

FIOCRUZ

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA FUNÇÃO CARDÍACA
EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2
INDUZIDO POR DIETA HIPERGORDUROSA EM
CAMUNDONGO**

ALICE COSTA KIPERSTOK

**Salvador, BA
2010**

ALICE COSTA KIPERSTOK

**AVALIAÇÃO LONGITUDINAL DA FUNÇÃO CARDÍACA
EM MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES TIPO 2
INDUZIDO POR DIETA HIPERGORDUROSA EM
CAMUNDONGO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação
em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dra. Milena Botelho Pereira Soares
Co-orientador: Dra. Simone Garcia Macambira

Salvador, BA
2010

Aos meus pais, irmãs e sobrinha, pelo apoio e incentivo. Por fazerem a minha vida mais feliz e encantadora.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse trabalho.

À minha família pelo apoio e incentivo incondicionais em todos os momentos da minha vida. Aos meus pais, minha base, meu apoio, pela certeza de que, sem eles, nada disso seria possível. Às minhas irmãs, sobrinha e cunhados pelo incentivo e companheirismo de sempre.

À Dra Milena Soares pelos anos de orientação e dedicação, contribuindo de forma significativa para a minha vida profissional.

Ao Dr Ricardo Ribeiro dos Santos pela oportunidade, por ter apoiado e possibilitado a realização desse trabalho.

À Dra Simone Garcia Macambira pela atenção e orientação, pelo apoio e carinho. Por abrir as portas da sua casa e família para mim. Meus agradecimentos nunca serão suficientes.

À Isabela Ichihara pelo empenho, disponibilidade e parceria na execução desse trabalho.

À equipe “cardio”, Adriano, Daniel, Isabela, Lucas, Murilo e Neto por horas de ecos e eletros, por horas de análises, pela ajuda e pela mobilização em torno do meu trabalho.

Ao Dr Wilfried Klein pela disponibilidade, orientação e dedicação.

Ao Dr Luiz Freitas, Juliana Freitas e toda a sua equipe, pelas orientações, ensinamentos, pela ajuda experimental e análise das lâminas.

À Siane Souza e Ludmila Chaves, minha eterna equipe diabetes, pela parceria, pelas discussões, pelo aprendizado e pela amizade.

Ao meu mestre Ricardo Lima por todo o aprendizado científico e de vida, pelos conselhos e carinho.

À Juliana Fraga Vasconcelos pela ajuda com os ELISAs e a morfometria, pelas conversas e conselhos.

Aos colegas e amigos do CBTC e LETI: técnicos, ICs e estudantes de pós-graduação por todo o apoio oferecido, tornando anos de trabalho muito mais divertidos. A Elisalva e Fabiana pelo apoio e carinho. Em especial a Aline, André, Bruno, Maria, Mariana, Mileninha, Neto e Tanira pelo incentivo, pela amizade, por aguentarem o meu estresse sempre com um sorriso no rosto.

À Roberta Couto, Hilda Marques e em especial, Lucyvera Imbroinise pelo excelente trabalho na administração do LETI e CBTC.

Aos meus amigos de pós-graduação, de escola, de faculdade, de vida por dividirem risadas e lágrimas, alegrias e tristezas, por amenizarem os dias difíceis e animarem as minhas semanas.

Ao CPqGM / FIOCRUZ pela excelente infra-estrutura disponibilizada para o desenvolvimento do trabalho.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

“A busca da excelência não deve ser um objetivo, e sim um hábito.”

Aristóteles

RESUMO

O diabetes tipo 2 é a forma prevalente do diabetes *mellitus* (DM), acometendo cerca de 90% dos pacientes. Ela resulta da combinação de resistência à insulina e deficiência relativa na sua produção. O ônus sócio-econômico do DM está associado às suas complicações, principalmente às doenças cardiovasculares. Estas podem resultar tanto da doença arterial coronariana, decorrente do aumento da aterogênese associado a fatores de risco como hipertensão, obesidade e dislipidemia, quanto de uma cardiomiopatia diabética, com disfunção ventricular independente da aterosclerose e hipertensão. A maioria dos modelos experimentais usados para estudar o diabetes e as suas complicações é induzida por mutação monogênica ou droga, sendo pouco representativos da condição em humanos. Nesse trabalho foi utilizado um modelo que alia uma predisposição genética a fatores ambientais. Camundongos C57Bl/6 machos alimentados com dieta hipergordurosa (*high-fat*) desenvolveram obesidade e DM2, com alterações metabólicas como hiperglicemia, intolerância à glicose, dislipidemia e hipoadiponectinemia. Para investigar as alterações funcionais cardíacas nesse modelo, foram realizados exames seriados de eletrocardiograma, ecocardiograma e ergometria. Camundongos submetidos à dieta hipergordurosa desenvolveram hipertrofia do ventrículo esquerdo, com espessamento das paredes septal e posterior e consequente aumento de massa ventricular e cardíaca. Cardiomiócitos hipertrofiados foram também observados neste grupo. Além da hipertrofia, foi constatada uma disfunção diastólica, com redução do volume diastólico final e aumento do tempo de enchimento rápido do ventrículo. A função sistólica foi preservada nesses animais. Tais alterações morfológicas e funcionais refletiram na redução da capacidade de exercícios nos animais.

Palavras-Chave: Diabetes tipo 2, Doenças cardiovasculares, Cardiomiopatia, Eletrocardiograma, Ecocardiograma, Ergometria

ABSTRACT

Type 2 diabetes is the most prevalent form of diabetes *mellitus*, which accounts for over 90% of cases worldwide. It results from the combination of insulin resistance and/or abnormal insulin secretion. The socioeconomic burden of the disease is caused by the associated complications, mainly cardiovascular disease. Cardiac complications associated with type 2 diabetes are due to increased coronary heart disease secondary to accelerated atherosclerosis because of associated risk factors such as hypertension, obesity, and dyslipidemia and a diabetic cardiomyopathy producing abnormalities in ventricular function in the absence of coronary heart disease or hypertension. Most experimental models of type 2 diabetes are chemically induced or genetically derived. Here, a model that combines genetic background and environmental factors was used. Male C57Bl/6 mice were fed a high-fat diet and developed obesity and type 2 diabetes, with hyperglycemia, glucose intolerance, dyslipidemia and hypoadiponectinemia. In order to investigate the cardiovascular complications in this model sequential electrocardiogram, echocardiogram and ergometry exams were performed. High-fat fed mice developed left ventricular hypertrophy, with septal and posterior wall thickening and increased ventricular mass. Cardiomyocyte hypertrophy also was observed. Left ventricular diastolic function was compromised in animals fed the *high-fat* diet, showing reduced E wave and end diastolic volume. These morphological and functional changes resulted in reduced exercise performance of the *high-fat* group.

Keywords: Type 2 diabetes, Cardiovascular disease, Cardiomyopathy, Electrocardiogram, Echocardiogram and Ergometry

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Componentes da doença cardíaca no diabetes e seus 22 principais fatores de risco.
- Figura 2** Alterações metabólicas no coração diabético e algumas 29 conseqüências que alteram o funcionamento cardíaco.
- Figura 3** Representação do delineamento experimental utilizado. 37
- Figura 4** Aumento de peso nos camundongos do grupo *high-fat* 45 durante período de indução.
- Figura 5** Camundongos dos grupos *high-fat* e *low-fat* após 8 e 10 46 meses de indução.
- Figura 6** Glicemia de jejum nos camundongos do grupo *high-fat* 46 durante período de indução.
- Figura 7** Glicemia de jejum nos camundongos do grupo *high-fat* 48 durante período de indução.
- Figura 8** Traçado eletrocardiográfico dos animais no 8º mês de 49 indução.
- Figura 9** Estudo eletrocardiográfico dos grupos HF e LF. 50
- Figura 10** Análise ecocardiográfica dos grupos ao longo do período de 52 indução.
- Figura 11** Imagem de ecocardiografia dos animais no 8º mês de 53 indução.
- Figura 12** Análise ecocardiográfica dos grupos ao longo do período de 55 indução.
- Figura 13** Análise ergométrica dos animais durante o período de 56 indução com as dietas.
- Figura 14** Medições de glicemia pré e pós teste ergométrico após 8 57 meses de indução.
- Figura 15** Peso dos corações dos grupos *high-fat* e *low-fat* após 8 e 10 58 meses de indução.
- Figura 16** Parâmetros bioquímicos do soro dos camundongos nos 59 períodos de 8 e 10 meses de indução.
- Figura 17** Adiponectina no soro dos animais. 59

Figura 18 Análise histológica de secções de coração coradas com H&E. 61

Figura 19 Volume dos núcleos dos cardiomiócitos após 10 meses de 61 indução.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição das rações *high-fat* e *low-fat*. 37

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	Átrio direito
AE	Átrio esquerdo
AGEs	Produtos finais de glicosilação avançada (do inglês: <i>advanced glycosylation end products</i>)
AGL	Ácidos graxos livres
AMPK	Proteína cinase ativada por AMP (do inglês: <i>AMP-activated protein kinase</i>)
AmpP	Amplitude da onda P
AmpQRS	Amplitude do QRS
Ang	Angiotensina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Cardiomiopatia diabética
CEUA	Comitê de Ética de Uso de Animais
DAC	Doença arterial coronariana
DAG	Diacilglicerol
DI	Deflexão intrinsecóide
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DM1	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 1
DM2	Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
ECG	Eletrocardiograma
FC	Frequência cardíaca
GAPDH	Gliceraldeído 3-fostato desidrogenase
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês: <i>high density lipoprotein</i>)
HF	Alto teor de gordura (do inglês: <i>high-fat</i>)
IC	Insuficiência cardíaca
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
IKkβ	<i>Inibidor do fator nuclear</i> $\kappa\beta$
IL-6	Interleucina-6
IPR	Intervalo PR
IQT	Intervalo QT
IR	Receptor de insulina (do inglês: <i>Insulin receptor</i>)
IRS	Substrato do receptor de insulina (do inglês: <i>insulin receptor substrate</i>)

LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês: <i>low density lipoprotein</i>)
LF	Baixo teor de gordura (do inglês: <i>low-fat</i>)
MVO₂	Consumo de oxigênio pelo miocárdio
NAC	Neuropatia autonômica cardíaca
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização mundial da saúde
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PI 3-K	Fosfatidilinositol 3-cinase
PKC	Proteína cinase C
PPAR-α	Receptores ativados da proliferação de peroxissomos (do inglês: <i>peroxisome proliferator-activated receptor-α</i>)
RI	Resistência à insulina
ROS	Reativas de oxigênio
SN	Sistema nervoso
SBD	Sociedade brasileira de diabetes
STZ	Estreptozotocina
TNF-α	Fator de necrose tumoral- α (do inglês: <i>tumor necrosis factor-α</i>)
TTG	Teste de tolerância à glicose
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	14
2 – REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 – Diabetes Mellitus tipo 2	16
2.1.1- Resistência à insulina	17
2.1.2 – Relação entre obesidade, DM2 e resistência à insulina	19
2.2 – Diabetes e coração	20
2.3- Cardiomiopatia diabética	22
2.4 – Alterações metabólicas no coração diabético	24
2.5 – Modelos experimentais de doenças cardiovasculares associadas ao DM	29
3 – OBJETIVOS	35
3.1- Objetivo geral	35
3.2 - Objetivos Específicos	35
4- MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1- Animais	36
4.2- Delineamento experimental	36
4.3- Indução do diabetes por dieta high-fat	37
4.4- Medições de glicemia em jejum e peso corporal	38
4.5- Teste de tolerância à glicose	38
4.6- Análise funcional cardíaca	38
4.6.1- Análise eletrocardiográfica	39
4.6.2- Análise ecocardiográfica	40
4.6.3- Análise ergométrica	41
4.6- Sacrifício dos animais	42
4.7- Análise histopatológica	42
4.8- Quantificação sérica de adiponectina	43
4.9- Parâmetros bioquímicos do plasma	44
4.10- Análise estatística	44
5- RESULTADOS	45
5.1- Peso corpóreo e glicemia de jejum	45
5.2- Tolerância à glicose	47

5.3- Análise funcional cardíaca.....	48
5.3.1-Eletrocardiografia	48
5.3.2- Ecocardiografia	51
5.3.3- Ergometria	56
5.4- Peso dos corações	58
5.5- Perfil lipídico	58
5.6- Quantificação de adiponectina no soro.....	59
5.7- Análise histológica	60
6- DISCUSSÃO	62
7- CONCLUSÃO	72
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
APÊNDICE	

1 - INTRODUÇÃO

A doença cardiovascular é apontada como uma das principais causas de morbidade e mortalidade entre os pacientes diabéticos, sendo a insuficiência cardíaca (IC) um dos fatores de maior risco para elevada morbidade destes pacientes (BELL, 2003). Aterosclerose coronariana e microangiopatia, hipertensão, disfunção autonômica e anormalidades neuro-hormonais são distúrbios cardiovasculares associados ao diabetes que aumentam o risco de doença cardíaca e infarto nestes pacientes (GRUNDY *et al.*, 1999). Inúmeros fatores de risco para doenças cardiovasculares, como obesidade, hipertensão e dislipidemia, também estão associados ao diabetes. Portanto, identificar a causa específica da doença cardíaca é difícil (KHAVANDI *et al.*, 2009), mas o diabetes em si representa um fator de risco independente (GRUNDY *et al.*, 1999).

A doença arterial coronariana (DAC) é considerada a principal causa da IC em pacientes diabéticos, porém as alterações metabólicas do diabetes *mellitus* (DM) podem afetar diretamente o miocárdio gerando alterações morfológicas e funcionais. Essa entidade é conhecida como cardiomiopatia diabética, caracterizada por hipertrofia, disfunção diastólica e/ou sistólica e ocorre independente de DAC ou hipertensão. Sua prevalência pode ser acima de 60% em pacientes com diabetes tipo 2 bem controlados (FEIN, 1990; NICOLINO *et al.*, 1995; SCHANNWELL *et al.*, 2002; BELL, 2003; DI BONITO *et al.*, 2005).

As alterações metabólicas do diabetes e as suas complicações, inclusive as manifestações cardíacas, têm sido estudadas em uma variedade de modelos animais. A utilização desses modelos é fundamental na elucidação de mecanismos patogênicos e na busca por novas alternativas terapêuticas. Entretanto, a maioria dos estudos experimentais é realizada em animais transgênicos (BAROUCH *et al.*, 2003; CARLEY *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2006) ou com diabetes quimicamente induzida (FINCK *et al.*, 2002; NIELSEN *et al.*, 2002; SUAREZ *et al.*, 2008). O estudo do fenótipo cardíaco desses animais oferece informações valiosas, mas não refletem a natureza multifatorial do DM. Além disso, podem apresentar outros efeitos associados à mutação ou droga utilizada para induzir a doença (BUGGER & ABEL, 2009). A utilização de

um modelo que se aproxime mais da condição da maioria dos pacientes diabéticos é, portanto, de grande relevância.

Obesidade e diabetes podem ser induzidos por dieta em roedores. Quando alimentados com ração hipergordurosa, camundongos C57Bl/6 machos desenvolvem obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), apresentando alterações metabólicas como hiperinsulinemia, resistência à insulina, intolerância a glicose, hiperglicemia de jejum e dislipidemia (SURWIT *et al.*, 1995; PAREKH *et al.*, 1998; PETRO *et al.*, 2004; SYMONS *et al.*, 2009). Nesse sentido, o camundongo C57Bl/6 alimentado com ração hipergordurosa constitui um modelo representativo para o estudo do DM2, associando uma suscetibilidade genética a fatores ambientais. Os dados da literatura acerca das alterações cardíacas nesse modelo ainda são escassos e não há estudos correlacionando a avaliação da função cardíaca por diferentes metodologias, sendo assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os distúrbios cardíacos decorrentes do DM2 induzido por dieta hipergordurosa em camundongos C57Bl/6. Para tal, a função cardíaca e alterações estruturais foram avaliadas em um estudo longitudinal.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Diabetes *mellitus* tipo 2

O diabetes *mellitus* é um grupo de doenças metabólicas, caracterizado por hiperglicemia crônica, cuja incidência está crescendo em todo o mundo (TUOMILEHTO *et al.*, 2001) e já atinge proporções epidêmicas (ZIMMET *et al.*, 2001). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que existam mais de 180 milhões de diabéticos no mundo, valor que pode dobrar até 2030. Em 2005, foram registrados cerca 1.1 milhões de mortes por diabetes e 2.9 milhões onde a doença contribuiu para o óbito (World Health Organization - WHO, 2006).

Alterações micro e macrovasculares características do DM podem acarretar danos ao sistema cardiovascular e nervoso, aos olhos, rins e fígado (WILD *et al.*, 2006), em consequência do aumento de aterogênese (STUMVOLL *et al.*, 2005). Essas alterações trazem consequências graves, comprometendo a qualidade e expectativa de vida do paciente (MALECKI, 2005). O ônus sócio-econômico da doença está principalmente associado aos comprometimentos consequentes do diabetes, representando elevados gastos aos sistemas de saúde (STUMVOLL *et al.*, 2005).

As doenças cardiovasculares são as complicações mais comuns do DM (GRUNDY *et al.*, 1999). O mau prognóstico dessas doenças provavelmente está associado também a outro comprometimento do DM, a neuropatia autonômica cardíaca (NAC) (POP-BUSUI *et al.*, 2004; SCHMID, 2007). As neuropatias diabéticas, incluindo a NAC, acometem cerca de 50% dos pacientes e afetam o sistema nervoso somático e autonômico (SCHMID, 2007).

O DM é classificado de acordo com a sua patogênese, sendo os tipos 1 e 2 as formas prevalentes (GALINDO *et al.*, 2006). O DM2 é responsável por cerca de 90% da prevalência da doença (MALECKI, 2005) e apresenta dois componentes: a resistência periférica à insulina e a deficiência relativa na sua secreção (ZIMMET *et al.*, 2001).

O DM tipo 2 tem expressão fenotípica variável. Na maioria dos casos, o paciente apresenta ambos os componentes em graus variados, refletindo a natureza multifatorial da doença (LEITE, 2006). A doença tem uma evolução lenta e gradual com sintomas inicialmente leves, de forma que cursa durante anos sem o devido diagnóstico. Este freqüentemente é dado após os 40 anos de idade (GALINDO *et al.*, 2006).

O DM2 resulta da interação entre predisposição genética e fatores de risco ambientais e comportamentais. A influência dos fatores ambientais é tamanha que o DM2 é considerado uma doença do estilo de vida moderno dos países ocidentais (AGUIAR & SILVA, 2006). A globalização foi acompanhada por mudanças de comportamento e modo de vida de seres humanos. O sedentarismo, a alimentação inadequada e o envelhecimento populacional acentuaram os casos de obesidade e diabetes (ZIMMET *et al.*, 2001).

A obesidade é um fator de risco significativo para o desenvolvimento do DM2, que gera impacto negativo sobre a sua progressão e tratamento (CORNIER, 2005), havendo um aumento da morbi-mortalidade entre pacientes obesos com diabetes (LIVINGSTON & KO, 2005). Estima-se que cerca de 80% dos casos dessa doença podem ser relacionados à obesidade (HU *et al.*, 2001). A relação entre a obesidade e o DM2 é a resistência à insulina, envolvendo mecanismos mediados por citocinas pró-inflamatórias, adipocinas e ácidos graxos livres (AGL).

2.1.1- Resistência à insulina

A resistência à insulina (RI) é a redução da capacidade de resposta dos tecidos alvos aos efeitos deste hormônio, como supressão da produção de glicose no fígado e da utilização da glicose pelo músculo esquelético, tecido adiposo e músculo cardíaco. Assim, a insulina não reduz o nível plasmático de glicose, acarretando uma hiperglicemia (FUJIMOTO, 2000). Alterações em diversos pontos da via de sinalização celular da insulina são responsáveis pelo quadro de resistência. Dentre eles, destaca-se a redução da concentração e da atividade cinase do seu receptor (*insulin receptor* - IR) e conseqüente redução de concentração e fosforilação do substrato do receptor (*insulin receptor*

substrate - IRS-1 e 2), da translocação de transportadores de glicose e da atividade das enzimas intracelulares (CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

No músculo cardíaco e esquelético, o passo mais importante da cascata de sinalização da insulina, é a translocação da proteína transportadora sensível à insulina GLUT4 do compartimento intracelular ao sarcolema (CZECH & CORVERA, 1999). A participação das proteínas cinases PI3-K (fostatidilinositol 3-cinase), Akt e isoformas atípicas da PKC (proteína cinase C) são fundamentais nesse processo (ZENG *et al.*, 2000).

A via de sinalização da insulina se inicia com a sua ligação ao receptor específico de membrana, levando à sua ativação. Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em múltiplos resíduos de tirosina, criando sítios de reconhecimento para moléculas com homologia a Src2 (SH2). Dentre essas moléculas, destaca-se a PI3-K, importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulado pela insulina. Atualmente, a PI3-K é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose. As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da PKC (KHAN, 2000; CARVALHEIRA *et al.*, 2002).

Esta cascata de sinalização é desencadeada, com reações de fosforilação e desfosforilação de moléculas como a Akt e isoformas atípicas de PKC, resultando nos efeitos metabólicos e mitogênicos da insulina (CARVALHEIRA *et al.*, 2002). No entanto, a depender de fatores externos (obesidade, adipocinas) o substrato do receptor de insulina pode ser também fosforilado em resíduos de serina/treonina. Tal fosforilação gera a ubiquitinação e degradação desse substrato, atenuando a transmissão do sinal. Estas fosforilações inibitórias causam retroalimentação negativa na sinalização insulínica e podem provocar a resistência à insulina. Os mecanismos que causam a fosforilação em serina são considerados multifatoriais e não são bem elucidados (RHODES, 2005). Fatores relacionados à obesidade participam desse processo, como os ácidos graxos livres (SHULMAN, 2000), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1996) e outras citocinas pró-inflamatórias, com conseqüente ativação do inibidor do fator nuclear $\kappa\beta$ (I $\kappa\kappa\beta$) (YUAN *et al.*, 2001).

2.1.2 – Relação entre obesidade, DM2 e resistência à insulina

Na última década, inúmeros trabalhos vêm associando a resistência à insulina e o diabetes a uma inflamação crônica no tecido adiposo. Esta é caracterizada por infiltrados de macrófagos no tecido adiposo e uma produção anormal de adipocinas e citocinas e ativação de cascatas de sinalização inflamatória (WELLEN & HOTAMISLIGIL, 2005; CHANDALIA & ABATE, 2007). Os macrófagos do infiltrado respondem por uma parte da produção de resistina e citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a interleucina-6 (IL-6), enquanto a leptina e a adiponectina são produzidos exclusivamente por adipócitos (SHOELSON *et al.*, 2006). Weisberg e colaboradores (2003) atribuem aos macrófagos no tecido adiposo quase toda a expressão das citocinas citadas.

O TNF- α age diretamente no adipócito regulando o acúmulo de gordura e interferido em processos dependentes da insulina, como a homeostase glicêmica e metabolismo de lipídios, inibindo lipogênese e induzindo lipólise (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Camundongos e humanos obesos, resistentes à insulina e diabéticos apresentam elevados níveis de TNF- α circulantes (ZECCHIN & SAAD, 2006). A curto prazo, essa citocina parece ativar proteínas cinases que reduzem a fosforilação do IRS em resíduos de tirosina. O efeito tardio da citocina seria a supressão de transportadores de glicose e a redução dos receptores de insulina (FEINSTEIN *et al.*, 1993).

O tecido adiposo atua como órgão endócrino, liberando hormônios em resposta a alterações metabólicas, as adipocinas. A leptina é um deles, responsável pela sensação de saciedade, está elevada nos pacientes obesos, indicando uma provável resistência a esse hormônio (ZECCHIN & SAAD, 2006). Outro hormônio, a adiponectina, reduz com a progressão do DM2 e parece estar relacionado à redução da resistência à insulina e a efeitos antiinflamatórios, antiateroscleróticos e protetor do endotélio (MATOS *et al.*, 2006). Em humanos, a redução dos níveis de adiponectina está diretamente relacionado à hipertensão (IWASHIMA *et al.*, 2004), resistência à insulina e hiperinsulinemia (WEYER *et al.*, 2001) e síndrome metabólica e hiperlipidemia (MOHAN *et al.*, 2005). A resistina foi a última adipocina a ser descoberta. Seus efeitos ainda não são bem compreendidos, mas estudos sugerem que é o

regulador negativo da insulina, reduzindo a tolerância à glicose e a sensibilidade a esse hormônio (ZECCHIN & SAAD, 2006).

Ácidos graxos livres também fazem a ligação entre obesidade e resistência à insulina. Os AGL circulantes são provenientes da lipólise e estão elevados em muitos estados de resistência à insulina. Nessa situação ocorre o acúmulo de triglicérides e metabólitos derivados de ácidos graxos no músculo e fígado, inibindo a captação e oxidação da glicose, a síntese de glicogênio e estimulando gliconeogênese hepática. Os elevados níveis de AGL circulantes também estão associados à redução da fosforilação do IRS-1 em tirosina e da sua associação com a PI3-K (MAITRA & ABBAS, 2005; ZECCHIN & SAAD, 2006). Adipócitos da gordura abdominal visceral são maiores e acumulam mais triglicérides, do que a gordura subcutânea. Assim, eles liberam mais ácidos graxos e acentuam a resistência à insulina (MATOS *et al.*, 2006).

A obesidade não está apenas associada ao aumento do risco de desenvolver diabetes, mas também com o aumento da prevalência de outros fatores de risco cardiovasculares. Pacientes obesos e com diabetes apresentam mais hipertensão arterial e dislipidemia quando comparados a pacientes diabéticos não obesos (ANDERSON *et al.*, 2003; ROGERS *et al.*, 2003).

2.2 – Diabetes e coração

As complicações cardiovasculares em pacientes diabéticos são consideradas uma das principais causas de morbi-mortalidade nestes pacientes (SHARMA & MCNEILL, 2006), sendo responsável por cerca de 80% dos óbitos de pacientes diabéticos (HAYAT *et al.*, 2004).

A causa central da IC nos diabéticos é a DAC associada à aterosclerose e/ou hipertensão (SOWERS *et al.*, 2001). A prevalência de IC está aumentada em pacientes diabéticos, sendo de 1 a 4% na população geral, e 12% entre os diabéticos (THRAINSDOTTIR *et al.*, 2005). Esse valor aumenta para 22% nos pacientes diabéticos com mais de 64 anos (BERTONI *et al.*, 2004). Após o

desenvolvimento da IC, pacientes diabéticos apresentam maior mortalidade e morbidade relacionada à mesma (HAFFNER *et al.*, 1998).

Diversos fatores de risco atribuídos ao desenvolvimento da DM2 são também citados como de risco para doenças cardiovasculares. Estes incluem obesidade, hiperinsulinemia, dislipidemia, sexo, dentre outros (ONAT *et al.*, 2005). Isso porque a hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina alteram a função endotelial, promovendo a aterogênese através da vasoconstrição, inflamação e trombose (BECKMAN *et al.*, 2002). Quando associados à idade e à pressão sanguínea, esses fatores aumentam o risco de desenvolver falência cardíaca nesses pacientes (HO *et al.*, 1993).

A dislipidemia representa um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares. Em pacientes diabéticos, a influência da dislipidemia no desenvolvimento desses distúrbios é ainda maior do que nos demais (LEHTO *et al.*, 1997). As alterações lipídicas mais frequentes na população diabética são hipertrigliceridemia, colesterol HDL baixo e alterações qualitativas nas lipoproteínas, tais como a formação de partículas de colesterol LDL pequenas e densas (Sociedade Brasileira de Diabetes - SBD, 2002).

