

**ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO NA CONDIÇÃO DE  
RESISTÊNCIA À OBESIDADE**

**JANETE CORRÊA CARDOSO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Vitória, Março de 2023**

**JANETE CORRÊA CARDOSO**

**ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO NA CONDIÇÃO DE RESISTÊNCIA À  
OBESIDADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. André Soares Leopoldo

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS  
Vitória, Março de 2023**

**JANETE CORRÊA CARDOSO**

**ESTRESSE OXIDATIVO CARDÍACO  
NA CONDIÇÃO DE RESISTENCIA À OBESIDADE**

Aprovada em 07 de Março de 2023.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Prof. Dr. André Soares Leopoldo**

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Orientador

**Profa. Dra. Ana Paula Lima Leopoldo**

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Co-orientadora

**Prof. Dr. Leonardo dos Santos**

Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

Membro Interno

**Profa. Dra. Camila Renata Correa**

Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Membro Externo

“Viver é enfrentar um problema atrás do outro.  
O modo como você o encara é que faz a diferença”

Benjamin Franklin

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela minha vida, saúde, paciência e por estar ao meu lado sempre.

Aos meus pais que fizeram de tudo para que essa jornada do mestrado fosse mais leve e gratificante, onde sempre se dedicaram para eu me tornar uma pessoa e profissional melhor.

Ao meu irmão pela parceria e por me ajudar no dia a dia e correrias, além das caronas para casa quando via o meu cansaço.

Agradeço também a minha namorada ao qual não mediu esforços para me ajudar, sempre me apoiando e acolhendo.

Aos meus sogros por me receber e acolher, tornando a caminhada mais tranquila.

Aos meus amigos da vida que estiveram presentes em meu dia a dia e fizeram com que eu levasse a vida mais leve.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Experimental (LAFIBE), pela parceria e trocas de experiências vivenciadas ao longo desses anos, agradeço à Amanda, Suellem, Ramon, Vinícius, Beatriz, Raíssa, Matheus, Lucas, Luisa, Késsia, Evelylyn e Daniel's.

Agradeço aos colegas de pesquisa do LEMC ao qual me ajudaram nas partes de aprendizagem técnica, agradeço ao Filipe, Ingridy, Renata.

Ao auxílio nas técnicas histológicas ao qual foi de suma importância para os meus resultados. Agradeço ao prof. Dr. Breno, Tadeu e Flávio, todos do LUCCAR. Além também do Laboratório de histotécnicas, um agradecimento ao Tércio.

Ao meu orientador Dr. André Soares Leopoldo, ao qual me incentivou e me ajudou a crescer dentro da pesquisa, sempre se dedicando na evolução da ciência e pesquisa.

À prof. Dra. Ana Paula e Dr. Jóctan pela troca de experiência e incentivos. À FAPES e CAPES pelo apoio financeiro para o fomento deste projeto.

## RESUMO

A resistência à obesidade está associada à complexa interação de fatores estritos e ambientais, conferindo a capacidade de ganho de massa e deposição de gordura corporal, mesmo quando ingeridos dietas hipercalóricas. Considerando que existem inúmeras lacunas na literatura sobre os processos metabólicos que explicam a resistência à obesidade, especificamente em relação ao estresse oxidativo, o objetivo do estudo foi investigar se ratos resistentes à obesidade desenvolvem espécies reativas elevadas de oxigênio no tecido cardíaco. Ratos Wistar foram inicialmente randomizados em dois grupos: Dieta Padrão (DP) e Dieta Hiperlipídica (DH). O grupo DH foi ainda dividido nos grupos Obeso (Ob) e Resistente à Obesidade (ROb) com base no ganho de peso corporal (1/3 superior para Ob; 1/3 inferior para ROb) após 4 semanas de DH. Os ratos foram sacrificados na 14ª semana, e soro e órgãos foram coletados. Avaliação nutricional, perfil alimentar, análise histológica, comorbidades e características cardiovasculares foram determinadas. A massa corporal apresentou diferença significativa entre os grupos dieta padrão e hiperlipídica na 4ª semana do protocolo experimental. Na 4ª semana, após a caracterização da Resistência à Obesidade, houve diferença significativa na massa corporal entre os grupos C, Ob e ROb. Os grupos Ob e ROb apresentaram aumento significativo na ingestão calórica em relação ao C. O grupo Ob apresentou aumento significativo na massa corporal final, gordura retroperitoneal, somatório dos depósitos de gordura corporal e em espécies reativas de oxigênio, em relação aos grupos C e Rob. A área sob a curva glicêmica, o índice de resistência à insulina e a glicemia basal foram elevados no grupo Ob em relação ao C. Massa cardíaca total, área seccional transversa (VE), fração de colágeno (VE), níveis de colesterol e leptina foram significativamente elevados nos grupos Ob e Rob em comparação com o grupo C. A dieta hiperlipídica, em ratos resistentes à obesidade, promoveu hipertrofia cardíaca sem alterações nas espécies reativas de oxigênio.

**Palavras-chave:** Resistência à obesidade, estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, coração, dieta hiperlipídica.

## ABSTRACT

Resistance to Obesity is associated with the complex interaction of stringent and environmental factors, conferring the ability to gain mass gain and body fat deposition, even when eating high-calorie diets. Considering that there are numerous gaps in the literature on the metabolic processes that explain Resistance to Obesity, specifically in relation to oxidative stress, the purpose of the study was to investigate whether obesity-resistant rats develop elevated reactive oxygen species in cardiac tissue. Methods: Wistar rats were initially randomized into two groups: Control (C) and High-fat diet (HFD). The HFD group was further divided into the Obese (Ob) and Obesity-Resistant (OR) groups based on body weight gain (upper 1/3 for Ob; lower 1/3 for OR) after 4 weeks on HFD. Rats were sacrificed at the 14th week, and serum and organs were collected. Nutritional assessment, food profiles, histological analysis, comorbidities, and cardiovascular characteristics were determined. Results: Body mass showed a significant difference between the standard diet and high-fat diet groups in the 4th week of the experimental protocol, characterizing obesity. In the 4th week, after the characterization of Resistance to Obesity, there was a significant difference in body mass between groups C, Ob and ROb. Ob and ROb groups showed a significant increase in caloric intake in relation to the C. Ob group showed a significant increase in final body mass, retroperitoneal fat pad, sum of corporal fat deposits and in reactive oxygen species, in relation to groups C and Rob. The area under the glycemic curve (AUC), the insulin resistance index and the baseline blood glucose were increased in the Ob group compared to the C group. Total cardiac mass, cross-sectional area (LV), collagen fraction (LV), cholesterol and leptin levels were significantly higher in the Ob and Rob groups compared to the C group. The high-fat diet, in obesity-resistant rats, promoted cardiac hypertrophy without reactive oxygen species alterations.

**Keywords:** Obesity-resistant, oxidative stress, reactive oxygen species, heart, high-fat diet.

## SUMÁRIO

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1     | INTRODUÇÃO .....  | 5  |
| 2     | REFERENCIAL TEÓRICO .....   | 8  |
| 2.1   | Radicais Livres .....   | 8  |
| 2.2   | Estresse Oxidativo .....  | 9  |
| 2.2.1 | Marcadores do Estresse oxidativo .....                              | 11 |
| 2.2.2 | Estresse oxidativo, Obesidade e Coração .....                       | 11 |
| 2.2.3 | Fatores Metabólicos Envolvidos no Estresse Oxidativo e na Obesidade | 12 |
| 3     | OBJETIVOS.....  | 14 |
| 3.1   | Objetivo Geral.....   | 14 |
| 3.2   | Objetivos Específicos .....   | 14 |
| 4     | MATERIAL E MÉTODOS .....  | 15 |
| 4.1   | Animais.....  | 15 |
| 4.2   | Delineamento Experimental .....                                     | 15 |
| 4.3   | Composição das Dietas .....   | 17 |
| 4.4   | Avaliação Nutricional e Perfil Alimentar .....                      | 18 |
| 4.5   | Comorbidades .....  | 19 |
| 4.5.1 | Teste de tolerância à glicose .....                                 | 19 |
| 4.5.2 | HOMA-IR.....  | 19 |
| 4.5.3 | Perfil lipídico .....   | 19 |
| 4.6   | Características Cardíacas .....                                     | 20 |
| 4.6.1 | Área Seccional Transversa.....                                      | 20 |
| 4.6.2 | Colágeno Intersticial Miocárdico .....                              | 20 |
| 4.6.3 | Dano Cardíaco .....   | 21 |
| 4.7   | Estresse Oxidativo Cardíaco.....                                    | 21 |
| 4.7.1 | Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....           | 21 |
| 4.7.2 | Determinação da Peroxidação Lipídica .....                          | 22 |
| 4.7.3 | Determinação da Carbonilação de Proteínas .....                     | 22 |
| 4.8   | Análise Estatística.....  | 23 |
| 5     | RESULTADOS.....   | 24 |
| 5.1   | Caracterização do Momento Inicial da Obesidade .....                | 24 |
| 5.2   | Caracterização da Resistência à Obesidade .....                     | 24 |
| 5.3   | Características Nutricionais .....                                  | 25 |
| 5.4   | Composição Corporal dos Grupos Experimentais.....                   | 26 |
| 5.5   | Características Bioquímicas e Hormonais dos Grupos Experimentais.   | 26 |

|     |   |    |
|-----|---|----|
| 5.6 | Características Morfológicas Cardíacas.....           | 28 |
| 5.7 | Estresse Oxidativo Cardíaco.....                      | 30 |
| 6   | DISCUSSÃO.....  | 32 |
| 6.1 | Indução de Resistência à Obesidade e Obesidade.....   | 32 |
| 6.2 | Caracterização da Adiposidade e Perfil Alimentar..... | 34 |
| 6.3 | Comorbidades.....                                     | 35 |
| 6.4 | Remodelamento Cardíaco e Dano Cardíaco.....           | 36 |
| 6.5 | Estresse Oxidativo.....                               | 37 |
| 7   | CONCLUSÃO.....  | 40 |
|     | REFERÊNCIAS.....                                      | 41 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1.</b> Composição e valores de macronutrientes das dietas ..... | 18 |
| <b>Tabela 2.</b> Características Nutricionais .....                       | 25 |
| <b>Tabela 3.</b> Características gerais .....                             | 26 |
| <b>Tabela 4.</b> Características morfológicas cardíacas .....             | 28 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.</b> Representação esquemática do delineamento experimental. ....  | 15 |
| <b>Figura 2.</b> Representação esquemática do critério de redistribuição dos grupos a partir do tercil obtido da massa corporal. ....                  | 16 |
| <b>Figura 3.</b> Evolução da massa corporal (g) durante o período de indução à obesidade (4 semanas).. ....  | 24 |
| <b>Figura 4.</b> Evolução da massa corporal após o critério do tercil para redistribuição dos grupos e caracterização da Resistência à Obesidade. .... | 25 |
| <b>Figura 5.</b> Características bioquímicas e hormonais dos grupos experimentais.....   | 27 |
| <b>Figura 6.</b> Determinação da Área de Secção Transversa (AST).....  | 29 |
| <b>Figura 7.</b> Fração de Colágeno.....   | 30 |
| <b>Figura 8.</b> Marcadores de dano cardíaco.....  | 30 |
| <b>Figura 9.</b> Marcadores de estresse oxidativo. ....  | 31 |
| <b>Figura 10.</b> Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....  | 32 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ASC** Área sob a curva

**AST** Área seccional transversa

**AT** Átrio

**ATP** Adenosina trifosfato

**ATPase** Adenosina trifosfato fosfatase

**C** Controle

**CAT** Catalase

**ClO-** Monóxido de cloro

**CTE** Cadeia transportadora de elétrons

**DH** Dieta hiperlipídica

**DHE** Dihidroetídeo

**DNA** Ácido desoxirribonucléico

**DNPH** 2,4-dinitrofenil-hidrazina

**DP** Dieta padrão

**ERNs** Espécies reativa de nitrogênio

**EROs** Espécies reativas de Oxigênio

**FC** Falso controle

**Fe<sup>3+</sup>/ Fe<sup>2+</sup>** Íon de ferro

**GPx** Glutathiona peroxidase

**GTT** Teste de tolerância à glicose

**H<sub>2</sub>O** molécula de água

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** Peróxido de hidrogênio

**HE** Hematoxilina-eosina

**HOMA-IR** Homeostatic model assessment

**LO•** Radical alcoxila

**LO<sub>2</sub>•** Radical peroxila

**LOOH** hidroperóxido lipídico

**MDA** Malondialdeído

**NADH** Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase

**NO•** Radical óxido nítrico

**O2 •** Radical superóxido

**O2** Oxigênio molecular

**Ob** Obeso

**OH•** Radical hidroxila

**ONOO** peroxinitrito

**ROb** Resistente à obesidade

**SOD** Superóxido dismutase

**TBA** Ácido tiobarbitúrico

**TBARS** Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TG** Triglicérides

**UCPs** Proteínas desacopladoras

**VD** Ventrículo direito

**VE** ventrículo esquerdo

## 1 INTRODUÇÃO

Quando humanos e animais ingerem dietas ricas em gordura, os achados mostram que, em sua maioria, ocorre o aumento da massa corporal com consequente elevação da adiposidade, denominados de indivíduos propensos à obesidade (Ob) (BUETTNER et.al., 2007; LIN et. al. 2000). Em contrapartida, alguns indivíduos alimentados com essa mesma dieta, caracterizados como resistentes à obesidade (ROb), ganham menos massa corporal do que aqueles propensos à obesidade (Ob) (HUANG et.al., 2003; LEVIN & KEESEY, 1998).

A utilização de modelos experimentais para o entendimento dos fatores comportamentais e vias metabólicas na condição de resistência à obesidade, está presente em muitos estudos sobre o assunto (SIMONČIČ et al., 2011; SMITH et. al., 2014; LU et. al. 2021; PORET et. al., 2021). Alguns protocolos usam ratos e camundongos com modificação genética (SIMONČIČ et al., 2011; PORET et. al., 2021), outros utilizam a identificação de fenótipos magros em cepas de animais alimentados com dieta hiperlipídica e/ou hipercalórica (SMITH et. al., 2014; LU et. al. 2021). Sendo que, na maioria dos estudos, a identificação da Resistência à Obesidade ocorre por meio de dietas, a qual aponta para uma maior aproximação das características humanas (MADSEN et. al., 2010), pois, fenótipos magros são observados somente em uma parte dos indivíduos, mesmo que todos tenham padrões alimentares e prática de atividade física equivalentes (JACKMAN; MACLEAN & BESSESEN, 2010).

O estresse oxidativo é um processo que ocorre um desequilíbrio homeostático entre compostos oxidantes e antioxidantes, apresentando como resultado o acúmulo de radicais livres, dentre eles as EROs, os quais podem afetar as funções biológicas das células acometidas. (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Esse acometimento está associado à obesidade, síndrome metabólica, resistência à insulina, câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (MELLOR; RITCHIE; DELBRIDGE, 2010; LUSHCHAK, 2014).

