no volume diastólico final, sendo $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

Por fim, avaliou-se o débito cardíaco que corresponde ao volume ejetado pelo ventrículo esquerdo por uma unidade de tempo (minuto). No período pré-indução (T0) não houve diferença entre os grupos experimentais, mas observou-se uma redução estatisticamente significativa no 9º mês após a introdução da dieta (Figura 20A). Nos grupos G-CSF e Salina após os dois meses do término do tratamento com G-CSF e retirada da indução não foram observadas diferenças entre os três grupos experimentais (Figura 20B).

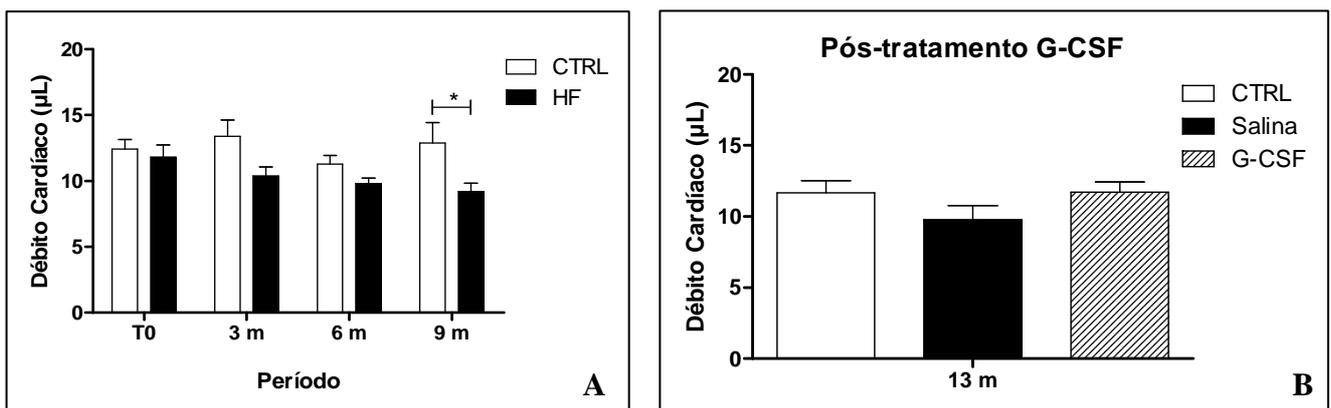


Figura 20. Débito cardíaco. (A) Representação dos valores no período pré-indução (T0) e ao longo da indução da obesidade no 3º, 6º e 9º mês, valores representam a média ± SEM de 8 animais no grupo controle (CTRL) e 16 animais do grupo HF, sendo *p<0,05. (B) Dois meses após o término do tratamento com G-CSF e retirada da dieta (13º mês), o grupo HF foi separado em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média ± SEM, não apresentando diferença estatística entre os grupos experimentais.

4.5 ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular foi realizada após o período de 2 meses do término do tratamento com G-CSF, visando identificar o parâmetro molecular presente ou não nos camundongos dos três grupos experimentais. O gráfico revela que o fator de transcrição GATA-4 dois meses após o término do tratamento e retirada da indução, encontrou-se significativamente elevado no grupo Salina (Figura 21). Contudo, os animais que receberam o G-CSF retornaram os seus valores de GATA-4 para os valores correspondentes aos animais do grupo controle.

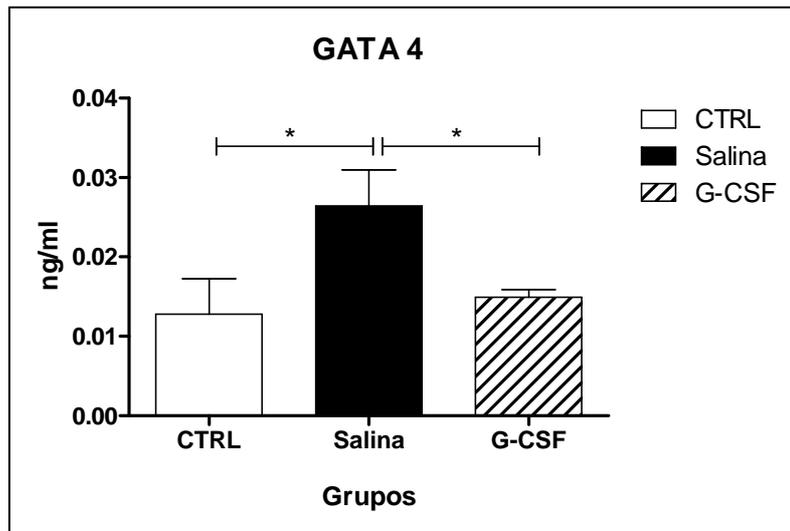


Figura 21. Análise molecular através do PCR- real time. Representação dos valores no 13º mês do experimento, nesse período o grupo HF foi dividido em 8 animais HF tratados com G-CSF (G-CSF), e 8 animais HF não tratados (Salina), valores representam a média \pm SEM, possuindo diferenças estatísticas entre o grupo Salina e o grupo G-CSF, bem como entre o grupo Salina e o grupo CTRL, sendo $*p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Definida como uma condição clínica caracterizada pelo excesso de gordura decorrente do balanço energético positivo, a obesidade promove um aumento no armazenamento de energia, decorrente de um maior peso corporal. O ganho exacerbado de peso está frequentemente associado à comorbidades como o diabetes, a hipertensão e as doenças cardiovasculares trazendo maiores prejuízos a saúde (PEREIRA et al., 1999; FRIEL; CHOPRA; SATCHER, 2007).

As doenças cardiovasculares se apresentam como uma das principais causas de morbidade e mortalidade no mundo ocidental, e têm como um dos principais agentes indutores a composição da dieta ingerida, por ser um fator que prediz o fenótipo cardíaco em resposta a obesidade. Como exemplo, a dieta rica em AGL acarreta alterações estruturais e funcionais no coração (KENCHAIAH et al., 2002; JECKEL et al., 2011).

Neste trabalho, para a indução da obesidade, escolheu-se um modelo que associa a predisposição genética à uma dieta hipergordurosa em camundongos C57Bl/6, visto que esses camundongos são capazes de desenvolver uma síndrome composta por obesidade, hiperinsulinemia, hiperglicemia e hipertensão (PAREKH et al., 1998). Os camundongos foram utilizados nesse modelo experimental devido à maior disponibilidade de ferramentas biotecnológicas para análise funcional (BUGGER; ABEL, 2009), além do baixo custo de criação, e por esta espécie desenvolver uma patologia com características semelhantes em humanos, decorrente da semelhança genética dessa espécie com a espécie humana (COLLINS et al., 2004; POORNIMA; PARIKH; SHANNON, 2006; VIEIRA et al., 2007).