Além dos fatores citados, o diabetes *per se* é um fator de risco independente para o desenvolvimento de doença cardiovascular. Muitos deles são observados em indivíduos obesos, o que poderia dificultar a identificação da causa da cardiopatia, ou seja, determinar se o desenvolvimento da cardiopatia é devido ao diabetes ou à obesidade. Contudo, fatores como a hiperglicemia e o metabolismo cardíaco sustentado nos ácidos graxos como fonte de energia são únicos ao estado diabético (CHATHAM & FORDER, 1997). A hiperglicemia de jejum, a despeito de níveis elevados de insulina e da intolerância à glicose, que podem coexistir ou ocorrer de forma independente, é considerada um fator de risco não só para o desenvolvimento do diabetes, mas também para as doenças cardíacas (MOLLER & FLIER, 1991).

De fato, o aumento do risco de IC persiste independente de ajustes para idade, hipertensão arterial, peso, hipercolesterolemia ou doença arterial coronariana (HO *et al.*, 1993). Deste modo, percebe-se que há um mecanismo potencial próprio do diabetes que causa a lesão miocárdica. Esta entidade é a cardiomiopatia diabética. Tais anormalidades podem aumentar a predisposição à IC em pacientes diabéticos assintomáticos quando estes desenvolvem

hipertensão ou doença isquêmica cardíaca, particularmente após o infarto do miocárdio (AN & RODRIGUES, 2006). A figura 1 apresenta os diferentes componentes da doença cardíaca no diabetes.

Figura 1

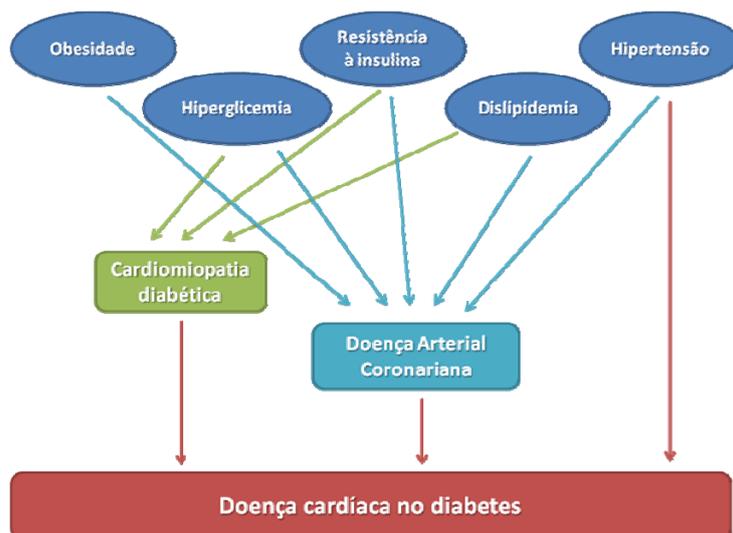


Figura 1. Componentes da doença cardíaca no diabetes e seus principais fatores de risco.

2.3- Cardiomiopatia diabética

A estreita associação entre diabetes, obesidade, hipertensão e/ou doença cardíaca isquêmica, que podem causar disfunção diastólica, torna difícil atribuir a IC apenas à condição diabética (BELL, 1995). Entretanto, pacientes com diabetes tipo 1 ou 2 têm sido diagnosticados com disfunção diastólica e hipertrofia do ventrículo esquerdo (VE) na ausência de DAC e hipertensão, ou IC de outra etiologia (FRANCIS, 2001; BERTONI *et al.*, 2003; BOYER *et al.*, 2004).

Nas últimas décadas, tem se acumulado resultados de estudos experimentais, epidemiológicos e clínicos indicando que as alterações metabólicas do DM podem, de fato, acarretar alterações estruturais e funcionais no coração independente de doença coronariana ou hipertensão (FANG *et al.*, 2004). Para essa condição, em 1972 foi criado o termo

cardiomiopatia diabética (CD) por Rubler e colaboradores, após descrever quatro pacientes diabéticos com falência cardíaca congestiva e artérias coronarianas normais. Observaram-se, nestes pacientes diabéticos, fibrose, remodelamento cardíaco e sinais de insuficiência cardíaca congestiva.

Alterações estruturais nos cardiomiócitos decorrentes do diabetes podem acarretar hipertrofia do VE e disfunção diastólica e/ou sistólica tardia (HAYAT *et al.*, 2004). A manifestação da CD habitualmente caracteriza-se por dispnéia devido à congestão pulmonar decorrente da disfunção diastólica. Posteriormente, com o avanço da doença, pode ocorrer comprometimento do desempenho sistólico agravando o quadro de insuficiência cardíaca. Os sinais e sintomas de IC, assim como a forma clínica de cardiomiopatia dilatada com IC global, não são comuns na cardiomiopatia diabética (OKOSHI *et al.*, 2007).

A disfunção ventricular, em geral a disfunção diastólica, não atribuída à doença coronariana e/ou hipertensão é a principal alteração da cardiomiopatia descrita em pacientes diabéticos (REGAN *et al.*, 1977; FEIN, 1990). A sua prevalência é extremamente elevada, atingindo cerca de 40 a 60% dos pacientes diabéticos (POIRIER *et al.*, 2001). Tardiamente, na evolução do quadro, o comprometimento cardíaco decorrente da CD pode ser agravado pela ação sinérgica da hipertensão e isquemia (KHAVANDI *et al.*, 2009).

O comprometimento da função cardíaca é devido à redução da complacência e da contratilidade cardíaca. A redução da complacência em diabéticos parece ser decorrente da hipertrofia celular, fibrose, deposição de glicogênio no subendocárdio e de colágeno (CHATHAM & FORDER, 1997), além da glicação de outras proteínas intersticiais associada à hiperglicemia (AVENDANO *et al.*, 1999). Contudo, os mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento da CD ainda não são bem elucidados. As complexas alterações moleculares e celulares sugerem sua origem multifatorial e dificultam a elucidação de sua patogênese.

2.4 – Alterações metabólicas no coração diabético

A cardiomiopatia diabética resulta da relação entre anormalidades metabólicas que acompanham o diabetes e suas conseqüências celulares e moleculares (POORNIMA *et al.*, 2006). Os três distúrbios metabólicos característicos do diabetes são: hiperlipidemia, hiperinsulinemia e hiperglicemia. O aumento sérico de lípidos, insulina e glicose induz alterações na ativação de fatores de transcrição celular dos cardiomiócitos, que resultam em modificações na expressão gênica e na utilização de substratos, crescimento do miocárdio, disfunção endotelial e aumento da rigidez miocárdica (HAYAT *et al.*, 2004).

As alterações no metabolismo do miocárdio observadas no DM2 são as principais responsáveis pelo desenvolvimento da CD. O aumento de AGL e triglicérides e a alteração na produção de adipocinas modula o metabolismo de diversos órgãos, inclusive do coração. Tais alterações contribuem para desregular o metabolismo cardíaco de lipídios, a resistência miocárdica à insulina e para o desenvolvimento de alterações morfológicas e funcionais (DOBRIN & LEBECHE, 2010). Sendo assim, a compreensão dos efeitos dos distúrbios metabólicos no cardiomiócito pode ajudar a prever as alterações estruturais e funcionais no coração diabético, bem como avaliar possíveis intervenções terapêuticas.

O músculo cardíaco tem uma alta demanda energética. Sob condições fisiológicas, o coração utiliza múltiplos substratos como fonte energética, incluindo ácidos graxos, carboidratos, aminoácidos e cetonas. Entre os substratos, ácidos graxos e carboidratos são as principais fontes. Em um coração adulto sadio, aproximadamente 70% do ATP gerado é proveniente da oxidação de ácidos graxos, enquanto que glicose e lactato seriam responsáveis por aproximadamente 30% (AN & RODRIGUES, 2006). Normalmente o coração utiliza, portanto, os ácidos graxos como sua fonte primária de energia durante a perfusão aeróbica e cargas de trabalho normais, dependendo da glicólise e oxidação do piruvato durante os períodos de isquemia e aumento de trabalho (NESTO, 2005).

O comprometimento da utilização da glicose devido à resistência à insulina e a maior disponibilidade de AGL alteram o perfil de uso de substrato energético do miocárdio. O coração diabético depende quase que completamente da oxidação de ácidos graxos, reduzindo a utilização da glicose e do lactato (BOUDINA & ABEL, 2007). Este desvio de substrato energético do miocárdio é essencial para a adaptação do coração à sobrecarga, mas também apresenta consequências deletérias. Os ácidos graxos são considerados substratos energéticos ineficientes, o aumento da sua utilização pelo coração diabético é freqüentemente acompanhado por um aumento no consumo de oxigênio pelo miocárdio (MVO_2) e redução da eficiência cardíaca em modelo animal (MAZUMDER *et al.*, 2004; HOW *et al.*, 2006) e em pacientes com diabetes tipo 1 (PETERSON *et al.*, 2008) e 2 (PETERSON *et al.*, 2004).

Em um cardiomiócito normal, ácidos graxos atendem a diversas funções essenciais, como fonte de energia, mediadores de transdução de sinal, ligadores para fatores de transcrição e componentes das membranas (AN & RODRIGUES, 2006). A elevação do nível celular de ácidos graxos acarreta um aumento de expressão das proteínas envolvidas na sua oxidação através da ativação do fator de transcrição PPAR α (*peroxisome proliferator-activated receptor α*). O PPAR- α antagoniza a ação da insulina, reduzindo a entrada de glicose na célula e inibindo a glicólise e oxidação mitocondrial do piruvato, favorecendo a oxidação dos ácidos graxos (LOPASCHUK *et al.*, 2007).

Além disso, quando a entrada de ácidos graxos na mitocôndria é maior do que a sua oxidação, há o acúmulo de acetil-CoA, que é utilizado na síntese de diacilglicerol (DAG) e ceramida. O DAG é um ativador de PKC, que participa da resistência à insulina e a ceramida pode iniciar apoptose e disfunção cardíaca (YOUNG *et al.*, 2002). O aumento da absorção e metabolismo de ácidos graxos não acarreta apenas um acúmulo dos seus intermediários e triglicérides, como também aumenta a demanda de oxigênio e geração de espécies reativas de oxigênio, danificando o coração (AN & RODRIGUES, 2006).

Estas alterações metabólicas do coração diabético podem alterar a homeostase do cálcio, contribuindo ainda mais para o desenvolvimento da cardiomiopatia. O aumento intracelular dos ácidos graxos livres pode alterar diretamente, e indiretamente, a contratilidade miocárdica por meio do

encurtamento do potencial de ação e alteração do trânsito intracelular de cálcio (OKOSHI *et al.*, 2007), culminando no retardo do relaxamento durante a diástole e redução na função cardíaca (AN & RODRIGUES *et al.*, 2006).

A hiperglicemia promove efeitos danosos ao coração por uma série de mecanismos. Dentre estes, destaca-se a manutenção da captação da glicose no coração diabético em níveis próximos ao coração normal apesar da redução na expressão do transportador de glicose (STANLEY *et al.*, 1997). Como a glicose que entra no cardiomiócito não é totalmente degradada, seus metabólitos se acumulam (YOUNG *et al.*, 2002) devido à redução da glicólise e da oxidação do piruvato. Conseqüentemente, a glicose é desviada para a via da hexosamina, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e formação de produtos de glicosilação avançada (AGEs) (DOBRIN & LEBECHE, 2010).

O aumento de ROS acarreta uma inflamação no miocárdio e disfunção endotelial através da PARP [Poli (ADP-ribose) polimerase] (HAYAT *et al.*, 2004). Esta enzima inibe a gliceraldeído 3-fostato desidrogenase (GAPDH), o que leva ao acúmulo de intermediários glicolíticos, o que acarreta lesão tecidual via formação de AGEs e ativação de PKC (DU *et al.*, 2003).

Os AGEs acumulam-se nos tecidos expostos à hiperglicemia e parecem contribuir para as modificações morfológicas que ocorrem no coração diabético. O acúmulo de matriz extracelular modificada pelos AGEs resulta em uma inelasticidade de parede celular e poderia interferir na função cardíaca (NESTO, 2005). Os AGEs também parecem inativar proteínas transportadoras de Ca^{2+} , interferindo no trânsito intracelular desse íon no cardiomiócito (BIDASEE *et al.*, 2004). Outro mecanismo pelo qual a hiperglicemia pode alterar a função dessas proteínas transportadoras é através da atividade aumentada da PKC, levando a sua fosforilação (BRAZ *et al.*, 2004). A redução da atividade dessas proteínas envolvidas no transporte intracelular do cálcio pode levar, portanto, ao comprometimento das funções sistólica e diastólica. As alterações metabólicas no coração diabético estão representadas na figura 2.

A inibição da utilização da glicose pelo cardiomiócito se torna mais problemática em situação de hipóxia ou isquemia, quando a sua oxidação é preferencial devido à melhor eficiência energética. De fato, o coração normal passa a utilizar a glicose como principal fonte de energia em momento de

estresse. O coração diabético é incapaz de promover essa troca, se tornando mais suscetível ao dano isquêmico (DOBRIN & LEBECHE, 2010). Além disso, tanto a hiperglicemia quanto a dislipidemia contribuem para a disfunção endotelial. As implicações clínicas dessa disfunção não estão apenas associadas à aterosclerose, já que células endoteliais ajudam na formação de circulação colateral. Em pacientes diabéticos, ela está reduzida, o que pode ajudar a explicar o aumento da extensão de infartos e insuficiência cardíaca congestiva (ICC) após o infarto nesses pacientes (HAYAT *et al.*, 2004).

A associação entre a hiperglicemia e a disfunção cardíaca pode ser demonstrada pela correlação entre gravidade da função diastólica e níveis de hemoglobina glicada (IRIBARREN *et al.*, 2001), provavelmente através da formação de ROS induzida por AGEs (AVENDANDO *et al.*, 1999) que resulta em deposição de colágeno e fibrose no miocárdio (YOUNG *et al.*, 2002).

O metabolismo cardíaco também sofre influência das adipocinas secretadas pelo tecido adiposo, dentre as quais, a leptina e a adiponectina merecem destaque. Até pouco tempo, se considerava que a leptina exercia apenas efeitos negativos no coração. Atualmente, porém, se sabe que essa adipocina tem efeitos mais variados do que se esperava, alguns até cardioprotetores. A consequência primária da leptina no coração é inotropia negativa mediada por NO endógeno (NICKOLA *et al.*, 2000). A leptina também exerce efeitos pró-hipertróficos em cardiomiócitos, em parte via uma resposta autócrina ou parácrina ao estímulo de endotelina-1 e angiotensina (Ang) II (RAJAPUROHITAM *et al.*, 2006).

Outra adipocina, a adiponectina, é sintetizada e secretada não apenas pelo tecido adiposo, mas também por cardiomiócitos. Esse hormônio aumenta a captação de glicose e ácidos graxos, podendo exercer funções importantes no metabolismo cardíaco (PINEIRO *et al.*, 2005). Estudos indicam que a adiponectina pode acelerar a oxidação dos ácidos graxos no coração, levando à ativação de AMPK e sua cascata de sinalização (SHIBATA *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2007). Em humanos, há uma correlação entre a redução dos níveis de adiponectina e o aumento do risco de infarto do miocárdio (PISCHON *et al.*, 2004), DAC (SCHULZE *et al.*, 2005) e IC (TAKANO *et al.*, 2009).

A adiponectina apresenta propriedades antiinflamatórias que podem conferir proteção ao endotélio, ao coração e às alterações metabólicas (OUCHI

& WALSH, 2007). Ela parece desempenhar um importante papel cardioprotetor em doenças cardíacas, como hipertrofia do VE e lesões de isquemia-reperfusão. Camundongos *knockout* para adiponectina apresentaram hipertrofia concêntrica de VE mais acentuada e mortalidade quando induzida sobrecarga de pressão após contração da aorta transversa. A suplementação de adiponectina mediada por adenovírus atenuou a hipertrofia nesses animais (SHIBATA *et al.*, 2004).

O efeito cardioprotetor da adiponectina é evidenciado também em estudos clínicos. Uma pesquisa recente aponta para uma relação inversa entre o nível plasmático de adiponectina e o índice de massa corpórea e parâmetros ecocardiográficos de hipertrofia cardíaca e disfunção diastólica (KITAOKA *et al.*, 2010). De fato, a hipoadiponectinemia parece ser um biomarcador de obesidade, DM, dislipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares subseqüentes (GIANNESI *et al.*, 2007; CHANG *et al.*, 2009).

Outro aspecto de relevância nas alterações no miocárdio diabético é a participação da insulina. A existência de uma resistência do miocárdio à insulina e dos seus efeitos na CD é um assunto bastante controverso e pouco elucidado. Alguns autores argumentam que existem tecidos que são responsivos à insulina mesmo em casos de RI e que este seria o caso do miocárdio. Então, o coração de pacientes diabéticos tipo 2 responderia normalmente ao hormônio, sugerindo que a resistência miocárdica à insulina não é uma característica comum do DM2 (UTRIAINEN *et al.*, 1998; JAGASIA *et al.*, 2001). Segundo este raciocínio, a hiperinsulinemia pode contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia do VE talvez pela ativação insulínica da síntese protéica cardíaca ou inibição da degradação protéica (ILERCIL *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2007).

Por outro lado, existem trabalhos que evidenciam a existência de uma resistência miocárdica à insulina. Nesse sentido, é proposto que é a própria RI do miocárdio que pode levar à disfunção cardíaca e contribuir para a IC (MAZUMDER *et al.*, 2004; PETERSON *et al.*, 2004; BUCHANAN *et al.*, 2005; SHARMA *et al.*, 2007). No momento, não se sabe ao certo se é o elevado nível plasmático de insulina ou a resistência sistêmica à insulina que contribui para a hipertrofia e/ou disfunção e remodelamento ventricular (LAPASCHUK *et al.*, 2007).

Outro mecanismo pelo qual o diabetes pode comprometer o coração é através da neuropatia autonômica cardíaca. A NAC está associada a um aumento do tônus simpático que pode alterar o metabolismo do miocárdio e gerar desacoplamento mitocondrial (DRAKE-HOLLAND *et al.*, 2001), em último caso acarretando as alterações funcionais características da CD (POP-BUSUI *et al.*, 2004).

Figura 2

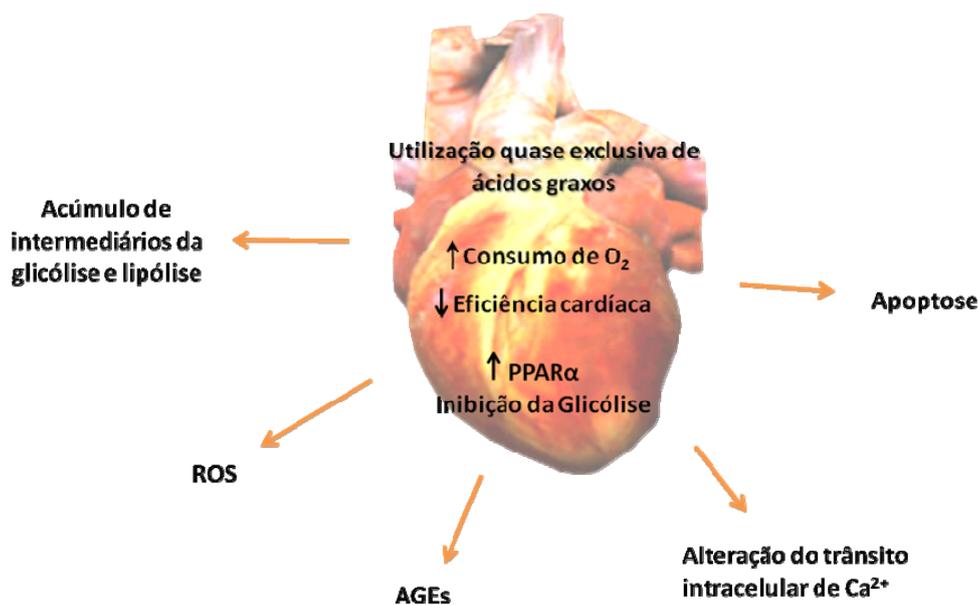


Figura 2. Alterações metabólicas no coração diabético e algumas conseqüências que alteram o funcionamento cardíaco.

2.5 – Modelos experimentais de doenças cardiovasculares associadas ao DM

Modelos experimentais de diabetes tipo 1 e tipo 2 apresentam manifestações cardíacas semelhantes. Ambos são caracterizados pelo aumento da oxidação de ácidos graxos e redução da utilização de glicose, alterações no fluxo de cálcio, comprometimento mitocondrial e aumento de tecido conectivo no coração. Sendo assim, conclusões tiradas de ambos os modelos têm sido relacionadas e utilizadas na compreensão da fisiopatologia da CD (BUGGER & ABEL, 2009). Entretanto, o aumento na produção de ROS pela mitocôndria e o desacoplamento mitocondrial induzido por ácidos graxos

ocorrem em modelo de DM2, mas não são observados em modelos de DM1 (BOUDINA & ABEL, 2007; BUGGER & ABEL, 2008). Além disso, modelos de DM1 apresentam aumento da apoptose no miocárdio e dilatação, enquanto os de DM2 tendem à hipertrofia (POORNIMA *et al.*, 2006).

Um dos modelos de DM1 mais utilizados é o quimicamente induzido pela estreptozotocina (STZ). O tratamento com a STZ é tóxico para as células β , acarretando necrose e consequente deficiência na produção de insulina (CHOI *et al.*, 2003). Roedores tratados com múltiplas e baixas doses de STZ desenvolvem hiperglicemia, dislipidemia, e redução progressiva dos níveis de insulina (ISLAS-ANDRADE *et al.*, 2000). Estudos de CD em modelo induzido por STZ relatam disfunção diastólica e sistólica, cuja gravidade aumenta com a duração do DM. São observadas a redução na fração de encurtamento (NIELSEN *et al.*, 2002; SUAREZ *et al.*, 2004), aumento da pressão diastólica (KAJSTURA *et al.*, 2001) e alteração do fluxo da mitral (LACOMBE *et al.*, 2007). O metabolismo do miocárdio também está alterado em animais com diabetes induzida por STZ, com aumento da oxidação de ácidos graxos e redução da glicólise e fosforilação oxidativa (DEPRE *et al.*, 2000; FINCK *et al.*, 2002), acarretando um maior consumo de O_2 e redução da eficiência energética (HOW *et al.*, 2006). Além disso, ocorre estresse oxidativo, aumento de apoptose (SINGH *et al.*, 2008) e alteração no transporte intracelular de cálcio (SUAREZ *et al.*, 2008).

O modelo da STZ é amplamente utilizado no estudo da DM, mas a maioria do conhecimento a cerca dos mecanismos da CD foi obtido a partir de animais geneticamente modificados com obesidade, resistência à insulina e/ou diabetes, que mimetizam mecanismos fisiopatológicos discretos, comumente observados na CD. A deleção ou a superexpressão de genes específicos são estratégias usadas para aumentar a CD ou mimetizar alguma de suas características (BUGGER & ABEL, 2009).

Um desses modelos é o camundongo OVE26, que superexpressa a calmodulina nas células β pancreáticas, acarretando uma DM1 precoce e grave por mecanismos não muito elucidados. Camundongos OVE26 apresentam um aumento dos níveis séricos de glicose e triglicérides e redução da insulina (LIANG *et al.*, 2002). Nesse modelo, a contratilidade de cardiomiócitos isolados está comprometida, mas seus efeitos no coração não são tão significativos

(LIANG *et al.*, 2002; SONG *et al.*, 2007). São observadas alterações ultraestruturais nas mitocôndrias, bem como aumento da produção de superóxido, acarretando estresse oxidativo (SHEN *et al.*, 2004). A alteração no trânsito intracelular dos íons de cálcio (Ca^{2+}) também está alterada em camundongos OVE26 (YE *et al.*, 2004).

Outro modelo de DM1 com animal geneticamente modificado é o camundongo Akita. Uma mutação dominante no gene insulina 2 impede o dobramento correto da proteína, acarretando estresse do retículo endoplasmático e consequente apoptose das células β (RON, 2002). O camundongo Akita apresenta hiperglicemia e hipertrigliceridemia (BUGGER *et al.*, 2008b) e a sua utilização é relativamente recente de forma que existem poucos trabalhos relacionados à sua cardiomiopatia. Em estudo de Lu e colaboradores (2007) foi observada uma redução de quase 50% da fração de encurtamento nos camundongos diabéticos. Esse achado não foi reproduzido em outro trabalho, no qual, entretanto, foi encontrada uma pequena redução na contratilidade de corações isolados (BUGGER *et al.*, 2008b). Neste mesmo estudo, foi constatado o aumento da oxidação de ácidos graxos e redução da oxidação da glicose, porém, sem sinais de desacoplamento mitocondrial e sem comprometimento da eficiência cardíaca (BUGGER *et al.*, 2008b).

Camundongos geneticamente modificados são utilizados também como modelos de DM2. É o caso dos camundongos com mutação no gene da leptina ou do seu receptor (*ob/ob* e *db/db*, respectivamente). Em ambos os modelos, o DM2 se desenvolve devido à ausência da ação da leptina no hipotálamo, resultando em hiperfagia, obesidade e resistência à insulina (SRINIVASAN & RAMARAO, 2007). Um quadro grave de hiperinsulinemia e DM2 se desenvolve mais precocemente nos camundongos *db/db*, quando comparados aos *ob/ob* e, nos dois modelos, uma dislipidemia é observada na maioria, mas não em todos os estudos (BUCHANAN *et al.*, 2005). A hiperglicemia é observada em graus variados nesses animais (POORNIMA *et al.*, 2006).

A cardiopatia em camundongos *ob/ob* é caracterizada por hipertrofia, disfunção diastólica (redução da razão E/A) e pouca ou nenhuma disfunção sistólica (BAROUCH *et al.*, 2003; CHRISTOFFERSEN *et al.*, 2003). A contratilidade está pouco ou não está comprometida em corações isolados (BAROUCH *et al.*, 2003; MAZUMDER *et al.*, 2004; BUCHANAN *et al.*, 2005) e

está normal ou aumentada *in vivo* (BUCHANAN *et al.*, 2002). O desvio de substrato também é observado no coração desses animais, com aumento de oxidação de ácidos graxos e redução da utilização da glicose. Além disso, o miocárdio desenvolve resistência à insulina. Tais alterações resultam no aumento de consumo de oxigênio e conseqüente redução da eficiência cardíaca (BUCHANAN *et al.*, 2002; MAZUMDER *et al.*, 2004). Estresse oxidativo e alterações no trânsito intracelular parecem também contribuir para a CD em animais *ob/ob* (LI *et al.*, 2006).

Camundongos *db/db* apresentam manifestações cardíacas semelhantes aos *ob/ob*. Alterações na contratilidade são mais pronunciadas no modelo *db/db*, provavelmente devido ao desenvolvimento mais precoce da hiperglicemia (BUGGER & ABEL, 2009). Yue e colaboradores (2007) acompanharam, por ressonância magnética, o desenvolvimento da cardiomiopatia nesses animais, com alterações estruturais e remodelamento do VE. Eles observaram inicialmente uma hipertrofia caracterizada por aumento da massa e espessamento das paredes do VE, seguida por dilatação progressiva e disfunção contrátil. A hipertrofia cardíaca se desenvolve nos camundongos *ob/ob* e *db/db* independente dos níveis de leptina e da sua ação, sugerindo que a hiperleptinemia não é necessária para essa manifestação no DM2 (POORNIMA *et al.*, 2006). Associado, ou não, à hipertrofia, a disfunção diastólica é um achado comum em camundongos diabéticos *db/db* (SEMENIUK *et al.*, 2002; STUCKEY *et al.*, 2008).