Dentro desse contexto, animais submetidos às dietas hipercalóricas com percentual maior que 40% de gordura, apresentam desregulação no metabolismo energético, desenvolvendo após um longo período, aumento da adiposidade corporal como alterações no depósito de gordura e hiperfagia, assim como resistência à insulina e inflamação sistêmica (MAIOLI et al., 2016; SHADEL & HORVATH, 2015). Estudos têm evidenciado que a ingestão elevada de uma dieta hiperlipídica promove à produção

excessiva espécies reativas de oxigênio (EROs) e induz estresse oxidativo (MILAGRO et al., 2006; YU et al., 2019), causando danos às mitocôndrias, bem como distúrbios no metabolismo (ROSINI; SILVA; MORAES, 2012). Esses fatores levam ao estresse oxidativo e a resistência à insulina no tecido cardíaco, gerando aumento de leptina, insulina, triglicerídeos e glicose na circulação sanguínea, acarretando um desequilíbrio do sistema redox formando o estresse oxidativo (BUETTNER et al., 2000).

A literatura sugere uma relação estreita entre a Obesidade e o Estresse Oxidativo (FAINE et al., 2002; NOVELLI et al., 2002; BURNEIKO et al., 2006; HUNTER et al., 2017; YU et al., 2018). Como exemplo a hiperglicemia (MENON et al., 2004), níveis elevados de lipídio tecidual (FURUKAWA et al., 2017), defesa antioxidante insuficiente (ANDERSEN et al., 2006) e inflamação crônica (MARTÍNEZ et al., 2006), entre outros.

Radicais livres são naturalmente gerados como resposta ao metabolismo celular do oxigênio, e quando em produção moderada, são essenciais para o organismo, regulando a função mitocondrial e a sinalização celular (BARBOSA et al., 2010; FERREIRA & ABREU, 2007). O sistema antioxidante é um sistema de defesa, no qual, tem a função de inibir e/ou reduzir danos causados por radicais livres em excesso, mantendo a homeostase celular. A defesa antioxidante enzimática inclui as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Essa situação promove o equilíbrio nas condições de transcrição e no sistema antioxidante, porém, quando de forma exacerbada, pode causar danos oxidativos nas estruturas celulares, lipídios (peroxidação lipídica) e proteínas (carbonilação proteica e quebra de grupos sulfidríla), alterando suas funções com consequente estresse oxidativo (FARIAS et al., 2013; MANGGE et al., 2014; USMAN & VOLPI, 2018).

Alterações cardiometabólicas que advém do estresse oxidativo são relacionados à uma redução da função contrátil, fibrose e remodelamento cardíaco (PANTH; PAUDEL; PARAJULI, 2016). Essas alterações patológicas são acometidas por meio da peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, danos no DNA, disfunção celular, proliferação de fibroblastos, ativação de metaloproteinases, alterações no transporte de cálcio intracelular e ativação de vias de sinalização hipertrófica (AZEVEDO et al., 2015; VELLOSA et al., 2021).

Considerando as alterações no tecido cardíaco decorrente do estresse oxidativo, a literatura tem demonstrado disfunção do endotélio com aumento da atividade inflamatória, a qual pode causar aterosclerose e insuficiência cardíaca (CAMERA et al.,

2019; DOROSZKO et al., 2018). Além disso, estudos mostram que o aumento das EROs gera aumento do risco de doenças cardiovasculares (MALEKMOHAMMAD et al., 2019).

Através do conhecimento sobre a diferença entre animais resistentes e propensos à obesidade, estudos estão sendo realizados, onde apontam que animais Ob são mais propensos ao ganho de peso, devido ao baixo consumo energético, indo de contraste aos animais ROb, ao qual, usam mais gordura e consomem mais energia (com o aumento do gasto energético através da melhora da atividade antioxidante mitocondrial), em estágios iniciais de consumo da dieta hiperlipídica (DH) (Howard et al., 1991; LU et al., 2021). Além disso, ratos ROb apresentam provável capacidade cardioprotetora, pois, apesar da dieta hipercalórica, não foi suficiente para o acometimento de doenças cardiometabólicas (PORET et al., 2019; PIMENTEL CORDEIRO et al., 2022).

Apesar das diferenças moleculares existentes entre os grupos propenso e resistentes à obesidade mostrados em estudos fisiológicos e neuromodulação (KOTZ et al., 2008), ainda existem poucos estudos que mostrem a diferença na condição de homeostase redox mitocondrial e no metabolismo energético entre esses dois grupos (LU et al., 2021). Ademais, o desenvolvimento ou ausência de estresse oxidativo cardíaco na condição de Resistência à Obesidade são escassos, bem como há carência de informações consistentes sobre as possíveis vias sinalizadoras envolvidas nesse processo.

Diante desse contexto, a proposta do estudo foi investigar se ratos ROb desenvolvem elevação de EROs e biomarcadores de estresse oxidativo no tecido cardíaco.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Radicais Livres

A geração de radicais livres ocorre, principalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Esses mecanismos podem, especialmente, serem favorecidos pelos íons ferro e cobre. A principal fonte geradora de radicais livres é a mitocôndria por meio da cadeia transportadora de elétrons (KOURY & DONANGELO, 2003; GREEN; BRAND; MURPHY, 2004).

Os organismos aeróbios metabolizam em condições fisiológicas cerca de 85% a 90% do oxigênio ( $O_2$ ) consumido na mitocôndria, por meio da cadeia transportadora de elétrons. O restante, 10% a 15%, são utilizados por diversas enzimas oxidases e oxigenases, além de reações químicas de oxidação direta (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

Na mitocôndria, o  $O_2$  sofre redução tetravalente, aceitando quatro elétrons com consequente formação de água; a citocromo oxidase é a enzima catalisadora dessa reação. Na parte terminal da cadeia transportadora de elétrons, essa enzima oxida quatro moléculas de citocromo c, removendo um elétron de cada uma delas. Quando esses elétrons são pareados com o  $O_2$ , ocorre a formação da água ( $H_2O$ ). A citocromo oxidase controla a geração de radicais livres, impedindo sua produção excessiva na mitocôndria. Todavia, entorno de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias são desviados para outra via metabólica, sendo reduzidos de forma univalente e, originando os radicais livres (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; KOURY & DONANGELO, 2003; SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

Decorrente da redução univalente do  $O_2$ , são gerados os radicais superóxido ( $O_2^\bullet$ ), hidroxila ( $OH^\bullet$ ) e, ainda, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Esse processo ocorre mediante reações específicas, catalisadas por enzimas e com a participação dos íons ferro e de cobre. O  $H_2O_2$ , apesar de não ser um radical livre, é uma espécie com alto potencial reativo, uma vez que não possui um elétron desemparelhado em sua última camada. Assim, por participar da geração de  $OH^\bullet$ , tem ação deletéria potencial, sendo o mais reativo dos radicais livres, pois pode alterar qualquer estrutura celular que esteja em suas proximidades. O  $H_2O_2$ , diferente dos radicais livres, possui vida longa e apresenta capacidade de atravessar as membranas celulares, se tornando potencialmente tóxico para as células. Esta condição de toxicidade pode ser aumentada, dez mil vezes, pela

presença de ferro (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

Além do  $O_2$  participar de reações de geração de  $OH\bullet$ , pode também gerar a espécie reativa de nitrogênio, peroxinitrito (ONOO), por meio da reação com o radical livre óxido nítrico ( $NO\bullet$ ) (GREEN; BRAND; MURPHY, 2004; SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

Nas reações de óxido-redução, os íons ferro e cobre são muito ativos e os capacitam como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres. A participação desses metais acontece por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. Na reação de Fenton ocorre a geração do radical  $OH\bullet$ , por meio do  $H_2O_2$ ; na reação de Haber-Weiss, estes íons catalisam a reação entre o  $H_2O_2$  e o radical  $O_2\bullet$ , gerando também o radical  $OH\bullet$  (KOURY & DONANGELO, 2003; SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

Nas membranas celulares os ácidos graxos poliinsaturados as transformam em potentes geradoras de radicais livres, alcoxila ( $LO\bullet$ ) e peroxila ( $LO_2\bullet$ ), por meio da lipoperoxidação. O radical  $OH\bullet$  desempenha papel importante na lipoperoxidação, pois retira um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, sendo considerado assim, o principal iniciador deste processo (WELCH et al., 2002). Porém, um fator determinante é a participação do ferro, levando em conta a importância da equidade molar existente entre  $Fe^{3+}/Fe^{2+}$ , para possibilitar a iniciação desse processo. Os íons ferro catalisam os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) em radicais  $LO\bullet$  e  $LO_2\bullet$ , que, por terem um potencial reativos, iniciam uma nova cadeia de reações, podendo ser rápidas ou lentas, de acordo com a valência do ferro (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Outra importante fonte de radicais livres são as enzimas oxidases, entre elas, a Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase (NADPH). São proteínas transmembrana que têm o objetivo de transferir os elétrons através das membranas celulares. Geralmente, o receptor de elétrons é o oxigênio e, em decorrência desse processo, gera-se o radical  $O_2\bullet$ . Essas enzimas existem em pelo menos seis isoformas, ao qual se diferem de acordo com local de expressão e co-fatores necessários para a sua ativação (BEDARD & KRAUSE, 2007).

## 2.2 Estresse Oxidativo

A oxidação é um processo metabólico que permite ao sistema celular converter potencial energético de partículas assimiláveis em energia utilizável e necessária para atividades essenciais das células (OLIVEIRA et al., 2009).

As EROs são moléculas capazes de reagir no organismo e, conseqüentemente, interferir nos processos biológicos e fisiológicos. Podem se formar de diferentes formas, entre elas, durante a redução do oxigênio a água na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. A capacidade destas espécies em ocasionar danos depende da caracterização do tipo de radical e das moléculas que estão sendo atingidas (HALLIWELL, 2012).

A formação dos EROs também ocorre durante os processos metabólicos normais ou patogênicos ou são provenientes de fontes exógenas físicas e químicas. Além de atuar como mediadores da transferência de elétrons, essas espécies atuam em vários processos bioquímicos, como a fagocitose, fenômeno em que EROs,  $H_2O_2$ , monóxido de cloro ( $ClO\cdot$ ) e  $O_2$ , são produzidas para eliminar o agente agressor por oxidação (OLIVEIRA et al., 2009).

No metabolismo celular normal existe a produção constante de EROs, no entanto, em condições com alta produção de EROs, ocorre ações deletérias em todos os componentes celulares. Os radicais livres e demais moléculas que surgem em função das ações oxidativas nos sistemas biológicos são denominados de EROs. Para se protegerem contra oxidações os organismos dispõem de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (ISSA; VOLATE; WARGOVICH; 2006).

O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo de ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. Quanto antioxidantes não enzimáticos, devem-se incluir algumas vitaminas (C, E e A), outros produtos naturais (ex. carotenoides, flavonoides, outros polifenóis, furanoides etióis) e produtos sintéticos (ex.: Ebselen, N-acetilcisteína e Trolox). É interessante notar que espécies carbonílicas no estado triplete, produzidas na termólise de dioxetanos e dismutação de radicais alcóxilas e peróxilas, formadas com altos rendimentos durante a peroxidação lipídica e outras oxidações biológicas, têm sido negligenciadas na literatura apesar de, *in vitro*, terem exibido reatividade similar à de radicais alcóxila (OLIVEIRA et al., 2009).

O excesso de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) no organismo é combatido de forma eficaz por antioxidantes, que podem ser produzidos pelo corpo ou absorvidos por meio da alimentação. Dentro desse contexto, promovem a neutralização das camadas com elétrons desemparelhados por meio da remoção ou adição de elétrons de acordo com a necessidade para a estabilização do átomo ou molécula (KHANSARI; SHAKIBA; MAHMOUDI, 2009). O consumo exagerado de gorduras, tabaco e álcool, assim como a exposição constante à poluição ou à condições de estresse, aumentam a formação de espécies reativas. Conseqüentemente, o balanço existente entre

antioxidantes, EROs e ERNs é quebrado, surgindo o estresse oxidativo, o qual está associado a fisiopatologia de várias doenças (LOBO; MIORELLI; ROCHA, 2006).

### *2.2.1 Marcadores do Estresse oxidativo*

Quando a produção de radicais livres e/ou espécies reativas supera a capacidade de ação dos antioxidantes, há o favorecimento da oxidação de biomoléculas, gerando metabólitos específicos, os quais são denominados de marcadores do estresse oxidativo. Tais marcadores são derivados, sobretudo, da oxidação de lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucléico (DNA), sendo os primeiros os de maior expressão (APAIJAI et al., 2019; BUETTNER et al., 2000; GUAN & LAN, 2018). Outra forma de avaliação do estresse oxidativo é a que emprega métodos indiretos, baseados na capacidade antioxidante (HUANG & PRIOR, 2005).

Cada vez há maior evidência científica de que o estresse oxidativo desencadeia relevantes implicações sobre os mecanismos que culminam com o desenvolvimento da síndrome metabólica (FURUKAWA et al., 2017).

### *2.2.2 Estresse oxidativo, Obesidade e Coração*

A literatura tem mostrado que no coração de indivíduos obesos são observadas as seguintes características metabólicas, entre elas,: captação de ácidos graxos e a oxidação de ácidos graxos aumentadas, assim como os níveis de triacilglicerol e ácidos graxos livres circulantes (AGL) e intramiocárdicos; em contrapartida, captação e oxidação de glicose reduzidos (LOPASCHUK et al., 2010, inserir mais uma referência). Apesar da redução da captação de glicose, há aumento do fluxo através das vias acessórias do metabolismo da glicose, como a via do polioliol ou a via biossintética da hexosamina (KOLWICZ; PUROHIT; TIAN, 2013).

No coração saudável, a utilização de ácidos graxos livres e glicose é bem equilibrada, possibilitando que o coração alterne entre as fontes de energia de acordo com sua disponibilidade e em resposta a estímulos ambientais. Isso proporciona ao coração um alto grau de flexibilidade na utilização do substrato (COLE et. al., 2011).

A incapacidade do coração obeso de usar adequadamente a glicose resulta em dependência da oxidação de ácidos graxos e redução da flexibilidade metabólica. A ineficiência cardíaca concomitante está relacionada ao aumento do desacoplamento

mitocondrial induzido por ácidos graxos, bem como à baixa eficiência de utilização de oxigênio (O<sub>2</sub>) da oxidação de ácidos graxos, resultando em diminuição da produção de trifosfato de adenosina (ATP) apesar da oxidação do combustível (COLE et al., 2011).

Alterações metabólicas observadas no coração obeso como aumento da oxidação de ácidos graxos, disfunção mitocondrial, auto-oxidação da glicose, metabolismo prejudicado do polioliol ou aumento do metabolismo da hexosamina, podem causar aumento da liberação de EROs. Assim, as EROs geradas por metabólitos desempenham papel importante no desenvolvimento de várias complicações cardiovasculares relacionadas à obesidade (NIEMANN et al., 2017).

### *2.2.3 Fatores Metabólicos Envolvidos no Estresse Oxidativo e na Obesidade*

A obesidade resulta em distúrbios da biogênese e função mitocondrial (complexo da cadeia respiratória I), que ocorre prematuramente em pacientes mais jovens com obesidade (NIEMANN et al., 2011).