Foram escolhidos camundongos C57Bl/6 machos para esse estudo, por ser bem estabelecido que o camundongo fêmea desta linhagem apresenta alterações metabólicas mais atenuadas, quando comparadas as desenvolvidas pelos machos, resultante da ação protetora do estrógeno sobre os adipócitos, contra a resistência à insulina (MACOTELE et al., 2009; MEDRIKOVA et al., 2012; STUBBINS et al., 2012). As alterações metabólicas desenvolvidas pelos camundongos machos são: inflamação visceral, intolerância à glicose, resistência à insulina e hiperinsulinemia, não sendo observadas nas fêmeas induzidas pelo mesmo modelo (PETTERSSON et al., 2012).

O modelo proposto nesse estudo corroborou com os dados encontrados na literatura, que o apontam como o mais indicado para o desenvolvimento da obesidade, hiperglicemia, e intolerância a glicose. Assim como também favorece a correlação entre a quantidade de lipídio consumido e a

incidência de distúrbios associados a alterações cardíacas (SURWIT et al., 1988, 1995; PETRO et al., 2004).

Neste trabalho, duas semanas após o início da indução da obesidade com a dieta hipergordurosa, os animais começaram a apresentar um ganho de peso, que tornou-se estatisticamente significativa a partir da 8ª semana assim como descrito na literatura (GALLOU-KABANI et al., 2007; SUTHERLAND et al., 2008).

A mensuração da glicemia em jejum nesses animais, apresentou um aumento estatisticamente significativo em relação ao grupo controle ($p < 0,001$) na 4ª semana da indução com a dieta hipergordurosa. Nas semanas subsequentes os níveis glicêmicos entre o grupo controle e o grupo induzido à obesidade continuaram discrepantes, porém com menor grau de significância ($p < 0,01$; $p < 0,05$). Na 40ª semana a dieta hipergordurosa foi retirada e o grupo de animais alimentados com essa ração foi dividido de maneira randômica em dois grupos para propiciar o tratamento. Os grupos foram re-nomeados como grupo G-CSF, que teve os animais tratados com G-CSF, e o grupo Salina com os animais não tratados com G-CSF, esses dois grupos retornaram para a dieta controle nesse período do experimento. A partir da 44ª semana os níveis glicêmicos tanto do grupo G-CSF quanto do Salina, apresentaram-se diminuídos e foram decaindo com mais veemência com o passar das semanas, até que na 52ª semanas os valores se igualaram em uma média de 142 mg/dL.

Os níveis séricos do colesterol total também apresentaram-se elevados no 9º mês de indução da obesidade com a dieta hipergordurosa, um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como a DAC e a aterosclerose que ao estreitar ou bloquear os vasos sanguíneos podem evoluir para um infarto. Estudos que utilizaram o mesmo modelo de indução obtiveram dosagens de colesterol total estatisticamente elevadas, e em menores tempos de indução quando comparado à dieta controle (SCHAEFER, 1997; WEI et al., 2004). Aos 9 meses de indução com a dieta, os níveis de colesterol estavam elevados, mas após o período do tratamento e retirada da dieta hipergordurosa os grupos experimentais não diferiram.

Já foi demonstrado que as elevadas concentrações de AGL circulantes reduzem a sensibilidade à insulina, inibindo a captação de glicose insulino-mediada, a síntese do glicogênio e a oxidação da glicose (BERGMAN; ADER, 2000). Da mesma forma observou-se que a hiperglicemia causa aumento da oxidação da glicose e geração mitocondrial de superóxido levando ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo tem origem no momento em que ocorre um desequilíbrio entre os sistemas pro-oxidantes e anti-oxidantes, de maneira que os primeiros sejam predominantes, resultando em compostos tóxicos ou danosos aos tecidos, chamados de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (SCHNEIDER; OLIVEIRA, 2004).

A decorrente elevação da glicose e de AGL aumentam a secreção de insulina do pâncreas, resultando em alterações metabólicas como a hiperinsulinemia, hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e conseqüentemente, um aumento do risco de doença cardiovascular (DANDONA et al., 2005; WAJCHENBERG et al., 2009). Contudo, neste trabalho não foram observadas variações nos níveis de insulina séricos dos camundongos durante a indução com a dieta hipergordurosa, pelo fato de que a interação da insulina com seu receptor nas células beta pancreáticas resultam em alterações nos mecanismos moleculares da via de sinalização, sugerindo uma associação entre a resistência à insulina e a diminuição da secreção deste hormônio (HARBER et al., 2001; ARAÚJO et al., 2005). Contudo, dois meses após a retirada da dieta observou-se um aumento nos níveis de insulina no grupo ao qual foi administrado salina, sugerindo que o uso prolongado da dieta hipergordurosa pode induzir uma resistência à insulina em fase tardia. Isto pode ser atribuído a uma alteração na expressão dos receptores para insulina nas células beta pancreáticas, com conseqüente, alteração nos mecanismos moleculares da via de sinalização, diminuindo sua secreção devido ao estresse oxidativo decorrente do excesso de AGL (HARBER et al., 2001; ARAÚJO et al., 2005), com a redução do aporte da dieta hipergordurosa, diminuiria os níveis de AGL, revertendo o efeito sobre os receptores para insulina nas células beta pancreáticas e sobre as vias de sinalização.

Em relação aos resultados do TTG, observou-se que a partir do 3º trimestre pós-indução da dieta os grupos alimentados com dieta hipergordurosa apresentaram níveis de glicemia mais elevados que o grupo controle. Diferença que permaneceu até o 9º mês após o início da introdução, mas dois meses após o término a retirada da dieta hipergordurosa essa diferença foi revertida, independente do uso de G-CSF.

Esse evento poderia ser justificado pelo fato de que as células β pancreáticas realizam uma compensação aumentando a produção de insulina devido à resistência à insulina (KAHN, 2001). Com a progressão da resistência à insulina e da hiperinsulinemia compensatória, as ilhotas pancreáticas tornam-se incapazes de preservar o estado hiperinsulinêmico, instalando-se então a intolerância à glicose. Entretanto, no trabalho aqui apresentado foi demonstrado que a obesidade provocada pela dieta hiperlipídica não alterou os níveis de insulina dos animais HF, fato que corrobora com o estudo de Duarte et al. (2006), porém contrapõem-se aos valores encontrados no trabalho de Borba et al. (2011).

As alterações bioquímicas e antropométricas foram revertidas após a retirada da dieta independente do tratamento com G-CSF, corroborando com estudos realizados em diversas partes do mundo que chegam sempre a um mesmo consenso de que modificações no estilo de vida sedentária para uma vida mais saudável, regrada a dieta balanceada, rica em fibras, associada à

atividade física de, pelo menos, 150 minutos semanais podem ter papel decisivo na prevenção da obesidade e diabetes (TUOMILEHTO et al., 2001).

