

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOTERAPIA

ANA LUÍSA FREITAS SIQUEIRA

ESTUDO DOS EFEITOS DA OBESIDADE ASSOCIADA À HIPERGLICEMIA
SOBRE A PERFUSÃO MIOCÁRDICA E A FUNÇÃO VENTRICULAR EM RATOS
WISTAR KYOTO

UBERABA

2021

ANA LUÍSA FREITAS SIQUEIRA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA OBESIDADE ASSOCIADA À HIPERGLICEMIA
SOBRE A PERFUSÃO MIOCÁRDICA E A FUNÇÃO VENTRICULAR EM RATOS
*WISTAR KYOTO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, área de concentração “Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica” (Linha de Pesquisa: Processo de Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica dos Sistemas Cardiorrespiratório e Neurológico), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Elias Vieira de Carvalho.

UBERABA

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

S628e Siqueira, Ana Luísa Freitas
Estudo dos efeitos da obesidade associada à hiperglicemia sobre a perfusão miocárdica e a função ventricular em ratos *wistar kyoto* / Ana Luísa Freitas Siqueira. -- 2021.
74 f. : il., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Elias Vieira de Carvalho

1. Obesidade. 2. Hiperglicemia. 3. Estreptozotocina. 4. Doenças cardiovasculares. 5. Imagem de perfusão do miocárdio. 6. Ecocardiografia I. Carvalho, Eduardo Elias Vieira de. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 613.25:616.12

ANA LUÍSA FREITAS SIQUEIRA

**ESTUDO DOS EFEITOS DA OBESIDADE ASSOCIADA À HIPERGLICEMIA
SOBRE A PERFUSÃO MIOCÁRDICA E A FUNÇÃO VENTRICULAR EM RATOS
*WISTAR KYOTO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia, área de concentração “Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica” (Linha de Pesquisa: Processo de Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica dos Sistemas Cardiorrespiratório e Neurológico), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Uberaba, 24 de Agosto de 2021.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Elias Vieira de Carvalho – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Octávio Barbosa Neto
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Aos meus pais, Hélio Carlos e Deise, por todo esforço e dedicação em tornar possível a realização dos meus sonhos. À vocês, com todo amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, pelas oportunidades concedidas e por guiar meus passos em cada uma delas;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Eduardo Elias Vieira de Carvalho, pelo acolhimento, paciência, ensinamentos e dedicação em cada etapa desta jornada;

Aos meus pais, Hélio Carlos e Deise, minha irmã Ana Cláudia e ao meu namorado João Pedro, pelo apoio, carinho e incentivo durante essa caminhada;

Ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, em especial, Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões, Denise Mayumi Tanaka, Camila Godoy Fabrício e Vanessa de Souza Nakagi, por todo suporte e auxílio durante a execução do estudo;

Ao Instituto de Pesquisa em Oncologia - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em especial, Profa. Dra. Márcia Antoniazi Michelin, Taíssa Lemos de Abreu e Ana Paula Peixoto, por toda assistência e disposição em atender;

Ao Prof. Dr. Douglas Reis Abdalla, pela participação em minha formação acadêmica e colaboração em mais uma etapa de formação;

Aos amigos Gabriela Souza Faria e Pedro de Oliveira Neto, pelo companheirismo, empenho e dedicação na realização do estudo;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa e apoio financeiro.

Aos demais familiares, amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste sonho tão almejado.

RESUMO

SIQUEIRA, ANA LUÍSA FREITAS. **Estudo dos efeitos da obesidade associada à hiperglicemia sobre a perfusão miocárdica e a função ventricular em ratos *wistar kyoto***. 2021. 74f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2021.

Introdução: A obesidade é uma doença crônica de origem multifatorial, caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo em decorrência do desequilíbrio energético entre o consumo e o gasto calórico do organismo. As implicações da obesidade estão associadas ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças metabólicas, como intolerância à glicose, resistência à insulina e diabetes *mellitus*, sendo um dos principais fatores de risco para doenças cardiovasculares, capaz de lesionar progressivamente a parede do vaso sanguíneo, desencadeando um processo inflamatório avançado e danificando a função de células endoteliais. Frequentemente são documentadas alterações na função ventricular esquerda, disfunção endotelial e defeitos de perfusão miocárdica, em decorrência das doenças metabólicas. Desta forma, sugerimos que estudos experimentais em modelos de animais sejam importantes para o entendimento de mecanismos fisiopatológicos que influenciam na evolução de doença como a obesidade e aquelas relacionadas com o aumento sustentado dos níveis de glicemia sanguínea. **Objetivos:** Avaliar a perfusão miocárdica, as alterações morfológicas e funcionais do ventrículo esquerdo e a reserva de fluxo coronário em um modelo experimental de ratos *Wistar Kyoto* adultos jovens induzidos à obesidade e hiperglicemia persistente. **Métodos:** Foram utilizados ratos *Wistar Kyoto* de 22 semanas de idade, mantidos em alojamento climatizado no biotério do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, alocados em Grupo Controle (GC, n = 10): ratos *Wistar Kyoto*, de 14 semanas de vida, tratados com ração padrão, Grupo Dieta Hipercalórica (DH, n = 12): ratos *Wistar Kyoto*, de 14 semanas de vida, que receberam uma dieta hipercalórica preparada em laboratório associada à frutose, e Grupo Dieta Hipercalórica associada a Estreptozotocina (DH+STZ, n = 18): ratos *Wistar Kyoto*, de 14 semanas de vida, que receberam a mesma alimentação do grupo DH, acrescida de duas injeções de 30 mg/kg de STZ. Após o início do protocolo de experimentação, os animais foram submetidos semanalmente a análise do peso e da glicemia sanguínea. Todos os grupos foram submetidos após oito semanas de experimentação aos seguintes exames de imagem *in vivo*: Dopplerecocardiograma transtorácico, reserva de fluxo coronário, cintilografia de perfusão miocárdica