A superprodução de superóxido induzida por hiperglicemia pela cadeia transportadora de elétrons (CTE) é reconhecida como uma das principais causas das complicações clínicas associadas ao diabetes e à obesidade (BROWNLEE, 2011). De fato, o aumento da liberação de EROs mitocondrial resulta em sensibilidade à insulina completamente preservada, apesar da ingestão de uma dieta rica em gordura (ANDERSON et al., 2009; SEIFERT et al., 2010).

A superprodução mitocondrial de EROs induzida por hiperglicemia ativa quatro vias principais envolvidas na patogênese de complicações cardiovasculares, incluindo o aumento da produção de produtos finais de glicação avançada, a via do polioliol, a via da hexosamina e a transdução de sinal dependente da proteína C quinase (BROWNLEE, 2011). A produção de EROs mitocondrial pode ser bloqueada por certos inibidores de CTE ou agentes de desacoplamento (NISHIKAWA et al., 2000).

Proteínas desacopladoras (UCPs) como UCP2 e UCP3, são as principais isoformas de UCP cardíaca humana (DE FARIAS et al., 2013), e podem dissipar o gradiente eletroquímico e, assim, atenuar a produção de EROs à custa da diminuição da eficiência cardíaca (BRAND & ESTEVES, 2005). A regulação positiva de UCP2 e/ou UCP3 cardíaca foi relatada em alguns, mas não em todos os estudos usando modelos pré-clínicos de obesidade (BOUDINA et al., 2007).

As EROs mitocondriais também prejudicam a respiração mitocondrial por meio de modificações pós-traducionais oxidativas dos complexos I e II da CTE, enquanto a eliminação de EROs mitocondriais inibiu a hipertrofia cardíaca e melhorou a função diastólica em um modelo pré-clínico de obesidade (SVERDLOV et al., 2016). Os mecanismos moleculares que associam as EROs com hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica incluem modificação oxidativa e inibição da ATPase de cálcio do retículo sarcoplasmático e comprometimento da função do complexo II através de modificação pós-traducional oxidativa (SVERDLOV et al., 2016; QIN et al., 2014; SVERDLOV et al., 2015).

Além das interações alostéricas que modulam as atividades enzimáticas, intermediários metabólicos, como a acetil coenzima A ou as EROs, estão envolvidos no controle do equilíbrio entre a oxidação da glicose e dos ácidos graxos. A acetilação *in vitro* das mitocôndrias cardíacas aumenta a produção de EROs e inibe a oxidação do piruvato (VADVALKAR et al., 2013), sugerindo que a acetilação das proteínas mitocondriais também está envolvida na modulação da flexibilidade metabólica.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o estresse oxidativo cardíaco na condição de Resistência à Obesidade.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- ✓ Investigar as características nutricionais de ratos resistentes à obesidade;
- ✓ Avaliar a composição corporal de ratos resistentes à obesidade;
- ✓ Investigar as características morfológicas cardíacas de ratos resistentes à obesidade;
- ✓ Investigar o estresse oxidativo de ratos resistentes à obesidade;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

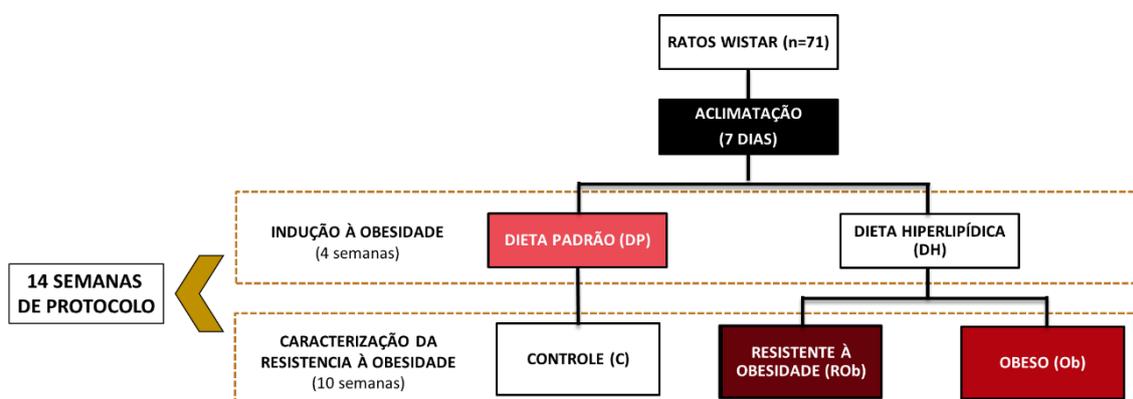
### 4.1 Animais

Após o nascimento, os animais permaneceram no Biotério Central da Universidade Federal do Espírito Santo até o desmame, sendo posteriormente transferidos para o Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Experimental (LAFIBE).

Ratos *Wistar*, machos ( $\approx$  45 dias), foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno com tampas de arame cromado e forradas com maravalha de *Pinus*, ciclo invertido de iluminação (12 horas claro/escuro), temperatura ( $24 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e a umidade ( $55 \pm 5\%$ ) controladas. Os procedimentos foram realizados de acordo com a legislação do “*Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)*” e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Experimentação Científica (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, sob número 53/2019 (ANEXO I).

### 4.2 Delineamento Experimental

O protocolo experimental (resumido na Figura 1) envolveu a utilização de 71 animais, os quais passaram por um período de 7 dias de aclimação à dieta e a gaiola funcional. Após este período, os ratos foram distribuídos em dois grupos 1) alimentados com dieta padrão (DP,  $n=35$ ), 2) alimentados com dieta hiperlipídica (DH,  $n=36$ ), sendo expostos ao protocolo experimental de acordo com o tipo de dieta ofertada (padrão ou hiperlipídica) por 14 semanas.

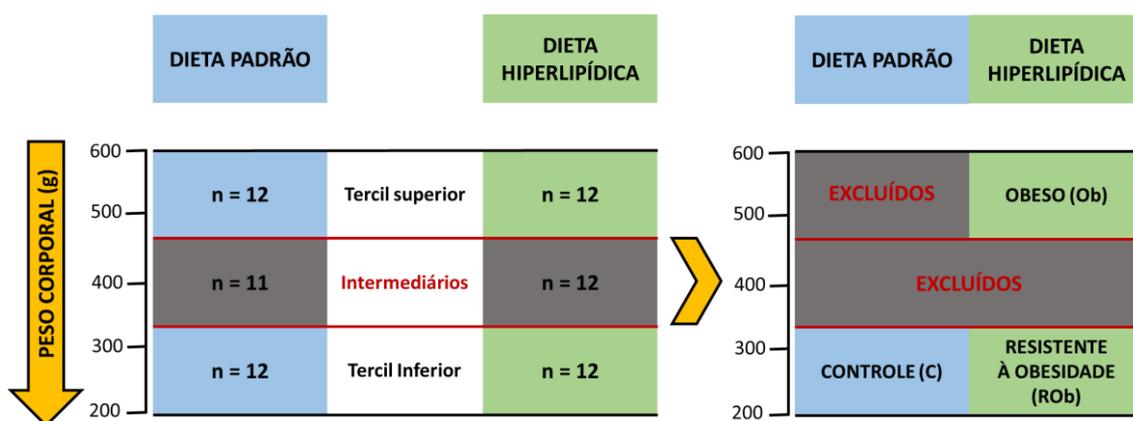


*Figura 1. Representação esquemática do delineamento experimental.*

O protocolo experimental foi dividido em dois momentos:

1º - Indução à obesidade e redistribuição dos grupos: 4 semanas de indução à obesidade e redistribuição dos grupos. O período denominado de indução à obesidade foi realizado com intuito de verificar diferença estatística na massa corporal entre os grupos experimentais DP e DH. Esse momento foi caracterizado como *início da obesidade*.

2º - Caracterização da resistência à obesidade: 10 semanas de exposição à dieta, com os grupos sendo redistribuídos em Controle (C), Obeso (Ob) e Resistente à Obesidade (ROb). Assim, com o intuito de redistribuição dos grupos experimentais, foi utilizado o critério do tercil a partir da massa corporal; o qual consistiu na organização dos animais de cada grupo em ordem crescente de massa corporal, sendo identificado o ponto de corte nos animais da seguinte forma: menor massa corporal, massas corporais intermediárias e animais com maior massa corporal. Desse modo, dos animais alimentados com DP, (n = 07) o tercil inferior de animais que apresentaram menor massa corporal, constituiu o grupo Controle (C). Os demais animais da dieta DP, foram denominados Falsos Controles (FC), tercil superior, e foram excluídos do estudo. Dos ratos alimentados com DH, 12 animais apresentaram menor massa corporal e foram classificados como Resistente à Obesidade (ROb) e 12 animais com maior massa corporal tornaram-se o grupo (Ob); os animais com massas corporais intermediárias foram excluídos do estudo, conforme descrito na Figura 2. Contudo, para o nosso estudo optamos por sortear 7 animais de cada grupo.



**Figura 2.** Representação esquemática do critério de redistribuição dos grupos a partir do tercil obtido da massa corporal.

Ao final da 14<sup>a</sup> semana foram realizadas análises *in vivo* e, posteriormente, *pós mortem*. Para a coleta de amostras, os animais permaneceram em jejum por 12 a 15 horas, sendo após esse período heparinizados (500U/kg/ intraperitoneal; Hepamax-S®, Blau Farmacêutica S.A, Cotia, São Paulo, Brasil), anestesiados com cloridrato de ketamina (50 mg/kg/intraperitoneal; Dopalen®, Sespo Indústria e Comércio Ltda. -Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg/ intraperitoneal; Anasedan®, Sespo Indústria Comércio Ltda. - Divisão Vetbrands, Jacareí, São Paulo, Brasil); quando o animal não apresentava um plano anestésico adequado para a intervenção cirúrgica, era administrado uma dose única mais alta (20 a 30% da dose inicial dos anestésicos) (FREEMAN e LUFF, 1982).

Após a eutanásia, os animais foram submetidos à toracotomia mediana, amostras de sangue foram coletadas e o soro armazenado a -80°C, após separação por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Foram retirados e pesados os tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e visceral, bem como o coração. O ventrículo esquerdo (VE) foi separado e, após pesagem, armazenado em freezer a -80° C para análises posteriores.

### **4.3 Composição das Dietas**

As rações ofertadas foram produzidas pela empresa PragSoluções Biociências® (Jaú, São Paulo, Brasil), sendo a composição dos nutrientes detalhada na Tabela 1. Os animais DP (incluindo o grupo C) receberam dieta padrão (AIN-93) para roedores. Animais do grupo DH (incluindo os grupos Ob e ROb) foram alimentados com dieta hiperlipídica.

**Tabela 1.** Composição e valores de macronutrientes das dietas

| Componentes (g/kg)    | Dietas        |      |
|-----------------------|---------------|------|
|                       | DP (AIN - 93) | DH   |
| Amido de Milho        | 465           | 271  |
| Caseína               | 140           | 170  |
| Amido dextrinizado    | 155           | 155  |
| Sacarose              | 100           | 60   |
| Óleo de soja          | 40            | 28   |
| Celulose              | 50            | 50   |
| Mix Vitamínico        | 10            | 10   |
| Mix Mineral           | 35            | 35   |
| L-Cistina             | 10            | 10   |
| Bitartarato de Colina | 2.5           | 2.5  |
| Banha                 | -             | 21.5 |
| Total                 | 1000          | 1000 |
| Macronutrientes (%)   |               |      |
| Carboidratos          | 14.7          | 14.1 |
| Proteínas             | 75.8          | 40.4 |
| Lipídios              | 9.47          | 45.4 |

#### 4.4 Avaliação Nutricional e Perfil Alimentar

A avaliação nutricional foi determinada pela análise da massa e gordura corporal, bem como o índice de adiposidade, parâmetros utilizados para caracterizar a obesidade experimental. A massa corporal dos animais foi aferida semanalmente, utilizando-se balança digital Edutec (Inca Tecnologia de Produtos e Serviços Ltda., Brasil). A quantidade de gordura corporal foi determinada a partir da somatória dos depósitos de gordura epididimal, retroperitoneal e visceral. O índice de adiposidade foi calculado, dividindo-se a gordura corporal pela massa corporal final, multiplicado por 100 (ROLLS e SHIDE, 1992; TAYLOR e PHILLIPS, 1996).

O perfil alimentar foi avaliado a partir do consumo alimentar, ingestão calórica e eficiência alimentar. Diariamente, os ratos receberam 40 g de ração e após 24 horas a quantidade de ração não consumida foi mensurada. O consumo alimentar diário foi calculado a partir da subtração desses valores (40g - quantidade não consumida). A oferta de água foi *ad libitum*. A ingestão calórica foi calculada pelo consumo alimentar diário multiplicado pelo valor calórico de cada dieta (g x kcal) (KOCH et al., 2014). A eficiência alimentar (EA) foi calculada para análise da capacidade de conversão da energia

consumida em massa corporal, dividindo o ganho de massa corporal total dos animais (g) pela energia total ingerida (Kcal) (IRVING et al., 2009; KIM et al., 2000).

#### 4.5 Comorbidades

A determinação das alterações hemodinâmicas, metabólicas e bioquímicas nos grupos experimentais foi realizada pela análise do teste de tolerância à glicose e perfil lipídico conforme técnicas descritas abaixo:

##### 4.5.1 *Teste de tolerância à glicose*

O perfil glicêmico dos animais foi avaliado após jejum de 6 horas, sendo analisados os níveis glicêmicos em condições basais e após sobrecarga intraperitoneal de 25% de glicose (Sigma-Aldrich, ® St Louis, MO, USA), equivalente a 2 g/kg (AKIYAMA et al., 1996). As amostras sanguíneas foram coletadas da ponta da cauda dos animais nos momentos 0, considerado condição basal, e após 30, 60, 90 e 120 minutos da infusão da glicose. A mensuração dos níveis glicêmicos foi realizada com glicosímetro portátil Accu-Chek Go Kit (Roche Diagnostic Brazil Ltda., São Paulo, Brasil). A tolerância à glicose foi avaliada pela área sob a curva (ASC) para glicose.

##### 4.5.2 *HOMA-IR*

O índice HOMA-IR (homeostatic model assessment), baseado nas concentrações séricas de glicose e insulina de jejum, foi analisado como indicador de resistência à insulina. O cálculo do HOMA-IR foi realizado pela seguinte fórmula: concentração de insulina ( $\mu\text{U/mL}$ ) multiplicada pelos níveis glicêmicos (mM/L) dividida por 22,5 (MATTHEWS et al., 1985).

##### 4.5.3 *Perfil lipídico*

O perfil lipídico foi avaliado através das amostras de sangue coletadas em tubos *Falcon* e centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos (Heraeus Megafuge 16R Centrifuge, Thermo Scientific - Massachusetts, USA) e, posteriormente, armazenadas em freezer à -80°C (Coldlab Ultra Freezer CL374-86V, Piracicaba, São Paulo, Brasil). As concentrações séricas de triglicérides (TG) e colesterol total foram determinadas

utilizando-se *kits* específicos (Bioclin Bioquímica®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e Synermed do Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e analisadas pelo equipamento bioquímico automatizado BS-200 (Mindray do Brasil - Comércio e Distribuição de Equipamentos Médicos Ltda., São Paulo, Brasil).