O comprometimento da contratilidade cardíaca em animais *db/db* também foi comprovada por ecocardiografia (CARLEY *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006) e em corações isolados (BELKE *et al.*, 2004; CARLEY *et al.*, 2004). Este parece estar associado a alterações no fluxo de cálcio dentro do cardiomiócito (BELKE *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2006). Além disso, a ativação do sistema nervoso parassimpático em detrimento do simpático no modelo *db/db* é indicativo de neuropatia autonômica cardíaca (GONÇALVES *et al.*, 2009).

Ratos Zucker obesos também apresentam mutação no gene do receptor da leptina, desenvolvendo hiperfagia. Eles apresentam obesidade e aumento dos níveis de triglicérides, ácidos graxos, leptina e insulina, mas são euglicêmicos (COORT *et al.*, 2004). O cruzamento seletivo dos ratos que

apresentavam hiperglicemia deu origem a outra linhagem, o rato Zucker obeso e diabético, com as mesmas características citadas, acrescentando os níveis elevados de glicose no soro (WANG *et al.*, 2005). Ambos os modelos apresentam hipertrofia e aumento do conteúdo lipídico no miocárdio (LEE *et al.*, 2001; LUIKEN *et al.*, 2001). A disfunção contrátil e o desvio de substrato energético, por sua vez, são mais evidentes em ratos Zucker obesos e diabéticos (SHARMA *et al.*, 2004; GOLFMAN *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2005).

Camundongos *ob/ob*, *db/db* e ratos Zucker parecem não desenvolver aterosclerose, de forma que permitem a avaliação dos efeitos da obesidade, RI e DM2, independente da DAC (RUSSELL & PROCTOR, 2006; HSUEH *et al.*, 2007).

A interpretação dos resultados deve levar em conta a causa da obesidade e diabetes no modelo utilizado. A gravidade desses fatores, bem como a susceptibilidade à CD, pode variar de acordo com o componente genético da linhagem utilizada. Além disso, a toxicidade de drogas utilizadas na indução do DM ou efeitos derivados da mutação genética utilizada devem ser considerados (BUGGER & ABEL, 2009). A STZ pode apresentar toxicidade extrapancreática. No caso do coração, por exemplo, a droga pode induzir disfunção contrátil diretamente através de estresse oxidativo (WOLD & REN, 2004). A leptina também exerce efeitos diretos na função cardíaca. Assim, a deficiência dessa adipocina (modelo *ob/ob*) ou a resistência à mesma (modelo *db/db*) podem confundir os resultados da CD (BUGGER & ABEL, 2009). Além disso, a leptina parece ter efeitos significativos nas células do sistema imune e alterações na resposta inata e adquirida já foram descritas em camundongos *ob/ob* (OTERO *et al.*, 2006), o que representaria mais um fator de confusão na interpretação dos resultados.

Independente dos efeitos desconhecidos da mutação, modelos de DM2 baseado em mutação monogênica não apresentam a base multifatorial da doença. Linhagens de camundongos e ratos suscetíveis à obesidade e diabetes por indução com dieta combinam os aspectos genéticos e ambientais típicos do DM2, representando modelos experimentais de grande interesse (PETRO *et al.*, 2004; OUWENS *et al.*, 2007). Ratos Wistar alimentados com ração rica em gordura por 7 semanas desenvolvem esteatose, degeneração

mitocondrial e disfunção contrátil no miocárdio (OUWENS *et al.*, 2005; OUWENS *et al.*, 2007).

Camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta hipergordurosa mimetizam bem a condição do DM2 em humanos, desenvolvendo obesidade central, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia, dislipidemia, intolerância à glicose e resistência à insulina (COLLINS *et al.*, 2004; GALLOUKABANI *et al.*, 2007). As manifestações cardíacas desse modelo de DM2 ainda não foram bem estudadas. Estudos indicam um desvio de substrato metabólico já no início da dieta rica em gordura, precedendo, inclusive a obesidade e o diabetes (WRIGHT *et al.*, 2009). Alguns trabalhos avaliam o efeito da dieta hipergordurosa após a indução de sobrecarga de pressão (CHESS *et al.*, 2008; DUDA *et al.*, 2008), entretanto, eles não avaliam a função cardíaca associada apenas à dieta. O estudo funcional do coração de animais com obesidade e DM2 semelhante à condição humana é, portanto, de grande relevância.

3 – OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar a presença de alterações cardíacas em modelo experimental de diabetes *mellitus* tipo 2 induzido por dieta hipergordurosa.

3.2 - Objetivos Específicos

- Avaliar a presença de alterações de condução nos corações de animais submetidos ou não à dieta hipergordurosa que desenvolvem DM 2;
- Avaliar o remodelamento mecânico nos corações de animais submetidos ou não à dieta hipergordurosa que desenvolvem DM 2;
- Avaliar a capacidade física durante o exercício de animais submetidos ou não à dieta hipergordurosa que desenvolvem DM 2,
- Analisar alterações morfológicas e histológicas nos corações de animais submetidos ou não à dieta hipergordurosa que desenvolvem DM 2;
- Correlacionar as alterações funcionais com os níveis de adiponectina.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Animais

Nesse estudo foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 machos, com 4 semanas de idade. Os animais são provenientes e foram mantidos no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz/Ba. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA 002/07) da Fiocruz/Ba.

4.2- Delineamento experimental

Foram realizados dois experimentos nos quais camundongos C57BL/6 foram alimentados, *ad libitum*, com uma ração com alto teor de gordura (*high-fat* - HF) para indução de obesidade e diabetes mellitus tipo 2, por um período total de 10 meses. Um grupo controle foi mantido em dieta de composição semelhante, porém baixo teor de gordura (*low-fat* - LF). No primeiro experimento, cada grupo foi composto por 10 animais. Já no segundo, cinco animais compuseram o grupo LF e 10, o HF.

A indução da obesidade e diabetes foi monitorada através de medições mensais de peso corpóreo e glicemia de jejum, além de testes de tolerância à glicose. No início do experimento (T_0) e nos períodos de 6, 8 e 10 meses de indução com a dieta, os animais de ambos os grupos foram submetidos a uma análise funcional cardíaca, a fim de verificar o comprometimento cardíaco nesse modelo. A análise consistiu de estudo eletrocardiográfico, ecocardiográfico e ergométrico. Animais foram sacrificados após 8 e 10 meses de dieta. A figura 3 ilustra o desenho experimental utilizado.

Figura 3

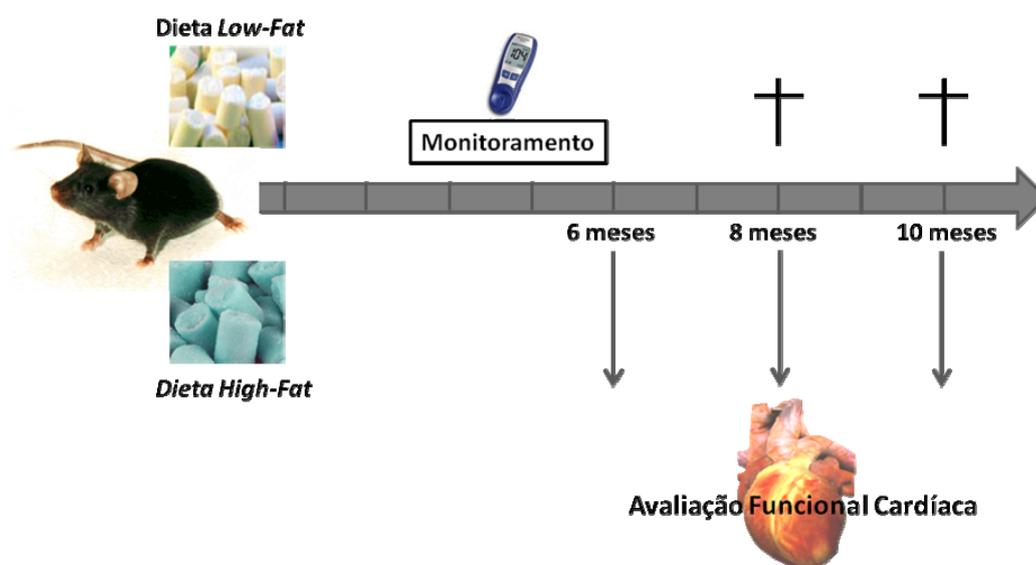


Figura 3. Representação do delineamento experimental utilizado.

4.3- Indução do diabetes por dieta *high-fat*

Ambas as rações *high-fat* (D12330) e *low-fat* (D12328) utilizadas ao longo dos 10 meses de experimento foram desenvolvidas pela *Research Diets* (New Brunswick, NJ, EUA). Elas são isocalóricas, de forma que uma apresenta a maior parte do valor energético associado à gordura hidrogenada vegetal e a outra apresenta um maior teor de carboidrato (amido de milho). Ademais, a composição das rações é semelhante e está resumida na tabela 1.

Tabela 1. Composição das rações *high-fat* e *low-fat*

Produto	<i>Low-fat</i>		Produto	<i>High-fat</i>	
	gm%	kcal%		gm%	kcal%
Proteína	16.8	16.4	Proteína	23.0	16.4
Carboidrato	74.3	73.1	Carboidrato	35.5	25.5
Gordura	4.8	10.5	Gordura	35.8	58.0
Total	4.07	100.0	Total	5.56	100.0

Fonte: www.researchdiets.com

4.4- Medições de glicemia em jejum e peso corporal

A glicemia de jejum e o peso corpóreo dos animais foram acompanhados mensalmente. Medições individuais de peso foram obtidas com o auxílio de uma balança semi-analítica, de forma a acompanhar o seu aumento e desenvolvimento da obesidade. O nível de glicose sanguíneo foi mensurado após um período de 7 horas de jejum, com amostras de sangue coletadas da extremidade da cauda do camundongo e leitura em glicosímetro Accu-check (Roche diagnostics, Mannheim, Alemanha).

4.5- Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado nos períodos de 3, 6, 8 e 10 meses de indução com a dieta, a fim de avaliar a intolerância à glicose, característica do DM2. Para tal, os camundongos foram mantidos em jejum durante 4 horas sendo injetada, após esse período, uma solução de salina contendo 2 g de glicose (Sigma, St. Louis, MO, EUA)/kg de peso do animal, via intraperitoneal. Amostras de sangue da cauda foram colhidas nos períodos de 15, 30, 60 e 120 minutos após a injeção para a medição dos níveis de glicose em glicosímetro Accu-check (Roche diagnostics, Mannheim, Alemanha). Os valores obtidos foram utilizados na construção da curva de tolerância, no software Graph Pad Prism 5.0.

4.6- Análise funcional cardíaca

Uma análise funcional cardíaca foi realizada nos animais com 4 semanas de idade (T_0), antes de iniciar as dietas experimentais e após 6, 8 e 10 meses de indução.

4.6.1- Análise eletrocardiográfica

A aquisição dos registros eletrocardiográficos dos camundongos foi iniciada após a indução de anestesia geral por via inalatória, utilizando o sistema de isoflurano (0,5 a 2%).

Os registros de eletrocardiogramas (ECGs) foram adquiridos usando um equipamento Bio Amp PowerLab System (PowerLab 2/20; ADInstruments, Castle Hill, Australia), que permite registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os dados foram adquiridos, armazenados em computador e analisados no programa Chart 5 for Windows (Power Lab; ADInstruments, Castle Hill, Australia). A fim de minimizar as interferências do ambiente sobre os registros utilizou-se um filtro de corte de 1 a 100 Hz. A frequência de amostragem foi de 1 kHz.

As análises de ECG incluíram as seguintes medidas: frequência cardíaca (FC); duração da onda P (P); amplitude da onda P (AmpP); intervalo PR (IPR); amplitude do QRS (AmpQRS); deflexão intrinsecóide (DI); intervalo QT (IQT) e QT corrigido (QTc). As durações das ondas foram calculadas automaticamente colocando o cursor ao longo do registro no ponto escolhido pelo observador e as medidas dos valores das médias foram determinadas em 14 ciclos cardíacos consecutivos ao longo do registro de ECG. O início e o final das ondas de deflexão foram considerados em relação à linha isoeletrica (linha base do registro).

A frequência cardíaca foi calculada diretamente pelo programa usando o algoritmo de detecção derivado do complexo QRS, identificando o pico da onda R automaticamente. A amplitude da onda P é mensurada do início da onda P a partir da linha isoeletrica até o pico de onda. O comprimento da onda P corresponde ao início da onda P até o ponto onde retorna à linha isoeletrica. O intervalo PR é mensurado do início da onda P até o início do complexo QRS, enquanto a amplitude do QRS é do início do complexo até o pico do QRS. Como os ECGs de roedores não apresentam a onda T separada do complexo QRS (BESTETTI & OLIVEIRA, 1990), o intervalo QT foi mensurado ao invés da duração do complexo de QRS. Tal mensuração compreende o início do complexo QRS até o final da onda T (WANG *et al.*, 2000).

4.6.2- Análise ecocardiográfica

A análise ecocardiográfica dos camundongos foi realizada utilizando o equipamento Vevo 770 (Visual Sonics, Toronto, Canadá), desenhado para pequenos roedores, que dispõe de transdutor de 30Mhz e propicia elevado detalhamento da anatomia cardíaca. Os exames foram gravados no disco rígido do próprio equipamento para posterior medição e obtenção dos resultados, imagens, vídeos e tabelas.

Os animais foram anestesiados com isoflurano (0,5 a 2%) por via inalatória, sendo controlada a concentração do anestésico ofertado pela frequência cardíaca, que deveria manter-se acima de 350bpm (STYPMANN, 2007). Apesar do anestésico deprimir a frequência cardíaca, a relação frequência cardíaca/fração de encurtamento mantém-se independente com uso da anestesia (ROTTMAN *et al.*, 2007).

O animal anestesiado foi colocado em decúbito dorsal em mesa aquecida, com as patas fixadas nos sensores correspondentes à aquisição do traçado eletrocardiográfico e, em seguida, foi realizada a tricotomia do tórax. A mesa na qual o animal foi fixado era móvel, facilitando a aquisição da imagem nas diferentes janelas acústicas, e aquecida a 37° C, com o intuito de evitar hipotermia. A avaliação ecocardiográfica transtorácica foi realizada utilizando como ferramentas de estudo o modo unidimensional (modo-M), bidimensional e *doppler* pulsado.

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

Após a aquisição desta imagem, o transdutor foi girado de forma a ficar com seu maior eixo perpendicular ao maior eixo do animal. Um corte axial do

coração foi obtido, sendo possível visualizar o septo interventricular, VE, parede posterior, parede ântero-lateral e VD. Nesta janela, foi traçado o modo-M na altura do músculo papilar. O diâmetro ventricular e as paredes septal e posterior foram mensurados em cinco ciclos cardíacos seguidos, sendo estes valores também utilizados no cálculo da massa de VE. Os volumes diastólico e sistólico finais foram calculados utilizando a fórmula de Teicholz. Entre a valva mitral e o músculo papilar, ao nível deste, abaixo, e próximo ao ápice do VE foram adquiridas imagens do ciclo cardíaco, que possibilitaram o delineamento do endocárdio, na diástole e na sístole. Esses valores de diástole e sístole do eixo curto, agregados aos valores relativos ao encurtamento do eixo longo, entraram na fórmula de Simpson para cálculo dos volumes diastólico e sistólico finais.

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

4.6.3- Análise ergométrica

Os camundongos foram colocados, individualmente, em uma esteira motorizada dentro de uma câmara de acrílico munida de estímulo elétrico (modelo LE 8700, Panlab, Barcelona, Espanha). Um trocador de gases (LE 400, Panlab) controla o fluxo de ar na câmara e a velocidade da esteira e a intensidade do choque foram controladas pelo equipamento LE 8700 – Treadmill Control (Panlab). Os dados foram enviados para um computador, onde foram armazenados e analisados no programa Chart 5 for Windows (Power Lab; ADInstruments, Castle Hill, Australia).

O animal foi colocado na esteira 30 minutos antes de iniciar o exercício para adaptação ao ambiente. No protocolo utilizado, a velocidade inicial foi de 6 cm/s com incremento de 6 cm/s a cada 10 minutos. O teste foi concluído quando o animal entrou em exaustão, isto é, permaneceu por 5 segundos ou mais na área de choque (0,8 A). Foi calculada a distância total percorrida pelo camundongo.

4.6- Sacrifício dos animais

Após os períodos de 8 e 10 meses de indução com a dieta, os animais foram sacrificados com quetamina (Ketamin-S; Cristália, Itapira-SP, Brasil) e xilazina (Amesadan, Vetbrand, Jacareí-SP, Brasil.) em dose três vezes superior à indicada para anestesia (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente). O sangue foi coletado para isolamento do soro. O coração foi retirado, pesado em balança semi-analítica, fixado em formalina 10% e incluso em blocos de parafina para posterior análise histológica.

4.7- Análise histopatológica

Cortes histológicos do coração foram corados por hematoxilina e eosina (H&E). As imagens das lâminas foram registradas com a ajuda de uma câmera CoolSnap cf) acoplada ao microscópio BX41 (Olympus, Tóquio, Japão).

Para quantificar o volume dos núcleos dos cardiomiócitos, foi seguido um método semelhante a Oliveira Júnior e colaboradores (2010). Os diâmetros de 30 núcleos por animal foram mensurados utilizando o programa Image-Pro Plus 7.0 (Media Cybernetics, San Diego, CA). Considerando a forma elipsóide do núcleo e sendo A o diâmetro maior e B o diâmetro menor, utilizou-se a fórmula de volume:

$$Vol = \frac{\pi AB^2}{6}$$

4.8- Quantificação sérica de adiponectina

A adiponectina foi quantificada no soro dos camundongos pela técnica de ELISA sanduíche usando kits Duoset ELISA Development System (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para adiponectina. Resumidamente, placas de 96 poços (NUNC – IMMUNO PLATE Maxisorp Surface) foram sensibilizadas com 50 μ L do anticorpo de captura (anticorpo monoclonal purificado anti-adiponectina), diluído em PBS, a 4°C durante a noite. As placas foram lavadas por 3x com PBS 0,05% Tween 20 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e foi adicionado 100 μ L da solução de PBS contendo 1% de BSA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por 1-2 horas à temperatura ambiente, a fim de bloquear sítios não específicos. As placas foram lavadas mais uma vez e foram incubadas com 50 μ L das amostras/poço em duplicata e do padrão da adiponectina em várias concentrações por 12 horas à 4° C. Após a lavagem das placas, foi adicionado o anticorpo secundário biotilado e as placas foram incubadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após as lavagens, foi adicionado 50 μ L/poço de estreptoavidina diluída 1:200, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Após lavagens, a reação foi revelada com 50 μ L/poço de solução reveladora contendo 10 mL de tampão citrato-fosfato 1 M, 2 μ L de H₂O₂ e uma pastilha TMB (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O bloqueio da reação foi feito através da adição de 50 μ L/poço de ácido fosfórico diluído 1:20. A leitura da densidade óptica foi determinada por espectrofotômetro (Spectra Max 190 - Molecular Devices, Califórnia, EUA), no comprimento de onda de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

4.9- Parâmetros bioquímicos do plasma

Amostras do soro coletado no sacrifício dos animais foram encaminhadas para análise bioquímica. Para tal, foi utilizado o equipamento Vitros 950 Chemistry System (Ortho-Clinical Diagnostis – Johnson & Johnson Company, Raritan-NJ, EUA) do Hospital São Rafael, Salvador – Bahia. Foram mensurados os níveis de colesterol total e triglicérides, a fim de avaliar uma possível dislipidemia decorrente da obesidade e DM2.

4.10- Análise estatística

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos dados, expondo os resultados em gráficos. Medidas descritivas como mínimo, máximo, média, desvio padrão e erro médio padrão foram utilizadas. Para comparar as variáveis quantitativas dos dois grupos (HF e LF) em um ponto, foi utilizado o teste *t* de Student para amostras independentes. Dois ou mais grupos foram comparados através de análise de variância (ANOVA) e pós-teste Turkey. Todas as conclusões foram obtidas considerando o nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada no software Graph Pad Prism 5.0 para Windows (San Diego-CA, EUA).

5- RESULTADOS

5.1- Peso corpóreo e glicemia de jejum

Camundongos C57Bl/6 machos alimentados com a ração hipergordurosa apresentaram aumento do peso corpóreo e glicemia de jejum quando comparados aos controles. A diferença entre os grupos foi significativa já a partir da quarta semana para ambos os parâmetros e a sua progressão ao longo dos 10 meses de indução está representada nas figuras 4 e 6. O ganho de peso foi evidente nos camundongos com 8 (figura 5A) e 10 meses (figura 5B) de indução.

Figura 4

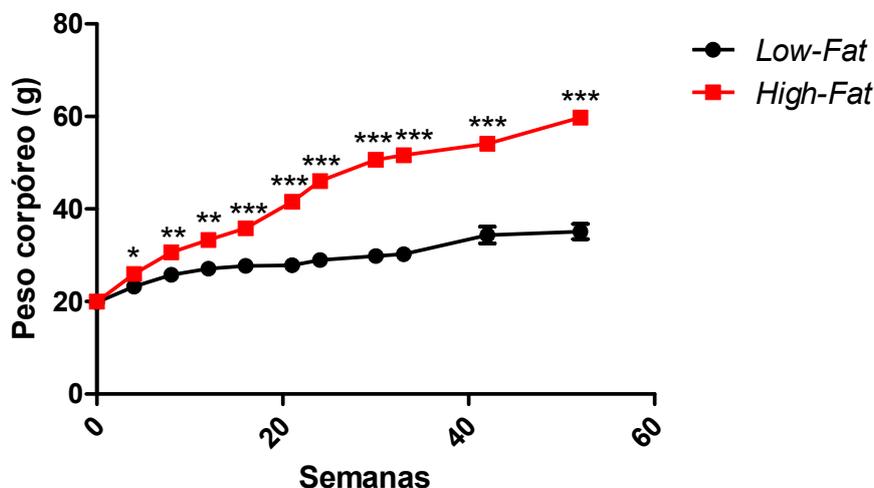


Figura 4. Aumento de peso nos camundongos do grupo *high-fat* durante período de indução. O peso dos animais alimentados com a ração hipergordurosa foi significativamente superior àqueles mantidos em dieta controle já no primeiro mês de indução. Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 5

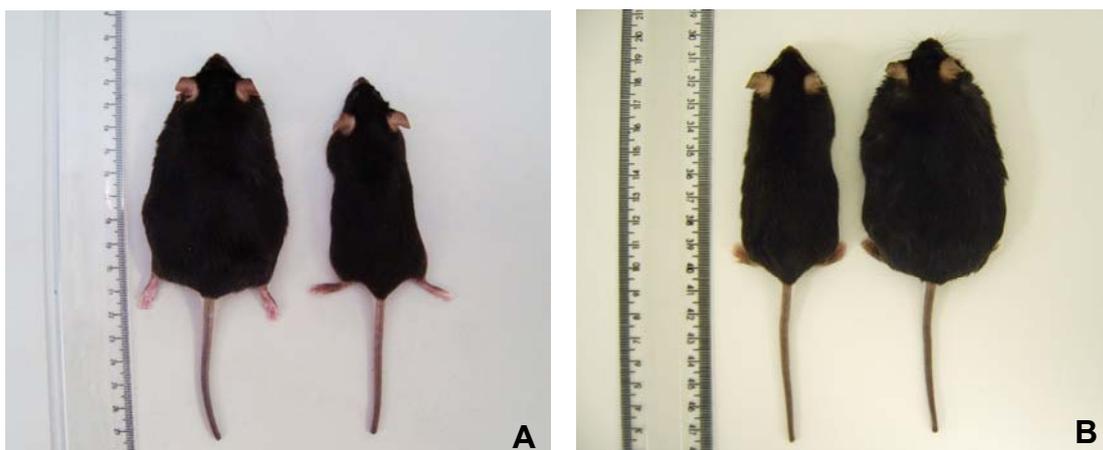


Figura 5. Camundongos dos grupos *high-fat* e *low-fat* após 8 e 10 meses de indução. Aparência dos animais após 8 (A) e 10 meses (B) de dieta.

Figura 6

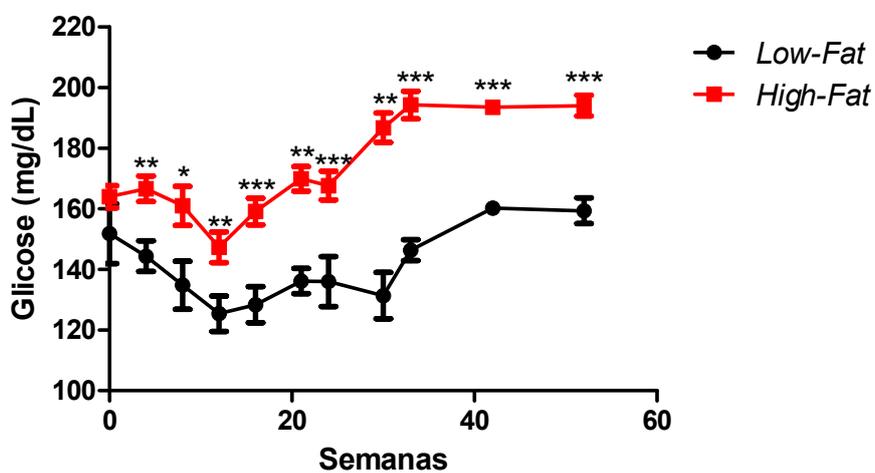


Figura 6. Glicemia de jejum nos camundongos do grupo *high-fat* durante período de indução. Os níveis de glicose dos animais alimentados com a ração hipergordurosa após 7 horas de jejum foram significativamente superiores àqueles mantidos em dieta controle já no primeiro mês de indução. Os valores representam a média \pm SEM, de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.2- Tolerância à glicose

A resistência à insulina, característica do DM2, foi acompanhada indiretamente por testes de tolerância à glicose. Os testes foram realizados nos períodos de 3, 6, 8 e 10 meses de indução com as dietas. Os gráficos revelam uma leve intolerância à glicose nos animais *high-fat* quando comparados aos controles *low-fat* já após 3 meses de indução (figura 7A). A intolerância aumentou ao longo do tempo de dieta hipergordurosa (figura 7B-D). Com 8 (figura 7C) e 10 meses (figura 7D) de indução, os animais do grupo *high-fat* tiveram mais dificuldade em reduzir os níveis de glicose plasmáticos.

O grupo *low-fat* reduziu seus níveis glicêmicos a valores semelhantes aos basais 120 minutos após a injeção de glicose. Nos animais *high-fat*, por outro lado, a glicemia se manteve significativamente superior à inicial (T_0) em todos os períodos avaliados. Essa dificuldade de retomar a concentração basal de glicose reflete a redução da captação de glicose pelas células, indício de resistência à insulina nos animais obesos.