com Sestamibi-Tc-99m (SPECT) em repouso e sob estresse farmacológico com dobutamina e teste de tolerância à glicose. A indução do estresse cardíaco foi feita pela infusão do cloridrato de dobutamina, com dose de 25 µg/Kg/min, durante um minuto de infusão. Os parâmetros morfológicos avaliados foram diâmetro sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo, espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole e em diástole, espessura do septo interventricular em sístole e em diástole, índice de massa do ventrículo esquerdo, espessura relativa da parede ventricular e velocidade pico da onda de fluxo coronário sob estresse e em repouso. Os parâmetros funcionais avaliados foram fração de ejeção e encurtamento do ventrículo esquerdo. Os defeitos de captação nas imagens de repouso e estresse foram semiquantificados, mediante atribuição de escores visuais (0 = normal; 1 = defeito leve; 2 = defeito moderado; e 3 = defeito grave), em modelo de 17 segmentos das paredes do ventrículo esquerdo. Para cada animal foram calculados escores somados nas imagens de repouso, estresse e diferença entre o estresse e o repouso para avaliação da extensão global da reversibilidade (isquemia) e a gravidade, medidas através do escore da diferença. Ao final do período de observação os animais foram eutanasiados para retirada de soro sanguíneo. **Resultados:** Os grupos DH ($336,6 \pm 28,1$ g, $p < 0,0001$) e DH+STZ ($304,2 \pm 19,2$ g, $p = 0,004$) apresentaram aumento significativo do peso em comparação ao GC ($330,1 \pm 27,2$ g); do mesmo modo na glicemia sanguínea, o grupo DH+STZ ($123,7 \pm 13,9$ mg/dL) apresentou maiores valores em comparação ao GC ($83,0 \pm 10,0$ mg/dL, $p < 0,0001$) e ao DH ($105,3 \pm 9,0$ mg/dL, $p < 0,03$), bem como o grupo DH em relação ao grupo controle ($p < 0,005$). No teste de tolerância à glicose foi observado que 15 minutos após a sobrecarga de glicose, os níveis de glicemia aumentaram em todos os grupos, sendo mais expressivo no DH ($230,8 \pm 54,9$ mg/dL, $p < 0,004$) e DH+STZ ($247,5 \pm 44,5$ mg/dL, $p = 0,0006$) quando comparados ao GC ($166,3 \pm 27,9$ mg/dL); após 30 minutos a glicemia atingiu seu pico, sendo ainda significativo nos grupos DH ($250,9 \pm 67,8$ mg/dL, $p = 0,0002$) e DH+STZ ($275,2 \pm 58,5$ mg/dL, $p < 0,0001$) em comparação ao GC ($168,9 \pm 25,6$ mg/dL); após 60 minutos, o grupo DH+STZ ($266,7 \pm 59,7$ mg/dL) ainda apresenta glicemia elevada quando comparado ao GC ($132,3 \pm 25,5$ mg/dL, $p < 0,0001$) e DH ($160,1 \pm 28,1$ mg/dL, $p < 0,0001$); 90 minutos após, a glicemia do DH+STZ ($205,3 \pm 52,9$ mg/dL) ainda é significativamente maior quando comparados ao GC ($119,7 \pm 19,5$ mg/dL, $p = 0,0003$) e DH ($135,5 \pm 26,0$ mg/dL, $p < 0,003$); após 120 minutos, os níveis de glicemia mostram-se semelhantes entre os três grupos ($p > 0,05$). Os parâmetros morfológicos observados no ECO apresentaram-se semelhantes entre os grupos experimentais ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa nos valores do fluxo coronário entre os grupos no repouso, estresse e da reserva do fluxo coronário ($p > 0,05$).

Também não foi observada diferença significativa dos defeitos de perfusão miocárdica entre os três grupos ($p > 0,05$). Foi documentado valores maiores e significativos nas IL-6 nos animais do grupo DH+STZ em relação ao GC ($p < 0,04$). **Conclusões:** A dieta hipercalórica associada à frutose na água e duas doses baixas de estreptozotocina induziu a obesidade, promoveu hiperglicemia, intolerância à glicose e discreta inflamação, em modelo experimental de obesidade em ratos *Wistar Kyoto* com 22 semanas de idade. Na fase da evolução dos distúrbios metabólicos em que os animais foram estudados, o período de alteração metabólica não foi suficiente para gerar defeitos de perfusão miocárdica, remodelamento ventricular e disfunção microvascular coronariana, sugerindo novas investigações para projetos futuros, com desenho longitudinal.

Palavras-chave: Obesidade; Hiperglicemia; Estreptozotocina; Doenças Cardiovasculares; Imagem de Perfusão do Miocárdio; Ecocardiografia.

ABSTRACT

SIQUEIRA, ANA LUÍSA FREITAS. **Study of the effects of obesity associated with hyperglycemia on myocardial perfusion and ventricular function in wistar kyoto rats.** 2021. 74p. Master's degree dissertation – Federal University of Triângulo Mineiro, Uberaba, 2021.

Introduction: Obesity is a chronic disease of multifactorial origin, characterized by the abnormal or excessive accumulation of fat in the adipose tissue as a result of the energy imbalance between consumption and the body's caloric expenditure. The implications of obesity are associated with the development and progression of several metabolic diseases, such as glucose intolerance, insulin resistance and diabetes mellitus, being one of the main risk factors for cardiovascular disease, capable of progressively injuring the vessel wall, triggering a process advanced inflammatory and impairing endothelial cell function. Alterations in left ventricular function, endothelial dysfunction and myocardial perfusion defects are frequently documented as a result of metabolic diseases. Thus, we suggest that experimental studies in animal models are important for understanding the pathophysiological mechanisms that influence the evolution of diseases such as obesity and those related to the sustained increase in blood glucose levels. **Objectives:** To evaluate myocardial perfusion, morphological and functional changes in the left ventricle and coronary flow reserve in an experimental model of young adult Wistar Kyoto rats induced to obesity and persistent hyperglycemia. **Methods:** 22-week-old Wistar Kyoto rats were used, kept in acclimatized accommodation in the vivarium of the Department of Clinical Medicine of the Faculty of Medicine of Ribeirão Preto - USP, allocated in a Control Group (CG, n = 10): Wistar Kyoto rats, aged 14 weeks of age, treated with standard chow, Hypercaloric Diet Group (DH, n = 12): Wistar Kyoto rats, 14 weeks of age, given a laboratory-prepared hypercaloric diet associated with fructose, and Hypercaloric Diet Group associated with Streptozotocin (DH+STZ, n = 18): 14-week-old Wistar Kyoto rats that received the same food as the DH group, plus two injections of 30 mg/kg of STZ. After starting the experimentation protocol, the animals were submitted to weekly analysis of weight and blood glucose. After eight weeks of experimentation, all groups underwent the following in vivo imaging tests: Doppler-transthoracic echocardiography, coronary flow reserve, myocardial perfusion scintigraphy with Sestamibi-Tc-99m (SPECT) at rest and under pharmacological stress with dobutamine and glucose tolerance test. The induction of cardiac stress was performed by infusion of