#### **4.6 Características Cardíacas**

O processo de remodelação cardíaca foi avaliado macroscopicamente por meio da determinação dos pesos do coração, ventrículo esquerdo (VE), direito (VD) e átrio total (AT) e suas relações com o comprimento da tíbia (YIN et al.1982) e microscopicamente por meio da análise da área seccional transversa do VE, conforme técnica descrita abaixo.

##### **4.6.1 Área Seccional Transversa**

A determinação da AST foi realizada em amostras de tecido de ventrículo esquerdo cardíaco. Os fragmentos foram adicionados em solução Karnovsky por 24 horas; em seguida transferidos para solução de etanol 70% e embebidos em bloco de parafina (CARROL; TYAGI, 2005). Os cortes histológicos de 4 µm de espessura foram corados em lâmina com solução de hematoxilina-eosina (HE) e projetados com aumento de 40 vezes com o auxílio de microscópio óptico com sistema de aquisição (AX70, *Olympus Optical CO*, Hamburg Germany), acoplado a câmera de vídeo, que envia imagens digitais a um computador dotado de programa de análise de imagens (*Image Pro-plus*, Media Cybernetics, Silver Spring, Maryland, USA). As imagens foram analisadas com software específico (*Image J*, v 1.43u, National Institute of Health, EUA). Para cálculo das áreas seccionais foram mensurados 100 miócitos por lâmina (MATSUBARA et al., 2000). Os tecidos deveriam estar seccionados transversalmente e apresentar forma arredondada com núcleo visível no centro da célula. As áreas seccionais transversas das amostras (AST; µm<sup>2</sup>) foram utilizadas como indicadores de tamanho celular, caracterizando presença ou ausência de hipertrofia cardíaca.

##### **4.6.2 Colágeno Intersticial Miocárdico**

A determinação do colágeno (%) foi realizada por meio da técnica de Picrosirius Red, sendo o colágeno perivascular excluído e mensurado apenas o colágeno intersticial. Os fragmentos do VE foram transferidos para etanol 70% diluído em água, inclusos em blocos de parafina e corados com Picrosirius Red. A quantificação do colágeno intersticial

foi realizada utilizando-se 10 campos por fragmento. Os cortes histológicos foram ampliados em 40 vezes com o auxílio de microscópio (*Leica Mikroskopie & System GmbH, Wetzlar, Germany*) acoplado a uma câmera de vídeo, que envia imagens digitais a um computador dotado de programa de aquisição Leica LAS EZ (*Leica Application Suite*, versão 3.2.1). As imagens obtidas foram analisadas com o auxílio do software Image J, com o plugin Threshold Colour, obtendo-se a porcentagem de colágeno, de acordo com o nível de coloração (cinza: colágeno).

#### **4.6.3 Dano Cardíaco**

A dosagem dos marcadores de lesão do músculo cardíaco foi realizada após jejum mínimo de 12h, sendo as amostras sanguíneas ( $\cong$  10 ml em EDTA) coletadas por punção venosa em sistema fechado a vácuo (Vacutainer® - Inglaterra), centrifugadas a 3000×g por 10 minutos (Thermo Scientific - Massachusetts, USA) e, posteriormente, armazenadas em microtubos a -80°C (Coldlab Ultra Freezer, Piracicaba, São Paulo, Brasil). As concentrações das enzimas creatinoquinase (CK) total, CKM $\beta$  (isoforma mais expressa no coração) e desidrogenase láctica (LDH), indicadoras de dano miocárdico, foram determinadas utilizando-se kits específicos (Bioclin Bioquímica®, Minas Gerais, Brasil) e analisadas por equipamento BS-200 (Mindray do Brasil, São Paulo, Brasil). As quantidades serão expressas por unidades por litro (U/L).

#### **4.7 Estresse Oxidativo Cardíaco**

O estresse oxidativo foi analisado por meio da determinação das EROS e mensuração da peroxidação lipídica e da carbonilação de proteínas em fragmentos do VE, conforme etapas descritas abaixo.

##### **4.7.1 Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)**

A geração de EROS foi determinada pelo método de fluorescência ao dihidroetídeo (DHE), um precursor não fluorescente, que quando é oxidado pelo radical superóxido, forma o produto fluorescente 2-hidróxietídeo, permitindo analisar a produção “in situ” de radical superóxido (OWUSU-ANSAH; YAVARI; BANERJEE, 2008). Cortes transversais do ventrículo esquerdo congelado (8  $\mu$ m) foram obtidos e colocados

em lâminas gelatinizadas e secos em estufa a 37°C por 20 minutos. As lâminas contendo os cortes foram lavadas e incubadas com solução de Krebs por 30 minutos a 37°C, em seguida, com DHE 2 µM (30 minutos, 37°C) em câmara úmida e protegidos da luz. A fluorescência emitida foi visualizada em microscópio de fluorescência invertido (Leica DM 2500 TI, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, EUA) equipado com câmera fotográfica, utilizando uma objetiva de fluorescência com aumento de 100x. A intensidade da fluorescência gerada nas imagens foi quantificada pelo programa *Image J ProPlus*, sendo o resultado expresso como intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias), normalizado pela intensidade do background.

#### **4.7.2** *Determinação da Peroxidação Lipídica*

A avaliação da peroxidação de lipídios de membrana foi realizada utilizando o método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para tanto, 250 µL de homogenato do tecido cardíaco foram colocados em tubo de ensaio e adicionados 750 µL de ácido tricloroacético a 10% para promover a precipitação de proteínas. Após agitação no vórtex, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos (Eppendorf® Centrifuge 5804-R, Hamburgo, Germany). Em tubos de ensaio, foram colocados 500 µL do sobrenadante e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 100°C durante 15 minutos. O MDA reage com o TBA na razão 1:2 MDA-TBA. Após resfriamento em banho de gelo, a leitura a 535 nm foi realizada no leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA), A concentração de MDA foi obtida pelo coeficiente de extinção molar ( $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e pela absorbância das amostras, sendo os resultados expressos em nmol/g de proteína (UCHIYAMA e MIHARA, 1978; SAMARGHANDIAN et al., 2016).

#### **4.7.3** *Determinação da Carbonilação de Proteínas*

As proteínas carboniladas foram mensuradas por meio do método adaptado de Mesquita et al. (2014), o qual consiste na utilização do derivatizador 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e detecção espectrofotométrica de quaisquer proteínas modificadas pelo processo de carbonilação.

Para quantificação foram utilizados 100  $\mu\text{L}$  de homogenato do tecido cardíaco para 100  $\mu\text{L}$  do DNPH (10 mL de HCl 2M). As amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e 50  $\mu\text{L}$  de NaOH (6M) foram adicionados e incubados novamente por 10 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi realizada a 450 nm em um leitor de microplacas Spectra Max 190 (Molecular Devices®, Sunnyvale, CA, USA), sendo o resultado obtido (nmol/mg de proteína) por meio da absorbância das amostras e do coeficiente de extinção molar (22000  $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

#### 4.8 Análise Estatística

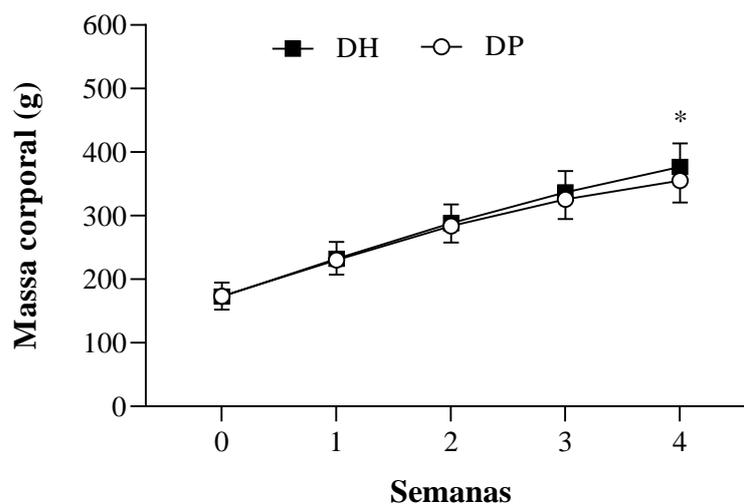
As análises foram realizadas no programa estatístico Graphpad Prim 8. Os dados foram expressos por meio de medidas de tendência central  $\pm$  dispersão e submetidos ao teste de Shapiro-Wilks para averiguar a aderência à normalidade. As análises entre os grupos experimentais e controle foi realizada a partir do teste t de *Student* (comparação entre dois grupos independentes) e análise de variância (ANOVA) one way complementada com teste de comparações múltiplas de Tukey (comparação entre três grupos).

A evolução do peso corporal e o teste de tolerância à glicose foram submetidos à ANOVA two-way (fatores evolução do peso e perfil glicêmico) para o modelo de medidas repetidas e complementada com teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 5%.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização do Momento Inicial da Obesidade

A massa corporal dos animais foi semelhante nas 3 primeiras semanas do protocolo experimental. A partir da 4ª semana, houve diferença estatística entre os grupos DP e DH (massa corporal do DH > DP), caracterizando o momento inicial da obesidade (Figura 3).

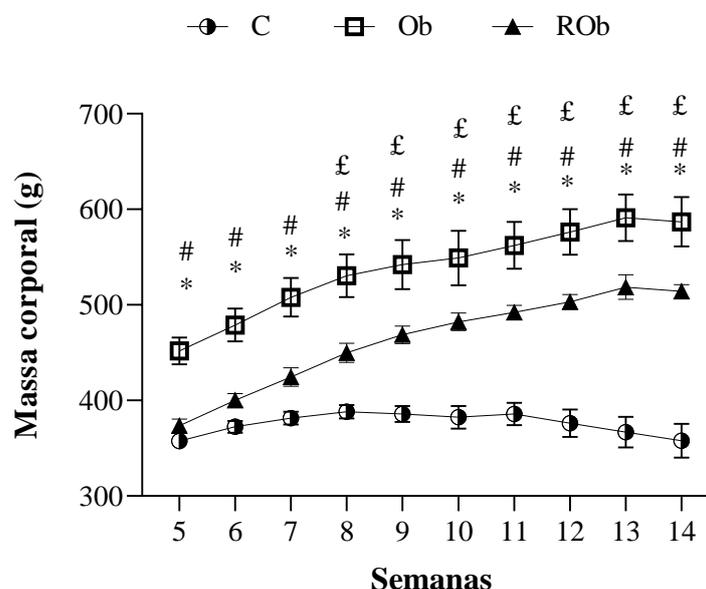


**Figura 3.** Evolução da massa corporal (g) durante o período de indução à obesidade (4 semanas). Grupos: Dieta padrão (DP, n=35) e dieta hiperlipídica (DH, n=36) saturada. Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. \* $p < 0,05$  Grupo DH vs. DP. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com teste post-hoc de Bonferroni.

### 5.2 Caracterização da Resistência à Obesidade

Após a diferença estatística entre os grupos DP e DH, na 4ª semana de tratamento experimental, houve a redistribuição dos grupos a partir do critério tercil, sendo os grupos redistribuídos em grupos Controle (C), Obeso (Ob) e Resistente à Obesidade (ROb), conforme descrito anteriormente. A massa corporal foi significativamente diferente entre os grupos ROb e C a partir da 4ª semana de caracterização da resistência à obesidade (Figura 4). Considerando o grupo Ob, observa-se que as massas corporais desse grupo foram elevadas significativamente em relação ao C e ROb, respectivamente, a partir da 5ª semana do momento de redistribuição dos grupos, permanecendo essa diferença por todo o protocolo experimental. A partir da 8ª semana, após redistribuição dos grupos e

caracterização da resistência à obesidade, houve diferença na massa corporal entre os grupos C e ROb.



**Figura 4.** Evolução da massa corporal após o critério do tercil para redistribuição dos grupos e caracterização da Resistência à Obesidade. Grupos controle (C, n=7), resistente à obesidade (ROb, n=7) e obeso (Ob, n=7). Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - C vs. Ob; #  $p < 0,05$  - Ob vs. ROb; £  $p < 0,05$  - C vs. ROb. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste post-hoc de Bonferroni.

### 5.3 Características Nutricionais

A Tabela 2 ilustra as características nutricionais dos grupos experimentais após 14 semanas de tratamento, sendo 4 semanas durante o protocolo de indução e exposição à Obesidade, e 10 semanas de caracterização da Resistência à Obesidade. Não houve diferença entre os grupos para a ingestão alimentar diária. A ingestão calórica do grupo Ob foi significativamente maior quando comparado ao grupo ROb e C, respectivamente, assim como o grupo ROb também apresentou diferença na ingestão calórica em relação ao grupo C. Os resultados mostram que a eficiência alimentar nos grupos Ob e ROb foi diferente em relação ao grupo C, sendo elevadas significativamente.

**Tabela 2.** Características Nutricionais

| Variáveis                    | Grupos          |                  |                  |
|------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
|                              | C               | Ob               | ROb              |
| Ingestão alimentar (g/dia)   | 16.5 $\pm$ 0.66 | 17.7 $\pm$ 0.21  | 16.9 $\pm$ 0.45  |
| Ingestão calórica (Kcal/dia) | 62.6 $\pm$ 2.52 | 81.4 $\pm$ 0.97* | 78.1 $\pm$ 2.12* |
| Eficiência Alimentar (%)     | 3.04 $\pm$ 0.12 | 4.41 $\pm$ 0.14* | 4.75 $\pm$ 0.12* |

7 animais por grupo. C: controle; ROb: resistente à obesidade e Ob: obeso. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - Grupos experimentais vs. C; #  $p < 0,05$  - Ob vs. ROb. ANOVA uma via para amostras independentes, complementada com o teste *post hoc* de Tukey.

#### 5.4 Composição Corporal dos Grupos Experimentais

A Tabela 3 ilustra a composição corporal dos grupos experimentais após 14 semana de protocolo experimental. Os resultados mostram que a massa corporal final do grupo Ob foi significativamente maior quando comparado aos grupos ROb e C, respectivamente, assim como o grupo ROb também apresentou diferença na massa corporal final em relação ao grupo C. O ganho de massa corporal dos grupos Ob e Rob foi diferente estatisticamente em relação ao grupo C, sendo mais elevados nesses grupos. Não houve diferença estatística para esse parâmetro entre os grupos Ob e ROb. Em relação à adiposidade corporal, os resultados apontam que gordura epididimal, visceral e o índice de adiposidade foram maiores significativamente nos grupos Ob e Rob em relação ao C. No entanto, o depósito de gordura retroperitoneal e o somatório dos depósitos de gordura demonstrou diferença estatística entre os grupos experimentais quando comparados ao C (Ob e ROb  $>$  C, bem como entre o grupo Ob e ROb (Ob  $>$  ROb).