Figura 7

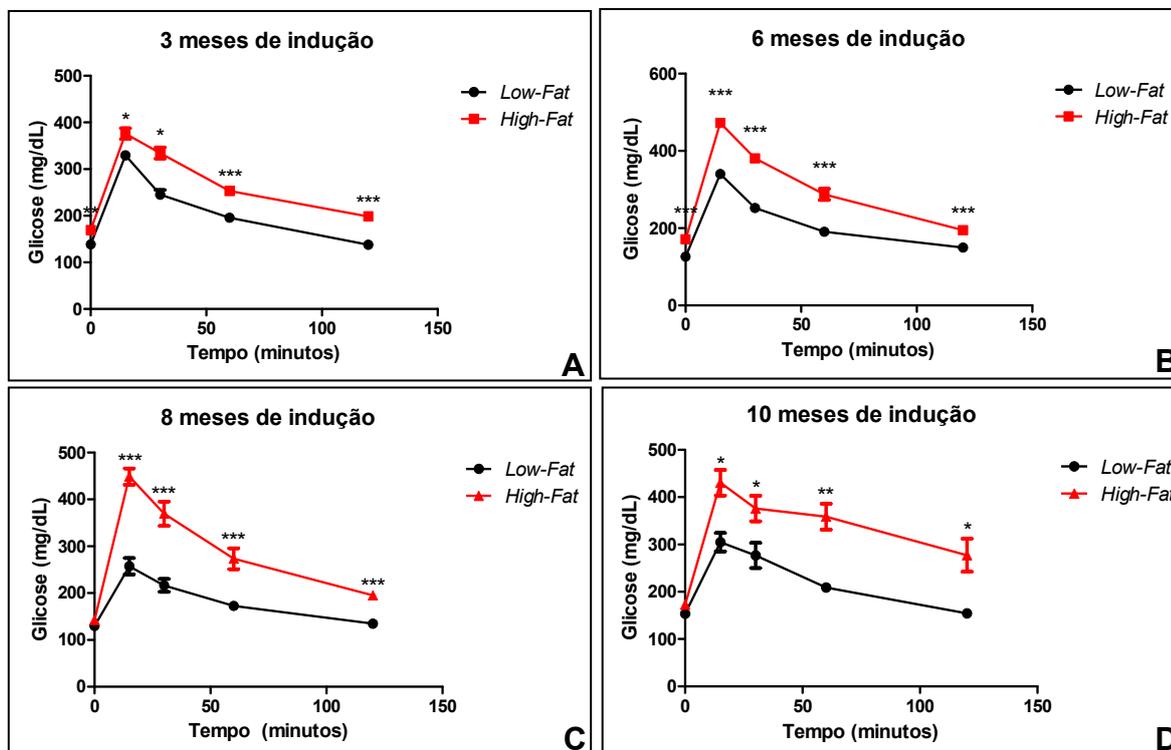


Figura 7. Tolerância à glicose ao longo dos 10 meses de indução. Desenvolvimento de uma intolerância à glicose nos animais do grupo HF nos períodos de 3 (A), 6 (B), 8 (C) e 10 (D) meses de indução com a dieta. Os valores representam a média \pm SEM, de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3- Análise funcional cardíaca

5.3.1-Eletrocardiografia

Um traçado eletrocardiográfico dos grupos experimentais está reproduzido na figura 6. A análise dos resultados do eletrocardiograma revelou alteração na função elétrica nos grupos *high* e *low-fat* ao longo do experimento. A frequência cardíaca reduziu em ambos do 6º para o 8º mês e retornou para os níveis iniciais no final do experimento (figura 9A). Diante disso, os intervalos RR (figura 9F) e QT (figura 9E), dependentes da frequência, aumentaram no 6º

mês de indução. A duração do intervalo PR não aumentou com a bradicardia (figuras 9B). A duração da onda P também varia de forma semelhante em ambos os grupos, revelando um aumento do mês 6 para o 8.

Figura 8

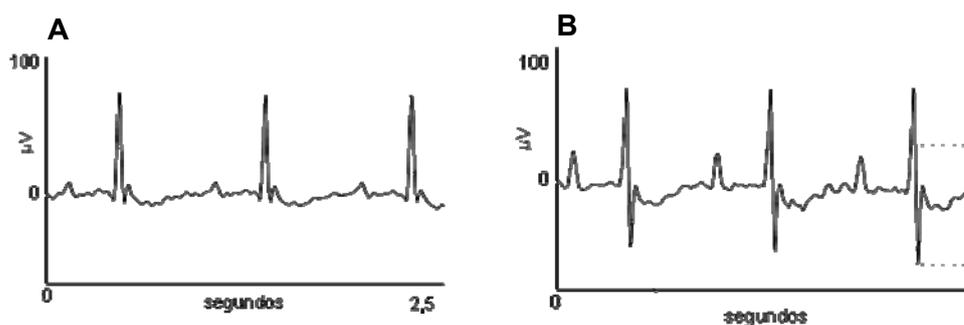


Figura 8. Traçado eletrocardiográfico dos animais no 8º mês de indução. Animais do grupo *low-fat* (A) e *high-fat* (B). FC, 429,8 bpm; AmpP, 66,2 μV ; P, 10,1 μV ; IPR, 48 ms; AmpQRS, 220 μV ; DI, 8,8 ms; IQT, 20 ms. Registro eletrocardiográfico sugestivo de cardiomiopatia hipertrófica com sobrecarga de VD e de AE. Presença de BAV de 1º grau. (A). FC, 490 bpm; AmpP, 31,4 μV ; P, 10,6 μV ; IPR, 40 ms; AmpQRS, 320,2 μV ; IQT, 20 ms; DI, 8,2 ms (B). FC, frequência cardíaca; AmpP, amplitude da onda P; P, duração da onda P; IPR, intervalo PR; AmpQRS, amplitude do complexo QRS; DI, deflexão intrinsecóide; IQT, intervalo QT; QTc, intervalo QT corrigido pela raiz de RR, VD, ventrículo direito; AE, átrio direito; BAV, bloqueio átrio-ventricular.

No 8º mês de indução, o grupo *high-fat* apresentou um aumento na amplitude da onda P (figura 9D) e do complexo QRS (figura 9G), apontando para uma sobrecarga de átrio direito e hipertrofia ventricular, respectivamente. Nesse mesmo período, se observa um aumento significativo da deflexão intrinsecóide nos animais alimentados com a ração hipergordurosa quando comparados ao controle (figura 9H).

Figura 9

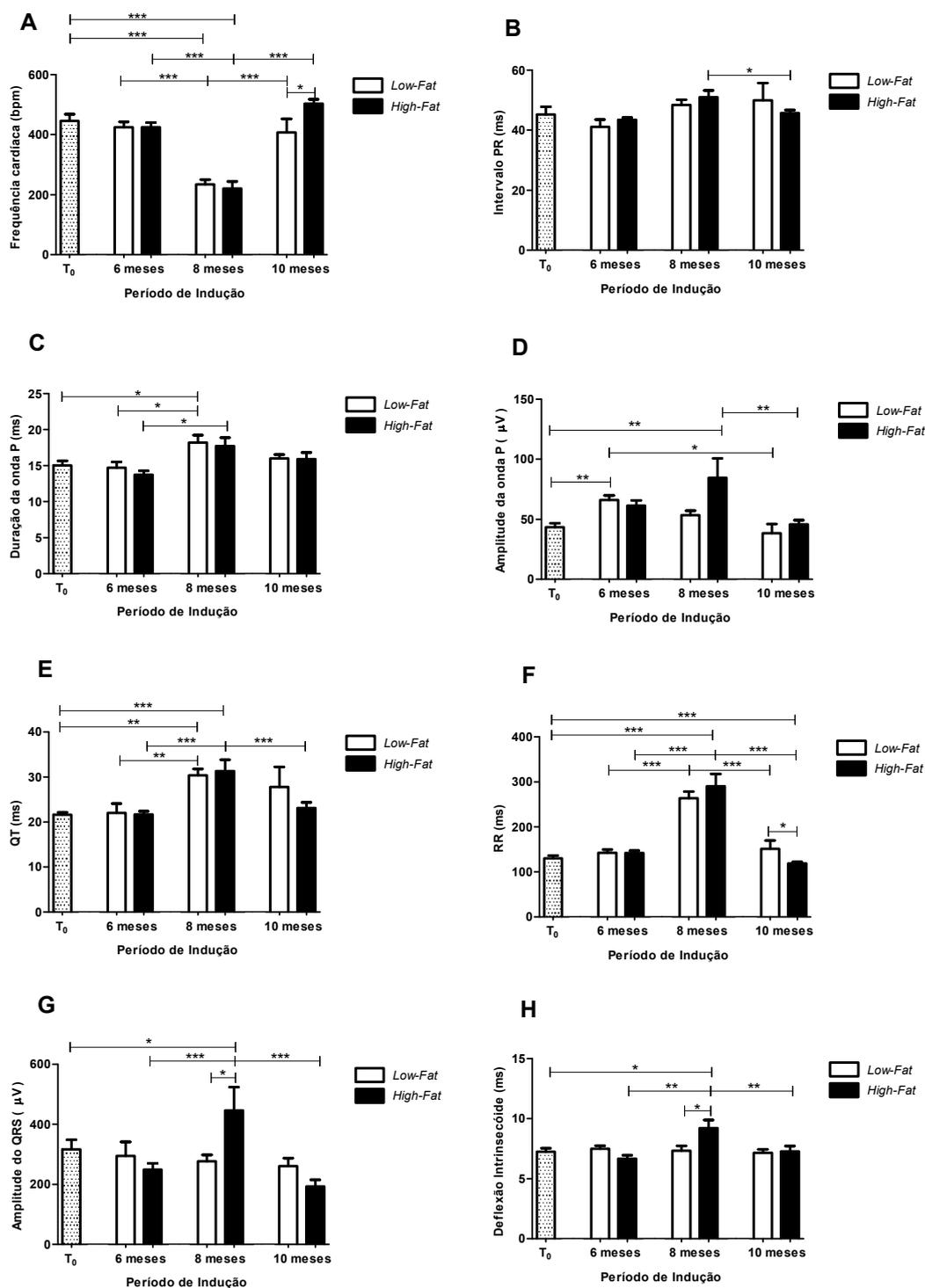


Figura 9. Estudo eletrocardiográfico dos grupos HF e LF. Parâmetros eletrocardiográficos analisados: frequência cardíaca (A), intervalo PR (B), Duração (C) e amplitude (D) da onda P e duração dos intervalos QT (E) e RR (F), amplitude do complexo QRS (G) e deflexão intrinsecóide (H) antes de iniciar as dietas e após 6, 8 e 10 meses de indução. Os valores representam a média ± SEM, de 5 animais do grupo low-fat e 10 animais do grupo high-fat sendo *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5.3.2- Ecocardiografia

No estudo ecocardiográfico, observou-se um aumento da espessura do septo interventricular e da parede posterior do VE, tanto na sístole quanto na diástole dos animais do grupo *high-fat* quando comparados aos *low-fat* (figuras 10A-D). Tal alteração aponta para uma hipertrofia do VE, corroborada pelo aumento da massa ventricular nesses animais (figura 10G). Parece haver um pequeno aumento da hipertrofia associada à dieta hipergordurosa ao longo do tempo. Como não houve uma redução do diâmetro interno do ventrículo (figuras 10E e F), a hipertrofia pode ser considerada excêntrica.

Figura 10

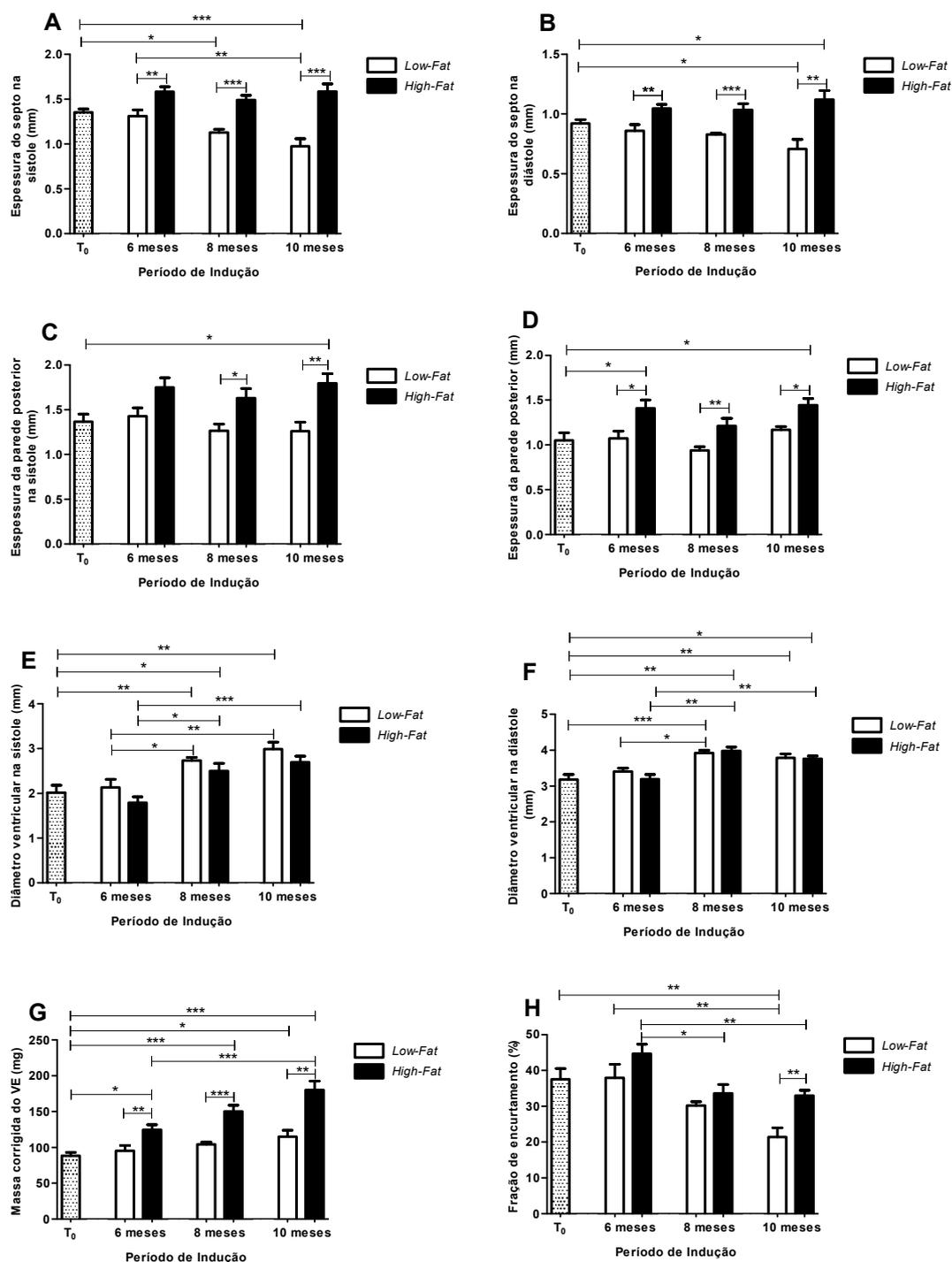


Figura 10. Análise ecocardiográfica dos grupos ao longo do período de indução. Espessura do septo interventricular na sístole (A) e diástole (B), espessura da parede posterior do VE na sístole (C) e diástole (D), diâmetro interno do VE na sístole (E) e diástole (F), massa corrigida do VE (G), Fração de encurtamento (H). Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

A figura 11 apresenta uma imagem de ecocardiografia dos animais no 8º mês de indução. Nela, se visualizam as paredes septal e posterior do VE e o diâmetro ventricular durante a sístole e a diástole. Observa-se um espessamento de parede septal e posterior no camundongo HF (figura 9A) quando comparado ao LF (figura 11B).

Figura 11

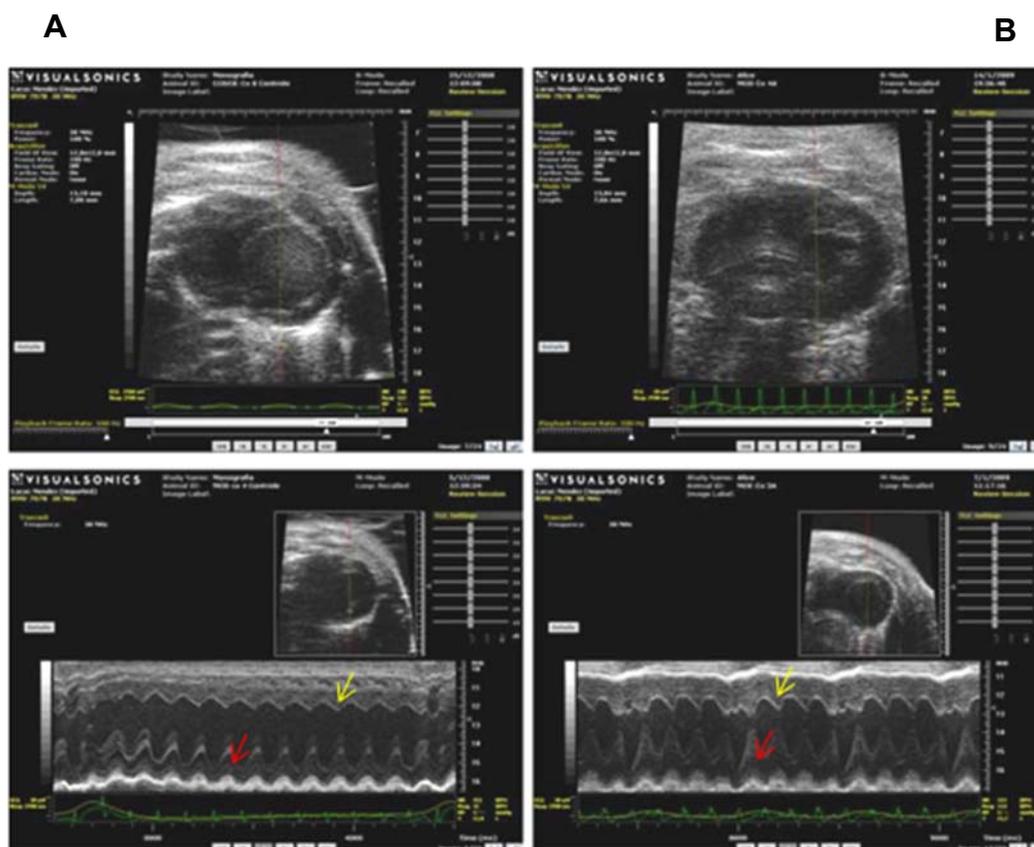


Figura 11. Imagem de ecocardiografia dos animais no 8º mês de indução. Avaliação ecocardiográfica visualizando parede septal (seta amarela) e posterior (seta vermelha) do VE, e diâmetro ventricular durante a sístole e a diástole. Ocorre espessamento das paredes no grupo *high-fat* (A) quando comparado ao *low-fat* (B).

Os resultados dos parâmetros de função diastólica estão representados na figura 120. A onda E (enchimento rápido do ventrículo) está reduzida nos animais diabéticos no 6º mês de indução, indicando uma disfunção diastólica. No 8º mês, entretanto, ela aumenta, se equiparando ao grupo controle, e volta a reduzir dois meses depois (figura 12A). A fração de encurtamento também

teve comportamento semelhante entre os grupos, apresentando uma redução ao longo do tempo (figura 10H). No 10º mês, ela está aumentada nos animais diabéticos, demonstrando que não houve comprometimento da função sistólica nesses animais.

Outros parâmetros de função cardíaca foram analisados pelo método de Simpson. A redução do volume diastólico final do grupo HF do 6º para o 10º mês, sendo, neste ponto, significativamente inferior ao LF (figura 12B), corrobora com a disfunção diastólica previamente mencionada. O volume sistólico reduziu ao longo do tempo em ambos os grupos (figura 12C) e essa mesma tendência foi observada no débito cardíaco (figura 12E). No 8º mês, entretanto, foi observado um débito cardíaco significativamente menor nos animais diabéticos.

A fração de ejeção tende a reduzir em ambos os grupos experimentais, sendo significativamente maior no HF no 10º mês de indução (figura 12D). Esse resultado está relacionado à redução do volume diastólico final e manutenção do volume sistólico desses animais no mesmo período.

Figura 12

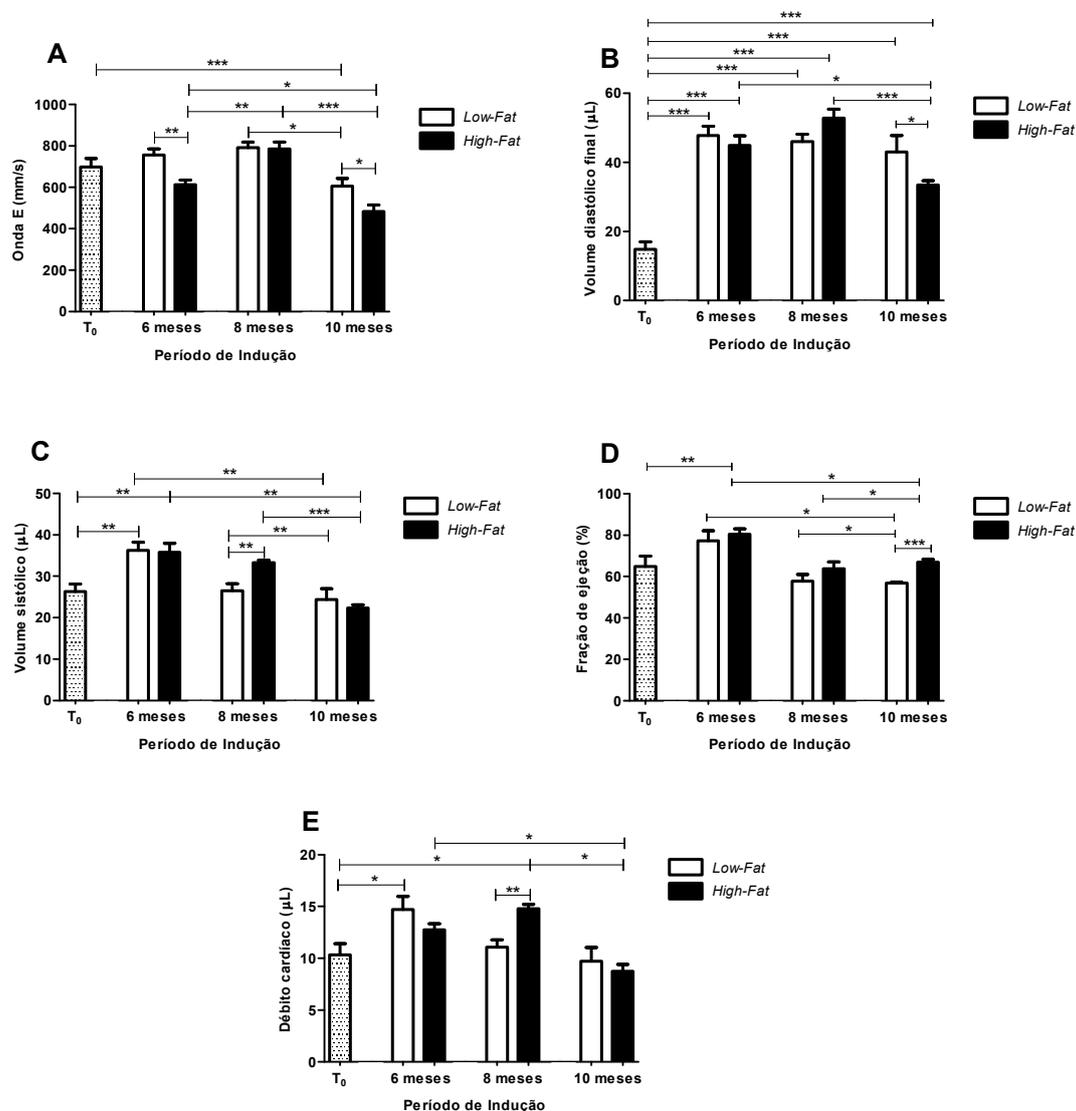


Figura 12. Análise ecocardiográfica dos grupos ao longo do período de indução. Onda E (A) e parâmetros ecocardiográficos obtidos pelo método de Simpson: volume diastólico final (B), volume sistólico (C), fração de ejeção (D) e débito cardíaco (E) antes de iniciar as dietas e após 6, 8 e 10 meses de indução. Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3.3- Ergometria

Uma vez constatadas as alterações elétricas e estruturais no coração dos animais submetidos à dieta hipergordurosa, buscou-se compreender os seus efeitos na performance em exercício. A distância percorrida pelos animais após 6, 8 e 10 meses de indução com a dieta está representada na figura 13.

Os animais do grupo HF percorreram uma menor distância na avaliação ergométrica quando comparados aos do grupo LF nos 3 períodos analisados. Foi constatada também uma redução no desempenho dos camundongos diabéticos do 6º para o 8º mês, que se estabilizou até o final do experimento.

Figura 13

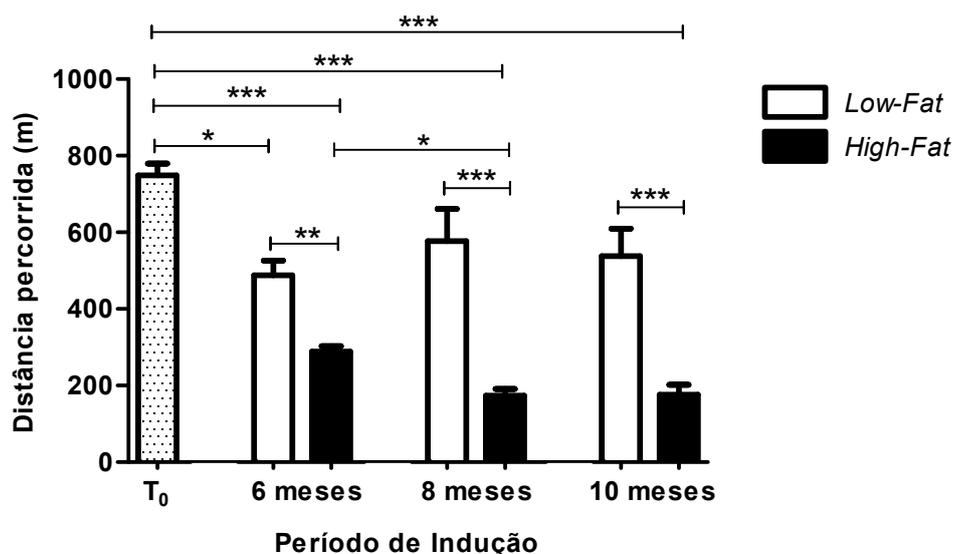


Figura 13. Análise ergométrica dos animais durante o período de indução com as dietas. Distância percorrida pelos animais no teste ergométrico, no início do experimento e pelos grupos *high-fat* e *low-fat* nos períodos de 6, 8 e 10 meses. Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

No 8º mês de indução, foi mensurada a glicemia antes do exercício, imediatamente após a exaustão e 30 minutos após a conclusão do teste ergométrico (figura 14). Essas medidas foram realizadas com a intenção de avaliar a capacidade de redução dos níveis plasmáticos de glicose, que se elevam após uma atividade que necessita de aporte energético, com descarga simpática. A incapacidade de estabilizar a glicemia após o exercício pode indicar intolerância à glicose.

Ambos os grupos apresentaram um aumento significativo da glicemia imediatamente após o exercício ($p < 0,001$ para o grupo HF e $p < 0,01$ para o grupo LF). Após 30 minutos de repouso, os animais *low-fat* reduziram o nível de glicose para valores semelhantes ao pré-exercício. Os animais obesos e diabéticos, no entanto, não foram capazes de retomar os níveis basais, refletindo a dificuldade de entrada de glicose nas células.