dobutamine hydrochloride, at a dose of 25 µg/Kg/min, during one minute of infusion. The morphological parameters evaluated were left ventricular end-systolic and diastolic diameter, left ventricular posterior wall thickness in systole and diastole, interventricular septum thickness in systole and diastole, left ventricular mass index, relative ventricular wall thickness and peak coronary flow wave velocity under stress and at rest. The functional parameters evaluated were ejection fraction and left ventricular shortening. The uptake defects in resting and stress images were semiquantified by assigning visual scores (0 = normal; 1 = mild defect; 2 = moderate defect; and 3 = severe defect) in a 17-segment model of the left ventricular walls. For each animal, scores were calculated summed on images at rest, stress and difference between stress and rest to assess the global extent of reversibility (ischemia) and severity, measured through the difference score. At the end of the observation period, the animals were euthanized to remove blood serum. **Results:** The DH (336.6 ± 28.1 g, $p < 0.0001$) and DH+STZ (304.2 ± 19.2 g, $p = 0.004$) groups showed a significant increase in weight compared to the CG (330.1 ± 27.2 g); similarly in blood glucose, the DH+STZ group (123.7 ± 13.9 mg/dL) had higher values compared to the CG (83.0 ± 10.0 mg/dL, $p < 0.0001$) and to DH (105.3 ± 9.0 mg/dL, $p < 0.03$), as well as the DH group in relation to the control group ($p < 0.005$). In the glucose tolerance test it was observed that 15 minutes after glucose overload, blood glucose levels increased in all groups, being more expressive in DH (230.8 ± 54.9 mg/dL, $p < 0.004$) and DH +STZ (247.5 ± 44.5 mg/dL, $p = 0.0006$) when compared to the CG (166.3 ± 27.9 mg/dL); after 30 minutes blood glucose reached its peak, being still significant in the groups DH (250.9 ± 67.8 mg/dL, $p = 0.0002$) and DH+STZ (275.2 ± 58.5 mg/dL, $p < 0.0001$) compared to the CG (168.9 ± 25.6 mg/dL); after 60 minutes, the DH+STZ group (266.7 ± 59.7 mg/dL) still has high blood glucose when compared to the CG (132.3 ± 25.5 mg/dL, $p < 0.0001$) and DH (160.1 ± 28.1 mg/dL, $p < 0.0001$); 90 minutes later, DH+STZ blood glucose (205.3 ± 52.9 mg/dL) is still significantly higher when compared to CG (119.7 ± 19.5 mg/dL, $p = 0.0003$) and DH (135.5 ± 26.0 mg/dL, $p < 0.003$); after 120 minutes, blood glucose levels are similar between the three groups ($p > 0.05$). The morphological parameters observed in the ECO were similar between the experimental groups ($p > 0.05$). There was no significant difference in coronary flow values between the groups at rest, stress and coronary flow reserve ($p > 0.05$). There was also no significant difference in myocardial perfusion defects between the three groups ($p > 0.05$). Higher and significant values were documented for IL-6 in animals from the DH+STZ group compared to the CG ($p < 0.04$). **Conclusions:** A high-calorie diet associated with fructose in water and two low doses of streptozotocin induced obesity, promoted hyperglycemia, glucose

intolerance and mild inflammation, in an experimental obesity model in 22-week-old Wistar Kyoto rats. In the phase of evolution of metabolic disorders in which the animals were studied, the period of metabolic alteration was not sufficient to generate myocardial perfusion defects, ventricular remodeling and coronary microvascular dysfunction, suggesting further investigations for future projects, with a longitudinal design.

Keywords: Obesity; Hyperglycemia; Streptozotocin; Cardiovascular Diseases; Myocardial Perfusion Imaging; Echocardiography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento geral do estudo.....	29
Figura 2 – Equipamentos utilizados na aquisição de imagens ecocardiográficas.	31
Figura 3 – Imagem ilustrativa adquirida durante o exame de ecocardiograma.....	32
Figura 4 – Imagem ilustrativa adquirida durante o exame de Doppler.....	33
Figura 5 – Sistema SPECT de alta resolução e posicionamento do animal.....	34
Figura 6 – Esquema de divisão do ventrículo esquerdo em 17 segmentos.....	36
Figura 7 – Mapa polar.....	37
Figura 8 – Imagem ilustrativa do estudo de perfusão miocárdica dos grupos experimentais..	49

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados obtidos do peso corporal entre os grupos experimentais.	40
Gráfico 2 – Resultados obtidos de glicemia sanguínea entre os grupos experimentais.....	41
Gráfico 3 – Resultados do teste de tolerância à glicose (TTG).....	43
Gráfico 4 – Frequência dos defeitos isquêmicos por segmento em repouso, estresse e a diferença.	46
Gráfico 5 – Quantificação das citocinas inflamatórias entre os grupos experimentais.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Média do peso corporal dos grupos experimentais.	40
Tabela 2 – Média da glicemia sanguínea dos grupos experimentais.	41
Tabela 3 – Teste de tolerância à glicose dos grupos experimentais, em mg/dL.....	43
Tabela 4 – Resultados dos parâmetros ecocardiográficos e fluxo coronário entre os grupos experimentais.	45
Tabela 5 – Resultados obtidos na cintilografia de perfusão miocárdica entre os grupos experimentais.....	47