**Tabela 3.** Características gerais

| Variáveis                         | Grupos          |                   |                  |
|-----------------------------------|-----------------|-------------------|------------------|
|                                   | C               | Ob                | ROb              |
| Massa corporal final (g)          | 358 $\pm$ 18    | 587 $\pm$ 10*#    | 514 $\pm$ 7*     |
| Ganho de massa corporal (g)       | 200 $\pm$ 12.6  | 372 $\pm$ 10*     | 365 $\pm$ 11*    |
| Gordura epididimal (g)            | 0.97 $\pm$ 0.33 | 7.11 $\pm$ 1.08*  | 5.77 $\pm$ 0.61* |
| Gordura retroperitoneal (g)       | 1.97 $\pm$ 0.72 | 19.5 $\pm$ 1.3*#  | 13.0 $\pm$ 1.7*  |
| Gordura visceral (g)              | 1.11 $\pm$ 0.31 | 8.01 $\pm$ 0.57*  | 6.06 $\pm$ 0.82* |
| $\Sigma$ depósitos de gordura (g) | 4.06 $\pm$ 1.33 | 32.9 $\pm$ 0.65*# | 24.8 $\pm$ 3.1*  |
| Índice de adiposidade (%)         | 1.08 $\pm$ 0.33 | 5.67 $\pm$ 0.27*  | 4.81 $\pm$ 0.57* |

7 animais por grupo. C: controle; ROb: resistente à obesidade e Ob: obeso. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - Grupos experimentais vs. C; #  $p < 0,05$  - Ob vs. ROb. ANOVA uma via para amostras independentes complementada com o teste *post hoc* de Tukey.

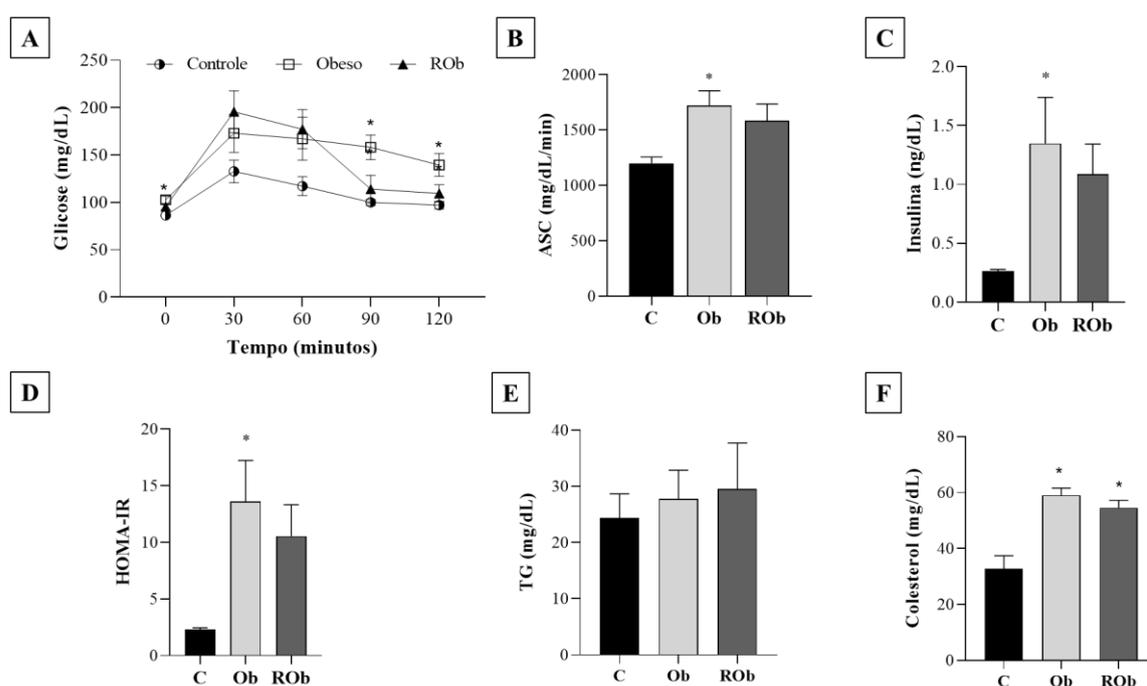
#### 5.5 Características Bioquímicas e Hormonais dos Grupos Experimentais

Os resultados do teste de tolerância à glicose, apresentados na Figura 5A mostram que nos tempos 0 (basal), 90 e 120 os valores de glicemia do grupo Ob foi significativamente elevado em relação ao C. Não houve diferença entre os grupos C e ROb

para a glicose no TTG. A área sob a curva (ASC) (Figura 5B) do grupo Ob foi significativamente maior em relação ao grupo C, porém sem diferença significativa entre os grupos Ob e ROb, bem como entre os grupos ROb e C, respectivamente. Na Figura 5C, observa-se que o grupo Ob apresentou elevação nos valores de insulina em relação ao grupo C; não houve diferença significativa entre os grupos Ob e ROb para esse parâmetro. Os resultados do HOMA-IR mostra valor significativo aumentado no grupo Ob em relação ao grupo C, no entanto, não houve diferença entre os grupos Ob e ROb (Figura 5D).

O perfil lipídico demonstrou que os valores de colesterol (mg/dL) foram significativamente maiores nos grupos experimentais Ob e ROb quando comparados com o grupo C, porém os níveis de TG foram similares entre os grupos (Figura 5E e F).

Os valores de Leptina (ng/mL) foram (C: 0.76 ; Ob: 9.34 e ROb: 10.17;  $p < 0,05$ ), sendo elevados significativamente nos grupos Ob e ROb em relação ao C.



**Figura 5.** Características bioquímicas e hormonais dos grupos experimentais. Grupos controle (C), resistente à obesidade (ROb) e obeso (Ob). 7 animais por grupo. A) Teste de Tolerância à Glicose; B) Área sobre a curva glicêmica (ASC); C) Insulina; D) HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment - Insulin Resistance); E) Triglicérides (TG) e; F) Colesterol Total. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - Ob vs. C. # C vs. ROb. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste post-hoc de Tukey.

## 5.6 Características Morfológicas Cardíacas

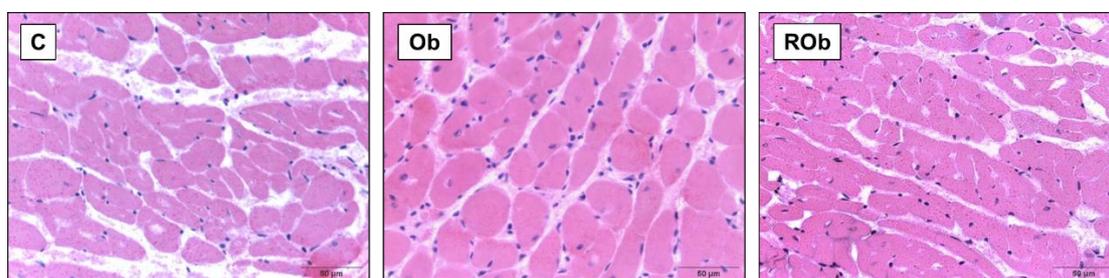
A Tabela 4 apresenta as características morfológicas cardíacas. Os efeitos da dieta de indução à obesidade foram evidenciados nos resultados dos animais ROb e Ob, mostrando valores mais elevados do coração, do ventrículo esquerdo (VE) e ventrículo direito (VD)/tíbia em relação ao C. Em adição, os valores do átrio (AT), coração/tíbia, VE/tíbia e átrio/tíbia foram elevados no grupo Ob em relação ao grupo C. O peso do VD foi maior nos grupos Ob e ROb quando comparado com ao C, sendo que no grupo Ob, o valor foi significativamente mais alto em relação ao grupo ROb.

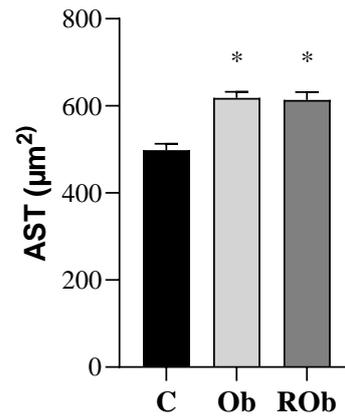
**Tabela 4.** Características morfológicas cardíacas

| Variáveis            | Grupos       |               |               |
|----------------------|--------------|---------------|---------------|
|                      | C            | Ob            | ROb           |
| Coração              | 0.86 ± 0.08  | 1.22 ± 0.02*  | 1.09 ± 0.04*  |
| VE (g)               | 0.66 ± 0.07  | 0.92 ± 0.02*  | 0.84 ± 0.03*  |
| VD (g)               | 0.14 ± 0.01  | 0.22 ± 0.01*# | 0.19 ± 0.01*  |
| AT (g)               | 0.05 ± 0.004 | 0.08 ± 0.005* | 0.07 ± 0.01   |
| Coração/Tíbia (g/cm) | 0.22 ± 0.02  | 0.30 ± 0.01*  | 0.27 ± 0.01   |
| VE/Tíbia (g/cm)      | 0.16 ± 0.009 | 0.22 ± 0.006* | 0.21 ± 0.006* |
| VD/Tíbia (g/cm)      | 0.04 ± 0.002 | 0.05 ± 0.002* | 0.05 ± 0.003* |
| AT/Tíbia (g/cm)      | 0.01 ± 0.001 | 0.02 ± 0.001* | 0.02 ± 0.002  |

7 animais por grupo. C: controle; ROb: resistente à obesidade e Ob: obeso. Dados expressos em média ± erro padrão. \* p<0,05 - Grupos experimentais vs. C; # p< 0,05 - Ob vs. ROb. ANOVA uma via para amostras independentes complementada com o teste *post hoc* de Tukey.

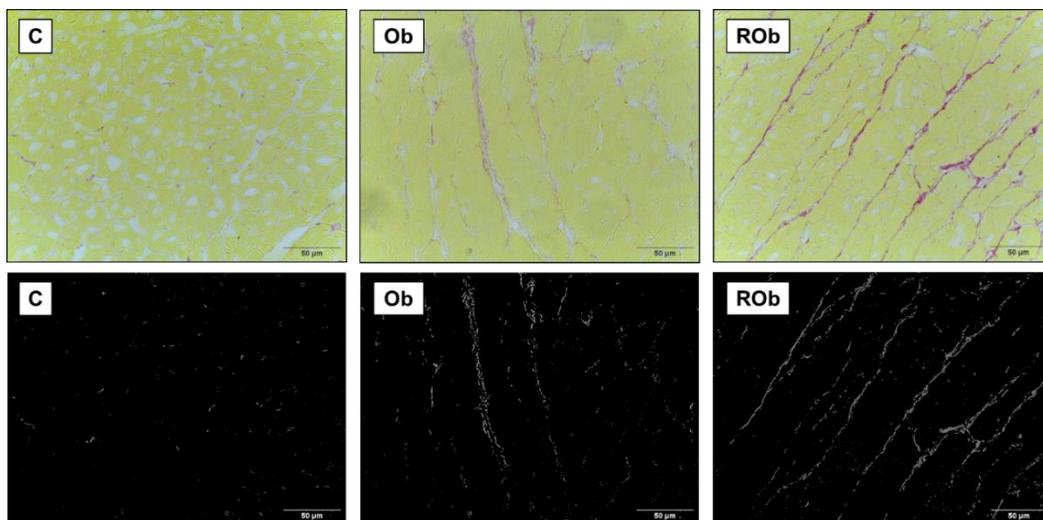
A área de secção transversa (AST) dos grupos experimentais Ob e ROb apresentaram aumento significativo em relação ao grupo C. Não houve diferença estatística entre os grupos Ob e ROb (Figura 6).

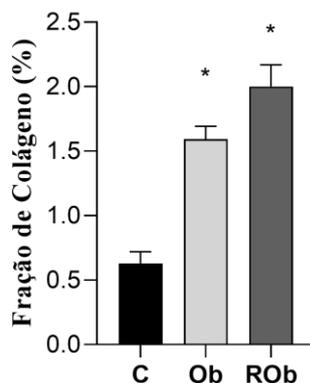




**Figura 6.** Determinação da Área de Secção Transversa (AST). Gráficos e painéis representativos da Área de Secção Transversa de fragmentos do ventrículo esquerdo (VE). Hematoxilina-eosina (40x). 7 animais por grupo. Grupos controle (C), resistente à obesidade (ROb) e obeso (Ob). Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - C vs Ob; #  $p < 0,05$  - Ob vs. ROb. ANOVA uma via para amostras independentes, complementada com o teste post hoc de Tukey.

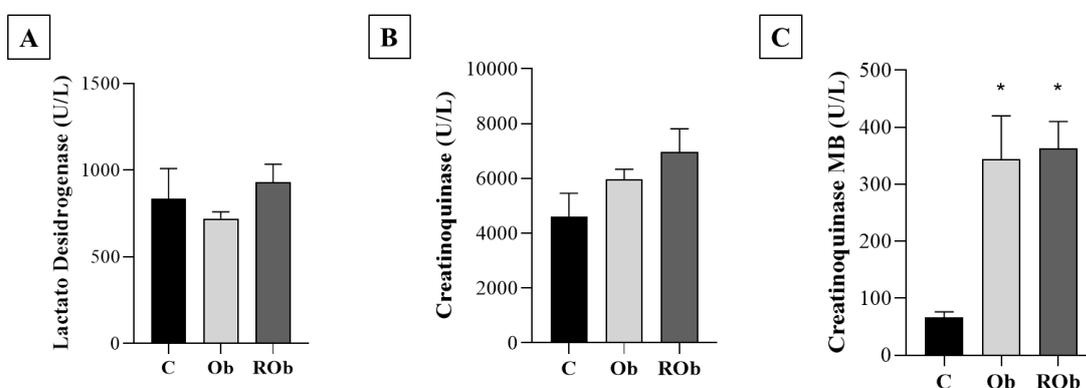
O colágeno intersticial cardíaco também apresentou aumento significativo nos grupos Ob e ROb em relação ao grupo C (Figura 7).





**Figura 7.** Fração de Colágeno. Gráficos e painéis representativos do colágeno do ventrículo esquerdo (VE). Picosirius Red (40x). 7 animais por grupo. Grupos controle (C), resistente à obesidade (ROb) e obeso (Ob). Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - C vs Ob; #  $p < 0,05$  - Ob vs. ROb. ANOVA uma via para amostras independentes, complementada com o teste post hoc de Tukey.

Não houve diferença estatística entre os grupos estudados, referente ao lactato desidrogenase (Figura 8A) e a creatinoquinase (Figura 8B), respectivamente. O resultado da CK-M $\beta$  mostrou aumento significativo nos valores dos grupos experimentais Ob e ROb em relação ao grupo C, respectivamente, sem diferença estatística entre eles (Figura 8C).

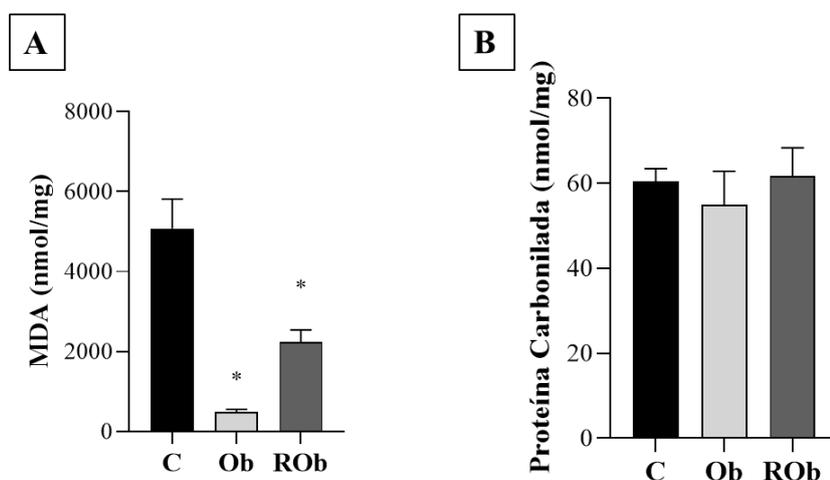


**Figura 8.** Marcadores de dano cardíaco. 7 animais por grupo. Grupos controle (C), resistente à obesidade (ROb) e obeso (Ob). A) Lactato desidrogenase; B) Creatinoquinase; C) Creatinoquinase M $\beta$ . Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - Ob vs. C. # C vs. ROb. ANOVA duas vias para medidas repetidas, complementada com o teste post-hoc de Tukey.