Figura 14

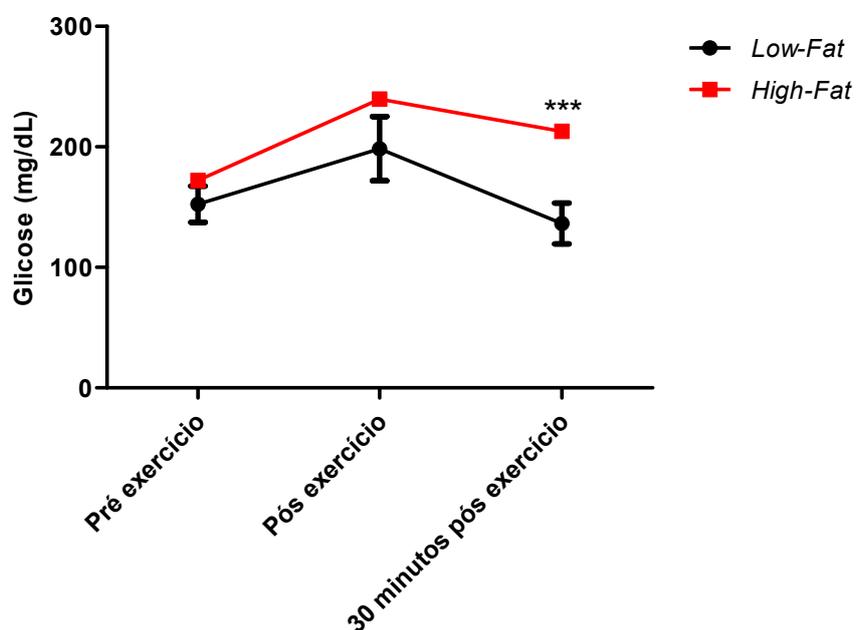


Figura 14. Medições de glicemia pré e pós teste ergométrico após 8 meses de indução. Aumento da glicemia após o exercício seguida pela sua redução em animais controle. Camundongos gordos e obesos não conseguem reduzir a glicemia para níveis basais. Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo *** $p < 0,001$.

5.4- Peso dos corações

Após 8 e 10 meses de indução com a dieta, os animais foram sacrificados e o coração, retirado e pesado. Foi observado um aumento significativo do peso dos corações associados à dieta hipergordurosa em ambos os momentos de sacrifício. Não houve diferença do 8º para o 10º mês de indução dentro de cada grupo (figura 15).

Figura 15

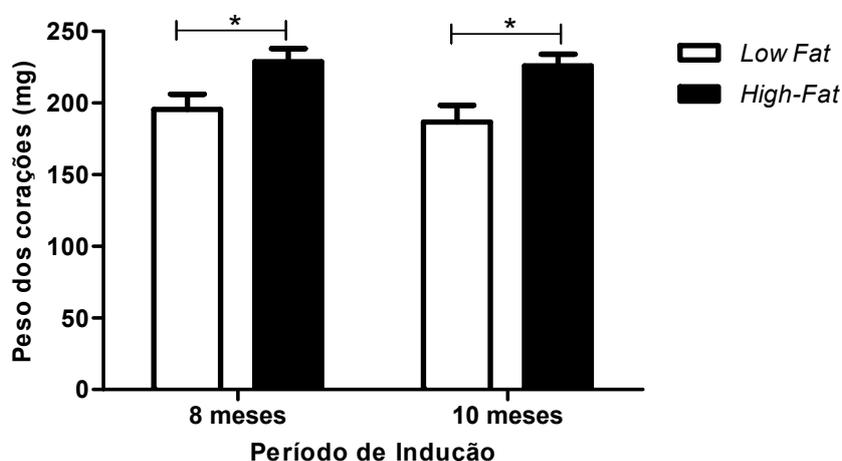


Figura 15. Peso dos corações dos grupos *high-fat* e *low-fat* após 8 e 10 meses de indução. Camundongos obesos e diabéticos apresentaram corações mais pesados quando comparados aos controles. Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo $*p < 0,05$.

5.5- Perfil lipídico

Foram realizadas análises bioquímicas de soro para avaliar o perfil lipídico dos camundongos. Os resultados apontaram para um aumento significativo do colesterol total e triglicérides no grupo *high-fat*, indicando uma dislipidemia, característica do diabetes. O quadro não se agravou do 8º para o 10º mês, assim como não foi observada diferença no grupo *low-fat* ao longo desse período (figura 16).

Figura 16

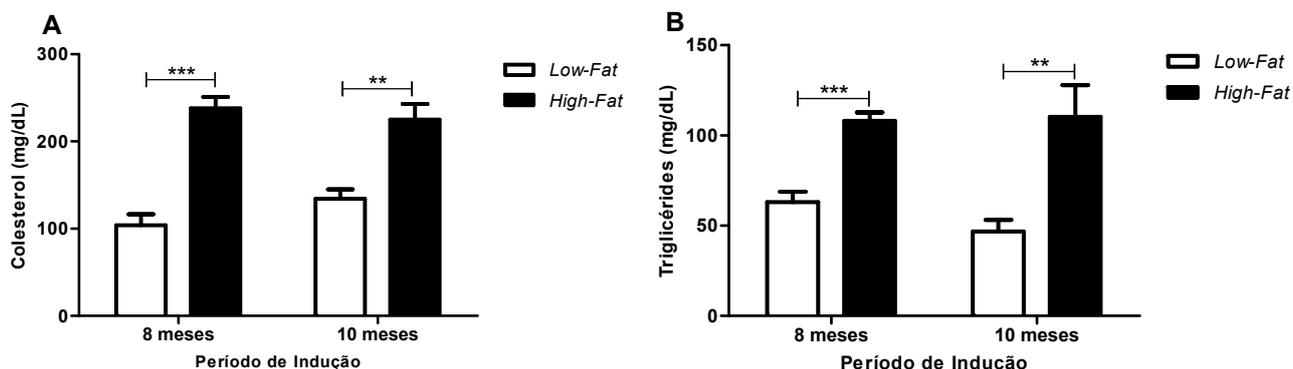


Figura 16. Parâmetros bioquímicos do soro dos camundongos nos períodos de 8 e 10 meses de indução. Camundongos obesos e diabéticos apresentaram aumento significativo de (A) colesterol e (B) triglicérides. Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

5.6- Quantificação de adiponectina no soro

A adiponectina foi quantificada no soro dos camundongos após 8 e 10 meses de indução por dieta. Animais obesos e diabéticos apresentaram uma redução significativa dessa adipocina, conforme observado em humanos. Os resultados foram semelhantes em ambos os períodos analisados (figura 17).

Figura 17

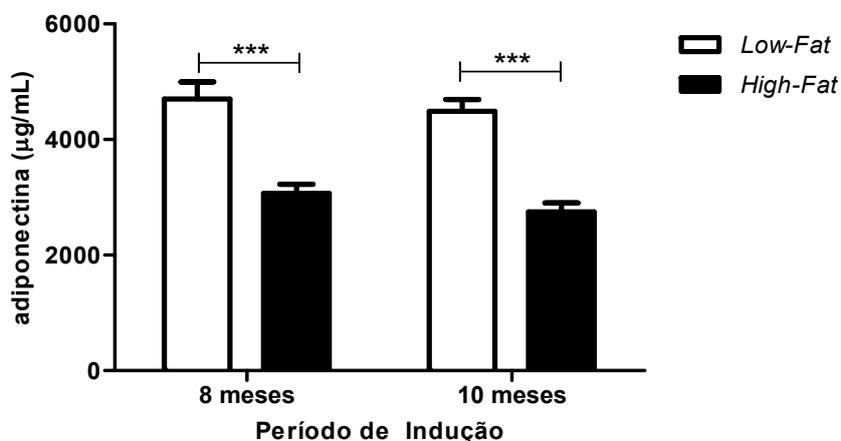


Figura 17. Adiponectina no soro dos animais. O grupo *high-fat* apresentou redução significativa dos níveis sorológicos da adipocina. Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo *** $p < 0,001$.

5.7- Análise histológica

Em análise macroscópica, não foram observadas alterações no coração dos animais alimentados com a dieta hipergordurosa. Em nível histológico, foram observados núcleos de tamanho aumentado nos cardiomiócitos dos camundongos após 8 e 10 meses de dieta hipergordurosa (figuras 18B e D). O aumento do volume dos núcleos é indícios de hipertrofia do cardiomiócito. Os núcleos dos animais controle tinham aparência normal (figuras 18A e C).

O volume dos núcleos dos animais após 10 meses de indução foi quantificado por morfometria. Os cardiomiócitos do grupo HF apresentaram, de fato, núcleos com volume médio significativamente maior do que o grupo LF (figura 19).

Figura 18

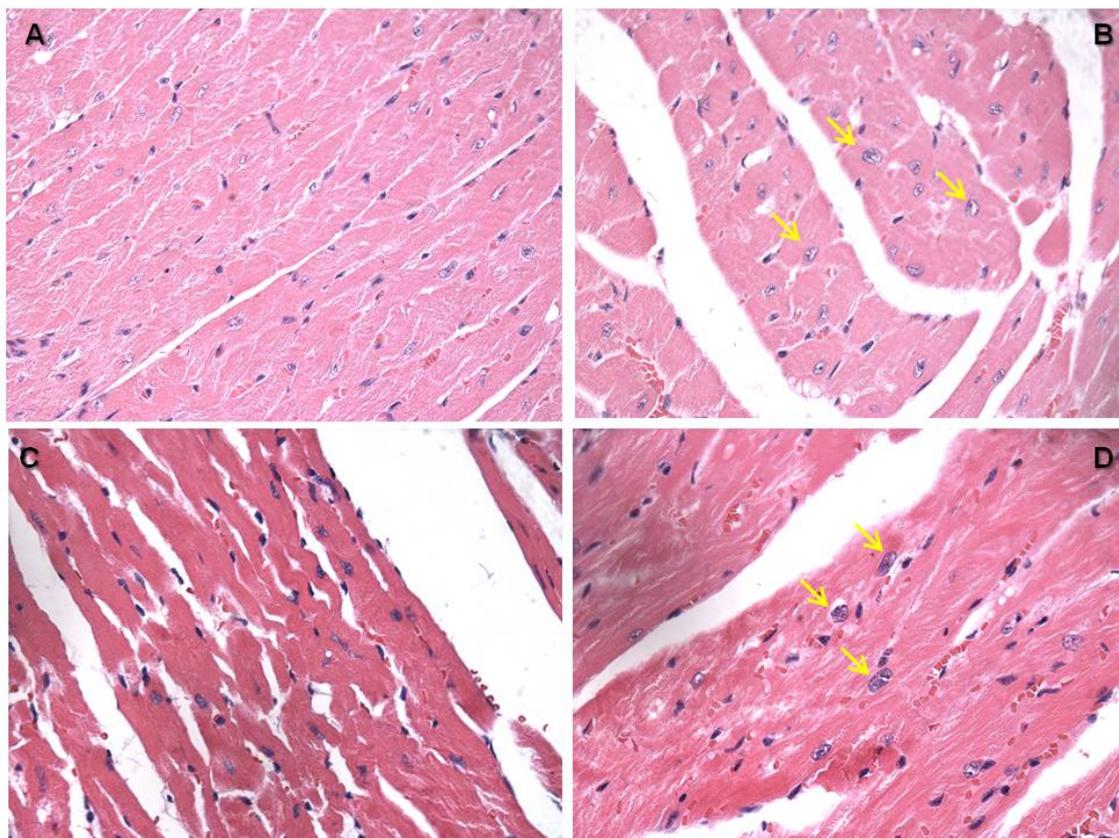


Figura 18. Análise histológica de secções de coração coradas com H&E. Animais dos grupos (A e C) *low-fat* e (B e D) *high-fat* nos períodos de (A e B) 8 e (C e D) 10 meses de indução. As setas indicam a presença de núcleos vesiculosos nos animais diabéticos. Aumento de 60X.

Figura 19

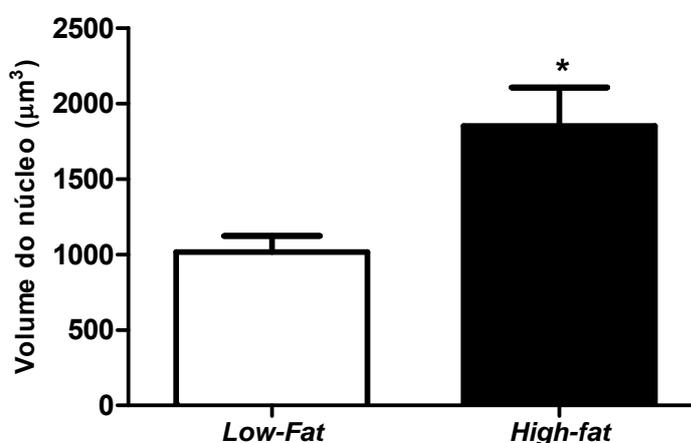


Figura 19. Volume dos núcleos dos cardiomiócitos após 10 meses de indução. Animais alimentados com a ração hipergordurosa apresentaram volume nuclear significativamente superior àqueles mantidos em dieta controle. Os valores representam a média \pm SEM de 5 animais do grupo *low-fat* e 10 animais do grupo *high-fat*, sendo $*p < 0,05$.

6- DISCUSSÃO

As entidades cardiovasculares que afetam pacientes diabéticos incluem a doença coronariana, hipertensão, hipertrofia miocárdica e cardiomiopatia diabética. A prevalência dessas complicações cresce juntamente com a diabetes. Neste cenário, o uso do modelo experimental da DM para avaliar e caracterizar o comprometimento da função cardíaca desponta como um excelente recurso para estudos futuros que visem a busca de opções terapêuticas eficazes para o tratamentos destes distúrbios cardiovasculares baseados nos mecanismos patogênicos.

O desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 depende de fatores genéticos e ambientais tanto em humanos quanto em camundongos. Ao contrário dos modelos experimentais baseados na mutação de um único gene, que desenvolvem obesidade e DM2 espontaneamente, o camundongo C57Bl/6 permanece magro quando alimentados com ração padrão *ad libitum* (REBUFFE-SCRIVE *et al.*, 1993). Entretanto, quando submetidos a uma dieta hipergordurosa, desenvolvem obesidade e o DM2 (ALMIND *et al.*, 2001). A predisposição genética dos camundongos C57Bl/6 aliada à dieta hipergordurosa os torna, então, um poderoso modelo de DM 2. Em modelo murino, a ingestão de gordura, e não necessariamente de teor calórico, representa o maior estímulo para o desenvolvimento da obesidade e do DM2 devido a um aumento da eficiência alimentar (peso ganho / Kcal consumida) (SURWIT *et al.*, 1995; PETRO *et al.*, 2004). Nesse sentido, o tipo de gordura da dieta também é relevante. Estudos epidemiológicos descreveram correlações entre o tipo de lipídeo consumido na dieta, a composição de ácidos graxos no tecido adiposo, a concentração destes no sangue e a incidência de certas doenças metabólicas (WARENSJO *et al.*, 2006). Dietas ricas em ácidos graxos saturados aumentam a resistência à insulina e a incidência de doenças cardiovasculares. Por sua vez, aquelas ricas em ácidos graxos mono- e poli-insaturados protegem o desenvolvimento dessas doenças (WOHLERS *et al.*, 2003). Estudos epidemiológicos indicam que o consumo de gordura trans industrializada aumenta o LDL e está associada a um aumento do risco

cardiovascular (LICHTENSTEIN *et al.*, 1999; OOMEN *et al.*, 2001; WILLETT, 2006; ERKKILA *et al.*, 2008).

Nesse trabalho, uma dieta rica em gordura hidrogenada vegetal induziu obesidade, hiperglicemia de jejum e intolerância à glicose, em camundongos C57Bl/6 machos. Esses resultados corroboram com outros estudos nesse modelo, onde é observado também uma progressiva hiperinsulinemia (PAREKH *et al.*, 1998) e disfunção das células β (WINZELL & AHREN, 2004). A hiperglicemia de jejum e a intolerância à glicose fornecem evidência tanto de resistência à insulina quanto de disfunção de célula beta (DAVIES *et al.*, 2000). Entretanto, não foi realizada outra avaliação de função das ilhotas pancreáticas, como a dosagem de insulina. A análise histológica do pâncreas neste modelo não detectou alterações morfológicas durante todo o período de indução (dados não mostrados). O mesmo também não foi observado no trabalho de Parekh e colaboradores (1998).

A dieta hipergordurosa acarretou também uma elevação dos níveis séricos de triglicérides e colesterol total. A alteração do perfil lipídico indica uma dislipidemia, que é característico do DM2. Outros estudos no mesmo modelo realizaram essas dosagens em menores tempos de indução e também encontraram valores significativamente mais elevados de triglicérides e colesterol após 8 (SCHAEFER, 1997) e 13 semanas de alimentação hipergordurosa quando comparada à dieta controle (WEI *et al.*, 2004).

Esse aumento de AGL pode inibir a captação da glicose, a síntese do glicogênio e a oxidação da glicose (BERGMAN & ADER, 2000). Elevados níveis de AGL circulantes também estão associados à redução da fosforilação insulino-estimulada do IRS-1 em resíduos de tirosina e da sua associação com a PI3-K (SHULMAN, 2000), sugerindo uma relação da dislipidemia com a resistência à insulina e o DM2.

A obesidade desenvolvida nesse trabalho tem distribuição central (visceral ou abdominal), como observado em outros estudos com o mesmo modelo (COLLINS *et al.*, 2004; REBUFFÉ-SCRIVE *et al.*, 1993). Esse tipo de obesidade está mais associado às alterações metabólicas como a RI, hiperinsulinemia e dislipidemia e, conseqüentemente, ao aumento do risco de doença cardiovascular (SOWERS, 2003; WAJCHENBERG *et al.*, 2009).

Outro achado consistente com o quadro de obesidade e diabetes em pacientes foi o elevado nível de adiponectina no soro dos animais, e a sua redução nos animais alimentados com a ração hipergordurosa. De fato, a adiponectina está presente em elevadas concentrações na circulação periférica em humanos (MAEDA *et al.*, 1996) e ela está inversamente associada à síndrome metabólica, DM2 e muitas das suas alterações metabólicas, como a RI e a dislipidemia (ARITA *et al.*, 2002; MOHAN *et al.*, 2005). A diminuição desta adipocina resulta de complexas interações regulatórias com citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 (FASSHAEUER *et al.*, 2003).

Sendo assim, o modelo utilizado nesse trabalho desenvolveu as alterações metabólicas do DM2 e síndrome metabólica observadas em pacientes, que constituem fatores de risco para o desenvolvimento das complicações cardiovasculares.

Em modelos experimentais, alterações cardíacas são atribuídas a dietas com elevado teor lipídico. Está descrito que duas semanas após o início desta dieta ocorre uma mudança no substrato utilizado pelo miocárdio, reduzindo a glicólise no miocárdio, aumentando a utilização de ácidos graxos como substrato energético, elevando o consumo de oxigênio pelo coração (WRIGHT *et al.*, 2009). Estes eventos precedem o desenvolvimento da obesidade e da resistência à insulina. Contudo, segundo Bugger e colaboradores (2009), a disfunção cardíaca em camundongo C57Bl/6 só pode ser observada 20 semanas após o início da dieta. No estudo aqui apresentado, as avaliações foram iniciadas após 24 semanas da dieta, verificando-se que parâmetros eletro e ecocardiográficos e ergométricos apresentaram-se alterados em relação ao T0 com dieta padrão e, que alguns destes parâmetros também apresentaram diferença entre os grupos HF e LF nos diferentes tempos de avaliação.

As alterações eletrocardiográficas em diferentes parâmetros foram observadas com mesmo perfil em ambos os grupos experimentais, HF e LF, entre o 6º e 8º meses. Estes parâmetros incluíram a frequência cardíaca, duração de onda P, intervalo QT e intervalo RR. A frequência cardíaca reduziu significativamente do 6º para o 8º mês em ambos os grupos e os parâmetros QT e RR aumentaram, dados que estão bem correlacionados visto que estes são fatores dependentes da frequência cardíaca (NESTO, 2005). As causas da

bradicardia podem ser variadas e divididas em cardíacas e não-cardíacas. As causas cardíacas incluem doença cardíaca vascular e doença cardíaca isquêmica crônica. Por outro lado as causas não-cardíacas geralmente são secundárias, relacionadas ao uso de drogas, distúrbios metabólicos, alterações endócrinas, desequilíbrio eletrolítico, fatores neurológicos, comprometimento autonômico e fatores circunstanciais (BREMBILLA-PERROT, 2007; 2009; PARRY *et al.*, 2009).

Neste trabalho, a bradicardia observada no grupo HF pode ser atribuída tanto aos distúrbios metabólicos quanto ao comprometimento autonômico. Da mesma forma como descrito por Gonçalves e colaboradores (2009), que observaram uma exacerbação do SN parassimpático apontando para uma NAC em camundongos *db/db*. Na verdade, distúrbios metabólicos associados ao diabetes como hiperglicemia crônica e resistência à insulina são um dos fatores determinantes da NAC que, por sua vez agrava a disfunção cardíaca.

O principal mecanismo de regulação nervosa extrínseca da função cardíaca é a inervação autonômica, portanto comprometimentos do sistema nervoso autônomo como observado na NAC podem levar a distúrbios cardíacos. Esta neuropatia, devido à hiperglicemia crônica, é secundária ao DM pode estar associada às alterações na funcionalidade elétrica e mecânica cardíaca que contribuem para o desenvolvimento da disfunção diastólica, característica da cardiomiopatia diabética e que ocorre independente do desenvolvimento da doença coronariana ou da hipertensão (COSSON & KEVORKIAN, 2003).

Neste estudo, os camundongos C57Bl/6 alimentados com dieta HF desenvolvem hiperglicemia desde a primeira semana após o início da dieta. A cronificação do estado hiperglicêmico pode estar contribuindo para disautonomia cardíaca e justificar o aumento da frequência cardíaca nestes animais no 10º mês, quando comparados ao grupo LF. Isto se baseia no fato de que a neuropatia autonômica desenvolve-se primeiro nas fibras longas do sistema autônomo, justificando as primeiras anormalidades serem atribuídas à denervação parassimpática. A fibra nervosa autonômica mais longa do sistema parassimpático é o nervo vago, responsável pelo controle autonômico parassimpático da atividade cardíaca. Isto explica porque no início do

desenvolvimento da NAC há uma exacerbação do tônus simpático (AXELROD *et al.*, 1987) que induz ao aumento da frequência cardíaca.

A NAC é um indício de mau prognóstico da doença cardíaca no diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2, tendo sido detectada nestes pacientes por diferentes técnicas de imagem (FANG *et al.*, 2004). Ao nível de exames eletrocardiográficos observa-se taquicardia de repouso, diminuição da variabilidade da frequência cardíaca. Outros sintomas da NAC incluem intolerância ao exercício, hipotensão ortostática e isquemia miocárdica silenciosa. Estas alterações cardíacas comprometem a qualidade de vida, relacionando-se à morte súbita por arritmias cardíacas, levando ao aumento das taxas de mortalidade (POP-BUSUI, 2010).

O surgimento da NAC tem sido cada vez mais associado ao desenvolvimento da CD devido ao número crescente de pacientes diabéticos com disfunção do VE na ausência de DAC e hipertensão. Exames clínicos de imagem demonstraram uma correlação entre comprometimento de função ventricular e redução da quantidade de inervação simpática tanto em diabetes tipo 1 quanto tipo 2 (SCHNELL *et al.*, 1996; STEVENS *et al.*, 1998; STEVENS *et al.*, 1999; VINIK & ZIEGLER, 2007).

Nos animais LF deste trabalho, a bradicardia no 8º mês também pode estar associada a distúrbios metabólicos e ao NAC. Isso porque a ração LF usada como controle tem baixo teor de gordura, mas é isocalórica em relação à HF, havendo maior percentual de carboidrato. Apesar de não haver muitos relatos de NAC devido à dieta rica em carboidratos com elevado teor glicêmico, esta dieta também pode desenvolver síndrome de resistência a insulina, que inclui intolerância a glicose, baixos níveis de HDL, elevados níveis de triglicérides, elevação da pressão sanguínea e inflamação sistêmica (STERN, 1995) e, portanto, induzir algum grau de comprometimento autonômico. Essas alterações, entretanto, não foram observadas nesse trabalho.

Nos últimos 30 anos, houve um aumento crescente do teor de carboidratos na dieta de indivíduos de países desenvolvidos e em desenvolvimento. Apesar da dieta rica em carboidratos e com baixo teor lipídico ser recomendada para prevenir cardiopatias (LICHTENSTEIN *et al.*, 1999), há evidências de que dietas com alto índice glicêmico contribui para o desenvolvimento da obesidade e da síndrome metabólica e aumenta o risco de

doenças cardiovasculares (ROSAMOND *et al.*, 2007). Estudos em humanos revelaram que o tipo de dieta rica em carboidratos e de elevado índice glicêmico compromete a função cardíaca, podendo aumentar o risco de infarto do miocárdio (JAKOBSEN *et al.*, 2010). Apesar disso, pouco se conhece a respeito dos efeitos e dos mecanismos de ação de uma dieta com elevada composição de carboidratos sobre a função cardíaca em humanos e, especialmente, em modelos experimentais.

Propõe-se que as dietas com elevado teor de carboidratos levam a hipertrofia ventricular esquerda devido à ativação de vias de sinalização da insulina no coração (BELKE *et al.*, 2002; SHIOJIMA & WALSH, 2002). Esta via envolve uma cascata de ativação enzimática que ativa inicialmente o IRS-1, que por sua vez através da PI3-K ativa a proteína cinase serina/treonina Akt que fosforila a proteína rapamicina que bloqueia a formação de peptídeos pró-apoptóticos, mas que por outro lado estimula a síntese protéica (MOLKENTIN & DORN, 2001; OPIE & SACK, 2004).

Nos animais HF, o aumento da duração e da amplitude da onda P registrada no ECG no 8º mês apresenta correlação com o aumento da onda A registrada ao ecocardiograma, sendo sugestivo de uma hipertrofia atrial. Esta exacerbação da contração atrial pode ser um mecanismo compensatório ao desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda nestes animais, detectada pelo aumento da espessura da parede posterior ventricular e do septo interventricular na diástole e na sístole, e da massa corrigida do VE. O diâmetro ventricular dos camundongos HF mensurado durante a sístole e a diástole nos 8º e 10º meses apresentou dimensão significativamente maior que o valor mensurado no 6º mês, sugerindo o desenvolvimento de uma hipertrofia excêntrica. A amplitude do complexo QRS e o tempo de ativação ventricular (deflexão intrínscóide) ao registro eletrocardiográfico estão elevados nos camundongos HF reforçando as evidências da hipertrofia ventricular.

Por outro lado, os camundongos LF apresentaram aumento da duração da onda P no ECG, que não foi acompanhado pelo aumento da amplitude da onda P, também no ECG, e da velocidade da onda A no ecocardiograma, no 8º mês. Visto que não há indicativos de hipertrofia ventricular esquerda pela avaliação ecocardiográfica no grupo LF, o prolongamento da duração da onda P pode ser considerado um evento isolado, sem indicativo de hipertrofia atrial.

Na literatura há relatos de casos em humanos que atribuem este prolongamento da onda P a valvopatias mitrais (UNVERFERTH *et al.*, 1984; TARASOUTCHI *et al.*, 1999) ou ao comprometimento ventricular com bloqueio de ramo (BOINEAU *et al.*, 1988; RUSTUM & RUSTUM, 2009), devido ao remodelamento eletrofisiológico, contrátil e estrutural.