LISTA DE SIGLAS

AUC – ÁREA SOB A CURVA

DDFVE – DIÂMETRO DIASTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO

DM – DIABETES MELLITUS

DM2 – DIABETES MELLITUS TIPO 2

DSFVE – DIÂMETRO SISTÓLICO FINAL DO VENTRÍCULO ESQUERDO

ER – ESPESSURA RELATIVA DA PAREDE VENTRICULAR

FEVE – FRAÇÃO DE EJEÇÃO DO VENTRÍCULO ESQUERDO

ICFEP - INSUFICIÊNCIA CARDÍACA COM FRAÇÃO DE EJEÇÃO PRESERVADA

IL-1 β – INTERLEUCINA 1 BETA

IL-6 – INTERLEUCINA 6

IMC – ÍNDICE DE MASSA CORPORAL

PPVEd – PAREDE POSTERIOR DO VENTRÍCULO ESQUERDO EM DIÁSTOLE

RFC – RESERVA DE FLUXO CORONÁRIO

SIVd – SEPTO INTERVENTRICULAR EM DIÁSTOLE

STZ – ESTREPTOZOTOCINA

TNF- α – FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

TTG – TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

VE – VENTRÍCULO ESQUERDO

bpm – BATIMENTOS POR MINUTO

cm – CENTÍMETROS

cm/s – CENTÍMETROS POR SEGUNDO

g/kg – GRAMA POR QUILOGRAMA

kg/m² – QUILOGRAMA POR METRO AO QUADRADO

mg/dL – MILIGRAMA POR DECILITRO

mg/kg – MILIGRAMA POR QUILOGRAMA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia.....	17
1.2 Fisiopatologia.....	19
1.3 Diagnóstico de Obesidade e Hiperglicemia.....	21
1.4 Estudos em Modelos Animais	22
1.5 Justificativa e Hipóteses	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 MÉTODOS	27
3.1 Animais e Protocolo Experimental	27
3.2 Grupos Experimentais	27
3.3 Delineamento Geral do Estudo	28
3.4 Indução da Obesidade e Hiperglicemia.....	29
3.5 Avaliação da Glicemia Sanguínea	30
3.6 Teste de Tolerância à Glicose	30
3.7 Métodos de Imagem.....	30
3.7.1 <i>Ecocardiograma – Avaliação da Função Ventricular e Reserva de Fluxo Coronário</i>	30
3.7.2 <i>Cintilografia de Perfusão Miocárdica de Alta Resolução com Sestamibi-Tc-99m (SPECT) em Repouso e sob Estresse Farmacológico</i>	33
3.7.2.1 <i>Sistema de Aquisição de Imagens Tomográficas</i>	33
3.7.2.2 <i>Aquisição de Imagens de Perfusão Miocárdica em Repouso e sob Estresse Farmacológico</i>	34
3.7.2.3 <i>Processamento e Análise das Imagens</i>	35
3.7.2.4 <i>Eutanásia e obtenção do Soro Sanguíneo</i>	37
3.7.2.5 <i>Determinações das Concentrações das Citocinas Inflamatórias</i>	37
3.8 Aspectos Éticos de Investigação Animal.....	38
3.9 Análise Estatística	38
4 RESULTADOS	39
4.1 Caracterização da Amostra	39
4.1.1 <i>Mortalidade e Exclusão</i>	39

4.1.2	<i>Peso Corporal</i>	39
4.1.3	<i>Glicemia Sanguínea</i>	40
4.1.4	<i>Teste de Tolerância à Glicose</i>	42
4.1.5	<i>Ecocardiograma</i>	44
4.1.6	<i>Fluxo Coronário</i>	44
4.1.7	<i>Cintilografia de Perfusão Miocárdica</i>	44
4.1.7.1	<i>Análise Descritiva da Distribuição Topográfica dos Defeitos de Perfusão Miocárdica</i>	44
4.1.7.2	<i>Análise Visual Semiquantitativa</i>	47
4.1.7.3	<i>Imagem Ilustrativa do Estudo de Perfusão Miocárdica</i>	48
4.1.8	<i>Avaliação das Citocinas Inflamatórias</i>	50
5	DISCUSSÃO	51
5.1	<i>Modelo Experimental</i>	51
5.2	<i>Métodos de Imagem</i>	55
5.2.1	<i>Ecocardiografia</i>	55
5.2.2	<i>Fluxo Coronário</i>	57
5.2.3	<i>Cintilografia de Perfusão Miocárdica</i>	59
5.3	<i>Citocinas Inflamatórias</i>	61
6	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	ANEXO 1 COMITÊ DE ÉTICA	64

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As doenças crônicas não transmissíveis ocupam o topo das causas de morbimortalidade, representando quase um terço dos óbitos no mundo e 63% das mortes de indivíduos com idade entre 30 e 69 anos (WHO, 2011; MANSUR; FAVARATO, 2012). Dentre elas, a obesidade vem se destacando devido a sua alta prevalência, sendo considerada uma epidemia global, configurando-se em um problema de saúde pública em ascensão e que ocorre em todos os países, independentemente do seu desenvolvimento econômico (WHO, 2011).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em 2016, o número de indivíduos adultos com sobrepeso no mundo foi superior a 1,9 bilhões, sendo que destes, 650 milhões estavam obesos. No Brasil, estudos epidemiológicos revelam que essa patologia teve um crescimento de 72% entre os anos de 2006 a 2018, sendo mais prevalente entre adultos de 45 a 54 anos (88,2%) e de 55 a 64 anos (87,4%) e entre o sexo feminino (21%). De acordo com esses dados, estima-se que 55,4% da população brasileira esteja acima do peso (homens: 57,1%; mulheres: 53,9%) e 20,3% apresentam obesidade (homens: 19,5%; mulheres: 21%) (VIGITEL BRASIL 2019, 2020).