## 5.7 Estresse Oxidativo Cardíaco

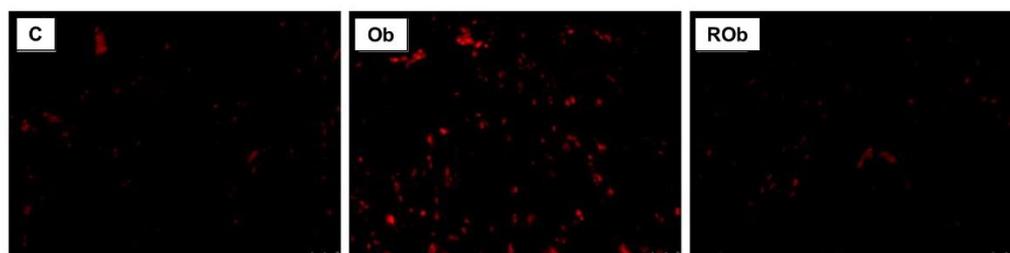
Os níveis de MDA (nmol/mg de proteína), marcador de peroxidação lipídica, foram elevados no grupo C em relação aos grupos Ob e ROb; não houve diferença estatística entre os grupos Ob e ROb para esse parâmetro (Figura 9A). Em relação à

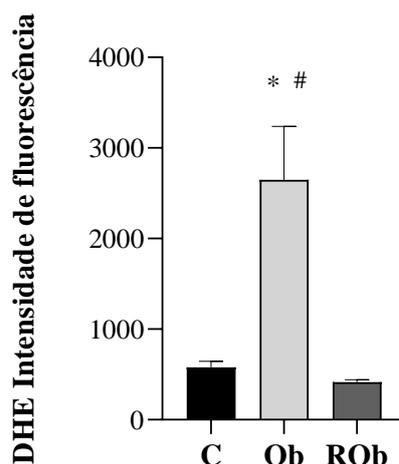
proteína carbonilada (nmol/mg de proteína), os resultados mostram que não houve diferença significativa entre os grupos estudados (Figura 9B).



**Figura 9.** Marcadores de estresse oxidativo. 7 animais por grupo. Grupos controle (C), resistente à obesidade (ROb) e obeso (Ob). A) Determinação da Peroxidação Lipídica; B) Determinação da Carbonilação de Proteínas. Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - C vs Ob; ANOVA uma via para amostras independentes, complementada com o teste post hoc de Tukey.

Os resultados mostram que os valores da determinação de espécies reativas de oxigênio (EROs) no grupo Ob foram significativamente maiores em relação aos grupos C e ROb, respectivamente (Figura 10).





**Figura 10.** Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). 7 animais por grupo. Grupos controle (C), resistente à obesidade (ROb) e obeso (Ob). Dados expressos em média  $\pm$  erro padrão. \*  $p < 0,05$  - C vs Ob; #  $p < 0,05$  - Ob vs. ROb. ANOVA uma via para amostras independentes, complementada com o teste post hoc de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo investigar o estresse oxidativo cardíaco em ratos resistentes à obesidade por meio de dieta hiperlipídica rica em banha de porco. Os principais achados do estudo foram que ratos resistentes à obesidade alimentados com a mesma dieta e ingestão calórica similar aos ratos obesos apresentaram igualmente dano e hipertrofia cardíaca, porém, com menor expressão de espécie reativa.

### 6.1 Indução de Resistência à Obesidade e Obesidade

Alguns modelos experimentais vêm sendo utilizados para reproduzir a obesidade e resistência à obesidade em animais (PORET et al., 2019; LEOPOLDO et al., 2016; PORET et al., 2021; LU et al., 2021). O modelo que melhor demonstra essas características é o que utiliza a dieta hiperlipídica em ratos sem modificações genéticas (LU et al., 2021; GASPARINI et al., 2021; PIMENTEL CORDEIRO et al., 2022). Animais quando expostos a esse tipo de oferta mimetizam fielmente o desenvolvimento da obesidade experimental como visualizado em humanos, (SCHRAUWEN & WESTERTEP, 2000). Em adição, a dieta hiperlipídica é ideal para induzir esses modelos de obesidade, pois apresenta maior densidade energética em uma mesma quantidade de alimento fornecido quando comparado com dieta padrão (LIN et al., 2000; WOODS et al., 2003). Entretanto, alguns animais expostos à dieta hiperlipídica ganham

menos massa corporal do que aqueles propensos à obesidade, sendo esses animais chamados de resistentes à obesidade (LU et al., 2021; LEVIN & KEESEY, 1998).

Diante disso, em nosso estudo, a massa corporal do grupo alimentado com a dieta hiperlipídica não obteve diferença estatística em relação ao grupo padrão até a 3ª semana, no entanto, a partir da 4ª semana, o grupo DH teve sua massa corporal estatisticamente elevada em relação ao grupo DP (Figura 2), configurando o início da obesidade. Esses achados vão de acordo com a literatura, os quais mostram que o ganho de massa corporal ocorre de forma gradual durante o período de exposição à dieta hiperlipídica; apesar de ser possível notar diferença na massa a partir da 2ª semana de protocolo em diferentes estudos, o fenótipo da obesidade se torna mais aparente após períodos prolongados, geralmente a partir de quatro semanas (BUETTNER & SCHOLMERICH & BOLLHEIMER, 2007; LIMA-LEOPOLDO et al., 2014; DA SILVA et al. 2017; LU et al., 2021).

Com o intuito de caracterizar a obesidade e a resistência à Obesidade de forma fidedigna, na 4ª semana de tratamento experimental, houve a redistribuição dos grupos a partir do critério tercil, sendo os grupos redistribuídos em grupos Controle (C), Obeso (Ob) e Resistente à Obesidade (ROb). Os resultados mostram que, a partir da 5ª semana de protocolo, houve aumento significativo na massa corporal do grupo Ob em relação aos grupos ROb e C, indicando o desenvolvimento de obesidade. Todavia, os animais ROb apresentaram massa corporal intermediária entre os grupos Ob e C, caracterizando o fenótipo da Resistência à Obesidade. (Figura 3). Esse resultado corrobora a literatura, visto que existem animais que desenvolvem maior ganho de massa corporal do que animais ROb, mesmo ingerindo a mesma quantidade alimentar e calórica (AKIEDA-ASAI et al., 2013; CHOI et al., 2010). Esse comportamento, na diferença de ganho de massa corporal entre os grupos, é associado ao fato ao qual parte dos animais submetidos à dieta hiperlipídica fazem ajustes na ingestão ou gasto de energia e não se tornam obesos, resistindo à obesidade (CHANG et al., 1990; LEVIN et al., 2004, LU et al., 2021). Já a outra parte dos animais, não compensa na ingestão, gasto energético ou na oxidação de gordura, se tornando obesos (CHANG et al., 1990; LEVIN et al., 2004; MACLEAN et al., 2004; BOOZER & LAUTERIO, 1998).

## 6.2 Caracterização da Adiposidade e Perfil Alimentar

Estudos têm demonstrado que animais alimentados com a mesma dieta hiperlipídica podem adquirir menos massa corporal do que aqueles denominados propensos à obesidade, sem diferença na ingestão alimentar, situação conhecida atualmente como Resistência à Obesidade (HUANG & HAN & STORLIEN, 2003; LEVIN & KEESEY, 1998). Em relação ao perfil nutricional dos animais ROb no presente estudo, os resultados mostram que os nossos achados corroboram os estudos de HUANG & HAN & STORLIEN, 2003; LEVIN & KEESEY, 1998)., visto que não houve diferença nos parâmetros nutricionais entre os grupos Ob e ROb. Cabe destacar que o grupo Ob apresentou massa corporal significativamente maior do que o grupo ROb, conforme visto anteriormente, evidenciando no grupo ROb a característica da Resistência à Obesidade, evidenciando uma característica intermediária entre a normalidade e a obesidade. Esse achado sugere que, na prática, mesmo consumindo a mesma dieta hiperlipídica e com perfil alimentar equivalente, ratos Ob são mais propensos a ganhar massa corporal do que ratos ROb, pois não compensam o aumento do conteúdo calórico com aumento de oxidação lipídica ou gasto energético (CHANG et al., 1990; BOOZER & LAUTERIO, 1998). Esse achado está em consonância com os resultados encontrados por Choi et al., (2010) e Lu et al., (2021), respectivamente.

Considerando a composição e a deposição de gordura corporal, as quais são importantes para o desenvolvimento da obesidade e de morbidades associadas (POIRIER et al., 2006; CALABRO et al., 2008; GHIGLIOTTI et al., 2014), os nossos achados mostram que na condição de ROb, a adiposidade foi reduzida conforme visualizado pela somatória dos depósitos de gordura e a gordura retroperitoneal, demonstrando que eles acumulam menos gordura corporal que os animais propensos à obesidade, mesmo ingerindo a dieta hiperlipídica saturada, ao qual corrobora com estudos similares de COMMERFORD et al. (2000), AKIEDA-ASAI et al. (2013) e LU et al. (2021).

Estudos mostram que a dieta hiperlipídica (DH) pode induzir o acúmulo de gordura corporal, porém, diferentes indivíduos possuem diferentes suscetibilidades à obesidade induzida por DH. Nesse sentido, estudos tem demonstrado que ratos ROb não armazenam excesso de lipídeos em adipócitos devido ao maior gasto energético metabólico, através da manutenção da função mitocondrial e defesa antioxidante, em relação à ratos Ob (LU et al., 2021; AKIEDA-ASAI et al., 2013, JOO et al., 2011), em concordância com os resultados do nosso estudo.

HOWARD et al. (1991) e AKIEDA-ASAI et al. (2013) também apontaram que os indivíduos Ob são mais propensos a ganhar mais massa corporal devido à redução do consumo de energia, o que contrasta com os indivíduos ROOb que usam mais gordura (catabolizando em maior quantidade) e consomem mais energia.

### 6.3 Comorbidades

A síndrome metabólica (SM) é definida pela ocorrência de múltiplos fatores concomitantes como obesidade, resistência à insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia e hipertensão arterial (PRASUN, 2020; FAHED et al., 2022). A alta ingestão calórica é uma fonte causal da SM, uma vez que a adiposidade visceral tem se mostrado um importante gatilho que ativa a maioria das vias da síndrome metabólica (MATSUZAWA & FUNAHASHI & NAKAMURA, 2011; PEKGOR et al., 2019).

Em nosso estudo, como esperado, ratos Ob apresentaram glicose basal elevada, hiperinsulinemia e resistência à insulina em relação ao grupo C, demonstrando importantes alterações metabólicas. Todavia, na condição de ROOb não foram observadas modificações no perfil glicêmico, indicando não haver um distúrbio metabólico por conta da alimentação às custas de DH. Corroborando com PIMENTEL CORDEIRO et al. (2022), LU (2021) e SÁ et al. (2015).

Considerando as possíveis alterações induzidas pela obesidade, os nossos resultados sugerem que ratos ROOb podem liberar o excesso de lipídeos na circulação, ao invés do acúmulo em adipócitos. Essa situação explicaria a visualização elevada de colesterol plasmático assim como no grupo Ob. Esses achados corroboram AKIEDA-ASAI et al. (2013) que observaram aumento da oxidação de ácidos graxos para regular o acúmulo de lipídeos em ratos ROOb. Por outro lado, não foram evidenciadas alterações nos níveis de triglicerídios.

A leptina é um hormônio peptídico produzido principalmente pelo tecido adiposo branco, sua produção é proporcional a quantidade de gordura corporal, ela é responsável pela saciedade e aumento do gasto energético por meio da ativação de receptores neurais centrais que favorecem o equilíbrio energético (CORREA & RAHMOUNI, 2006; FRÜHBECK et al., 2017). Sabe-se que a obesidade está associada à hiperleptinemia, refletindo a resistência à leptina, pois, indivíduos obesos apresentam elevação de adiposidade corporal com altas concentrações circulantes desse hormônio. (CARO et al., 1996; FRÜHBECK et al., 2017). Essa insensibilidade à leptina em indivíduos Ob ocorre

pela falta de ligação dela com seu receptor, ao qual impede a retroalimentação com o sistema nervoso central (hipotálamo) (DOS SANTOS PINHO & DE PAIVA & DE CARVALHO OLIVEIRA, 2022).

Dentro desse contexto, os nossos achados mostram que os níveis de leptina sérica foram significativamente elevados nos grupos Ob e ROb em relação ao grupo C. O que, em contraste do observado em obesos, animais ROb apresentaram valores inferiores em relação nos depósitos de gordura em relação aos animais Ob no nosso estudo. Podendo sugerir que ratos ROb não desenvolvem resistência à leptina.

O aumento de leptina sérica, sobretudo nos indivíduos obesos, deve constituir um sinal de alerta para desequilíbrios energéticos de resistência à insulina, de hiperinsulinemia com seu grupamento de anomalias nos metabolismos da glicose e dos lipídios que influenciam fortemente ao aumento e o desenvolvimento das doenças crônicas, doença cardiovascular e diabetes tipo 2 (DO CARMO MARTINS & FALEIRO & FONSECA, 2012). No entanto, a presença da proteína em animais sem sobrepeso tem levantado funções fisiológicas importantes em relação ao controle energético e manutenção da massa corporal visto em BRAVO et al. (2006), corroborando com nossos resultados metabólicos e corporais dos animais do grupo ROb.

A leptina possui ação direta e inibitória em relação a secreção de insulina, e na regulação do peso corporal e metabolismo da glicose ZIEBA & BIERNAT & BARĆ (2020). Essa inibição da insulina pode ocorrer pela ativação dos canais de potássio dependentes de ATP ou através da interação com a sinalização da proteína AMPK (responsável na regulação da homeostase energética celular), também pode ocorrer oxidação de triagliceróis do tecido adiposo, reduzindo o acúmulo de gordura e então inibindo a geração (lipogênese) e estimulando a quebra de gordura (lipólise) (AHREN & HAVEL, 1999). No grupo ROb houve aumento da leptina similar ao Ob, porém, não houve aumento de adiposidade e resistência a insulina, podendo supor o efeito da leptina na sensibilidade à insulina e à lipólise do grupo.

#### **6.4 Remodelamento Cardíaco e Dano Cardíaco**

A maioria das doenças cardíacas são seguidas por aumento de massa cardíaca e alterações morfológicas. O remodelamento cardíaco é definido como um processo como variações celulares, moleculares e intersticiais cardíacas, manifestando-se de forma clínica pela alteração de massa, tamanho e função do coração (SCHIRONE et al., 2017).