Observou-se nos camundongos HF uma redução significativa do volume diastólico final a partir do 10º mês concomitante com a redução da velocidade da onda E, refletindo uma redução da complacência ventricular e conseqüente comprometimento da função diastólica. O volume sistólico reduziu da mesma forma que o débito cardíaco a despeito do aumento da frequência cardíaca.

Neste mesmo período, os camundongos LF não apresentaram indícios de disfunção diastólica, mas apresentaram redução do débito sistólico e do débito cardíaco, apesar da elevação da frequência cardíaca. Este perfil pode estar associado à redução da capacidade contrátil destes animais revelada por uma redução significativa da fração de encurtamento ao longo do tempo e em relação ao grupo HF. Estas alterações hemodinâmicas podem estar associadas a um aumento de pós-carga, que encontra suporte na descrição de Stern e colaboradores (1995) sobre a associação desta dieta rica em carboidratos e com alto teor glicêmico à elevação da pressão sanguínea. Contudo, este não é um ponto fácil de abordar visto que muito pouco se sabe a respeito dos efeitos de uma dieta rica em carboidratos sobre a disfunção ventricular. Em camundongos submetidos à constrição aórtica transversa e alimentados com dieta de baixo teor lipídico e elevada composição de carboidratos, observou-se aumento da mortalidade, alta expressão de marcadores moleculares de cardiopatia e disfunção contrátil quando comparados aos animais controles, sugerindo a um efeito deletério sobre a função cardíaca (CHESS *et al.*, 2008). Propõe-se que o excesso de consumo de açúcar acelera a inativação de PPAR- α , reduzindo o metabolismo cardíaco dos ácidos graxos e o funcionamento das mitocôndrias. Isso pode contribuir para o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda e a progressão da falência cardíaca (OKERE *et al.*, 2006; SHARMA *et al.*, 2007).

A hipertrofia associada à dieta hipergordurosa foi observada no ecocardiograma pelo espessamento de parede posterior e do septo interventricular e aumento da massa do VE. Esses dados corroboram com o

aumento do peso dos corações no momento do sacrifício e com a hipertrofia dos cardiomiócitos, inferida a partir do aumento de volume dos núcleos.

Ratos Wistar submetidos a uma dieta hipergordurosa apresentaram aumento do volume do núcleo de cardiomiócitos, mas sem alteração da espessura da parede ventricular (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2010). Em outro estudo com ratos Wistar, entretanto, foi observado aumento de massa do VE e espessamento das paredes. Além disso, foi observada uma disfunção contrátil nesses animais e essas alterações estavam relacionadas a um aumento da captação de ácidos graxos pelo miocárdio (OUWENS *et al.*, 2007).

Além da espécie e linhagem de roedor utilizada, a duração e a composição específica das dietas utilizadas em cada trabalho são possíveis explicações para a variação observada nos resultados da associação de dietas hipergordurosas com alterações metabólicas e cardiovasculares (GALLOU-KABANI *et al.*, 2007). No estudo de Wright e colaboradores (2009), por exemplo, não foi observada hipertrofia após 5 semanas de dieta hipergordurosa em camundongo C57Bl/6. Esse resultado provavelmente está associado ao curto período de indução. Ainda que tenha sido observado aumento do peso corpóreo e alteração do substrato energético nos cardiomiócitos já com 2 semanas de dieta, outros parâmetros como a resistência do miocárdio à insulina, a hiperglicemia e a dislipidemia se desenvolveram depois. O pouco tempo de exposição a essas condições provavelmente não foi suficiente para o desenvolvimento da hipertrofia no estudo de Wright e colaboradores (2009).

As alterações funcionais cardíacas descritas nos animais e o desenvolvimento da obesidade neste modelo experimental contribuíram diretamente para os resultados obtidos durante a avaliação ergométrica realizada neste trabalho. Camundongos HF apresentaram uma redução da distância percorrida já a partir do 6º mês, reproduzindo a redução na capacidade de exercícios de pacientes diabéticos. Esta resposta não foi observada em camundongos LF. Estudos comprovam que a capacidade de exercício é um forte preditor de mortalidade cardiovascular e em geral (SNADER *et al.*, 1997), e pacientes com DM tipo 2 queixam-se com frequência de fadiga e redução da capacidade de exercícios. A presença do diabetes, independentemente, pode contribuir para a redução desta capacidade de

exercícios, que está associada com baixo controle da doença, disfunção diastólica do ventrículo esquerdo e redução na taxa de recuperação da frequência cardíaca, o que indica um comprometimento autonômico (FANG *et al.*, 2005) e NAC (POP-BUSUI, 2010).

Associada à redução da capacidade de exercício, os animais HF apresentaram uma dificuldade de reduzir os níveis glicêmicos após exercício quando comparados aos níveis basais (pré-exercício). A glicemia nesse grupo se manteve alta 30 minutos após o exercício, já os camundongos LF reestabeleceram o nível basal de glicemia. Esses resultados indicam novamente a intolerância à glicose e corroboram com o achado em pacientes diabéticos (TANG & REED, 2001).

Nesse trabalho não foram avaliados os possíveis mecanismos responsáveis pelas alterações cardíacas observadas. A dieta rica em gordura acarretou obesidade central, DM2 e disfunções metabólicas associadas, como hiperglicemia e alteração do perfil lipídico e da sensibilidade à insulina. Entretanto, a dieta também pode modular a função cardiovascular por disfunção endotelial, trombose e inflamação (ERKILLA *et al.*, 2008).

Não foram encontrados trabalhos na literatura que avaliassem a presença de hipertensão e aterosclerose em C57Bl/6 machos alimentados com a mesma dieta usada nesse estudo. Alguns apontam para uma associação entre dieta hipergordurosa e o aumento da pressão sanguínea em camundongos C57Bl/6 (MILLS *et al.*, 1993; WILLIAMS *et al.*, 2003). Entretanto, no trabalho de Williams e colaboradores (2003), a ração utilizada era rica em gordura animal e foi observado apenas um pequeno aumento da pressão no fotoperíodo claro. A mesma ração que a usada nesse trabalho, rica em gordura hidrogenada vegetal, foi utilizada para alimentar uma linhagem F1 resultante do cruzamento entre C57Bl/6 e 129, não sendo observada hipertensão (TSAI *et al.*, 2004). Uma dieta hipergordurosa também não alterou a pressão sanguínea de ratos Wistar (OLIVEIRA-JÚNIOR *et al.*, 2010).

Quanto à aterosclerose, roedores tendem a ser resistentes à sua indução. O camundongo C57Bl/6, entretanto, apresenta certa suscetibilidade, ainda que não desenvolva a doença de forma homogênea. Fêmeas dessa linhagem são mais suscetíveis que os machos (HSUEH *et al.*, 2007). De fato, Nishina e colaboradores (1993) relataram a ocorrência de aterosclerose em

C57Bl/6 fêmeas associada a dietas ricas em gordura. Eles testaram diferentes fontes de gordura e, dentre elas, a gordura hidrogenada vegetal resultou em menor lesão. Fêmeas dessa linhagem desenvolveram aterosclerose também quando alimentadas com uma dieta rica em gordura e colesterol (PAIGEN, 1995). Em dieta de composição semelhante à do trabalho de Paigen (1995), Miki e colaboradores (2001) observaram aterosclerose em machos e fêmeas.

Diante dos resultados apresentados, observa-se que as alterações cardíacas são induzidas principalmente pela dieta hipergordurosa. Isso corrobora com o papel da obesidade e das alterações metabólicas, como hiperglicemia, resistência à insulina, dislipidemia e hipoadiponectinemia, no contexto multifatorial do desenvolvimento da disfunção cardíaca do DM2 e na consequente intolerância ao exercício.

7- RESUMO DOS RESULTADOS

Os camundongos C57BL/6 machos alimentados com dieta hipergordurosa (*high-fat*) desenvolvem hiperglicemia, obesidade, intolerância à glicose e dislipidemia, semelhante à condição em humanos.

As alterações eletrocardiográficas observadas neste trabalho, independente da dieta ser hipergordurosa ou hiperglicídica, são indicativos do desenvolvimento da NAC, corroborando com outros estudos.

A dieta hipergordurosa é responsável pelo desenvolvimento de hipertrofia e disfunção diastólica associado às alterações metabólicas do DM2 e à obesidade.

As alterações cardíacas descritas neste trabalho estão de acordo com o quadro do DM2 e estão bem correlacionadas à redução na capacidade de realizar exercícios nos camundongos alimentados com dieta *high-fat*.

O modelo desenvolvido nesse trabalho reproduz, portanto, a doença humana, representando uma promissora ferramenta de estudo dos mecanismos patogênicos associados à DM2, bem como de investigação de novas opções terapêuticas.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. J. B.;SILVA, S. C. Genética do diabetes. In: R. L. N. Cavalcanti (Ed.). **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006. p.71-77.

ALMIND, K.;DORIA, A.;KAHN, C. R. Putting the genes for type II diabetes on the map. **Nat Med**, v. 7, n. 3, p. 277-9, 2001.

AN, D.;RODRIGUES, B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. **American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 4, p. H1489-506, 2006.

ANDERSON, J. W.;KENDALL, C. W.;JENKINS, D. J. Importance of weight management in type 2 diabetes: review with meta-analysis of clinical studies. **J Am Coll Nutr**, v. 22, n. 5, p. 331-9, 2003.

ARITA, Y. *et al.* Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell. **Circulation**, v. 105, n. 24, p. 2893-8, 2002.

AVENDANO, G. F. *et al.* Effects of glucose intolerance on myocardial function and collagen-linked glycation. **Diabetes**, v. 48, n. 7, p. 1443-7, 1999.

AXELROD, S. *et al.* Spectral analysis of fluctuations in heart rate: an objective evaluation of autonomic nervous control in chronic renal failure. **Nephron**, v. 45, n. 3, p. 202-6, 1987.

BAROUCH, L. A. *et al.* Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. **Circulation**, v. 108, n. 6, p. 754-9, 2003.

BECKMAN, J. A.;CREAGER, M. A.;LIBBY, P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **JAMA**, v. 287, n. 19, p. 2570-81, 2002.

BELKE, D. D. *et al.* Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 5, p. 629-39, 2002.

BELKE, D. D.;SWANSON, E. A.;DILLMANN, W. H. Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart. **Diabetes**, v. 53, n. 12, p. 3201-8, 2004.

BELL, D. S. Diabetic cardiomyopathy. **Diabetes Care**, v. 26, n. 10, p. 2949-51, 2003.

BELL, D. S. Diabetic cardiomyopathy. A unique entity or a complication of coronary artery disease? **Diabetes Care**, v. 18, n. 5, p. 708-14, 1995.

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

BERTONI, A. G. *et al.* Heart failure prevalence, incidence, and mortality in the elderly with diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 3, p. 699-703, 2004.

BERTONI, A. G. *et al.* Diabetes and idiopathic cardiomyopathy: a nationwide case-control study. **Diabetes Care**, v. 26, n. 10, p. 2791-5, 2003.

BESTETTI, R. B.; OLIVEIRA, J. S. The surface electrocardiogram: a simple and reliable method for detecting overt and latent heart disease in rats. **Braz J Med Biol Res**, v. 23, n. 12, p. 1213-22, 1990.

BIDASEE, K. R. *et al.* Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. **Diabetes**, v. 53, n. 2, p. 463-73, 2004.

BOINEAU, J. P. *et al.* Demonstration of a widely distributed atrial pacemaker complex in the human heart. **Circulation**, v. 77, n. 6, p. 1221-37, 1988.

BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy revisited. **Circulation**, v. 115, n. 25, p. 3213-23, 2007.

BOYER, J. K. *et al.* Prevalence of ventricular diastolic dysfunction in asymptomatic, normotensive patients with diabetes mellitus. **The American Journal of Cardiology**, v. 93, n. 7, p. 870-5, 2004.

BRAZ, J. C. *et al.* PKC- α regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. **Nature Medicine**, v. 10, n. 3, p. 248-54, 2004.

BREMBILLA-PERROT, B. [Dilated cardiomyopathy and syncope: management]. **Arch Mal Coeur Vaiss**, v. 100, n. 9, p. 782-6, 2007.

BREMBILLA-PERROT, B. The management of arrhythmic syncope. **Minerva Med**, v. 100, n. 3, p. 195-211, 2009.

BUCHANAN, J. *et al.* Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5341-9, 2005.

BUGGER, H.; ABEL, E. D. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. **Clinical Science**, v. 114, n. 3, p. 195-210, 2008.

BUGGER, H.;ABEL, E. D. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. **Disease Models & Mechanisms**, v. 2, n. 9-10, p. 454-66, 2009.

BUGGER, H. *et al.* Type 1 diabetic akita mouse hearts are insulin sensitive but manifest structurally abnormal mitochondria that remain coupled despite increased uncoupling protein 3. **Diabetes**, v. 57, n. 11, p. 2924-32, 2008.

CARLEY, A. N. *et al.* Treatment of type 2 diabetic db/db mice with a novel PPARgamma agonist improves cardiac metabolism but not contractile function. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 286, n. 3, p. E449-55, 2004.

CARVALHEIRA, J. B. C.;ZECCHIN, H. G.;SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**. 46: 419-425 p. 2002.

CHANDALIA, M.;ABATE, N. Metabolic complications of obesity: inflated or inflamed? **J Diabetes Complications**, v. 21, n. 2, p. 128-36, 2007.

CHANG, L. C. *et al.* The clinical implications of blood adiponectin in cardiometabolic disorders. **J Formos Med Assoc**, v. 108, n. 5, p. 353-66, 2009.

CHATHAM, J. C.;FORDER, J. R. Relationship between cardiac function and substrate oxidation in hearts of diabetic rats. **Am J Physiol**, v. 273, n. 1 Pt 2, p. H52-8, 1997.

CHESS, D. J. *et al.* Effects of a high saturated fat diet on cardiac hypertrophy and dysfunction in response to pressure overload. **Journal of Cardiac Failure**, v. 14, n. 1, p. 82-8, 2008.

CHOI, J. B. *et al.* Little evidence of transdifferentiation of bone marrow-derived cells into pancreatic beta cells. **Diabetologia**, v. 46, n. 10, p. 1366-74, 2003.

CHRISTOFFERSEN, C. *et al.* Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. **Endocrinology**, v. 144, n. 8, p. 3483-90, 2003.

COLLINS, S. *et al.* Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. **Physiol Behav**, v. 81, n. 2, p. 243-8, 2004.

COORT, S. L. *et al.* Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese zucker rats. **Diabetes**, v. 53, n. 7, p. 1655-63, 2004.

CORNIER, M. A. Obesity and diabetes. **Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity**, v. 12, n., p. 260-266, 2005.

COSSON, S.;KEVORKIAN, J. P. Left ventricular diastolic dysfunction: an early sign of diabetic cardiomyopathy? **Diabetes Metab**, v. 29, n. 5, p. 455-66, 2003.

CZECH, M. P.;CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J Biol Chem**, v. 274, n. 4, p. 1865-8, 1999.

DAVIES, M. J. *et al.* Impaired glucose tolerance and fasting hyperglycaemia have different characteristics. **Diabet Med**, v. 17, n. 6, p. 433-40, 2000.

DEPRE, C. *et al.* Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. **J Mol Cell Cardiol**, v. 32, n. 6, p. 985-96, 2000.

DI BONITO, P. *et al.* Early detection of diabetic cardiomyopathy: usefulness of tissue Doppler imaging. **Diabet Med**, v. 22, n. 12, p. 1720-5, 2005.

DOBRIN, J. S.;LEBECHE, D. Diabetic cardiomyopathy: signaling defects and therapeutic approaches. **Expert Review of Cardiovascular Therapy**, v. 8, n. 3, p. 373-91, 2010.

DRAKE-HOLLAND, A. J. *et al.* Chronic catecholamine depletion switches myocardium from carbohydrate to lipid utilisation. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 15, n. 2, p. 111-7, 2001.

DU, X. *et al.* Inhibition of GAPDH activity by poly(ADP-ribose) polymerase activates three major pathways of hyperglycemic damage in endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 7, p. 1049-57, 2003.

DUDA, M. K. *et al.* Low-carbohydrate/high-fat diet attenuates pressure overload-induced ventricular remodeling and dysfunction. **Journal of Cardiac Failure**, v. 14, n. 4, p. 327-35, 2008.

ERKKILA, A. *et al.* Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. **Prog Lipid Res**, v. 47, n. 3, p. 172-87, 2008.

FANG, Z. Y.;PRINS, J. B.;MARWICK, T. H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 4, p. 543-67, 2004.

FANG, Z. Y. *et al.* Determinants of exercise capacity in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v. 28, n. 7, p. 1643-8, 2005.

FASSHAUER, M. *et al.* Adiponectin gene expression and secretion is inhibited by interleukin-6 in 3T3-L1 adipocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 301, n. 4, p. 1045-50, 2003.

FEIN, F. S. Diabetic cardiomyopathy. **Diabetes Care**, v. 13, n. 11, p. 1169-79, 1990.

FEINSTEIN, R. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha suppresses insulin-induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor and its substrates. **J Biol Chem**, v. 268, n. 35, p. 26055-8, 1993.

FINCK, B. N. *et al.* The cardiac phenotype induced by PPARalpha overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 1, p. 121-30, 2002.

FONSECA-ALANIZ, M. H. *et al.* O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FRANCIS, G. S. Diabetic cardiomyopathy: fact or fiction? **Heart**, v. 85, n. 3, p. 247-8, 2001.

FUJIMOTO, C. M. The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Medicine**, v. 108, n., p. 14S-19S, 2000.

GALINDO, V.;CAVALCANTI, N.;LIRA, R. Definição, diagnóstico e classificação dos distúrbios no metabolismo dos hidratos de carbono. In: N. C. Ruy Lira (Ed.). **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006. p.55-60.

GALLOU-KABANI, C. *et al.* C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, n. 8, p. 1996-2005, 2007.

GIANNESSI, D.;MALTINTI, M.;DEL RY, S. Adiponectin circulating levels: a new emerging biomarker of cardiovascular risk. **Pharmacol Res**, v. 56, n. 6, p. 459-67, 2007.

GOLFMAN, L. S. *et al.* Activation of PPARgamma enhances myocardial glucose oxidation and improves contractile function in isolated working hearts of ZDF rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 289, n. 2, p. E328-36, 2005.

GONCALVES, A. C. *et al.* Diabetic hypertensive leptin receptor-deficient db/db mice develop cardioregulatory autonomic dysfunction. **Hypertension**, v. 53, n. 2, p. 387-92, 2009.

GRUNDY, S. M. *et al.* Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. **Circulation**, v. 100, n. 10, p. 1134-46, 1999.

HAFFNER, S. M. *et al.* Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 339, n. 4, p. 229-34, 1998.

HAYAT, S. A. *et al.* Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment. **Clinical Science**, v. 107, n. 6, p. 539-57, 2004.

HO, K. K. *et al.* The epidemiology of heart failure: the Framingham Study. **J Am Coll Cardiol**, v. 22, n. 4 Suppl A, p. 6A-13A, 1993.

HOTAMISLIGIL, G. S. *et al.* IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF- α - and obesity-induced insulin resistance. **Science**, v. 271, n. 5249, p. 665-8, 1996.

HOW, O. J. *et al.* Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice. **Diabetes**, v. 55, n. 2, p. 466-73, 2006.

HSUEH, W. *et al.* Recipes for creating animal models of diabetic cardiovascular disease. **Circ Res**, v. 100, n. 10, p. 1415-27, 2007.

HU, F. B. *et al.* Diet, lifestyle, and the risk of type 2 diabetes mellitus in women. **N Engl J Med**, v. 345, n. 11, p. 790-7, 2001.

ILERCIL, A. *et al.* Associations of insulin levels with left ventricular structure and function in American Indians: the strong heart study. **Diabetes**, v. 51, n. 5, p. 1543-7, 2002.

IRIBARREN, C. *et al.* Glycemic control and heart failure among adult patients with diabetes. **Circulation**, v. 103, n. 22, p. 2668-73, 2001.

ISLAS-ANDRADE, S. *et al.* Streptozotocin and alloxan in experimental diabetes: Comparison of the two models in rats. **Acta Histochemica**, v. 33, n. 3, p. 201-208, 2000.

IWASHIMA, Y. *et al.* Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. **Hypertension**, v. 43, n. 6, p. 1318-23, 2004.

JAGASIA, D. *et al.* Effect of non-insulin-dependent diabetes mellitus on myocardial insulin responsiveness in patients with ischemic heart disease. **Circulation**, v. 103, n. 13, p. 1734-9, 2001.

JAKOBSEN, M. U. *et al.* Intake of carbohydrates compared with intake of saturated fatty acids and risk of myocardial infarction: importance of the glycemic index. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 6, p. 1764-8, 2010.

KAJSTURA, J. *et al.* IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress. **Diabetes**, v. 50, n. 6, p. 1414-24, 2001.

KHAN, S. E. The Importance of the beta-Cell in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. **American Journal of Medicine**, v. 108, n. 6A, p. 2S-8S, 2000.

KHAVANDI, K. *et al.* Diabetic cardiomyopathy--a distinct disease? **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 23, n. 3, p. 347-60, 2009.

KITAOKA, H. *et al.* Plasma adiponectin levels and left ventricular remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. **Int Heart J**, v. 51, n. 1, p. 51-5, 2010.

LACOMBE, V. A. *et al.* Mechanisms of impaired calcium handling underlying subclinical diastolic dysfunction in diabetes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 5, p. R1787-97, 2007.

LEE, Y. *et al.* Liporegulation in diet-induced obesity. The antisteatotic role of hyperleptinemia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 8, p. 5629-35, 2001.

LEHTO, S. *et al.* Dyslipidemia and hyperglycemia predict coronary heart disease events in middle-aged patients with NIDDM. **Diabetes**, v. 46, n. 8, p. 1354-9, 1997.

LEITE, S. O. Patogênese do pâncreas no diabetes tipo 2. In: R. L. N. Cavalcanti (Ed.). **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006. p.87-91.

LI, L. *et al.* Adiponectin modulates carnitine palmitoyltransferase-1 through AMPK signaling cascade in rat cardiomyocytes. **Regulatory Peptides**, v. 139, n. 1-3, p. 72-9, 2007.

LI, S. Y. *et al.* Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. **Diabetologia**, v. 49, n. 6, p. 1434-46, 2006.

LIANG, Q. *et al.* Overexpression of metallothionein reduces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 51, n. 1, p. 174-81, 2002.

LICHTENSTEIN, A. H. *et al.* Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. **N Engl J Med**, v. 340, n. 25, p. 1933-40, 1999.

LIVINGSTON, E. H.;KO, C. Y. Effect of diabetes and hypertension on obesity-related mortality. **Surgery**, v. 137, n. 1, p. 16-25, 2005.

LOPASCHUK, G. D.;FOLMES, C. D.;STANLEY, W. C. Cardiac energy metabolism in obesity. **Circulation Research**, v. 101, n. 4, p. 335-47, 2007.

LU, Z. *et al.* Decreased L-Type Ca²⁺ Current in Cardiac Myocytes of Type 1 Diabetic Akita Mice Due to Reduced Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling. **Diabetes**, v. 56, n. 11, p. 2780-2789, 2007.

LUIKEN, J. J. *et al.* Increased rates of fatty acid uptake and plasmalemmal fatty acid transporters in obese Zucker rats. **J Biol Chem**, v. 276, n. 44, p. 40567-73, 2001.

MAEDA, K. *et al.* cDNA cloning and expression of a novel adipose specific collagen-like factor, apM1 (AdiPose Most abundant Gene transcript 1). **Biochem Biophys Res Commun**, v. 221, n. 2, p. 286-9, 1996.

MALECKI, M. T. Genetics of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 68 Suppl1, n., p. S10-21, 2005.

MATOS, A. F. G.;GUEDES, E. P.;VIEIRA, A. O adipócito: funções e relação com a resistência à insulina e o diabetes. In: R. L. N. Cavalcanti (Ed.). **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006. p.117-121.

MAZUMDER, P. K. *et al.* Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. **Diabetes**, v. 53, n. 9, p. 2366-74, 2004.

MIKI, S. *et al.* Reduction of atherosclerosis despite hypercholesterolemia in lymph-deficient mice fed a high-fat diet. **Genes to Cells**, v. 6, n. 1, p. 37-42, 2001.

MILLS, E. *et al.* Hypertension in CB57BL/6J mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Am J Physiol**, v. 264, n. 1 Pt 2, p. R73-8, 1993.

MOHAN, V. *et al.* Association of low adiponectin levels with the metabolic syndrome--the Chennai Urban Rural Epidemiology Study (CURES-4). **Metabolism**, v. 54, n. 4, p. 476-81, 2005.

MOLKENTIN, J. D.;DORN, G. W., 2ND. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. **Annu Rev Physiol**, v. 63, n., p. 391-426, 2001.

MOLLER, D. E.;FLIER, J. S. Insulin resistance--mechanisms, syndromes, and implications. **N Engl J Med**, v. 325, n. 13, p. 938-48, 1991.

NICKOLA, M. W. *et al.* Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes. Role of NO. **Hypertension**, v. 36, n. 4, p. 501-5, 2000.

NICOLINO, A. *et al.* Left ventricular diastolic filling in diabetes mellitus with and without hypertension. **Am J Hypertens**, v. 8, n. 4 Pt 1, p. 382-9, 1995.

NIELSEN, L. B.;BARTELS, E. D.;BOLLANO, E. Overexpression of apolipoprotein B in the heart impedes cardiac triglyceride accumulation and development of cardiac dysfunction in diabetic mice. **J Biol Chem**, v. 277, n. 30, p. 27014-20, 2002.

NESTO, R. W. Diabetes and heart diseases. In: Zipes DP, Libby P, Bonow RO, Braunwald E. **Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine**. 7th ed. Philadelphia: WB Saunders Co., 2005. p. 1355-66.

NISHINA, P.M. *et al.* Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. **Journal of Lipid Research**, v. 34, n. 8, p. 1413-1422, 1993.

OKERE, I. C. *et al.* Low carbohydrate/high-fat diet attenuates cardiac hypertrophy, remodeling, and altered gene expression in hypertension. **Hypertension**, v. 48, n. 6, p. 1116-23, 2006.

OKOSHI, K. *et al.* Miocardiopatia Diabética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 160-167, 2007.

OLIVEIRA JUNIOR, S. A. *et al.* Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. **Med Sci Monit**, v. 16, n. 7, p. BR208-17, 2010.

ONAT, A. *et al.* Sex difference in development of diabetes and cardiovascular disease on the way from obesity and metabolic syndrome. **Metabolism**, v. 54, n. 6, p. 800-8, 2005.

OOMEN, C. M. *et al.* Association between trans fatty acid intake and 10-year risk of coronary heart disease in the Zutphen Elderly Study: a prospective population-based study. **Lancet**, v. 357, n. 9258, p. 746-51, 2001.

OPIE, L. H.;SACK, M. M. Signal Systems: Coordinating life and death. In: L. H. Opie (Ed.). **Heart Physiology: from cell to circulation**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2004.

OTERO, M. *et al.* Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin. **Rheumatology (Oxford)**, v. 45, n. 8, p. 944-50, 2006.

OUCHI, N.;WALSH, K. Adiponectin as an anti-inflammatory factor. **Clin Chim Acta**, v. 380, n. 1-2, p. 24-30, 2007.