As implicações do sobrepeso e obesidade estão associadas ao desenvolvimento e progressão de diversas doenças metabólicas, como hipertensão arterial sistêmica, dislipidemia, intolerância à glicose, resistência à insulina e diabetes *mellitus* (DM), predispondo à síndrome metabólica. Além de afetar a qualidade de vida, também favorecem a elevação da taxa de morbimortalidade por doenças cardiovasculares (JAMES; RIGBY; LEACH, 2004), incluindo o infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular encefálico (EVERETT *et al.*, 2006) e a doença arterial coronariana (TIROSH *et al.*, 2011).

De forma geral, indivíduos com índice de massa corporal (IMC) elevados apresentam maior risco de mortalidade por todas as causas, com redução média na expectativa de vida entre dois e quatro anos na condição de sobrepeso e de oito à dez anos na condição de obesidade grave (WHITLOCK *et al.*, 2009). Supõem-se que essa patologia seja a quinta causa de óbitos no mundo, desencadeando a morte de cerca de 2,8 milhões de indivíduos anualmente (ELLULU *et al.*, 2014).

Fatores como transições epidemiológicas e nutricionais, crescente urbanização, sedentarismo, associação à outras doenças crônicas não transmissíveis, bem como aumento

populacional e progressão da idade (ABESO, 2016; SBD, 2017) fazem com que o excesso de peso e a obesidade gerem um grave impacto tanto na economia quanto nos sistemas de saúde, sendo um desafio a ser solucionado (IDF, 2015). Além dos gastos com medicação por parte do portador da doença, as complicações advindas da obesidade, como doenças do aparelho circulatório, DM, acidente vascular encefálico, doença renal crônica e alguns tipos de câncer, necessitam de cuidados prolongados resultando em frequente utilização dos serviços de saúde (BAHIA; ARAÚJO, 2014).

Dados nacionais de 2015 revelam que o impacto econômico desencadeado pelas doenças cardiovasculares nas redes privada e pública, incluindo hospitalizações, morte prematura e perda de produtividade devido à doença, totalizaram um gasto de R\$ 37,1 bilhões (SIQUEIRA; SIQUEIRA-FILHO; LAND, 2017). Em 2018, o custo com internações, procedimentos ambulatoriais e medicamentos ofertados pelo Programa Farmácia Popular em decorrência da hipertensão arterial, diabetes e obesidade, resultaram ao Sistema Único de Saúde um gasto de R\$ 3,45 bilhões. A hipertensão arterial foi responsável por 59% do custo direto, enquanto o DM correspondeu a 30% e a obesidade, a 11% (NILSON *et al.*, 2020).

É importante destacar ainda que a intolerância à glicose ou pré-diabetes, quadro geralmente associado à obesidade, também é fator de risco para o agravamento dos distúrbios metabólicos e sua crescente taxa de prevalência para os próximos anos torna-se preocupante. Em 2019, o número estimado de adultos de 20 a 79 anos com tolerância à glicose diminuída em todo o mundo foi de 374 milhões. Supõe-se que em 2030 esse número seja de 454 milhões, aumentando para 548 milhões em 2045. Além disso, cerca de 28,3% de indivíduos com intolerância à glicose estão na faixa etária de 20 a 39 anos. Isso significa que esses indivíduos estarão expostos a um progressivo e contínuo aumento de risco para desenvolvimento de diabetes tipo 2 e complicações cardiovasculares (IDF, 2019).

O DM e todas as suas etiologias, bem como os quadros de intolerância à glicose e resistência à insulina, estão associados a uma hiperglicemia persistente que, por sua vez, está relacionada a uma série de complicações micro e macrovasculares em longo prazo, como retinopatia, nefropatia, neuropatia, disfunção endotelial da microcirculação, doenças coronarianas e doença arterial periférica, contribuindo para o surgimento de comorbidades, aumento de mortalidade e pior qualidade de vida (WHO, 2016; SHAH; KANAYA, 2014; SBD, 2021).

1.2 Fisiopatologia

A obesidade pode ser definida como uma doença crônica de origem multifatorial, caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura no tecido adiposo em decorrência do desequilíbrio energético entre o consumo e o gasto calórico do organismo (KOPELMAN, 2000). Apesar de envolver diversos fatores de cunho genético, hormonal e ambiental, a alimentação inadequada e o sedentarismo/inatividade física configuram-se como os principais determinantes para a elevação do peso corporal, bem como agravamento da obesidade e desenvolvimento da síndrome metabólica (FAROOQI; O'RAHILLY, 2006).

A obesidade também é compreendida como um estado de inflamação crônica de baixo grau (CLEMENT; LANGIN, 2007). Devido ao excesso de tecido adiposo, processos inflamatórios são ativados potencializando a produção de adipocinas e citocinas pró-inflamatórias, como leptina, resistina, proteína C reativa (PCR), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) e óxido nítrico (NO) (ALBERTI; ZIMMET; SHAW, 2005; QURESHI; ABRAMS, 2007; KAMADA *et al.*, 2008). Além de influenciar no processo inflamatório, as adipocinas também mediam outros processos fisiopatológicos, como homeostase energética, sensibilidade à insulina, angiogênese, regulação da pressão arterial, proteção vascular e coagulação sanguínea (HAVEL, 2004).

Evidências científicas também apontam que a obesidade é um importante fator de risco para o desenvolvimento de resistência à insulina (CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006; DEFRONZO; TRIPATHY, 2009), devido ao excesso de ácidos graxos livres circulantes provenientes da lipólise e de lipoproteínas ricas em triglicerídeos que reduzem a sensibilidade à insulina (GUERRE-MILLO, 2004; PANKOW *et al.*, 2004) e a expressão do GLUT4 (transportador de glicose dependente da insulina), diminuindo a captação de glicose nos músculos, fígado e tecido adiposo, levando a um estado hiperglicêmico com predisposição a intolerância à glicose (PENALVA, 2008). Além do mais, devido a hiperglicemia, as células betas pancreáticas aumentam a produção e secreção de insulina, elevando seus níveis no sangue, promovendo hiperinsulinemia (CZECH; CORVERA, 1999).