O excesso de AGL na circulação além de interferir no transporte de glicose reduzindo a expressão de GLUT4 no músculo esquelético, também altera o metabolismo do músculo cardíaco com consequente depressão do transporte de glicose insulino-mediado. No coração esse excesso traduz em piora da função contrátil (MACHADO; SCHAAN; SERAPHIM, 2006), devido ao desenvolvimento de resistência a insulina e dislipidemia, o que aumenta o risco de doenças cardiovasculares (SOWERS; EPSTEIN; FROHLICH, 2001; COLLINS et al., 2004; WAJCHENBERG et al., 2009).

Para a avaliação da função cardíaca, neste estudo foram realizados o eletrocardiograma, o ecocardiograma e a ergometria antes da indução da dieta, durante a dieta (3º, 6º e 9º mês) e dois meses após o término do tratamento com o G-CSF e retirada da dieta (13º mês). Os parâmetros avaliados na eletrocardiografia incluíram a frequência cardíaca, intervalo PR, intervalo RR, intervalo QT, amplitude do QRS, amplitude e duração da onda P.

No período da pré-indução, todos os parâmetros dos grupos experimentais se apresentaram sem diferenças estatísticas, com o início da administração da dieta e indução da obesidade foi observadas uma diminuição significativa ($p < 0,05$) da frequência cardíaca entre o grupo HF e controle, que foram bem correlacionados com aumento do IPR e do IRR. A bradicardia observada no grupo HF pode ser atribuída ao comprometimento autonômico, agravado ao longo do tempo pelo desenvolvimento da neuropatia autonômica cardíaca (NAC) frequente em pacientes obesos (KEMPLER et al., 2002; MASER et al., 2003). Dois meses após o término do tratamento e remoção da dieta, observou-se que os animais alimentados com dieta hipergordurosa e tratados com G-CSF tiveram esses parâmetros eletrocardiográficos normalizados com a melhora da frequência, e diminuição do IPR e do IRR. Remme (2003) em seu trabalho propõe que essas alterações elétricas encontradas durante o período da indução no grupo HF, estão envolvidas com o processo gradual de remodelamento estrutural e elétrico cardíaco associado ao desenvolvimento da obesidade.

Foi encontrado nesse estudo um aumento da amplitude do QRS que é sugestivo de desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, esta elevação está associada ao aumento da densidade de correntes despolarizantes na região ventricular, devido a um aumento do tamanho dos cardiomiócitos (RUSSEL et al, 2007). A remoção da dieta hipergordurosa não foi capaz de reverter esta alteração funcional, mas a administração concomitante do G-CSF restaurou a amplitude do QRS para os níveis do grupo controle, sugerindo uma modulação sobre a progressão do remodelamento cardíaco. A presença de hipertrofia ventricular pode levar ao aumento na duração da onda P, representando uma lentificação na condução intra atrial decorrente de um maior esforço

que a câmara atrial está exercendo para bombear sangue para o ventrículo hipertrofiado (OUWENS et al., 2005; 2007).

A hipertrofia também foi sugerida pelos achados nos exames de ecocardiografia, onde os animais HF apresentaram aumento da espessura do septo interventricular e da parede posterior, bem como aumento da massa e uma redução no diâmetro da câmara ventricular a partir do 6º mês de indução, indicando o desenvolvimento de uma hipertrofia concêntrica. Na hipertrofia, o cardiomiócito pode aumentar em comprimento ou diâmetro. Quando aumenta em comprimento, o diâmetro interno do VE reduz e a hipertrofia é denominada concêntrica, estando mais associada à sobrecarga de pressão e consequentemente a obesidade. A hipertrofia concêntrica é o padrão geométrico ventricular mais associado à progressão para IC, e em especial, para sua forma com disfunção diastólica (BRUNNER, 2008).

Esse estudo corroborou com o estudo realizado por van den Brom e cols. (2012), ao observarem que a dieta hipergordurosa administrada para ratos resultou numa diminuição do diâmetro do VE durante a diástole, aumento da espessura da parede na sístole e na diástole, e na diminuição dos volumes diastólicos e sistólicos no 6º e 9º mês de indução da obesidade. A obesidade se associa com padrão de enchimento diastólico menor, o que reflete uma possível redução da complacência ventricular associada não somente, a redução do diâmetro ventricular, mas também a um comprometimento progressivo da função diastólica, relacionada a uma diminuição da complacência. Mesmo com o volume diastólico final e o volume sistólico menores, a fração de ejeção esteve aumentada pelo fato que a fração de encurtamento também aumentou, demonstrando que esse ventrículo está contraindo mais, sendo achados frequentes em situações de hipertrofia. A administração do G-CSF aumentou o volume diastólico final e o volume sistólico final, sugerindo uma reversão do quadro de hipertrofia concêntrica, facilitando o enchimento ventricular. O aumento da expressão de receptores de G-CSF nos cardiomiócitos após a administração deste fator de crescimento, pode desencadear na melhora do desempenho cardíaco (HARADA et al., 2005; SUGANO et al., 2005).

Avaliando a capacidade de realização de exercício, a partir do 3º mês do início da dieta hipergordurosa observou-se uma diminuição estatisticamente significativa da distância percorrida no grupo HF, e a capacidade de exercício desses animais foi diminuindo progressivamente ao longo do experimento. Esses achados são consistentes com o observado em humanos (REGENSTEINER et al., 1995) e com estudos prévios realizados em camundongos alimentados com dieta hipergordurosa, que após 2 meses de uso já apresentavam diminuição da capacidade de realizar atividade física (YOKOTA et al., 2009). A obesidade induzida por dieta hipergordurosa contribui diretamente para a capacidade reduzida de realizar atividade física (YOKOTA, 2009), mas a perda

de peso pela retirada da dieta sem o tratamento com G-CSF, não induziu a recuperação da capacidade de exercício na esteira ergométrica, sugerindo que a redução do remodelamento cardíaco e, conseqüente, preservação da estrutura e função cardíaca foram elementos essenciais para manutenção da capacidade física destes animais tratados com G-CSF.

Neste estudo as alterações da função cardíaca como redução de volume diastólico final, volume sistólico e, conseqüentemente, débito cardíaco podem ter contribuído diretamente para redução da capacidade física do animal. Em estudos realizados com camundongos portadores da cardiomiopatia chagásica crônica foi observado que a administração de G-CSF recuperou a capacidade de realizar exercício físico nesses animais (MACAMBIRA et al., 2009). Os efeitos benéficos do G-CSF sobre o coração em diferentes modelos de cardiopatia incluem diminuição da apoptose de miócitos cardíacos; aumento da expressão de conexina 43; aumento da expressão dos receptores de G-CSF; aumento da apoptose de células inflamatórias e mobilização de células tronco. Estes efeitos contribuem para a restauração da função cardíaca, e conseqüentemente, para a recuperação da capacidade de realizar exercício físico (HARADA et al., 2005; SUGANO et al., 2005; MACAMBIRA et al., 2009).