Esse remodelamento ocorre com o objetivo de manter a função cardíaca, porém, após se tornar recorrente pode ocasionar o comprometimento da capacidade funcional de forma progressiva (PEREIRA, 2015).

Considerando o processo de remodelação cardíaca, podemos afirmar que tanto a obesidade quanto a Resistência à Obesidade promoveram alterações morfológicas como hipertrofia cardíaca (aumento de massa cardíaca, VE, relação ventrículos/tíbia e AST) e fibrose. Em adição, observa-se elevação dos níveis de creatinoquinase M $\beta$ , apontando dano cardíaco nas duas condições.

Apesar da menor adiposidade do ROb em relação ao Ob os dois grupos tiveram similar ingestão calórica e alimentação do tipo hiperlipídica, além de terem similaridade na concentração de colesterol plasmático. A alimentação hipercalórica possui uma grande densidade energética relacionada a uma mesma quantidade de alimento padrão fornecido. Ratos ROb, apesar de não aumentarem a massa corporal como os animais Ob, sofrem ajustes no gasto energético e na oxidação lipídica (CHANG et al., 1990; LEVIN et al., 2004, LU et al., 2021). Essa regulação para manutenção da homeostase sugere uma sobrecarga hemodinâmica advinda da impossibilidade das células cardíacas se dividirem na fase adulta, resultando em um remodelamento cardíaco (DE FRANCISCHI et al., 2000).

A partir disso, ratos ROb podem apresentar hipertrofia e dano cardíaco relacionados à sua resistência ao desenvolvimento da obesidade, corroborando com OLIVEIRA et al. (2021) e PORET et al. (2019).

## **6.5 Estresse Oxidativo**

A mitocôndria não produz apenas ATP para o metabolismo celular, na fosforilação oxidativa, gera também EROs (Nickel et al., 2014). Alguns estudos reportaram que a ingestão elevada de gordura acarreta produção excessiva de EROs e, consequentemente, estresse oxidativo, o qual causa danos e alterações mitocondriais (Milagro et al., 2006; Yu et al., 2019; Balaban et al., 2005).

A produção de EROs no tecido cardíaco (ânion superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio) apresenta função sinalizadora tanto para a fisiologia quanto para a patológica (PEOPLES et al., 2019). Em condições fisiológicas, a sinalização serve para a regulação do desenvolvimento e maturação das células cardíacas, manuseio do cálcio, tonificação vascular, e contração/excitação (BURGOYNE et al., 2012). Em condições

patológicas, com produção elevada de EROs, ocorre o estresse oxidativo, com disfunção mitocondrial, ativação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (desacoplando a membrana levando apoptose e necrose) e morte celular (RICHARDSON & SCHADT, 2014).

Nossos resultados apontam que a obesidade acarretou aumento de EROs no tecido cardíaco, mais especificamente o radical superóxido, porém, em contrapartida, a resistência à obesidade não induziu elevação das EROs, fato esse que pode ser associado à menor deposição de gordura corporal. Todavia, embora a obesidade tenha promovido aumento na produção de EROs, o presente estudo não observou elevação nos biomarcadores de estresse oxidativo no coração.

O MDA é um produto da oxidação lipídica ao qual, quando o corpo está em estresse oxidativo, é amplamente utilizado para mensurar a peroxidação lipídica (Lu et al., 2021). A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares, ao qual, gera radicais livres que alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das membranas (MAHATTANATAWEE et al., 2006; AUST et al., 2001). A produção excessiva, estimulam os radicais promoverem lesões oxidativas. No tecido cardíaco, há elevação da taxa metabólica oxidativa e redução da atividade de enzimas antioxidantes, ao qual, se apresenta suscetível a lesões tecidual pelo aumento do estresse oxidativo (ZHANG & CHEN, 2011).

Em divergência com a hipótese inicial, os nossos resultados mostraram aumento significativo de MDA nos animais expostos à dieta padrão quando comparados aos grupos Ob e ROb, corroborando com Róvero Costa (2019). Esse resultado pode ser explicado pela formulação da dieta, desde que a fonte de lipídio é um ácido graxo poliinsaturado (PUFA), o qual está presente no óleo de soja; esse ingrediente apresenta-se em dobro na dieta padrão (AIN-93) quando comparada à dieta hiperlipídica dos grupos Ob e ROb, respectivamente (EL-SAYED et al., 2014; PAKIET et al., 2020). Dentro desse contexto, a literatura relata que os PUFAs são mais suscetíveis à peroxidação lipídica e estudos realizados em animais alimentados com dieta padrão também mostraram que os tipos e níveis de gordura da dieta interferem na suscetibilidade à peroxidação lipídica (BUCKINGHAM, 1985; THOMAS et al., 1994; THOMAS & MICHEL & RUDEL, 1996; REAVEN et al., 1993).

As Proteínas Carboniladas são um bom biomarcador de dano oxidativo grave das proteínas (DALLE-DONNE et al., 2006). Assim, além da peroxidação lipídica, o estresse oxidativo pode gerar dano a nível proteico, com a carbonilação de proteína, ao qual ocorre pela deleção de células e tecidos no organismo, ocorrendo assim alterações nas funções proteicas com consequente estresse oxidativo (FARIAS et al., 2013; MANGGE et al., 2014; USMAN & VOLPI, 2018). Em nosso estudo, não houve diferença entre os grupos em relação à proteína carbonilada.

## **7 CONCLUSÃO**

A resistência à obesidade, diante da dieta hiperlipídica ofertada, não promove alterações metabólicas e nas espécies reativas de oxigênio como na obesidade. No entanto, promove hipertrofia e dano cardíaco. Isso indica que a resistência à obesidade, apesar de não desenvolver alterações no metabolismo energético assim como no obeso, causou danos ao tecido cardíaco, ao qual não foi capaz de preservar.

**REFERÊNCIAS**

- AHREN, B. O.; HAVEL, Peter J. Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 4, p. R959-R966, 1999.
- AKIEDA-ASAI, S. et al. Metabolic features of rats resistant to a high-fat diet. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 7, n. 4, p. e243–e250, 2013.
- ANDERSEN, Lene Frost et al. Longitudinal associations between body mass index and serum carotenoids: the CARDIA study. **British Journal of Nutrition**, v. 95, n. 2, p. 358-365, 2006.
- ANDERSON, Ethan J. et al. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 3, p. 573-581, 2009.
- APAIJAI, Nattayaporn et al. High-saturated fat high-sugar diet accelerates left-ventricular dysfunction faster than high-saturated fat diet alone via increasing oxidative stress and apoptosis in obese-insulin resistant rats. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, n. 2, p. 1800729, 2019.
- AUST, Olivier et al. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. **Journal of Chromatography A**, v. 936, n. 1-2, p. 83-93, 2001.
- AZEVEDO, Paula S. et al. Cardiac remodeling: concepts, clinical impact, pathophysiological mechanisms and pharmacologic treatment. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 106, p. 62-69, 2015.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BEDARD, Karen; KRAUSE, Karl-Heinz. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.
- BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BOOZER, C. N.; LAUTERIO, T. J. High initial levels of plasma leptin predict diet-induced obesity in rats. **Int J Obes**, v. 22, n. Suppl 3, p. S166, 1998.
- BOUDINA, Sihem et al. Mitochondrial energetics in the heart in obesity-related diabetes: direct evidence for increased uncoupled respiration and activation of uncoupling proteins. **Diabetes**, v. 56, n. 10, p. 2457-2466, 2007.
- BRAND, Martin D.; ESTEVES, Telma C. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. **Cell metabolism**, v. 2, n. 2, p. 85-93, 2005.
- BRAVO, Paco E. et al. Leptin and hypertension in obesity. **Vascular health and risk management**, v. 2, n. 2, p. 163-169, 2006.

BRAYMER, H. Douglas et al. Lingual CD36 and nutritional status differentially regulate fat preference in obesity-prone and obesity-resistant rats. **Physiology & Behavior**, v. 174, p. 120-127, 2017.

BROWNLEE, Michael. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 813-820, 2001.

BUCKINGHAM, Kent W. Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. **The Journal of nutrition**, v. 115, n. 11, p. 1425-1435, 1985.

BUETTNER, Roland et al. Correction of diet-induced hyperglycemia, hyperinsulinemia, and skeletal muscle insulin resistance by moderate hyperleptinemia. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 278, n. 3, p. E563-E569, 2000

BUETTNER, Roland; SCHÖLMERICH, Jürgen; BOLLHEIMER, L. Cornelius. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, n. 4, p. 798-808, 2007.

BURGOYNE, Joseph R. et al. Redox signaling in cardiac physiology and pathology. **Circulation research**, v. 111, n. 8, p. 1091-1106, 2012.

BURNEIKO, Regina CM et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, 2006.

CALABRO, Paolo et al. The role of adiposity as a determinant of an inflammatory milieu. **Journal of Cardiovascular Medicine**, v. 9, n. 5, p. 450-460, 2008.

CAMERA, Fernanda Dal'Maso et al. Cardioprotective effects of physical exercise on redox biology in mice exposed to hand-rolled cornhusk cigarette smoke. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 661, p. 50-55, 2019.

CARO, José F. et al. Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance. **The Lancet**, v. 348, n. 9021, p. 159-161, 1996.

CHANG, S. et al. Metabolic differences between obesity-prone and obesity-resistant rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 259, n. 6, p. R1103-R1110, 1990.

CHOI, Ji-Young et al. The metabolic response to a high-fat diet reveals obesity-prone and-resistant phenotypes in mice with distinct mRNA-seq transcriptome profiles. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 9, p. 1452-1460, 2016.

CHOI, Jung-Won et al. Plasma proteome analysis in diet-induced obesity-prone and obesity-resistant rats. **Proteomics**, v. 10, n. 24, p. 4386-4400, 2010.

CLARKSON, Priscilla M.; THOMPSON, Heather S. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health?. **The American journal of clinical nutrition**, v. 72, n. 2, p. 637S-646S, 2000.

COLE, Mark A. et al. A high fat diet increases mitochondrial fatty acid oxidation and uncoupling to decrease efficiency in rat heart. **Basic research in cardiology**, v. 106, n. 3, p. 447-457, 2011.

- COMMERFORD, S. Renee et al. Fat oxidation, lipolysis, and free fatty acid cycling in obesity-prone and obesity-resistant rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 279, n. 4, p. E875-E885, 2000.
- CORREIA, Marcelo LG; RAHMOUNI, Kamal. Role of leptin in the cardiovascular and endocrine complications of metabolic syndrome. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 8, n. 6, p. 603-610, 2006.
- DA SILVA, Vitor L. et al. Moderate exercise training does not prevent the reduction in myocardial L-type Ca<sup>2+</sup> channels protein expression at obese rats. **Physiological Reports**, v. 5, n. 19, p. e13466, 2017.
- DALLE-DONNE, Isabella et al. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 10, n. 2, p. 389-406, 2006.
- DALVI, Shubhangi Mahesh et al. Nitric oxide, carbonyl protein, lipid peroxidation and correlation between antioxidant vitamins in different categories of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. **Malaysian Journal of Medical Sciences**, v. 20, n. 1, p. 21-30, 2013.
- DE FARIAS, J. M. et al. Effect of physical training on the adipose tissue of diet-induced obesity mice: interaction between reactive oxygen species and lipolysis. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 03, p. 190-196, 2013.
- DE FRANCISCHI, R. P. P. et al. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 1, p. 17-28, 2000.
- DIMEO, Sergio; IOSSA, Susanna; VENDITTI, Paola. Skeletal muscle insulin resistance: role of mitochondria and other ROS sources. **Journal of Endocrinology**, v. 233, n. 1, p. R15-R42, 2017.
- DO CARMO MARTINS, Maria; FALEIRO, Luís Lima; FONSECA, Aidil. Relationship between leptin and body mass and metabolic syndrome in an adult population. **Revista Portuguesa de Cardiologia (English Edition)**, v. 31, n. 11, p. 711-719, 2012.
- DOROSZKO, Adrian et al. New insights into the role of oxidative stress in onset of cardiovascular disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2 pages, 2018.
- DOS SANTOS PINHO, Kaellen Haab; DE PAIVA, Maria Joseane; DE CARVALHO OLIVEIRA, Raffael Azevedo. Leptina e adiponectina: papel dos hormônios nos processos metabólicos e impactos na sua desregulação. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 2, p. e34711225144-e34711225144, 2022.
- EL-SAYED, Mohammad El-Sayed Yassin et al. Impact of dietary oils and fats on lipid peroxidation in liver and blood of albino rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 1, p. 52-58, 2014.
- ENGIN, Atila. The pathogenesis of obesity-associated adipose tissue inflammation. **Obesity and Lipotoxicity**, p. 221-245, 2017.
- FAINE, L. A. et al. Toxicity of ad lib. overfeeding: effects on cardiac tissue. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 5, p. 663-668, 2002.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da associação médica brasileira**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, Isabel CFR; ABREU, Rui. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, p. 32-39, 2007.

FRÜHBECK, Gema et al. Involvement of the leptin-adiponectin axis in inflammation and oxidative stress in the metabolic syndrome. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6619, 2017.

FURUKAWA, Shigetada et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2017.

GASPARINI, Patrícia Vasconcelos Fontana et al. High-Fat and Combined High-Fat and Sucrose Diets Promote Cardiac Oxidative Stress Independent of Nox2 Redox Regulation and Obesity in Rats. **Cell Physiol Biochem**, v. 55, p. 618-634, 2021.

GASPARRI, Susana. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da Costus spicatus**. 2005. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brasil.

GHIGLIOTTI, Giorgio et al. Adipose tissue immune response: novel triggers and consequences for chronic inflammatory conditions. **Inflammation**, v. 37, n. 4, p. 1337-1353, 2014.

GREEN, Katherine; BRAND, Martin D.; MURPHY, Michael P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. suppl\_1, p. S110-S118, 2004.

GUAN, Guiping; LAN, Shile. Implications of antioxidant systems in inflammatory bowel disease. **BioMed Research International**, vol. 2018, Article ID 1290179, 7 pages, 2018.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants—quo vadis?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, n. 3, p. 125-130, 2011.

HALLIWELL, Barry; CROSS, Carroll E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n.10, p. 5-12, 1994.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HUANG, Dejian; OU, Boxin; PRIOR, Ronald L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUANG, Xu-Feng; HAN, Mei; STORLIEN, Len H. The level of NPY receptor mRNA expression in diet-induced obese and resistant mice. **Molecular Brain Research**, v. 115, n. 1, p. 21-28, 2003.

HUNTER, Ian et al. Cardiovascular function in male and female JCR: LA-cp rats: effect of high-fat/high-sucrose diet. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 312, n. 4, p. H742-H751, 2017.