Ressalta-se ainda que a intolerância à glicose associada à obesidade pode preceder o diagnóstico de outras patologias ainda mais graves, como o diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), uma vez que o organismo pode apresentar graus variáveis de intolerância à glicose e resistência à insulina por vários anos antes dos níveis plasmáticos de glicose estarem elevados (CARVALHO; COLAÇO; FORTES, 2006; FAJANS; BELL; POLONSKY, 2001; MEIGS *et al.*, 2006). Desta forma, a intolerância à glicose apresenta importante contribuição para o

desenvolvimento desta doença, reproduzindo de forma eficaz as características típicas dos diferentes estágios da progressão do DM2, desde a passagem de um estado metabolicamente saudável, para um estado pré-diabético - obesidade acompanhada de redução da sensibilidade à insulina, hiperinsulinemia e tolerância à glicose diminuída (TABÁK *et al.*, 2009), até a fase tardia da doença - hiperglicemia franca, disfunção total de células betas e lesões em órgãos-alvo (BARRIÈRE *et al.*, 2018).

Além disso, obesidade e intolerância à glicose juntamente com os demais fatores de risco, como dislipidemia, hiperglicemia, resistência à insulina, hipertensão arterial e DM, em associação ao risco cardiovascular, são capazes de lesionar progressivamente a parede do vaso, desencadeando um processo inflamatório avançado e de danificação da função de células endoteliais, potencializando a vasoconstrição das artérias coronárias e risco de trombose (REAVEN, 1993; ROSS, 1999; DI CARLI *et al.*, 2003).

O endotélio é a camada de células que reveste a parede interna dos vasos sanguíneos e tem como principal função, a manutenção da homeostase vascular, regulação do tônus vascular, crescimento e remodelamento dos vasos e equilíbrio da trombólise, através da liberação de substâncias vasodilatadoras e vasoconstritoras (SENA; PEREIRA; SEIÇA, 2013; QUYYUMI, 1998; TABIT *et al.*, 2010).

As substâncias vasodilatadoras, como o NO, são responsáveis por proteger a parede vascular da lesão aterogênica através da manutenção constante do estado de vasodilatação, prevenindo a adesão e a agregação plaquetária, ao contrário das substâncias vasoconstritoras, como a endotelina (ET-1), que agem em sentido oposto ao NO, potencializando a perda da integridade funcional do vaso ao promover a adesão de monócitos e plaquetas, aumentando a permeabilidade vascular, a proliferação e a migração de células musculares lisas, com consequente formação de placa ateromatosa e espessamento da túnica íntima (LUSCHER; SEO; BUHLER, 1993; HARRISON, 1997).

A disfunção endotelial ocorre quando há um desequilíbrio entre essas substâncias, fator que promove inflamação e, conseqüentemente, lesões vasculares graves, trombose, rigidez arterial, aterosclerose em artérias coronárias e desenvolvimento de complicações microvasculares (KALINOWSKI; MALINSKI, 2004; MANO *et al.*, 1996; TOOKE, 1995).

Em situações em que os níveis de glicemia sanguínea estão aumentados, a hiperglicemia modifica as funções protetoras do endotélio ao alterar os mecanismos moleculares reguladores, aumentando a expressão da ET-1 e da angiotensina II, diminuindo a atividade do NO, com maior ativação da proteína Kinase C, citocinas inflamatórias (IL-1 e IL-6), moléculas de adesão celular (ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, PCR) e de fatores

teciduais (TNF- α), assim favorecendo a vasoconstrição, inflamação, trombose e crescimento da musculatura lisa da parede do vaso (BECKMAN; CREAGER; LIBBY, 2002; GIANNINI *et al.*, 2011; SHEETZ; KING, 2002), tanto na hiperglicemia crônica, quanto em episódios agudos e transitórios (WILLIAMS *et al.*, 1998; TAYLOR; POSTON, 1994). Em adultos obesos, a disfunção endotelial tem se mostrado ocorrer precocemente (HSUEH; LYON; QUIÑONES, 2004), sendo detectável juntamente com a resistência a insulina, precedendo as manifestações clínicas da síndrome metabólica (HSUEH; QUIÑONES, 2003).

Têm-se verificado também que alterações na microcirculação coronariana podem provocar isquemia miocárdica devido ao antagonismo entre fornecimento e demanda miocárdica, com abrangência de todos os microvasos coronarianos ou apenas no miocárdio sem distribuição uniforme (PICCHI *et al.*, 2010; MASERI *et al.*, 1991). Apesar de a isquemia miocárdica estar relacionada com aterosclerose obstrutiva das artérias coronárias, é comum pacientes com angina apresentarem angiografias coronarianas normais, condição denominada de angina microvascular (PATEL *et al.*, 2010).

A isquemia também é uma característica comum da cardiomiopatia hipertrófica, doença determinada geneticamente (CECCHI *et al.*, 2003), que juntamente com as alterações dos sarcômeros, são distúrbios ocasionados pela disfunção microvascular coronariana severa, que também levam a um maior índice de fibrose miocárdica e, quando crônica, pode causar isquemia recorrente e conseqüentemente a morte do miócito (OLIVOTTO *et al.*, 2011; MARON *et al.*, 2009).