Nesse estudo a investigação molecular mostrou que o grupo G-CSF apresentou níveis do fator de transcrição GATA-4 equivalentes ao grupo controle e menores que o grupo Salina, estando bem associados, ao fato que níveis elevados do fator de transcrição GATA-4 estão de acordo com o desenvolvimento da HVE, visto ser um fator responsável pelo remodelamento cardíaco associado à hipertrofia e à insuficiência cardíaca. O fator transcricional GATA-4, atua como um fator regulador chave da transcrição dos genes fetais cardíacos como a isoforma β de miosina de cadeia pesada, peptídeo natriurético atrial, peptídeo natriurético cerebral, e a troponina-I (VEGA et al., 2003). Ku et al. (2011) demonstrou uma expressão significativamente aumentada do gene da troponina-I no coração de ratos obesos compatível com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca. A administração do G-CSF nos animais HF reduziu significativamente os valores elevados do fator de transcrição GATA-4, o mesmo não foi visto no grupo não tratado.

6 CONCLUSÃO

Baseado no exposto, observa-se que o uso prolongado da dieta hipergordurosa é capaz de induzir obesidade, alterações bioquímicas e funcionais nos camundongos machos C57Bl/6, semelhante à condição em humanos. A retirada da dieta hipergordurosa foi capaz de reverter as alterações bioquímicas representadas por glicemia elevada e intolerância à glicose, e colesterol total sérico o que está de acordo com o preconizado na clínica em relação à mudança de hábitos alimentares.

As alterações cardíacas descritas neste trabalho estão de acordo com o quadro da obesidade e estão bem correlacionadas à redução na capacidade de realizar exercícios nos camundongos alimentados com dieta hipergordurosa. Somente a administração do G-CSF foi capaz de induzir a recuperação morfofuncional cardíaca, assim como a capacidade de realizar atividade física e prevenir o comprometimento cardíaco, representado neste trabalho por redução significativa da frequência cardíaca, aumento da amplitude do QRS e espessamento do septo e da parede ventricular que sugerem hipertrofia cardíaca nos animais não tratados. O aumento do marcador GATA-4 foi mais um indicativo da hipertrofia miocárdica encontrada nos animais induzidos com a dieta hipergordurosa, bem como sua redução nos animais tratados com G-CSF foi um indicativo do potencial terapêutico do G-CSF.

Diante deste trabalho, abrem-se as perspectivas futuras para investigação dos mecanismos de ação envolvidos nos efeitos benéficos do G-CSF sobre o coração, através da investigação por novas técnicas de biologia molecular (Real-time PCR), ELISA, ensaio de morte celular, ensaio de proliferação celular e imunofluorescência.

REFERÊNCIAS

ABEL, E. D.; LITWIN, E. S.; SWEENEY, G. Cardiac Remodeling in Obesity. **Physiol Rev**, v. 88, p. 389–419. 2008.

ADA - American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes Care**, v. 20, p. 1183-97. 1997.

ADACHI, Y.; IMAGAWA, J.; SUZUKI, Y.; YOGO, K.; FUKAZAWA, M.; KUROMARU, O.; SAITO, Y. G-CSF treatment increases side population cell infiltration after myocardial infarction in mice. **J Mol Cell Cardiol**, v. 36, n. 5, p. 707-10. 2004.

AINSLIE, D. A.; PROIETTO, J.; FAM, B. C.; THORBURN, A. W. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats. **Am J Clin Nutr**, v. 71, p. 438–42. 2000.

ALPERT, M. A. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. **Am J Med Sci**, v. 321, p. 225–36. 2001.

ANEJA, A; TANG, W. H. W.; BANSILAL, S.; GARCIA, M.; FARKOUH, M. E. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options. **The American Journal of Medicine**, v. 121, p. 748-757. 2008.

ARAÚJO, E. P.; DE SOUSA, C. T.; GASPARETTI, A. L.; UENO, M.; BOSCHERO, A. C.; SAAD, M. J.; VELLOSO, L. A. Short-term in vivo inhibition of IRS-1 expression leads to insulin resistance, hyperinsulinemia and increased adiposity. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1428-37. 2005.

BALSAM, L. B.; WAGERS, A. J.; CHRISTENSEN, J. L.; KOFIDIS, T.; WEISSMAN, I. L.; ROBBINS, R. C. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. **Nature**, v. 428, p. 668-73. 2004.

BARREDA, D.; HANINGTON, P.; BELOSEVIC, M. Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, p. 509-554, 2004.

BERGMAN, R. N.; ADER, M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 9, p. 351-6, 2000.

BONEBERG, E.; HARTUG, T. Molecular aspects of anti-inflammatory action of G-CSF. **Inflammation Research**, v. 51(3), p. 119-128, 2002.

BORBA, A. J.; ROCHA, M. G. M.; DA SILVA, M. F.; TIBURCIO, D. T. S.; PEREIRA, S. A. L.; DOS REIS, L. C.; JÚNIOR, G. T. Dieta hiperlipídico-proteica utilizada para emagrecimento induz obesidade em ratos. **Rev. Nutr**, v. 24, n. 4, p. 519-528. 2011.

BREDE, M.; WIESMANN, F.; JAHNS, R.; HADAMEK, K.; ARNOLT, C.; NEUBAUER, S.; LOHSE, M. J.; HEIN, L. Feedback Inhibition of Catecholamine Release by Two Different α_2 -Adrenoceptor Subtypes Prevents Progression of Heart Failure. **Circulation**, v. 106, p. 2491-2496. 2002.

- BRISTOW, M. R. Mechanisms of development of heart failure in the hypertensive patient. **Cardiology**, v. 92, (suppl 1), p. 3-6. 1999.
- BRUNNER et al. G-CSF treatment after myocardial infarction: Impact on bone marrow derived vs cardiac progenitor cells. **Exp Hematol**, v. 36, n. 6, p. 695-702. 2008.
- BUGGER, H.; ABEL, E. D. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. **Dis Model Mech**, v. 2, n. 9-10, p. 454-66, 2009.
- CALLE, E. E.; RODRIGUES, C.; WALKER-THURMOND, K.; THUN, M. J. Overweight, Obesity, and Mortality from Cancer in a Prospectively Studied Cohort of U.S. Adults. **N Engl J Med**, v. 348, n. 17. 2003.
- CAMPOS, M.A.G.; PEDROSO, E. R. P.; LAMOUNIER, J. A.; COLOSIMO, E. A.; ABRANTES, M. M. Estado nutricional e fatores associados em idosos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 52, n. 4, p. 214-221, 2006.
- CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, vol. 50, n. 2. 2006.
- CASTRO CABEZAS, M.; DE BRUIN, T. W.; De VALK, H. W.; SHOULDERS, C. C.; JANSEN, H.; WILLEM ERKELENS, D. Impaired fatty acid metabolism in familial combined hyperlipidemia. A mechanism associating hepatic apolipoprotein B overproduction and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 92, p. 160-8. 1993.
- CHIOLERO, A.; BOVET, P.; PARADIS, G.; PACCAUD, F. Has Blood Pressure Increased in Children in Response to the Obesity Epidemic? **Pediatrics**, v. 119, n. 3, p. 544 -553. 2007.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem**, v. 162, n. 1, p. 156-9. 1987.
- COLLINS, S.; MARTIN, T. L.; SURWIT, R. S.; ROBIDOUX, J. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiol Behav**, v. 81, n. 2, p. 243-8, 2004.
- COOPER, Z.; FAIRBURN, C. G. A new cognitive behavioural approach to the treatment of Obesity. **Behaviour Research and Therapy**, v. 39, p. 499-511. 2001.
- CORMICK, S. E.; CLARKE, C. I. Prevention and management of overweight/obesity in the community. **Nutrition Bulletin**, v, 29, p. 274-279. 2004.
- COUTINHO, E.; BANDEIRA, F. **Hiperlipidemia e Diabetes**. In: Bandeira F. *Endocrinologia e Diabetes*, 1ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003. 945-57.
- DANDONA, P.; ALIJADA, A.; CHAUDHURI, A.; MOHANTY, P.; GARG, R. Metabolic syndrome: A comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. **Circulation**, v. 111, p. 1448-54. 2005.