- HURREL, Samantha; HSU, Walter H. The etiology of oxidative stress in insulin resistance. **Biomedical Journal**, v. 40, n. 5, p. 257-262, 2017.
- JACKMAN, Matthew R.; MACLEAN, Paul S.; BESSESEN, Daniel H. Energy expenditure in obesity-prone and obesity-resistant rats before and after the introduction of a high-fat diet. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 299, n. 4, p. R1097-R1105, 2010.
- JOO, Jeong In et al. Differential expression of adipose tissue proteins between obesity-susceptible and-resistant rats fed a high-fat diet. **Proteomics**, v. 11, n. 8, p. 1429-1448, 2011.
- JUNIOR, Silvio A. Oliveira et al. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. **Medical Science Monitor**, v. 16, n. 7, p. BR208-BR217, 2010.
- KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V. Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 187, n. 1, p. 1-17, 2006.
- KHANSARI, Nemat; SHAKIBA, Yadollah; MAHMOUDI, Mahdi. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 73-80, 2009.
- KOLWICZ JR, Stephen C.; PUROHIT, Suneet; TIAN, Rong. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. **Circulation research**, v. 113, n. 5, p. 603-616, 2013.
- KOTZ, Catherine M.; TESKE, Jennifer A.; BILLINGTON, Charles J. Neuroregulation of nonexercise activity thermogenesis and obesity resistance. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 294, n. 3, p. R699-R710, 2008.
- KOURY, Josely Correa; DONANGELO, Carmen Marino. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v. 16, p. 433-441, 2003.
- KUMAR, S.; PANDEY, Abhay K. Free radicals: health implications and their mitigation by herbals. **Journal of Advances in Medicine and Medical Research**, p. 438-457, 2015.
- LEOPOLDO, A. S. et al. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, 2016.
- LEVIN, Barry E. et al. Abnormalities of leptin and ghrelin regulation in obesity-prone juvenile rats. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 285, n. 5, p. E949-E957, 2003.
- LEVIN, Barry E.; KEESEY, Richard E. Defense of differing body weight set points in diet-induced obese and resistant rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 2, p. R412-R419, 1998.
- LIMA-LEOPOLDO, Ana Paula et al. Long-term obesity promotes alterations in diastolic function induced by reduction of phospholamban phosphorylation at serine-16 without affecting calcium handling. **Journal of applied physiology**, v. 117, n. 6, p. 669-678, 2014.

- LIN, Lawrence I.-Kuei. Total deviation index for measuring individual agreement with applications in laboratory performance and bioequivalence. **Statistics in medicine**, v. 19, n. 2, p. 255-270, 2000.
- LIN, S. et al. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. **International journal of obesity**, v. 24, n. 5, p. 639-646, 2000.
- LOBO, Larissa Aline Carneiro; MIORELLI, Simone; ROCHA, Jaqueline. Efeitos do composto organoselenado ebselen em células eucarióticas. **Salão de iniciação Científica (18.: 2006: Porto Alegre, RS). Livro de resumos. Porto Alegre: UFRGS, 2006.**, 2006.
- LOPASCHUK, Gary D. et al. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. **Physiological reviews**, v. 90, n. 1, p. 207-258, 2010.
- LU, Yi-Fa; LU, Shuwen. Influence of dietary fat saturation on lipid peroxidation of serum and low density lipoprotein in rats. **Nutrition research**, v. 22, n. 4, p. 463-472, 2002.
- LU, Yipin et al. Differences in energy metabolism and mitochondrial redox status account for the differences in propensity for developing obesity in rats fed on high-fat diet. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 3, p. 1603-1613, 2021.
- LUSHCHAK, Volodymyr I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164-175, 2014.
- MACLEAN, Paul S. et al. Enhanced metabolic efficiency contributes to weight regain after weight loss in obesity-prone rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 287, n. 6, p. R1306-R1315, 2004.
- MADSEN, Andreas Nygaard et al. Long-term characterization of the diet-induced obese and diet-resistant rat model: a polygenetic rat model mimicking the human obesity syndrome. **Journal of Endocrinology**, v. 206, n. 3, p. 287-296, 2010.
- MAHATTANATAWEE, Kanjana et al. Total antioxidant activity and fiber content of select Florida-grown tropical fruits. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 19, p. 7355-7363, 2006.
- MALEKMOHAMMAD, Khojasteh; SEWELL, Robert DE; RAFIEIAN-KOPAEI, Mahmoud. Antioxidants and atherosclerosis: mechanistic aspects. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, p. 301, 2019.
- MANGGE, Harald et al. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 462, 2014.
- MARTINEZ, J. A. Mitochondrial oxidative stress and inflammation: an slalom to obesity and insulin resistance. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 62, n. 4, p. 303-306, 2006.
- MATSUZAWA, Yuji; FUNAHASHI, Tohru; NAKAMURA, Tadashi. The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 18, n. 8, p. 629-639, 2011.
- MATTHEWS, David R. et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and  $\beta$ -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412-419, 1985.

MELLOR, Kimberley M.; RITCHIE, Rebecca H.; DELBRIDGE, Lea MD. Reactive oxygen species and insulin-resistant cardiomyopathy. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 37, n. 2, p. 222-228, 2010.

MENON, V. et al. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. **Diabetic medicine**, v. 21, n. 12, p. 1346-1352, 2004.

MILAGRO, Fermín I.; CAMPIÓN, Javier; MARTÍNEZ, J. Alfredo. Weight gain induced by high-fat feeding involves increased liver oxidative stress. **Obesity**, v. 14, n. 7, p. 1118-1123, 2006.

NIEMANN, Bernd et al. Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 5, p. 577-585, 2011.

NIEMANN, Bernd et al. Oxidative stress and cardiovascular risk: obesity, diabetes, smoking, and pollution: part 3 of a 3-part series. **Journal of the American college of cardiology**, v. 70, n. 2, p. 230-251, 2017.

NISHIKAWA, Takeshi et al. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. **Nature**, v. 404, n. 6779, p. 787-790, 2000.

NOVELLI, E. L. B. et al. The adverse effect of a high energy dense diet on cardiac tissue. **Journal of Nutritional & Environmental Medicine**, v. 12, n. 4, p. 287-294, 2002.

OH, Sechang et al. Nuclear factor (erythroid derived 2)-like 2 activation increases exercise endurance capacity via redox modulation in skeletal muscles. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

OH, Tae-Seok et al. Time-dependent hepatic proteome analysis in lean and diet-induced obese mice. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 12, p. 1211-1227, 2011.

OLIVEIRA, Alane Cabral de et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, Scarlet Marques de et al. Cardiac Remodeling in Obesity-Resistance Model is not Related to Collagen I and III Protein Expression. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, 2021.

PAKIET, Alicja et al. The effect of a high-fat diet on the fatty acid composition in the hearts of mice. **Nutrients**, v. 12, n. 3, p. 824, 2020.

PANTH, Nisha; PAUDEL, Keshav Raj; PARAJULI, Kalpana. Reactive oxygen species: a key hallmark of cardiovascular disease. **Advances in Medicine**, v. 2016, 2016.

PEKGOR, Selma et al. The role of visceral adiposity index levels in predicting the presence of metabolic syndrome and insulin resistance in overweight and obese patients. **Metabolic syndrome and related disorders**, v. 17, n. 5, p. 296-302, 2019.

PEOPLES, Jessica N. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. **Experimental & molecular medicine**, v. 51, n. 12, p. 1-13, 2019.

PEREIRA, Bruna Letícia Buzati. Influência da suplementação de tomate e licopeno na remodelação cardíaca após infarto agudo do miocárdio. 2015.

PIMENTEL CORDEIRO, Jóctan et al. Resistance to obesity prevents obesity development without increasing spontaneous physical activity and not directly related to greater metabolic and oxidative capacity. **Plos one**, v. 17, n. 8, p. e0271592, 2022.

POIRIER, Paul et al. Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. **Circulation**, v. 113, n. 6, p. 898-918, 2006.

PORET, Jonquil M. et al. High fat diet consumption differentially affects adipose tissue inflammation and adipocyte size in obesity-prone and obesity-resistant rats. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 3, p. 535-541, 2018.

PORET, Jonquil M. et al. Sex differences in markers of metabolic syndrome and adipose tissue inflammation in obesity-prone, Osborne-Mendel and obesity-resistant, S5B/Pl rats. **Life Sciences**, v. 273, p. 119290, 2021.

PORET, Jonquil M. et al. The prevalence of cardio-metabolic risk factors is differentially elevated in obesity-prone Osborne-Mendel and obesity-resistant S5B/Pl rats. **Life Sciences**, v. 223, p. 95-101, 2019.

PRASUN, Pankaj. Mitochondrial dysfunction in metabolic syndrome. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 10, p. 165838, 2020.

QIN, Fuzhong et al. Cytosolic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediates hypertrophy, apoptosis, and decreased SERCA activity in mice with chronic hemodynamic overload. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 306, n. 10, p. H1453-H1463, 2014.

RADI, Rafael. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 23, p. 5839-5848, 2018.

REAVEN, Peter et al. Effects of oleate-rich and linoleate-rich diets on the susceptibility of low density lipoprotein to oxidative modification in mildly hypercholesterolemic subjects. **The Journal of clinical investigation**, v. 91, n. 2, p. 668-676, 1993.

RICHARDSON, Arlan G.; SCHADT, Eric E. The role of macromolecular damage in aging and age-related disease. **Journals of Gerontology Series A: Biomedical Sciences and Medical Sciences**, v. 69, n. Suppl\_1, p. S28-S32, 2014.

ROSINI, Tiago Campos; SILVA, Adelino Sanchez Ramos da; MORAES, Camila de. Obesidade induzida por consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados com a obesidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, p. 383-387, 2012.

ROVER JÚNIOR, Laércio et al. Antioxidant system involving the glutathione metabolic cycle associated to electroanalytical methods in the oxidative stress evaluation. **Quimica Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

RÓVERO COSTA, Mariane et al. Lycopene modulates pathophysiological processes of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. **Antioxidants**, v. 8, n. 8, p. 276, 2019.

SÁ, Felipe Gonçalves dos Santos de et al. Resistência à Obesidade Promove Disfunção Contrátil Leve Associada com Trânsito Ca<sup>2+</sup> Intracelular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 105, p. 588-596, 2015.

SCHIRONE, Leonardo et al. A review of the molecular mechanisms underlying the development and progression of cardiac remodeling. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, 2017.

SCHNEIDER, Cláudia Dornelles; OLIVEIRA, Alvaro Reischak de. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 10, p. 308-313, 2004.

SCHRAUWEN, Patrick; WESTERTERP, Klaas R. The role of high-fat diets and physical activity in the regulation of body weight. **British journal of nutrition**, v. 84, n. 4, p. 417-427, 2000.

SEIFERT, Erin L. et al. Electron transport chain-dependent and-independent mechanisms of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission during long-chain fatty acid oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 8, p. 5748-5758, 2010.

SIMONČIČ, Matjaž et al. Obesity resistant mechanisms in the Lean polygenic mouse model as indicated by liver transcriptome and expression of selected genes in skeletal muscle. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2011.

SMITH, Pauline M. et al. AT1 receptor blockade alters nutritional and biometric development in obesity-resistant and obesity-prone rats submitted to a high fat diet. **Frontiers in Psychology**, v. 5, p. 832, 2014.

SOUSA, Cleyton Marcos de M. et al. Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. **Química nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SUN, Jingyu et al. Early mitochondrial adaptations in skeletal muscle to obesity and obesity resistance differentially regulated by high-fat diet. **Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes**, v. 125, n. 08, p. 538-546, 2017.

SVERDLOV, Aaron L. et al. High fat, high sucrose diet causes cardiac mitochondrial dysfunction due in part to oxidative post-translational modification of mitochondrial complex II. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 78, p. 165-173, 2015.

SVERDLOV, Aaron L. et al. Mitochondrial reactive oxygen species mediate cardiac structural, functional, and mitochondrial consequences of diet-induced metabolic heart disease. **Journal of the American Heart Association**, v. 5, n. 1, p. e002555, 2016.

THOMAS, Michael J. et al. Fatty acid composition of low-density lipoprotein influences its susceptibility to autoxidation. **Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 1828-1834, 1994.

THOMAS, Michael J.; RUDEL, Lawrence L. Dietary fatty acids, low density lipoprotein composition and oxidation and primate atherosclerosis. **The Journal of nutrition**, v. 126, n. suppl\_4, p. 1058S-1062S, 1996.

USMAN, Moonisah; VOLPI, Emanuela V. DNA damage in obesity: Initiator, promoter and predictor of cancer. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 778, p. 23-37, 2018

VADVALKAR, Shraddha S. et al. Metabolic inflexibility and protein lysine acetylation in heart mitochondria of a chronic model of type 1 diabetes. **Biochemical Journal**, v. 449, n. 1, p. 253-261, 2013.

VELLOSA, José Carlos Rebuglio et al. Estresse oxidativo: uma introdução ao estado da arte. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 10152-10168, 2021.

WANG, Xia et al. Differential expression of liver proteins between obesity-prone and obesity-resistant rats in response to a high-fat diet. **British journal of nutrition**, v. 106, n. 4, p. 612-626, 2011.

WELCH, Kevin D. et al. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. **Free radical biology and medicine**, v. 32, n. 7, p. 577-583, 2002.

WOODS, Stephen C. et al. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 4, p. 1081-1087, 2003.

YIN, F. C. et al. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 243, n. 6, p. H941-H947, 1982.

YU, Hai-Tao et al. Oxidative damage of mitochondrial respiratory chain in different organs of a rat model of diet-induced obesity. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 5, p. 1957-1967, 2018.

YU, Yue et al. Bamboo leaf flavonoids extracts alleviate oxidative stress in HepG2 cells via naturally modulating reactive oxygen species production and Nrf2-mediated antioxidant defense responses. **Journal of food science**, v. 84, n. 6, p. 1609-1620, 2019.

ZHANG, Yuanyuan; CHEN, Xiaoli. Reducing seleno protein P expression suppresses adipocyte differentiation as a result of increased preadipocyte inflammation. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 300, n. 1, p. E77-E85, 2011.

ZIEBA, D. A.; BIERNAT, W.; BARĆ, J. Roles of leptin and resistin in metabolism, reproduction, and leptin resistance. **Domestic animal endocrinology**, v. 73, p. 106472, 2020.

## ANEXO I

|  |   |
|--|---|
|  <p>Universidade Federal do Espírito Santo</p>  |    |
| <h1>CERTIFICADO</h1>   |   |
| <p>Certificamos que a proposta intitulada</p>  | <p><b>Caracterização da Remodelação cardíaca na condição de resistência à obesidade</b></p>                                     |
| <p>Registrada sob o n.º</p>  | <p>sob a responsabilidade de <b>ANDRE SOARES LEOPOLDO</b></p>   |
| <p>que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n.º 167.6899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, em reunião no dia</p> | <p><b>20 de dezembro de 2019</b></p>  |
| <p>Vigência da autorização:</p>  | <p><b>dezembro/19 a outubro/21</b></p>  |
| <p>Espécie(s):</p>   | <p><b>Rato (Rattus norvegicus)</b></p>  |
| <p>Linhagem(ns)/raça(s):</p>   | <p><b>Wistar</b></p>  |
| <p>Peso:</p>   | <p><b>250 gramas</b></p>  |
| <p>Número de animais:</p>  | <p><b>76</b></p>  |
| <p>Origem:</p>   | <p><b>Biotério Central, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Maruípe, Vitória-ES</b></p> |
| <p>Coordenador da CEUA-Ufes</p>  | <p><i>Breno S. Salgado</i><br/>Breno Souza Salgado<br/>Vitória-ES, 20 de dezembro de 2019</p>                                   |