1.3 Diagnóstico de Obesidade e Hiperglicemia

O diagnóstico de obesidade é realizado com base na avaliação da adiposidade corporal através do cálculo do IMC, no qual é realizada a divisão do peso em quilograma pelo quadrado da altura em metros (kg/m^2). Apesar de ser um bom indicador, o IMC não reflete a distribuição da gordura corporal, no entanto, correlaciona-se com o risco de comorbidades (ABESO, 2016).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, em indivíduos adultos o IMC normal varia de 18,5 a 24,9 kg/m^2 . É classificado como sobrepeso ou pré-obeso quando o IMC for entre 25 e 29,9 kg/m^2 , apresentando risco de doença pouco elevado. O indivíduo é considerado com obesidade grau 1, quando apresenta IMC entre 30 e 34,9 kg/m^2 , com elevado risco de doença, e obesidade grau 2, IMC entre 35 e 39,9 kg/m^2 , com risco muito elevado de doença, sendo diagnosticado com obesidade grave quando o IMC alcança valor

igual ou superior a 40 kg/m^2 , com risco de doença muitíssimo elevado. Classifica-se ainda como baixo peso grave, condição em que o IMC é inferior a 16 kg/m^2 ; baixo peso moderado, IMC entre 16 e $16,9 \text{ kg/m}^2$ e baixo peso leve, IMC entre 17 e $18,4 \text{ kg/m}^2$, com elevado risco de doença em todas essas classificações (WHO, 2000).

Para o diagnóstico de hiperglicemia, exames laboratoriais são realizados por meio da glicemia de jejum, glicemia 2 horas após a ingestão de 75 g de glicose (teste de tolerância oral à glicose) e hemoglobina glicada (HbA1c). Para a glicemia de jejum, amostras do sangue periférico são coletadas após jejum de no mínimo oito horas. Para a realização do teste de tolerância oral à glicose, uma amostra de sangue é coletada após jejum de oito horas e uma segunda amostra é coletada após duas horas da ingestão de 75 g de glicose dissolvida em água. A tolerância à glicose reflete a eficiência em que o organismo metaboliza a glicose após uma sobrecarga oral de glicose, podendo ser a única alteração detectável no início do DM (SBD, 2021).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes, é classificado como normoglicemia condição em que a glicemia de jejum for entre 60 e 99 mg/dL; o (teste de tolerância oral à glicose $< 140 \text{ mg/dL}$; e a HbA1c $< 5,7\%$). O indivíduo é considerado pré-diabético ou com risco aumentado para DM, quando apresenta glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL; teste de tolerância oral à glicose entre 140 e 199 mg/dL; e HbA1c entre 5,7 e 6,4%, sendo diagnosticado com diabetes estabelecido quando os exames indicarem glicemia de jejum $\geq 126 \text{ mg/dL}$; teste de tolerância oral à glicose $\geq 200 \text{ mg/dL}$; HbA1c $\geq 6,5\%$ (SBD, 2021).

1.4 Estudos em Modelos Animais

Roedores em geral são frequentemente utilizados na experimentação científica (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007), pois apresentam alterações clínicas, laboratoriais e histopatológicas semelhantes à de humanos, permitindo reproduzir uma condição real das patologias, além de ser um modelo de fácil manejo, adaptação e acomodação, que possibilita investigar vários grupos experimentais de forma simultânea e padronizada, permite remover facilmente diversos tipos de tecidos e ainda apresenta baixo custo (NILSSON *et al.*, 2012; ARAÚJO; FELIPINI, 2010).

A indução da obesidade por dietas hipercalóricas tem sido amplamente utilizada em modelos experimentais por possibilitar de forma detalhada o conhecimento e compreensão dos mecanismos fisiopatológicos e etiológicos envolvidos durante e após o processo de

instalação da doença, permitindo assim, a busca por novas terapias que objetivam a prevenção ou tratamento de diversas patologias (NILSSON *et al.*, 2012; FUCHS *et al.*, 2018).

Dieta hipercalórica, além de gerar certo grau de obesidade, também tem sido frequentemente utilizada para induzir o DM em modelos experimentais (KUWABARA *et al.*, 2017). No entanto, esta estratégia não é capaz de reproduzir as complicações advindas do estágio mais avançado da doença, limitando-se apenas a sua fase inicial, ou seja, um quadro similar ao pré-diabetes, mesmo em ratos que aumentaram o peso corporal (BARRIÈRE *et al.*, 2018).

Por outro lado, a estreptozotocina (STZ) é uma droga diabetogênica comumente utilizada em pesquisas científicas por produzir hiperglicemia severa em ratos por meio da geração de radicais livres, ocasionando a destruição das células betas do pâncreas, impedindo totalmente a produção do hormônio insulina (MACHADO; ORTOLANI; SPADELLA, 2009).

Dessa forma, quando se combina dieta rica em gordura a baixas doses de STZ em roedores é possível desenvolver um modelo que reproduz todas as fases de instalação da doença, se aproximando do desenvolvimento natural da doença em humanos, principalmente em seu estágio mais avançado (CASTRO *et al.*, 2017).

Seguindo este modelo experimental, Ménard e colaboradores (2010) alimentaram ratos *Wistar* com ração com alto teor de gordura, associada a uma pequena dose de STZ (25 mg/kg), e notaram que, ao final de seis semanas, os animais apresentavam hiperglicemia, resistência à insulina e disfunção sistólica do VE com fração de ejeção reduzida, quando comparados aos animais alimentados com ração padrão e não diabéticos.

Utilizando da mesma estratégia de dieta hipercalórica combinada a STZ (30 mg/kg), Shao e colaboradores (2019) evidenciaram, por meio de análises do ecocardiograma e da histopatologia, aumento do diâmetro do átrio esquerdo e das espessuras do septo interventricular e da parede posterior do VE, bem como fibrose intersticial extensa e aumento das áreas transversais de cardiomiócitos atriais em ratos Sprague – Dawley, após quatro semanas de DM2.

Outro achado relevante desencadeado pelo consumo das dietas hipercalóricas é o comprometimento da microcirculação coronariana, uma das primeiras adaptações funcionais provenientes do desenvolvimento da obesidade, que ocorre em um período relativamente curto. Estudos experimentais demonstraram que animais alimentados com dieta hipercalórica, apresentavam acentuada adiposidade abdominal, redução da sensibilidade à insulina e,

consequentemente, perfusão microvascular coronariana prejudicada em seis semanas (VAN HAARE *et al.*, 2015) e oito semanas (VAN HAARE *et al.*, 2017).