DARVALL, K.; SAM, R.; SILVERMAN, S.; BRADBURY, A.; ADAM, D. Obesity and thrombosis. **Eur J Vasc Endovasc Surg**, v. 33, n. 2, p. 223–233. 2007.

DE FERRANTI, S.; MOZAFFARIAN, D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. **Clin Chem**, v. 54, n. 6, p. 945–955. 2008.

DEMETRI, G; GRIFFIN, J. Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Its Receptor. **The Journal of The American Society of Hematology**, v. 78, n° 11, 1991.

DUARTE, A. C. G. O; FONSECA, D. F.; MANZONI, M. S. J.; SOAVE, C. F.; SENE-FIORESE, M.; DÂMASO, A. R. et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Rev Nutr**, v. 19, n. 3, p. 341-8. 2006.

DUNN, F. G. Left ventricular hypertrophy in hypertension. **N Engl J Med**, v. 340, p. 1279-80. 1999.

ECKEL, R. H.; KAHN, S. E.; FERRANNINI, E.; GOLDFINE, A. B. Obesity and Type 2 Diabetes: What Can Be Unified and What Needs to Be Individualized? **Diabetes Care**. 2011; 34:1424–1430.

FANG, Z. Y.; PRINS, J. B.; MARWICK, T. H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. **Endocr Rev**, v. 25, p. 543–567, 2004.

FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. **Schalm's veterinary hematology**. 5.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.

FERRANNINI, E.; NATALI, A.; CAPALDO, B.; LEHTOVIRTA, M.; JACOB, S.; YKI-JARVINEN, H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. **Hypertension**, v. 30, p. 1144-9. 1997.

FONTES, C. F. L. **Diabetes**. In: Poian AT, CarvalhoAlves PC. Hormônios e Metabolismo - Integração e Correlações Clínicas 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2003. 215-68.

FORTUNATO, G. F.; VIDAL, D. T. A.; KLEIN, W.; NETO, A.; ANGRIZANI, A.; VASCONCELOS, J. F.; KANETO, C.; SOUZA, B. S. F.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. P.; MACAMBIRA, S. G. Recovery of pulmonary structure and exercise capacity by treatment with granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) in a mouse model of emphysema. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, *in press*. 2013.

FRANCOSO, L. A.; COATES, V. Anatomicopathological evidence of the beginning of atherosclerosis in infancy and adolescence. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, p. 131-42. 2002.

FRIEL, S.; CHOPRA, M.; SATCHER, D. Unequal weight: equity oriented policy responses to the global obesity epidemic. **BMJ**, v. 335, n. 7632, p. 1241–1243. 2007.

FRIMM, C. C. Disfunção sistólica e diastólica na hipertensão arterial sistêmica com hipertrofia ventricular esquerda. **HiperAtivo**, v. 3, p. 189-94.1998.

FUKUHARA, S.; TOMITA, S.; NAKATANI, T.; OHTSU, Y.; ISHIDA, M.; YUTANI, C.; KITAMURA, S. G-CSF promotes bone marrow cells to migrate into infarcted mice heart, and differentiate into cardiomyocytes. **Cell Transplant**, v. 13, p. 741-748. 2004.

GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ, A.; GROSS, M. S.; RABÈS, J. P.; BOILEAU, C.; LARUE-ACHAGIOTIS, C.; TOMÉ, D.; JAIS, J. P.; JUNIEN, C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. **Obesity** (Silver Spring), v. 15, n. 8, p. 1996-2005, 2007.

GILL, H.; MUGO, M.; WHALEY-CONNELL, A.; STUMP, C.; SOWERS, J. The key role of insulin resistance in the cardiometabolic syndrome. **Am J Med Sci**, v. 330, n. 6, p. 290-294. 2005.

GRAZIOSI, P. Análise ecocardiográfica da estrutura e da função sistólica ventricular esquerda na hipertensão arterial. **HiperAtivo**, v. 3, p. 161-74. 1998.

GUEDES, D. P.; GUEDES, J. E. R. P. **Controle de peso corporal, composição corporal, atividade física e nutrição**. Editora Midiograf. 1998.

GUSTAFSON, B. Adipose tissue, inflammation and atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb**. v. 17, n. 4, p. 332-341. 2010.

HARADA, M.; QIN, Y.; TAKANO, H.; MINAMINO, T.; ZOU, Y.; TOKO, H. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jack-Stat pathway in cardiomyocytes. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 305-311, 2005.

HARBER, E. P.; CURI, R.; CARVALHO, C. R. O.; CARPINELLI, A. R. Secreção da Insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 45, n. 3, p. 19-23. 2001.

HASEGAWA, H.; TAKANO, H.; SHIRAIISHI, H.; UEDA, K.; NIITSUMA, Y.; TADOKORO, H. et al. Intracoronary injection of granulocyte colony-stimulating factor ameliorates the progression of left ventricular remodeling after myocardial ischemia/reperfusion in rabbits. **Circ J**, v. 70, p. 942-944. 2006.

HENRY, C. J.; BUSS, M. S.; LOTHROP, C. D. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part I. Oncology. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 6, p. 728-734, 1998.

HIMMELMANN, A. Hypertension: an important precursor of heart failure. **Blood Press**, v. 8, n. 5-6, p. 253-60. 1999.

HSUEH, W. A.; LYON, C. J.; QUIÑONES, M. J. Insulin resistance and the endothelium. **Am J Med**, v. 117, p. 109-17. 2004.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

JECKEL, K. M.; MILLER, K. E.; CHICCO, A. J.; CHAPMAN, P. L.; MULLIGAN, C. M.; FALCONE, P. H.; MILLER, M. L.; PAGLIASSOTTI, M. J.; FRY, M. A. The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 10, n. 92. 2011.

KAHN, S. E. Clinical Review: The importance of beta-cell failure in the development and progression of type 2 diabetes. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 9, p. 4047-58. 2001.