Ouwens, D. M. *et al.* Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. **Diabetologia**, v. 48, n. 6, p. 1229-37, 2005.

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

PAIGEN, B. Genetics of responsiveness to high-fat and high-cholesterol diets in the mouse. **Am J Clin Nutr**, v. 62, n. 2, p. 458S-462S, 1995.

PAREKH, P. I. *et al.* Reversal of diet-induced obesity and diabetes in C57BL/6J mice. **Metabolism**, v. 47, n. 9, p. 1089-96, 1998.

PARRY, S. W. *et al.* The intravenous adenosine test: a new test for the identification of bradycardia pacing indications? A pilot study in subjects with bradycardia pacing indications, vasovagal syncope and controls. **QJM**, v. 102, n. 7, p. 461-8, 2009.

PEREIRA, L. *et al.* Mechanisms of $[Ca^{2+}]_i$ transient decrease in cardiomyopathy of db/db type 2 diabetic mice. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 608-15, 2006.

PETERSON, L. R. *et al.* Fatty acids and insulin modulate myocardial substrate metabolism in humans with type 1 diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 1, p. 32-40, 2008.

PETERSON, L. R. *et al.* Effect of obesity and insulin resistance on myocardial substrate metabolism and efficiency in young women. **Circulation**, v. 109, n. 18, p. 2191-6, 2004.

PETRO, A. E. *et al.* Fat, carbohydrate, and calories in the development of diabetes and obesity in the C57BL/6J mouse. **Metabolism**, v. 53, n. 4, p. 454-7, 2004.

PINEIRO, R. *et al.* Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. **FEBS Letters**, v. 579, n. 23, p. 5163-9, 2005.

PISCHON, T. *et al.* Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. **JAMA**, v. 291, n. 14, p. 1730-7, 2004.

POIRIER, P. *et al.* Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabetes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. **Diabetes Care**, v. 24, n. 1, p. 5-10, 2001.

POORNIMA, I. G.;PARIKH, P.;SHANNON, R. P. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. **Circulation Research**, v. 98, n. 5, p. 596-605, 2006.

POP-BUSUI, R. Cardiac autonomic neuropathy in diabetes: a clinical perspective. **Diabetes Care**, v. 33, n. 2, p. 434-41, 2010.

POP-BUSUI, R. *et al.* Sympathetic dysfunction in type 1 diabetes: association with impaired myocardial blood flow reserve and diastolic dysfunction. **J Am Coll Cardiol**, v. 44, n. 12, p. 2368-74, 2004.

RUBLER, S., *et al.* New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. **Am J Cardiol Nov**, v. 8, n. 6, p.595-602, 1972.

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

RAJAPUROHITAM, V. *et al.* An autocrine role for leptin in mediating the cardiomyocyte hypertrophic effects of angiotensin II and endothelin-1. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, n. 2, p. 265-74, 2006.

REBUFFE-SCRIVE, M. *et al.* Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Metabolism**, v. 42, n. 11, p. 1405-9, 1993.

REGAN, T. J. *et al.* Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. **J Clin Invest**, v. 60, n. 4, p. 884-99, 1977.

RHODES, C. J. Type 2 diabetes-a matter of beta-cell life and death? **Science**, v. 307, n. 5708, p. 380-4, 2005.

ROGERS, R. G.;HUMMER, R. A.;KRUEGER, P. M. The effect of obesity on overall, circulatory disease- and diabetes-specific mortality. **J Biosoc Sci**, v. 35, n. 1, p. 107-29, 2003.

RON, D. Proteotoxicity in the endoplasmic reticulum: lessons from the Akita diabetic mouse. **J Clin Invest**, v. 109, n. 4, p. 443-5, 2002.

ROSAMOND, W. *et al.* Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. **Circulation**, v. 115, n. 5, p. e69-171, 2007.

ROTTMAN, J. N.;NI, G.;BROWN, M. Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. **Echocardiography**, v. 24, n. 1, p. 83-9, 2007.

RUSSELL, J. C.;PROCTOR, S. D. Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. **Cardiovasc Pathol**, v. 15, n. 6, p. 318-30, 2006.

RUSTUM, M. D.;RUSTUM, B. R. Alternating Bundle Branch Block Associated with Alternating Atrioventricular Conduction:24 hours outpatient registration. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado do Rio de Janeiro**, v. 22, n. 1, p. 59-62, 2009.

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

SCHANNWELL, C. M. *et al.* Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. **Cardiology**, v. 98, n. 1-2, p. 33-9, 2002.

SCHMID, H. Impacto Cardiovascular da Neuropatia Autonômica do Diabetes Mellitus. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51, n. 2, p. 232-243, 2007.

SCHNELL, O. *et al.* Reduced myocardial ¹²³I-metaiodobenzylguanidine uptake in newly diagnosed IDDM patients. **Diabetes**, v. 45, n. 6, p. 801-5, 1996.

SCHULZE, M. B. *et al.* Adiponectin and future coronary heart disease events among men with type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 54, n. 2, p. 534-9, 2005.

SEMENIUK, L. M.;KRYSKI, A. J.;SEVERSON, D. L. Echocardiographic assessment of cardiac function in diabetic db/db and transgenic db/db-hGLUT4 mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 283, n. 3, p. H976-82, 2002.

SHARMA, N. *et al.* Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy. **Cardiovascular Research**, v. 73, n. 2, p. 257-68, 2007.

SHARMA, S. *et al.* Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. **FASEB J**, v. 18, n. 14, p. 1692-700, 2004.

SHARMA, V.;MCNEILL, J. H. Diabetic cardiomyopathy: where are we 40 years later? **Can J Cardiol**, v. 22, n. 4, p. 305-8, 2006.

SHEN, X. *et al.* Cardiac mitochondrial damage and biogenesis in a chronic model of type 1 diabetes. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 287, n. 5, p. E896-905, 2004.

SHIBATA, R. *et al.* Adiponectin-mediated modulation of hypertrophic signals in the heart. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1384-9, 2004.

SHIOJIMA, I.;WALSH, K. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. **Circ Res**, v. 90, n. 12, p. 1243-50, 2002.

SHOELSON, S. E.;LEE, J.;GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 116, n., p. 1793-1801, 2006.

SHULMAN, G. I. Cellular mechanisms of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 2, p. 171-6, 2000.

SINGH, V. P. *et al.* Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. **Diabetes**, v. 57, n. 12, p. 3297-306, 2008.

SNADER, C. E. *et al.* Importance of estimated functional capacity as a predictor of all-cause mortality among patients referred for exercise thallium single-photon emission computed tomography: report of 3,400 patients from a single center. **J Am Coll Cardiol**, v. 30, n. 3, p. 641-8, 1997.

SONG, Y. *et al.* Diabetic Cardiomyopathy in OVE26 Mice Shows Mitochondrial ROS Production and Divergence Between In Vivo and In Vitro Contractility. **Rev Diabet Stud**, v. 4, n. 3, p. 159-68, 2007.

SOWERS, J. R. Obesity as a cardiovascular risk factor. **Am J Med**, v. 115 Suppl 8A, n., p. 37S-41S, 2003.

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

SRINIVASAN, K.;RAMARAO, P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. **Indian J Med Res**, v. 125, n. 3, p. 451-72, 2007.

STANLEY, W. C.;LOPASCHUK, G. D.;MCCORMACK, J. G. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. **Cardiovascular Research**, v. 34, n. 1, p. 25-33, 1997.

STERN, M. P. The case for randomized clinical trials on the treatment of obesity. **Obes Res**, v. 3 Suppl 2, n., p. 299s-306s, 1995.

STEVENS, M. J. *et al.* Cardiac sympathetic dysinnervation in diabetes: implications for enhanced cardiovascular risk. **Circulation**, v. 98, n. 10, p. 961-8, 1998.

STEVENS, M. J. *et al.* Regression and progression of cardiac sympathetic dysinnervation complicating diabetes: an assessment by C-11 hydroxyephedrine and positron emission tomography. **Metabolism**, v. 48, n. 1, p. 92-101, 1999.

STUCKEY, D. J. *et al.* Novel MRI method to detect altered left ventricular ejection and filling patterns in rodent models of disease. **Magn Reson Med**, v. 60, n. 3, p. 582-7, 2008.

STUMVOLL, M.;GOLDSTEIN, B. J.;VAN HAEFTEN, T. W. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. **Lancet**, v. 365, n. 9467, p. 1333-46, 2005.

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

SUAREZ, J. *et al.* In vivo adenoviral transfer of sorcin reverses cardiac contractile abnormalities of diabetic cardiomyopathy. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 286, n. 1, p. H68-75, 2004.

SUAREZ, J.;SCOTT, B.;DILLMANN, W. H. Conditional increase in SERCA2a protein is able to reverse contractile dysfunction and abnormal calcium flux in established diabetic cardiomyopathy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 295, n. 5, p. R1439-45, 2008.

SURWIT, R. S. *et al.* Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. **Metabolism**, v. 44, n. 5, p. 645-51, 1995.

SYMONS, J. D. *et al.* Contribution of insulin and Akt1 signaling to endothelial nitric oxide synthase in the regulation of endothelial function and blood pressure. **Circ Res**, v. 104, n. 9, p. 1085-94, 2009.

TAKANO, H. *et al.* Adiponectin is released from the heart in patients with heart failure. **International Journal of Cardiology**, v. 132, n. 2, p. 221-6, 2009.

TANG, T.;REED, M. J. Exercise adds to metformin and acarbose efficacy in db/db mice. **Metabolism**, v. 50, n. 9, p. 1049-53, 2001.

TARASOUTCHI, F.;SAMPAIO, R. O.;GRINBERG, M. Aplicações clínicas do eletrocardiograma nas afecções valvares. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 9, n. 3, p. 301-311, 1999.

THRAINSDOTTIR, I. S. *et al.* The association between glucose abnormalities and heart failure in the population-based Reykjavik study. **Diabetes Care**, v. 28, n. 3, p. 612-6, 2005.

TSAI, Y. S. *et al.* Hypertension and abnormal fat distribution but not insulin resistance in mice with P465L PPARgamma. **J Clin Invest**, v. 114, n. 2, p. 240-9, 2004.

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

UNVERFERTH, D. V. *et al.* Atrial fibrillation in mitral stenosis: histologic, hemodynamic and metabolic factors. **Int J Cardiol**, v. 5, n. 2, p. 143-54, 1984.

UTRIAINEN, T. *et al.* Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM. **Diabetologia**, v. 41, n. 5, p. 555-9, 1998.

VINIK, A. I.;ZIEGLER, D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. **Circulation**, v. 115, n. 3, p. 387-97, 2007.

WAJCHENBERG, B. L. *et al.* Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 53, n. 2, p. 145-50, 2009.

WANG, J. *et al.* Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. **The Review of Diabetic Studies**, v. 3, n. 3, p. 108-17, 2006.

WANG, L.;SWIRP, S.;DUFF, H. Age-dependent response of the electrocardiogram to K(+) channel blockers in mice. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 1, p. C73-80, 2000.

WANG, P. *et al.* Impact of altered substrate utilization on cardiac function in isolated hearts from Zucker diabetic fatty rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 288, n. 5, p. H2102-10, 2005.

WARENSJO, E. *et al.* Factor analysis of fatty acids in serum lipids as a measure of dietary fat quality in relation to the metabolic syndrome in men. **Am J Clin Nutr**, v. 84, n. 2, p. 442-8, 2006.

WEI, P. *et al.* Glomerular structural and functional changes in a high-fat diet mouse model of early-stage Type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 47, n. 9, p. 1541-9, 2004.

- WEISBERG, S.P. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-1808, 2003.
- WELLEN, K. E.;HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation, stress, and diabetes. **J Clin Invest**, v. 115, n. 5, p. 1111-9, 2005.
- WEYER, C. *et al.* Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 5, p. 1930-5, 2001.
- WILLETT, W. C. Trans fatty acids and cardiovascular disease-epidemiological data. **Atheroscler Suppl**, v. 7, n. 2, p. 5-8, 2006.
- WILLIAMS, T. D. *et al.* Diet-induced obesity and cardiovascular regulation in C57BL/6J mice. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** v. 30, n. 10, p. 769-78, 2003.
- WINZELL, M. S.;AHREN, B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53 Suppl 3, n., p. S215-9, 2004.
- WOHLERS, M. *et al.* Participation of corticosteroids and effects of indomethacin on the acute inflammatory response of rats fed n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acid-rich diets. **Inflammation**, v. 27, n. 1, p. 1-7, 2003.
- WOLD, L. E.;REN, J. Streptozotocin directly impairs cardiac contractile function in isolated ventricular myocytes via a p38 map kinase-dependent oxidative stress mechanism. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 318, n. 4, p. 1066-71, 2004.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diabetes. Fact Sheet No312. 2006.
- WRIGHT, J. J. *et al.* Mechanisms for increased myocardial fatty acid utilization following short-term high-fat feeding. **Cardiovasc Res**, v. 82, n. 2, p. 351-60, 2009.
- YE, G. *et al.* Catalase protects cardiomyocyte function in models of type 1 and type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 53, n. 5, p. 1336-43, 2004.
- YOUNG, M. E.;MCNULTY, P.;TAEGTMEYER, H. Adaptation and maladaptation of the heart in diabetes: Part II: potential mechanisms. **Circulation**, v. 105, n. 15, p. 1861-70, 2002.
- YUAN, M. *et al.* Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. **Science**, v. 293, n. 5535, p. 1673-7, 2001.

YUE, P. *et al.* Magnetic resonance imaging of progressive cardiomyopathic changes in the *db/db* mouse. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 292, n. 5, p. H2106-2118, 2006.

ZECCHIN, H. G.;SAAD, M. J. A. Resistência insulínica no diabetes mellitus tipo 2. In: R. L. N. Cavalcanti (Ed.). **Diabetes mellitus**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2006. p.93-103.

ZENG, G. *et al.* Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. **Circulation**, v. 101, n. 13, p. 1539-45, 2000.

ZIMMET, P.;ALBERTI, K. G.;SHAW, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. **Nature**, v. 414, n. 6865, p. 782-7, 2001.

APÉNDICE

Development of nonalcoholic steatohepatitis and adenoma in inbred mice submitted to a high-fat diet.

Siane Campos Souza¹, Alice Costa Kiperstok¹, Ludmila Chaves Fonseca¹, Wilson Carvalho², Ricardo Ribeiro-dos-Santos^{1,2}, Milena Botelho Pereira Soares^{1,2*}, Luiz Antônio Rodrigues de Freitas^{1*}.

¹Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil

²Hospital São Rafael, Salvador, Bahia, Brazil

*** Corresponding authors:**

Luiz Antônio Rodrigues de Freitas

Laboratório de Patologia e Biointervenção, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

FIOCRUZ - Rua Waldemar Falcão, 121 - Candeal – Salvador, BA, Brazil -

40296-710

Phone: +55 71 3176 2210 ; Fax: +55 71 3176 2290

E-mail: lfreitas@bahia.fiocruz.br

Milena Botelho Pereira Soares

Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Centro de Pesquisas

Gonçalo Moniz, FIOCRUZ - Rua Waldemar Falcão, 121 - Candeal – Salvador,

BA, Brazil - 40296-710

Phone: +55 71 3176 2260 ; Fax: +55 71 3176 2272

E-mail: milena@bahia.fiocruz.br

Abstract

Background/Aims: Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a chronic liver disease associated with obesity, type-2 diabetes, and hyperlipidemia. Here we describe an experimental model of NASH induced by a high fat diet (HFD).

Methods: Male C57Bl/6 mice were fed for 12 months with a HFD (58 cal% fat) or a low fat diet. Animals were examined at different time points for weight gain, serum transaminases (AST and ALT), serum cholesterol and triglycerides, fasting blood glucose, and histological liver alterations.

Results: Mice fed with HFD became obese, developed glucose intolerance and hyperglycemia, had high aminotransferases levels, and increased concentration of total serum cholesterol and triglycerides. Histological analysis of the liver showed macro and microvacuolar steatosis, ballooning hepatocytes, Mallory bodies, inflammatory cell infiltration, and perisinusoidal/pericellular fibrosis. The presence of adenoma was detected in livers of mice fed over 10 months with HFD.

Conclusions: Our results indicate that the HFD model successfully reproduces many of the typical aspects of NASH, being a model very similar to the natural history of human nonalcoholic fatty liver disease spectra, reproducing many of its laboratory and histopathological features, and therefore can be use useful to the understanding of NASH pathogenesis and its treatment. Furthermore, this model may be useful to the understanding of liver oncogenesis in the context of metabolic syndrome.

Keywords: Nonalcoholic steatohepatitis (NASH); Obesity; High fat diet; Mice

1. Introduction

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered one of the most prevalent chronic liver diseases in the Western world, leading to important public health problems (4). It is the primary cause of cryptogenic cirrhosis in the United States and other developed countries (25). NAFLD comprises a wide spectrum of liver diseases, ranging from simple steatosis to steatohepatitis that can evolve to advanced fibrosis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma (33). Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) refers to a stage within the spectrum of NAFLD characterized by hepatic steatosis, presence of ballooning hepatocytes, inflammation, and fibrosis (22). Its occurrence is related to the risk of evolution to advanced forms of liver disease, including cirrhosis(18).

Despite the high prevalence of NAFLD and its potential to evolve to end stages of liver disease, the underlying pathogenic mechanisms leading to the progression of fatty liver to NASH and cirrhosis are poorly understood (22). It is largely accepted the involvement of at least two different steps or hits. In the first hit, a metabolic disturbance induces accumulation of triglycerides in the cytoplasm of hepatic cells. In some subjects the second hit induces oxidative stress to the liver, resulting in injury to the hepatocytes, inflammation, and progressive fibrosis. Pro-inflammatory agents such as LPS and TNF are thought to be involved in the induction of the oxidative stress, although free fatty acids (FFAs) that are increased in obesity and metabolic syndrome may also induce the production of reactive oxygen species by the mitochondria (10, 15, 33). A better understanding of the pathogenesis of the disease may contribute to the development of therapeutic options for NASH, to which, to date, no therapy has been proven effective (15, 37).

The high prevalence of obesity and type 2 diabetes in the population is likely responsible for the increasing number of individuals with fatty liver (7). This close association suggested that NAFLD must be included as a component of the metabolic syndrome, which consists of a wide range of cardiovascular risk factors (2, 16, 25). Insulin resistance, obesity, type 2 diabetes, and dyslipidemia frequently coexist with NAFLD. In particular, the association of obesity and diabetes may pose an additional risk to the progression to advanced liver disease (6, 22).

A number of studies have documented the presence of hyperinsulinemia and abnormal glucose tolerance in patients with NAFLD (20), suggesting that insulin resistance, which often occurs in conjunction with other metabolic disorders, may be a primary phenomenon in the development of hepatic steatosis and NASH (25). On the other hand, obesity is also strongly associated with nonalcoholic fatty liver disease (14). In addition to the genetic component, high caloric intake is another important factor of obesity. Many studies have demonstrated that normal rats become obese and develop hepatic steatosis when fed with a high fat diet *ad libitum* (37).

To understand the pathogenic mechanisms of NASH and develop novel therapeutic strategies, it is necessary the establishment of a suitable experimental model. Several animal models of NASH, such as rodents fed methionine-choline-deficient (MCD) diet or genetically manipulated mice, have been used (10, 15). However, these pathogenic factors are not common in human patients with NASH and models with metabolic abnormalities similar to those found in humans have rarely been reported, particularly in mice (37). In the present study we used an experimental model of NASH in non-genetically

modified mice that mimics many of the clinical and histopathological features described in patients with NASH related to metabolic syndrome. This model may be very useful to the understanding of many aspects of the pathogenesis of NASH, as well as to test new therapeutic approaches.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Four weeks-old C57Bl/6 male mice were housed in a temperature controlled room (20° C) on a 12-hour light/dark cycle and had free access to water. The animals were fed with a high fat diet (HFD), with a control hypercaloric, low fat diet (LFD), or with a control balanced diet (CBD) ad libitum for 12 months, starting immediately upon weaning at 4 weeks of age. The HFD (D12330) containing 58% kcal from fat hydrogenated coconut oil and the LFD (D12328) 10.5% kcal, both were purchased from Research Diets (New Brunswick, NJ, USA). CBD was purchased from Biobase (Águas Frias, SC, BRA). Animals from both HFD and control groups were weighted at different time points. All experimental protocols used in this study were approved by the local Animal Ethics Committee

2.2. Assessment of blood biochemical parameters

During the study fasting blood glucose was measured using an AccuChek Glucometer (Roche Diagnostic Corporation, Basel, Switzerland). After 6 months of HFD or control diet feeding, the animals were subjected to a glucose tolerance test, in which mice were fasted for 4 hours and blood samples were drawn from the tail at 0, 15, 30, 60, and 120 min after

intraperitoneal (i.p.) injection of D-glucose (2 g/kg of body weight; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). At the end of the diet period, the plasma levels of total cholesterol, glucose, alanine transaminase (ALT), aspartate transaminases (AST) and triglycerides were measured using conventional laboratory tests.

2.3. Histological analysis

Liver fragments from all animals were fixed in 10% saline formaldehyde and then embedded in paraffin. Three μm -thick sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) or picro-sirius red counterstained with hematoxylin and Gomori reticulin, to evaluate fibrosis. The presence and extent of steatosis, ballooning hepatocytes, Mallory bodies, inflammatory infiltrate, necrosis, and perisinusoidal, septal, and portal fibrosis were evaluated in the liver sections by the same pathologist, which was unaware of the biochemical results and diet status of the mice.

2.4. Statistical analyses

All data analyses were conducted using Prism Software (version 4.0; GraphPad Software, San Diego, CA). Data are shown as the means \pm SEM, and the statistical comparisons were performed with Student's *t* test. We considered *p* values < 0.05 to be statistically significant.

3. Results

3.1. Body weight and plasma biochemical parameters

Adult C57Bl/6 male mice were fed with a high fat diet to induce obesity and glucose tolerance or with a control diet. After 10 weeks of feeding, the mice

on a high fat diet had an increased weight compared to age-matched controls (Figures 1A and 2A). At later time points, the weight of HFD-fed mice was in average 20 g higher than those of control mice (Figure 2A).

The fasting blood glucose levels in the mice fed with the control diet remained approximately 160 mg/dL during all the study, whereas the glucose levels of mice fed the high fat diet were significantly elevated after 10 weeks ($p < 0.0001$), indicating the beginning of a hyperglycemic stage (Figure 2B). After 6 months, HFD-fed mice developed persistent hyperglycemia characterized by elevations in fasting plasma glucose and by an impaired glucose tolerance test (Figure 2C).

The concentrations of transaminases, triglycerides, and total cholesterol in the blood of mice fed with control or high fat diets for 12 months are shown in Figure 3. Triglycerides and cholesterol concentrations, which directly reflect the amount of ingested fat, were elevated in HFD-fed mice compared with control mice. Alanine aminotransferase (ALTs) and aspartate aminotransferase (ASTs) levels were increased in serum of HFD-fed mice, compared to the control group.

3.2. Morphological analysis

Mice fed with HFD developed hepatic morphological alterations akin to those described in human non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Hepatic changes similar to non-alcoholic hepatitis (NASH) were seen in all mice fed during 12 months with HFD. Histological analyses of liver sections stained with H&E showed macro and microvesicular steatosis of hepatocytes located around terminal hepatic, mainly in zones 3 and 2 of the acini (Figure 4A). These

alterations were accompanied by variable degrees of ballooning hepatocytes (Figure 4B). Some of these hepatocytes with enlarged and clear cytoplasm also had Mallory bodies (Figure 4C). Few foci of mixed inflammatory infiltrate composed by mononuclear inflammatory cells and neutrophils were seen scattered in the hepatic parenchyma around degenerated or necrotic hepatocytes (Figure 4D). Picrosirius-red staining revealed perisinusoidal and pericellular fibrosis in zones 3 and 2 of the acini (Figure 4E). Thin fibrous septa connecting terminal veins to terminal veins or portal tracts were seen in some mice, suggesting a progression to cirrhosis (Figure 4F). Liver sections from mice that received CBD diet did not show steatosis nor perisinusoidal fibrosis. Well preserved hepatocytes were seen in zones 1, 2 and 3 of the Rappaport liver acinus (data not shown).

Hepatic tumors were found in three mice out of 16 with NAFLD associated with HFD. As depicted in figure 2, tumors presented as non-encapsulated and well circumscribed yellowish nodules. Histological examination revealed that the tumors were composed of well differentiated hepatic cells arranged in sheets and cords. Acinar architecture was not recognized and tumor growth compressed the surrounding non-tumorous liver parenchyma (Figure 5). Frequently hepatocytes within the tumors contained large lipid droplets or had features of ballooning cells with occasional Mallory bodies in their cytoplasm. Neoplastic cells were not seen invading blood vessels nor portal tracts stroma and therefore the tumors were classified as liver cell adenomas.

4. Discussion

In the present study we describe an experimental model of NASH induced in C57Bl/6 mice by feeding with a hypercaloric and high fat commercial diet. Mice developed progressive obesity and changes related to metabolic syndrome, such as glucose intolerance, hypertriglyceridemia, and hypercholesterolemia, and, at latter stages, hyperglycemia and type 2 diabetes. Biochemical liver tests showed high serum levels of aminotransferases. Histological liver alterations at 10 and 12 months after the introduction of the HFD included: (i) severe hepatocellular macro and microvesicular steatosis, (ii) cytoplasmic ballooning, (iii) hyaline Mallory bodies, (iv) hepatocellular necrosis, (v) foci of mixed inflammatory infiltrate, and (vi) perisinusoidal and septal fibrosis. These morphological changes, associated with obesity, hyperglycemia and dyslipidemia, are identical to those described in NASH in human patients with metabolic syndrome.

An additional finding in the present study was the occurrence of liver cell neoplasia in three mice fed with HFD that developed NASH. The tumors were composed of well differentiated hepatocytes forming expansible nodules that compressed surrounding non-tumorous liver parenchyma. Vascular invasion by neoplastic cells was not observed. The tumors were classified as liver cell adenomas based on the grade of differentiation of the hepatocytes, cell density similar to that of the non-neoplastic surrounding tissue, and in the absence of vascular and/or stromal invasion (21). However, it is not possible to rule out that they represent well differentiated hepatocellular carcinomas (HCC). The findings of liver cell adenoma and HCC have been reported in other experimental murine models of NAFLD (28, 35). Hepatocyte-specific

phosphatase and tensin homolog (PTEN) deficient mice present liver alterations similar to those described in NASH and develop liver cell adenomas and HCC. PTEN is a suppressor gene that down-regulates phosphatidylinositol-3-kinases. Its deficiency is implicated in many sporadic and hereditary human cancers. Different from our model, mice do not develop other features of metabolic syndrome. Furthermore, we did not find reports on human cases of NASH related to mutations on this specific gene. One study describes the development of liver cell adenomas and HCC in transgenic mice expressing retinoic acid receptor dominant negative form. Loss of retinoic acid signals impairs mitochondrial fatty acid β -oxidation and causes liver steatosis. Hepatocarcinogenesis is associated with activation of the Wnt pathway and oxidative stress. More recently, Paradis et al. (2009) described well differentiated HCCs associated with liver cell adenoma in patients with metabolic syndrome in livers without significant fibrosis (23). They suggest that the well known multi-step progression from fibrosis to cirrhosis and from that to HCC may not be the main pathway to the development of HCC in the context of metabolic syndrome. It is possible that factors related to the metabolic syndrome *per se* and recognized as potential risk factor for HCC, such as obesity, type 2 diabetes hiperinsulinimia, free reactive oxygen species, and lipid peroxidation, are involved in liver cell oncogenesis in humans, as well as in the model of NAFLD presented herein (3, 5, 9, 19). The presence of adenoma associated with HCC in many cases suggests that mechanisms involved in the progression of adenoma to HCC are a pathway to be investigated.