KANOUPAKIS, E.; MICHALOUDIS, D.; FRAIDAKIS, O.; PARTHENAKIS, F.; VARDAS, F.; MELISSAS, J. Left ventricular function and cardiopulmonary performance following surgical treatment of morbid obesity. **Obes Surg**, v. 11, n. 5, p.552-8. 2001.

KATAN, M. B. Nutrition and blood lipids. **Nutri Metab Cardiovasc Dis**, v. 9, n. 4, p. 2-5. 1999.

KEMPLER, P.; TESFAYE, S.; CHATURVEDI, N. et al. Autonomic neuropathy is associated with increased cardiovascular risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. **Diabet Med**, v. 19, p. 900–909. 2002.

KENCHIAIAH, S.; EVANS, J. C.; LEVY, D.; WILSON, P. W. F.; BENJAMIN, E. J.; LARSON, M. G.; KANNEL, W. B.; VASAN, R. S. Obesity and the risk of heart failure. **N Engl J Med**, v. 347, p. 305–13. 2002.

KU, P.; CHEN, L.; LIANG, J. et al. Molecular role of GATA binding protein 4 (GATA-4) in hyperglycemia-induced reduction of cardiac contractility. **Cardiovascular Diabetology**, v. 10, n. 57. 2011.

LAVIE, C. J.; MILANI, R. V.; VENTURA, H. O.; CARDENAS, G. A.; MEHRA, M. R.; MESSERLI, F. H. Disparate effects of left ventricular geometry and obesity on mortality in patients with preserved left ventricular ejection fraction. **Am J Cardiol**, v. 100, p. 1460–4. 2007.

LI, S. Y.; YANG, X.; CEYLAN-ISIK, A. F.; DU, M.; SREEJAYAN, N.; REN, J. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. **Diabetologia**, v. 49, n. 6, p. 1434-46, 2006.

MACAMBIRA, S. G.; VASCONCELOS, J. F.; COSTA, C. R.; KLEIN, W.; LIMA, R. S.; GUIMARÃES, P.; VIDAL, D. T.; MENDEZ, L. C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; SOARES, M. B. Granulocyte colony-stimulating factor treatment in chronic Chagas disease: preservation and improvement of cardiac structure and function. **FASEB J**, v. 23, n. 11, p. 3843-50. 2009.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Transportadores de glicose na síndrome metabólica. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 177-89. 2006.

MACIEL, B. C. A hipertrofia cardíaca na hipertensão arterial sistêmica: mecanismo compensatório e desencadeante de insuficiência cardíaca. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 409-13. 2001.

MACOTELA, Y.; BOUCHER, J.; TRAN, T. T.; KAHN, CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. **Diabetes**, v. 58, p. 803-812. 2009.

MAGGIO, A. B. R.; AGGOUN, Y.; MARCHAND, L. M.; MARTIN, X. E.; HERRMANN, F.; BEGHETTI, M.; FARPOUR-LAMBERT, N. J. Associations among obesity, blood pressure, and left ventricular mass. **J Pediatr**, v. 152, n. 4, p. 489-93. 2008.

- MANCO, M.; CALVANI, M.; MINGRONE, G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 6, p. 402-13. 2004.
- MANSUR, A. P.; FAVARATO, D.; SOUZA, M. F. M.; AVAKIAN, S. D.; ALDRIGHI, J. M.; CÉSAR, L. A. M.; RAMIRESET, J. A. F. Trends in death from circulatory diseases in Brazil between 1979 and 1996. **Arq Bras Cardiol**, v. 77, n. 2, p. 204. 2001.
- MARTINEZ J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 59, p. 337-345, 2000.
- MASER, R. E.; MITCHELL, B. D.; VINIK, A. I.; FREEMAN, R. The association between cardiovascular autonomic neuropathy and mortality in individuals with diabetes: a meta-analysis. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1895–1901. 2003.
- MEDRIKOVA, D.; JILKOVA, Z. M.; BARDOVA, K.; JANOVSKA, P.; ROSSMEISL, M.; KOPECKY, J. Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control. **Int J Obes**, v. 36, n. 2, p. 262-72. 2012.
- MELANSON, K.; MCINNIS, K.; RIPPE, J.; BLACKBURN, G.; WILSON, P. Obesity and Cardiovascular Disease Risk: Research Update. **Cardiology in Review**, v. 9, n. 4, p. 202-207. 2001.
- MESSERLI, F. H.; NUNEZ, B. D.; VENTURA, H. O.; SNYDER, D. W. Overweight and sudden death: increased ventricular ectopy in cardiomyopathy of obesity. **Arch Intern Med**, v. 147, p. 1725– 8. 1987.
- METCALF, D. The colony-stimulating factors and cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 10, p. 425–434. 2010.
- MEYERS, M.; GOKCE, N. Endothelial dysfunction in obesity: etiological role in atherosclerosis. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 14, n. 5, p. 365–369. 2007.
- MILBERG, P.; KLOCKE, R.; FROMMEYER, G.; QUANG, T. H.; DIEKS, K.; STYPMANN, J.; OSADA, N.; KUHLMANN, M.; FEHR, M.; MILTING, H.; NIKOL, S.; WALTENBERGER, J.; BREITHARDT, G.; ECKARDT, L. G-CSF therapy reduces myocardial repolarization reserve in the presence of increased arteriogenesis, angiogenesis and connexin 43 expression in an experimental model of pacing-induced heart failure. **Basic Res Cardiol**, v. 106, p. 995–1008. 2011.
- MILL, J. G.; VASSALO, D. V. Hipertrofia cardíaca. **Rev Bras Hipertens**, v. 8, p. 63-75, 2001.
- MINATOBUCHI, S.; TAKEMURA, G.; CHEN, X.; WANG, N.; UNO, Y.; KODA, M.; ARAI, M.; MISAO, Y.; LU, C.; SUZUKI, K.; GOTO, K.; KOMADA, A.; TAKAHASHI, T.; KOSAI, K.; FUJIWARA, T.; FUJIWARA, H. Acceleration of the Healing Process and Myocardial Regeneration May Be Important as a Mechanism of Improvement of Cardiac Function and Remodeling by Postinfarction Granulocyte Colony–Stimulating Factor Treatment. **Circulation**, v. 109, p. 2572-2580. 2004.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE**. Obesidade. Cadernos de Atenção Básica - n.º 12. Brasília – DF, 2006.
- MISHU, L.; CALLAHAN, G.; ALLEBBAN, Z.; MADDUX, J. M.; BOONE, T. C.; SOUZA, L. M.; LOTHROP, C. D. Jr. Effects of recombinant canine granulocyte colony-stimulating factor on

white blood cell production in clinically normal and neutropenic dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 12, p. 1957-1964, 1992.

MOMBOULI, J.; VANHOUTE, P. M. Endothelial dysfunction: from physiology to therapy. **J Mol Cell Cardiol**, v. 31, p. 61-74. 1999.

MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; DE SOUZA, A. L.; POPKIN, B. The nutrition transition in Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, p. 105-113, 1995.

MORENO, G.; PERELLÓ, M.; CAMIHORT, G.; LUNA, G.; CONSOLE, G.; GAILLARD, R. C.; SPINEDI, E. Impact of transient correction of increased adrenocortical activity in hypothalamodamaged, hyperadipose female rats. **Int J Obes. (Lond)** 2005.

MORGAN, H. E.; BAKER, K. M. Cardiac hypertrophy: mechanical, neural, and endocrine dependence. **Circulation**, v. 83, n. 1, p. 13-25. 1991.

MURPHY, M.; METCALF, B.; JEFFERY, A.; VOSS, L.; WILKIN, T. Does lean rather than fat mass provide the link between birth weight, BMI, and metabolic risk? *EarlyBird* 23. **Pediatric Diabetes**, v. 7, p. 211-214. 2006.

MURRY, C. E.; SOONPAA, M. H.; REINECKE, H.; NAKAJIMA, H. O.; RUBART, M.; PASUMARTHI, K. B.; VIRAG, J. I.; BARTELMEZ, S. H.; POPPA, V.; BRADFORD, G.; DOWELL, J. D.; WILLIAMS, D. A.; FIELD, L. J. Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts. **Nature**, v. 428, p. 664-68. 2004.

NONINO-BORGES, C. B.; BORGES, R. M.; SANTOS, J. E. Tratamento clínico da obesidade. *Medicina, Ribeirão Preto*, **Simpósio: Distúrbios respiratórios do sono**, v. 39, n. 2, p. 246-252. 2006.

OLIVEIRA, F. S. **Cardiopatia e Obesidade**. In: SOCESP. *Tratado de Cardiologia*, 1. ed. Barueri, SP, 2005.

OPAS. (Organização Pan-Americana de Saúde). **Doenças crônico-degenerativas e obesidade: estratégia mundial sobre alimentação saudável, atividade física e saúde**. Organização Pan-Americana de Saúde: Brasília, 2003).

OTT, H. C.; TAYLOR, D. A. From cardiac repair to cardiac regeneration – ready to translate? **Expert Opin Biol Ther**, v.6, p. 867-878. 2006.

OUWENS, D. M.; BOER, C.; FODOR, M.; DE GALAN, P.; HEINE, R. J.; MAASSEN, J. A.; DIAMANT, M. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. **Diabetologia**, v. 48, n. 6, p. 1229-37, 2005.

OUWENS, D. M.; DIAMANT, M.; FODOR, M. et al. Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. **Diabetologia**, v. 50, n. 9, p. 1938-48, 2007.

PARVING, H. H.; PERSSON, F.; LEWIS, J. B.; LEWIS, E. J.; HOLLENBERG, N. K. Aliskiren combined with losartan in type 2 diabetes and nephropathy. **N Engl J Med**, v. 358, n. 23, p. 2433-46. 2008.

STTITES, D. P.; TERR, A. I; PARSLOW, T. **Imunologia médica**. 10^a ed. Rio de Janeiro - RJ, Guanabara Koogan, 2004.

PAREKH, P. I.; PETRO, A. E.; TILLER, J. M.; FEINGLOS, M. N.; SURWIT, R. S. Reversal of Diet-Induced Obesity and Diabetes in C57BL/6J Mice. *Metabolism*, v. 147, n. 9, p. 1089-1096. 1998.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P. ; KLOPFER, M. et al. Obesity and its implications: effects of physical activity and nutritional control. **Rev Bras Nutr Clin**, v. 14, p. 9–17. 1999.

PETTERSSON, U. S.; WALDÉN, T. B.; CARLSSON, P. O.; JANSSON, L.; PHILLIPSON, M. Female Mice are Protected against High-Fat Diet Induced Metabolic Syndrome and Increase the Regulatory T Cell Population in Adipose Tissue. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e46057. 2012.

PETRO, A. E.; COTTER, J.; COOPER, D. A.; PETERS, J. C.; SURWIT, S. J.; SURWIT, R. S. Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. **Metabolism**, v. 53, n. 4, p. 454-7, 2004.

POIRIER, P.; ECKEL, R. H. Obesity and Cardiovascular Disease. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 4, p. 448–453. 2002.

POORNIMA, I. G.; PARIKH, P.; SHANNON, R. P. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. **Circ Res**, v. 98, p. 596-605, 2006.

POPKIN, B. M.; DOAK, C. M. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. **Nutr Rev**, v. 56, p. 106-14. 1998.

QUINONES, M. A.; OTTO, C. M.; STODDARD, M.; WAGGONER, A.; ZOGHBI, W. A. Recommendations for quantification of Doppler echocardiography: a report from the Doppler Quantification Task Force of the Nomenclature and Standards Committee of the American Society of Echocardiography. **J Am Soc Echocardiogr**, v. 15, n. 2, p. 167-84, 2002.

REGENSTEINER et al. Effects of non-insulin-dependent diabetes on oxygen consumption during treadmill exercise. **Med Sci Sports Exerc**, v. 27, n. 6, p. 875-81. 1995.

REMME, W. J. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 17, p. 349-360. 2003.

REWERTS, J. M.; HENRY, C. J. Veterinary uses of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. Part II. Infectious Diseases. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 20, n. 7, p. 823-827, 1998.

ROCHA, V. Z.; LIBBY, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, p. 399-409. 2009.

ROSMOND, R. Aetiology of obesity: a striving after wind?. **Obesity reviews**, v. 5, p. 177–181. 2004.

RUSSEL, J. K. Early experience with a novel ambulatory monitor. **J Electrocardiol**, v. 40, n. 6, p. 160-4. 2007.

SAITO, M.; MINOKOSHI, Y.; SHIMAZU, T. Brown adipose tissue after ventromedial hypothalamic lesions in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 248, n. 1, p. 20-25.

SANTOS, J. E. **Obesidade e Sobrepeso**. In: SOCESP. Tratado de Cardiologia, 1. ed. Barueri, SP, 2005.

SANTOS, M. G. S.; PEGORARO, M.; SANDRINI, F.; MACUCOET, E. C. Fatores de Risco no Desenvolvimento da Aterosclerose na Infância e Adolescência **Arq Bras Cardiol**, v. 90, n. 4, p. 301-308. 2008.

SARAIVA, J. F. K. Doença cardíaca hipertensiva: da hipetrofia à insuficiência cardíaca. **HiperAtivo**, v. 2, p. 102-14, 1997.

SCHAEFER, E. J. Effects of dietary fatty acids on lipoproteins and cardiovascular disease risk: summary. **Am J Clin Nutr**, v. 65, n. 5 Suppl, p. 1655S-1656S, 1997.

SCHNEIDER, C. D.; OLIVEIRA, A. R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Rev Bras Med Esporte**, v. 10, n. 4, p. 308-13. 2004.

SCHRAM, M. T.; HENRY, R. M.; VAN DIJK, R. A.; KOSTENSE, P. J.; DEKKER, J. M.; NIJPELS, G.; HEINE, R. J.; BOUTER, L. M.; WESTERHOF, N.; STEHOUWER, C. D. Increased central artery stiffness in impaired glucose metabolism and type 2 diabetes: the Hoorn Study. **Hypertension**, v. 43, n. 2, p. 176-81. 2004.

SHIM, W.; MEHTA, A.; LIM, S. Y.; ZHANG, G.; LIM, C. H.; CHUA, T.; WONGET, P. G-CSF for stem cell therapy in acute myocardial infarction: friend or foe?. **Cardiovascular Research**, v. 89, p. 20-30. 2011.

SILVA, A. R. A.; DOURADO, K. F.; PEREIRA, P. B.; LIMA, D. S. C.; FERNANDES, A. O.; ANDRADE, A. M.; HENRIQUES, M. A. M. Razão TG/HDL-c e Indicadores Antropométricos Preditores de Risco para Doença Cardiovascular. **Rev Bras Cardiol**, v. 25, n. 1, p. 41-49. 2012.

SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**; Tradução Ivana Beatrice Mânica da Cruz et al., 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. VI Diretrizes Brasileiras de Hipertensão. **Rev Bras Hipertens**, vol. 17, n. 1. 2010.

SOWERS, J. R.; EPSTEIN, M.; FROHLICH, E. D. Diabetes, hypertension, and cardiovascular disease: an update. **Hypertension**, v. 37, n. 4, p. 1053-9, 2001.

STOCKHAM, S.L.; SCOTT, M.A. Leukocytes. In: _____. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, 2002. Cap.3, p.49-83.

STUBBINS, R. E.; NAJJAR, K.; HOLCOMB, V. B.; HONG, J.; NUNES, N. P. Estrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. **Diabetes Obes Metab**, v. 14, n. 1, p. 58-66. 2012.

STYPMANN, J. Doppler ultrasound in mice. **Echocardiography**, v. 24, n. 1, p. 97-112, 2007.

SUGANO, Y.; ANZAI, T.; YOSHIKAWA, T. et al. Granulocyte colony-stimulating factor attenuates early ventricular expansion after experimental myocardial infarction. **Cardiovasc Res**, v. 65, n. 2, p. 446-56. 2005.

SURWIT, R. S.; KUHN, C. M.; COCHRANE, C.; MCCUBBIN, J. A.; FEINGLOS, M. N. Diet induced type II diabetes in C57BL/6J mice. **Diabetes**, v. 37, p. 1163-7. 1988.

SURWIT, R. S.; FEINGLOS, M. N.; RODIN, J.; SUTHERLAND, A.; PETRO, A. E.; OPARA, E. C. et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. **Metabolism**, v. 44, n. 5, p. 645-51. 1995.

SUTHERLAND, J.; MCKINLEY, B.; ECKEL, R. The metabolic syndrome and inflammation. **Metab Syndr Relat Disord**, v. 2, n. 2, p. 82-104. 2004.

SUTHERLAND, L. N.; CAPOZZI, L. C.; TURCHINSKY, N. J.; BELL, R. C.; WRIGHT, D. C. Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. **American Journal of Physiology**, v. 295, n. 5, p. E1076- E1083. 2008.

SWYNGHEDAUW, B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 1, p. 215-27. 1999.

TATSUMI, K.; OTANI, H.; SATO, D.; ENOKI, C.; IWASAKA, T.; IMAMURA, H. et al. Granulocyte-Colony Stimulating Factor Increases Donor Mesenchymal Stem Cells in Bone Marrow and Their Mobilization Into Peripheral Circulation but Does Not Repair Dystrophic Heart After Bone Marrow Transplantation. **Circulation Journal**, v. 72, p. 1351-1358. 2008.

TUOMILEHTO, J.; LINDSTROM, J.; ERIKSSON, J. G. et al. Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 18, p. 1343-50, 2001.

van den BROM, C. E.; BULTE, C. S. E.; KLOESE, B. M. et al. High fat diet-induced glucose intolerance impairs myocardial function, but not myocardial perfusion during hyperaemia: a pilot study. **Cardiovascular Diabetology**, v. 11, n. 74. 2012.

VAN LEEUWEN, M.; GIJBELS, M. J.; DUIJVESTIJN, A.; SMOOK, M.; VAN DE GAAR, M. J.; HEERINGA, P.; DE WINTHER, M. P.; TERVAERT, J. W. Accumulation of myeloperoxidase-positive neutrophils in atherosclerotic lesions in LDLR^{-/-} mice *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 28, p. 84-89. 2008.

VEGA, R. B.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. Control of cardiac growth and function by calcineurin signaling. **J Biol Chem**, v. 278, p. 36981-36984. 2003.

VIEIRA, V. J.; VALENTINE, R. J.; WILUND, K. R.; WOODS, J. Á.; CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl**, v. 28, n. 1, p. 11-23. 2007.

Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico-VIGITEL BRASIL 2006. Disponível em:

http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/vigitel_2006_brasil.pdf acessado em 10/11/2012. Acesso 13/11/12.

VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir. Bras**, v. 21, n.6, p. 425-429. 2006.

WAJCHENBERG, B. L.; NERY, M.; CUNHA, M. R.; SILVA, M. E. R. Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 2, p. 145-50, 2009.

WEI, P.; LANE, P. H.; LANE, J. T.; PADANILAM, B. J.; SANSOM, S. C. Glomerular structural and functional changes in a high-fat diet mouse model of early-stage Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 47, n. 9, p. 1541-9, 2004.

WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **Am J Clin Nutr**, v. 67, n. 1, p. 505S–12S. 1998.

WILLET, W. C. **Nutritional Epidemiology** 2nd ed. Oxford University Press: New York. 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Obesity – preventing and managing the global epidemic**. Geneva: Report of a WHO Consultation on Obesity, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The World Health Report 2000. **Obesity - preventing and managing the Global EpidemicII** Series. 2000. Geneve.

WRIGHT, J. J.; KIM, J.; BUCHANAN, J.; BOUDINA, S.; SENA, S.; BAKIRTZI, K.; ILKUN, O.; THEOBALD, H. A.; COOKSEY, R. C.; KANDROR, K. V.; ABEL, E. D. Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. **Cardiovasc Res**, v. 82, n. 2, p. 351-60, 2009.

YOKOTA et al. Oxidative stress in skeletal muscle impairs mitochondrial respiration and limits exercise capacity in type 2 diabetic mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 297, n. 3. P. H1069-77. 2009.

YOUNG, M. E.; MCNULTY, P.; TAEGTMEYER, H. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: part II. Potential mechanisms. **Circulation**, v. 109, p. 121-30. 2002.

ZANELLA, M. T. **Tratamento** In: GLAUDINO A. M.; ZANELLA, M. T. Transtornos alimentares e obesidade. São Paulo: Manole, 2005.