There are only few reports on the development of NASH in mice associated with obesity and metabolic syndrome in which animals were not

genetically manipulated, or that the “second hit” was not induced by an external stimulus such as LPS or tetracycline injections (10, 11). To our knowledge, this is the first description of a mouse model of NAFLD with progression to NASH and liver tumor associated with obesity and metabolic syndrome in which animals were not genetically manipulated.

Mouse models of human diseases have several advantages, such as the small size of the animals, short generation interval, easy availability, and low costs, compared to large/non rodent animal species, and can be kept under controlled environmental conditions. Moreover, inbred animal models, in which the genetic background is uniform, are valuable not only for genetic studies of multifactorial diseases (29), but also because the results are more homogeneous than outbred animals (13) .

The increase in dietary fat content has been shown to produce diabetes and obesity in various strains of mice and rats. The B6 mouse strain is a particularly good model of human metabolic syndrome because it develops a syndrome of obesity, hyperinsulinemia, hyperglycemia, and hypertension when allowed *ad libitum* access to a high-fat diet, but not to a low-fat diet (31). Other strains, such as A or C57BL/Ks, are relatively resistant to these effects of a high-fat diet, compared to B6 mice (24, 30, 32). The development of insulin resistance, hyperglycemia, and obesity in the B6 mouse closely parallels the progression of common forms of the human disease. For example, the onset of diabetes and obesity in humans occurs gradually and often in the presence of a high-fat diet (36).

Recently, a high-fat, high-calorie liquid diet was able to reproduce some features of NASH in rats (25). However, the liquid diet represents a time-

consuming method that was used for only three weeks and did not induce significant changes in body weight, as compared with the standard diet group (25). One other study using this model did not succeed in inducing NASH (1). The type of dietary fat may also be an important factor. A number of studies have been conducted in the MCD diet model, which exhibits histological features similar to those observed in NASH patients (8). However, treatment with MCD diet decreases body weight and increases insulin sensitivity in rodents, findings rarely seen in NASH patients (12, 17, 26). Considering the diverse etiology of human NASH, the knowledge of the direct impact of diet composition, as well as species differences, in the development of NASH are critical issues to be addressed.

Type 2 diabetes, hyperglycemia, and glucose intolerance, found in 20%-75% of adult patients with NASH (25), were seen in our mouse model of NASH. The glucose intolerance observed in this model suggests an increase of insulin resistance, considered to play a primary role in NASH pathogenesis (4). Some mouse strains with phenotype of obesity and insulin resistance, such as *ob/ob* and *db/db*, although helpful in identifying factors involved in obesity-induced diabetes, present disadvantages, such as the spontaneous type 2 diabetic obesity model caused by an autosomal recessive mutation in the leptin or leptin receptor genes, respectively. These mice develop peripheral leptin resistance and, although severe obesity due to leptin deficiency has been documented in humans, its occurrence is extremely rare. In addition, the high-fat diet-fed C57Bl/6 mouse model exhibited marked fasting and basal hyperglycemias, in contrast to normal basal glucose levels seen in C57Bl/6 (*ob/ob*) mice (29).

Thus, the HFD-fed model more closely resembles the human NASH pathology and may therefore provide insights into other aspects of the disease.

Genetically obese *db/db* mice on MCD diet develop NAFLD and, although MCD diet exposure causes significant reductions in body weight in this model, the MCD-*db/db* mice exhibited metabolic abnormalities and severe steatohepatitis (27). MCD diet induces NASH in C57Bl/6 mice, characterized by the presence of liver steatosis, increased triglycerides, inflammation, increased levels of tumor necrosis factor, and fibrosis (34).

Progress in the understanding of the pathogenesis and pathophysiology of NASH has been hampered by the lack of experimental models that adequately reproduce features of the human disease (33). While several models of steatosis exist, very few of steatohepatitis are available (20). We described here a new spontaneous mouse model of NASH induced by simply feeding high fat diet to a non-obese, non-diabetic and non-genetically manipulated mouse strain. In conclusion, the model reproduces all clinical indices of NAFLD and NASH pathology, recapitulating the key features of NASH associated with the most common etiological background in humans and may be very useful to the understanding of many aspect of this emerging disease.

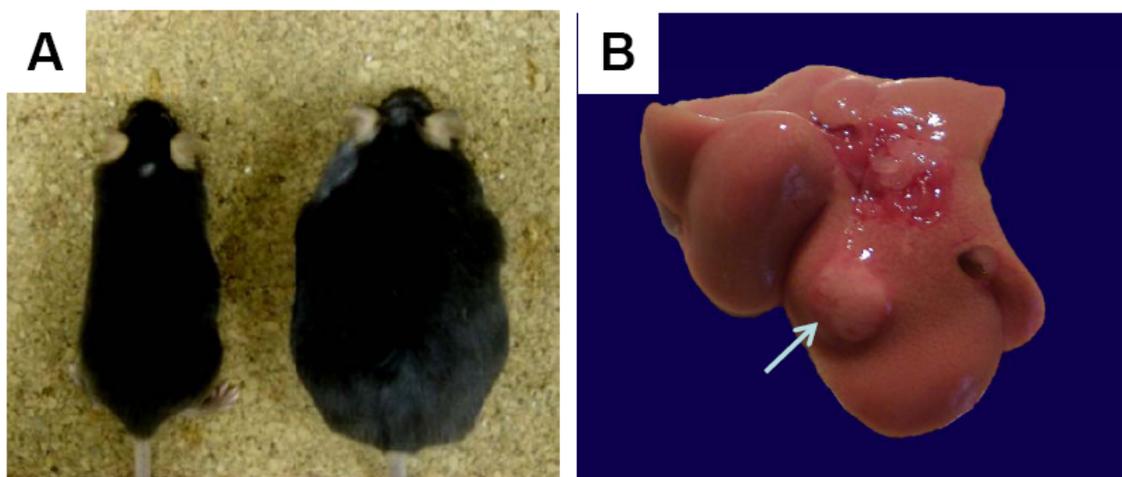


Figure 1: Increased body size and macroscopic liver alterations in mice fed with high-fat diet. **A**, Male C57Bl/6 mice fed with control (left) or high-fat (right) diets. **B**, Liver from a C57Bl/6 mouse submitted to HFD during one year, showing fat accumulation and altered color. Arrow indicates the presence of a tumor identified as a hepatocellular adenoma.

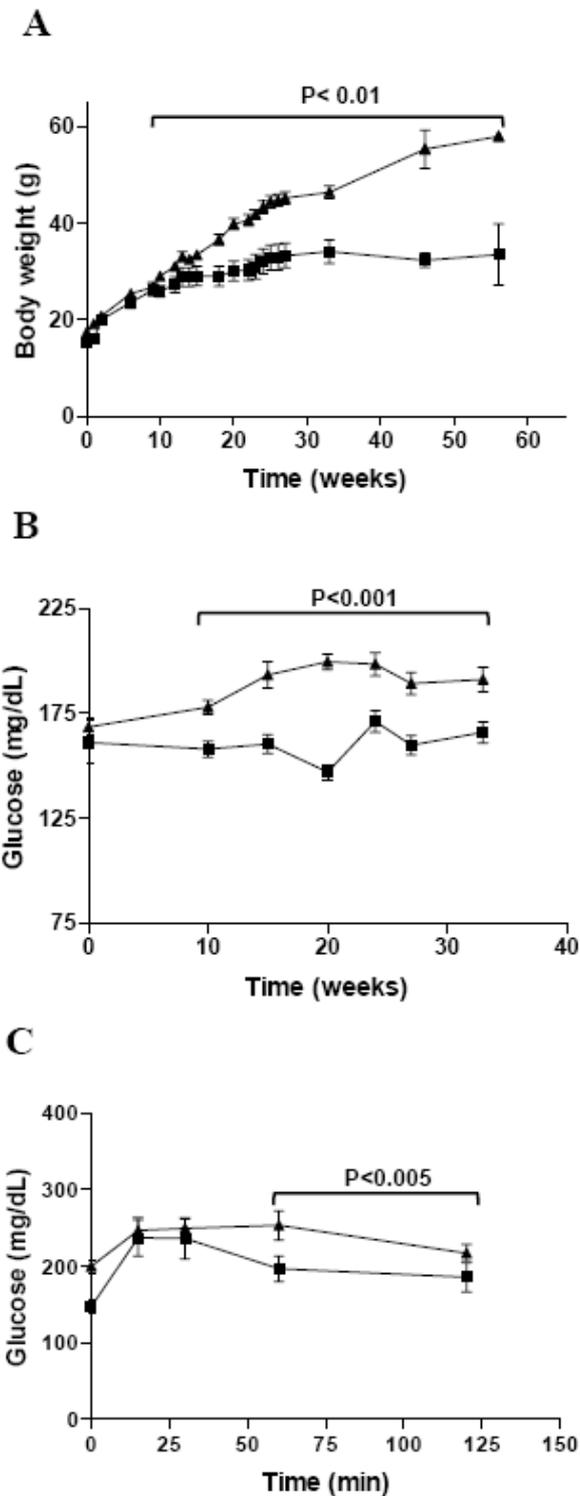


Figure 2: Obesity and diabetes in C57Bl/6 mice fed with high-fat diet. A and B, Weight gain and fasting blood glucose curves of C57Bl/6 mice fed with control (squares) or high-fat (triangles) diets. **C,** Glucose tolerance test in C57Bl/6 mice fed with control (squares) or high-fat (triangles) diets during 6 months. Mice were fasted for 4 h and treated i.p. with a D-glucose solution (2 g/kg of body weight). Blood samples were collected from the tail vein at 0, 15, 30, 60, and 120 min later for determination of blood glucose levels using a glucometer. Values represent the means \pm SEM of 10-20 mice/group.

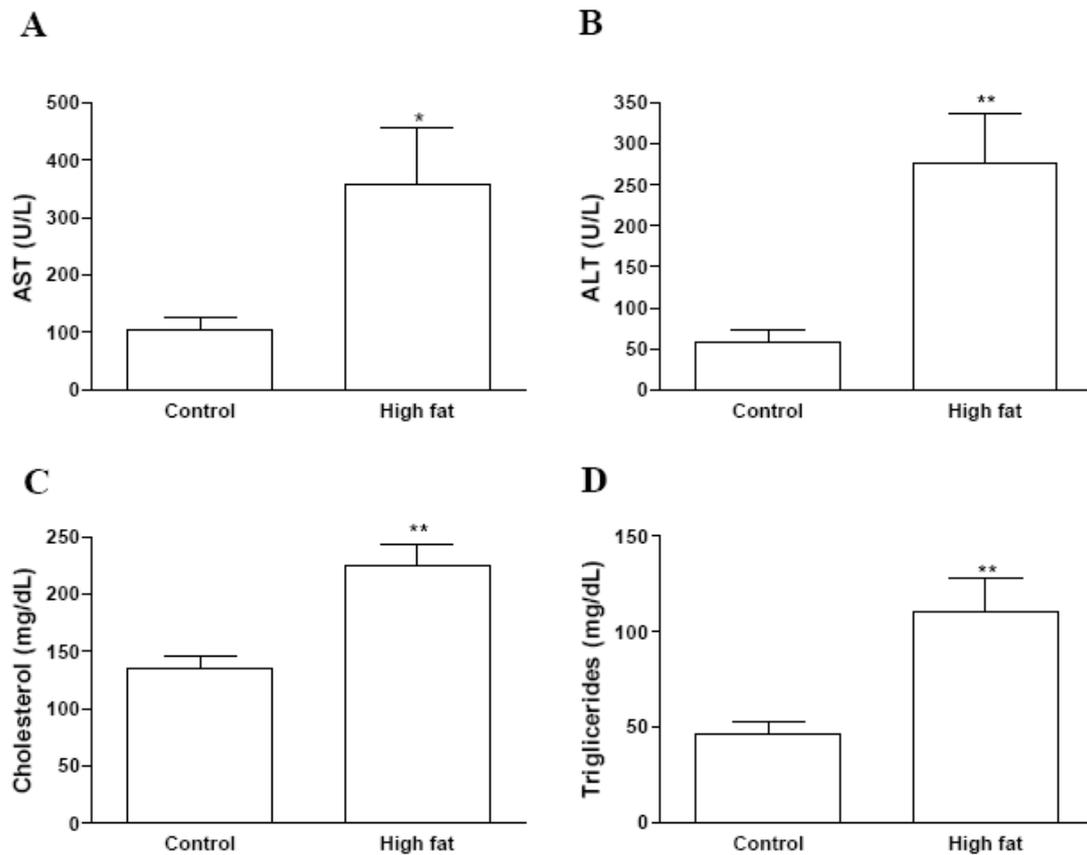


Figure 3: Biochemical alterations in mice submitted to a high-fat diet. Plasma levels of aspartate transaminases (AST) (A), alanine transaminase (ALT) (B), total cholesterol, (C), and triglycerides (D) of mice submitted to a control or high-fat diets for one year. Values represent the means \pm SEM of 10-20 mice/group. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

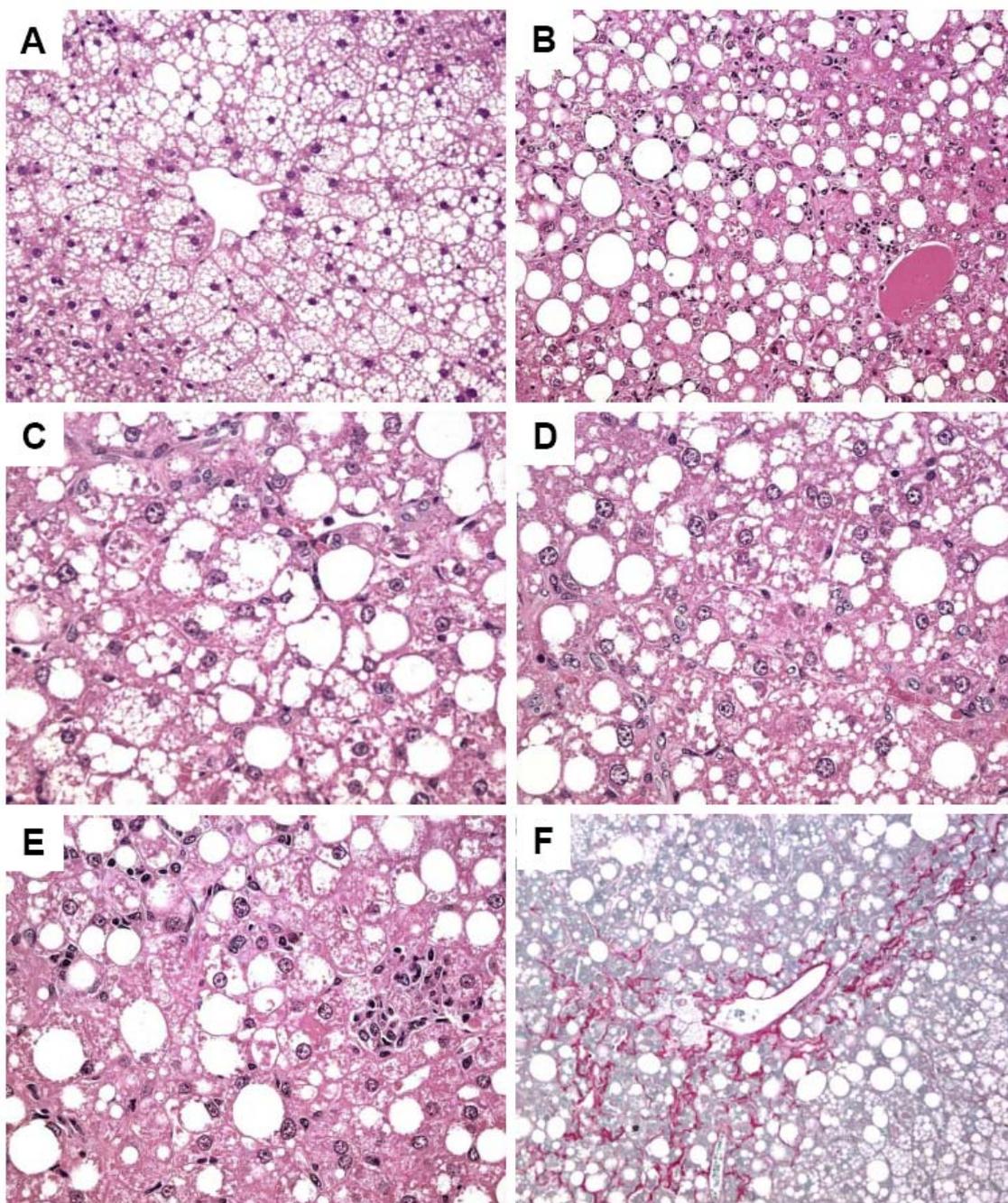


Figure 4: Liver histological findings characteristic of NASH. **A**, Histological section of the liver showing macro and microvesicular steatosis in hepatocytes around a central vein in zones 3 and 2 of the hepatic acinus. H&E x200. **B**, Liver section showing macrovesicular steatosis and scattered foci of inflammatory infiltrate. H&E x100. **C**, Detail of hepatocytes with macro and microvesicular steatosis, and ballooning (arrow). H&E x400. **D**, Ballooning hepatocyte containing a Mallory body in the cytoplasm (arrowhead). H&E x400. **E**, Detail showing steatosis, ballooning hepatocytes with Mallory bodies and inflammatory cells infiltrate. H&E x400. **F**, Sirius-red staining showing peri-sinusoidal and peri-cellular fibrosis in zone 3 of the hepatic parenchyma around a central vein. X100.

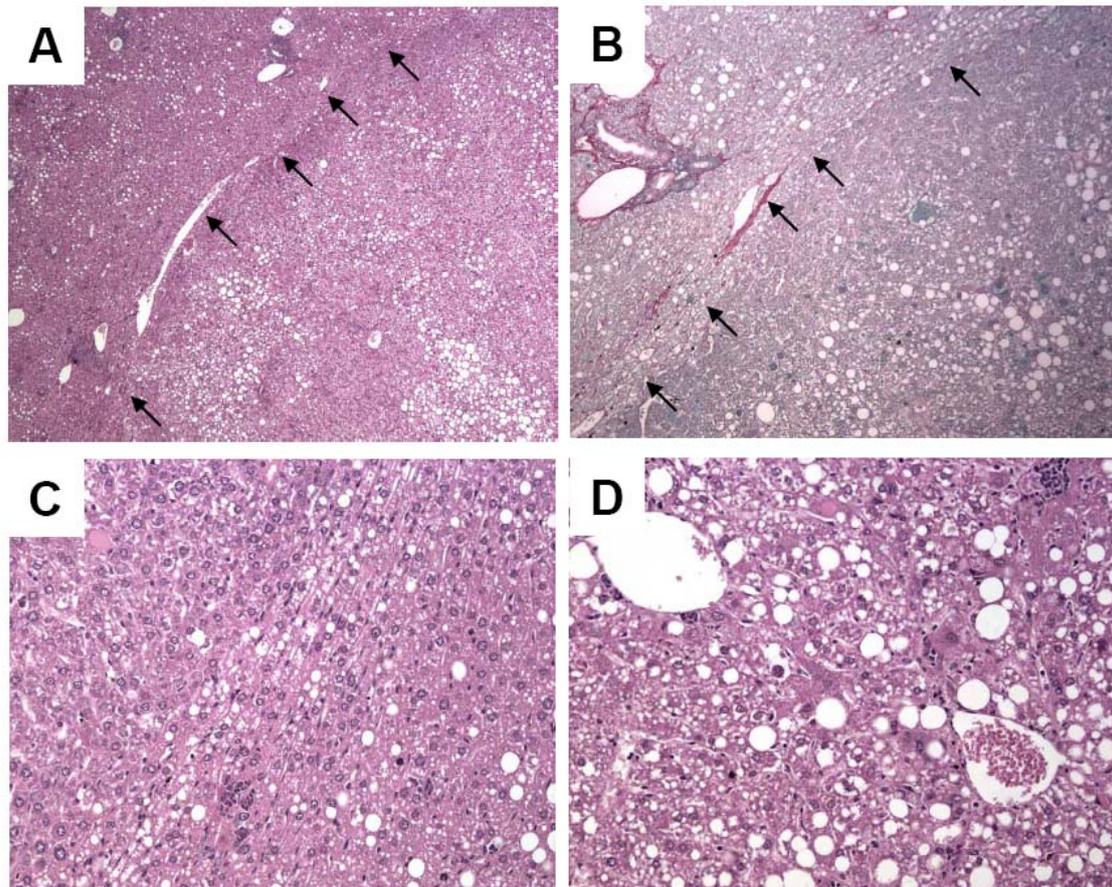


Figure 5: Presence of adenoma in livers of mice one year after high-fat diet feeding. **A**, Hepatocellular adenoma (arrowheads) well delimited from the hepatic parenchyma with slight compression of the hepatocytes but without a fibrous capsule. H&E x40. **B**, Selected area from (**A**) stained with picro-sirius red. X40. **C**, Zone of transition between the adenoma and the non-neoplastic liver. Note that cells in the adenoma are well differentiated hepatocytes that grow in an expansible mass that compress the liver around it. H&E x100. **D**, Hepatocellular adenoma containing steatotic hepatocytes and veins. H&E x 100.

References

1. Ahmed U, Redgrave TG, Oates PS. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2009 Aug;24(8):1463-1471.
2. Bogdanova K, Poczatkova H, Uherkova L, Riegrova D, Rypka M, Feher J, et al. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)--a novel common aspect of the metabolic syndrome. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2006 Jul;150(1):101-104.
3. Caldwell SH, Crespo DM, Kang HS, Al-Osaimi AM. Obesity and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004 Nov;127(5 Suppl 1):S97-103.
4. Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 2002 May;122(6):1649-1657.
5. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004 Feb;126(2):460-468.
6. Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* 2004 Feb;5(1):27-42.
7. Flegal KM, Ogden CL, Wei R, Kuczmarski RL, Johnson CL. Prevalence of overweight in US children: comparison of US growth charts from the Centers for Disease Control and Prevention with other reference values for body mass index. *Am J Clin Nutr* 2001 Jun;73(6):1086-1093.
8. Green RM. NASH--hepatic metabolism and not simply the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003 Jul;38(1):14-17.
9. Hu W, Feng Z, Eveleigh J, Iyer G, Pan J, Amin S, et al. The major lipid peroxidation product, trans-4-hydroxy-2-nonenal, preferentially forms DNA adducts at codon 249 of human p53 gene, a unique mutational hotspot in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 2002 Nov;23(11):1781-1789.
10. Ito M, Suzuki J, Sasaki M, Watanabe K, Tsujioka S, Takahashi Y, et al. Development of nonalcoholic steatohepatitis model through combination of high-fat diet and tetracycline with morbid obesity in mice. *Hepatol Res* 2006 Feb;34(2):92-98.
11. Ito M, Suzuki J, Tsujioka S, Sasaki M, Gomori A, Shirakura T, et al. Longitudinal analysis of murine steatohepatitis model induced by chronic exposure to high-fat diet. *Hepatol Res* 2007 Jan;37(1):50-57.
12. Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, Marais DA, Jaffer MA, Woodburne VE, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies. *J Gastroenterol Hepatol* 2003 Nov;18(11):1272-1282.
13. Lee L, Alloosh M, Saxena R, Van Alstine W, Watkins BA, Klaunig JE, et al. Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Hepatology (Baltimore, Md)* 2009 Jul;50(1):56-67.
14. Li Z, Soloski MJ, Diehl AM. Dietary factors alter hepatic innate immune system in mice with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005 Oct;42(4):880-885.
15. Lieber CS, Leo MA, Mak KM, Xu Y, Cao Q, Ren C, et al. Model of nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Clin Nutr* 2004 Mar;79(3):502-509.

16. Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, et al. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001 Aug;50(8):1844-1850.
17. Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* 2003 Apr;37(4):917-923.
18. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 1999 Jun;116(6):1413-1419.
19. Nair S, Mason A, Eason J, Loss G, Perrillo RP. Is obesity an independent risk factor for hepatocellular carcinoma in cirrhosis? *Hepatology* 2002 Jul;36(1):150-155.
20. Nanji AA. Another animal model for nonalcoholic steatohepatitis: how close to the human condition? *Am J Clin Nutr* 2004 Mar;79(3):350-351.
21. Naveau S, Thaury J, Barri-Ova N, Balian A, Dauvois B, Njike-Nakseu M, et al. Predictive factors for pure steatosis in alcoholic patients. *Alcoholism, clinical and experimental research* 2009 Jun;33(6):1104-1110.
22. Ota T, Takamura T, Kurita S, Matsuzawa N, Kita Y, Uno M, et al. Insulin resistance accelerates a dietary rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2007 Jan;132(1):282-293.
23. Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, et al. Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology* 2009 Mar;49(3):851-859.
24. Rebuffe-Scrive M, Surwit R, Feinglos M, Kuhn C, Rodin J. Regional fat distribution and metabolism in a new mouse model (C57BL/6J) of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1993 Nov;42(11):1405-1409.
25. Reid AE. Nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 2001 Sep;121(3):710-723.
26. Rinella ME, Green RM. The methionine-choline deficient dietary model of steatohepatitis does not exhibit insulin resistance. *J Hepatol* 2004 Jan;40(1):47-51.
27. Sahai A, Malladi P, Pan X, Paul R, Melin-Aldana H, Green RM, et al. Obese and diabetic db/db mice develop marked liver fibrosis in a model of nonalcoholic steatohepatitis: role of short-form leptin receptors and osteopontin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004 Nov;287(5):G1035-1043.
28. Shiota G. Loss of function of retinoic acid in liver leads to steatohepatitis and liver tumor: A NASH animal model. *Hepatol Res* 2005 Oct;33(2):155-160.
29. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 2007 Mar;125(3):451-472.
30. Surwit RS, Feinglos MN, Rodin J, Sutherland A, Petro AE, Opara EC, et al. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. *Metabolism* 1995 May;44(5):645-651.
31. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 1988 Sep;37(9):1163-1167.
32. Surwit RS, Wang S, Petro AE, Sanchis D, Raimbault S, Ricquier D, et al. Diet-induced changes in uncoupling proteins in obesity-prone and obesity-resistant strains of mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Mar 31;95(7):4061-4065.

33. Svegliati-Baroni G, Candelaresi C, Saccomanno S, Ferretti G, Bachetti T, Marzioni M, et al. A model of insulin resistance and nonalcoholic steatohepatitis in rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and n-3 polyunsaturated fatty acid treatment on liver injury. *Am J Pathol* 2006 Sep;169(3):846-860.
34. Velayudham A, Dolganiuc A, Ellis M, Petrasek J, Kodys K, Mandrekar P, et al. VSL#3 probiotic treatment attenuates fibrosis without changes in steatohepatitis in a diet-induced nonalcoholic steatohepatitis model in mice. *Hepatology* 2009 Mar;49(3):989-997.
35. Watanabe S, Horie Y, Suzuki A. Hepatocyte-specific Pten-deficient mice as a novel model for nonalcoholic steatohepatitis and hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2005 Oct;33(2):161-166.
36. West KM, Kalbfleisch JM. Influence of nutritional factors on prevalence of diabetes. *Diabetes* 1971 Feb;20(2):99-108.
37. Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, et al. High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 2006 Aug 8;79(11):1100-1107.