A obesidade também vem sendo associada ao dano vascular, manifestado pela inflamação endotelial (CHADDERDON *et al.*, 2014). Quando a inflamação evolui para a disfunção endotelial na microcirculação coronariana, alterações nos cardiomiócitos podem ocorrer em associação a redução na biodisponibilidade NO, monofosfato cíclico de guanosina (cGMP) e proteína G quinase (PKG) (PAULUS; TSCHÖPE, 2013), gerando distúrbios da função cardíaca, com remodelamento e disfunção diastólica do VE (KATZ *et al.*, 2014), consequentemente insuficiência cardíaca com fração de ejeção preservada (ICFEP) (BROUWERS *et al.*, 2013).

Evidências revelam que essas alterações ocorrem de forma semelhante tanto em humanos quanto em modelo animal. Pacientes com ICFEP e ratos obesos que desenvolveram fenótipo ICFEP após 20 semanas, apresentaram aumento das moléculas de adesão (ICAM-I, E-selectina) e do estresse oxidativo, desacoplamento de óxido nítrico-sintase endotelial e baixo nível de NO no miocárdio em decorrência da sinalização cGMP-PKG prejudicada, sugerindo que o risco metabólico em associação a inflamação microvascular coronariana, pode ser um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento da ICFEP (FRANSSEN *et al.*, 2016).

1.5 Justificativa e Hipóteses

Diante das evidências apresentadas acima, fica claro que a obesidade, em especial quando associada a um quadro persistente de hiperglicemia, é importante e crescente problema de saúde mundial, sendo grave marcador de risco para desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cerebrovasculares e renais, com impacto negativo nos cofres públicos, devido ao alto custo do tratamento da doença e aos afastamentos temporários e permanentes de atividades ocupacionais dos pacientes acometidos.

Uma vez que a inflamação e a disfunção endotelial estão presentes em pacientes obesos e essas afecções induzem danos na microcirculação, em especial na coronariana, é plausível considerar importante um estudo que investigue a influência dos mecanismos fisiopatológicos da obesidade sobre a perfusão miocárdica e a função ventricular em um modelo animal, com imagens cintilográficas de alta resolução e ecocardiográficas *in vivo*.

Esperamos que a dieta hipercalórica, desenvolvida em nosso laboratório, por meio de uma mistura de ração padrão e banha de porco, induza obesidade nos animais. Acreditamos

também que o estímulo que será dado pela aplicação de baixas doses de STZ induza alterações metabólicas com hiperglicemia persistente.

Desse modo, esperamos que esse modelo de ratos obesos e com hiperglicemia nos permita estudar *in vivo* a influência da obesidade sobre a perfusão miocárdica, a função ventricular e o fluxo na artéria coronária, desses animais.

Os resultados do presente estudo levantarão novas hipóteses para projetos futuros, com desenho longitudinal, bem como, para testar terapêutica farmacológica com diferentes drogas e não farmacológicas, por meio de estímulos que levem a mudança do estilo de vida, em especial o treinamento físico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a perfusão miocárdica, as alterações morfológicas e funcionais do ventrículo esquerdo e a reserva de fluxo coronário em um modelo experimental de ratos *Wistar Kyoto* adultos jovens induzidos à obesidade e hiperglicemia persistente.

2.2 Objetivos Específicos

Reproduzir um modelo de animais obesos e hiperglicêmicos através de dieta hipercalórica e injeção de doses de STZ.

Investigar a presença de defeitos cintiligráficos de perfusão miocárdica em repouso e sob estresse farmacológico com dobutamina.

Obter a reserva de fluxo coronário a partir das medidas do fluxo da artéria coronária descendente anterior em repouso e sob estresse farmacológico com dobutamina.

Avaliar a presença de inflamação em modelo de ratos *Wistar Kyoto* obesos e hiperglicêmicos.

3 MÉTODOS

3.1 Animais e Protocolo Experimental

O protocolo experimental iniciou-se após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Protocolo: 159/2020 - Anexo 1).

Foram utilizados para o estudo 40 ratos adultos da linhagem *Wistar Kyoto*, com 14 semanas de vida, provenientes do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Os animais foram alocados em três grupos de experimentação e ficaram alojados em caixas de polietileno em rack com ventilação independente, com espaço adequado para acomodação, em ambiente com ciclo claro/escuro de 12 horas, com temperatura controlada ($21\pm 3^{\circ}\text{C}$) e com livre acesso a água e ração.

3.2 Grupos Experimentais

A seguir, estão descritos os grupos experimentais e a quantidade de animais por grupos:

1. **Grupo controle (GC), n = 10:** Ratos *Wistar Kyoto*, com 14 semanas de vida, tratados com ração padrão.
2. **Grupo Dieta Hipercalórica (DH), n = 12:** Ratos *Wistar Kyoto*, com 14 semanas de vida, que receberam uma dieta hipercalórica preparada em laboratório, associada à frutose, por um período de oito semanas.
3. **Grupo Dieta Hipercalórica + Estreptozotocina (DH+STZ), n = 18:** Ratos *Wistar Kyoto*, com 14 semanas de vida, que receberam a mesma alimentação do grupo DH, acrescida de duas injeções de 30 mg/kg de STZ.

É importante destacar que o número de animais inicialmente planejado para o grupo DH+STZ, que foram injetados com STZ, é suficiente para obter uma amostra de aproximadamente 10 animais na fase mais avançada do experimento, oito semanas após a indução da hiperglicemia, baseando-se na mortalidade apresentada em estudos prévios de aproximadamente 30% a 50% (DELFINO *et al.*, 2002).

3.3 Delineamento Geral do Estudo

Os animais dos grupos GC, DH e DH+STZ foram adquiridos com 10 semanas de vida. Após quatro semanas de ambientação, ou seja, 14 semanas de vida, com os animais em fase adulta, foram iniciados os protocolos de experimentação, com duração de oito semanas.

O GC recebeu água e ração padrão ao longo das oito semanas e uma injeção de solução de cloreto de sódio 0,9% via intraperitoneal na quarta e quinta semana de experimentação, sendo a glicemia sanguínea avaliada semanalmente para confirmar a condição normoglicêmica dos animais deste grupo.

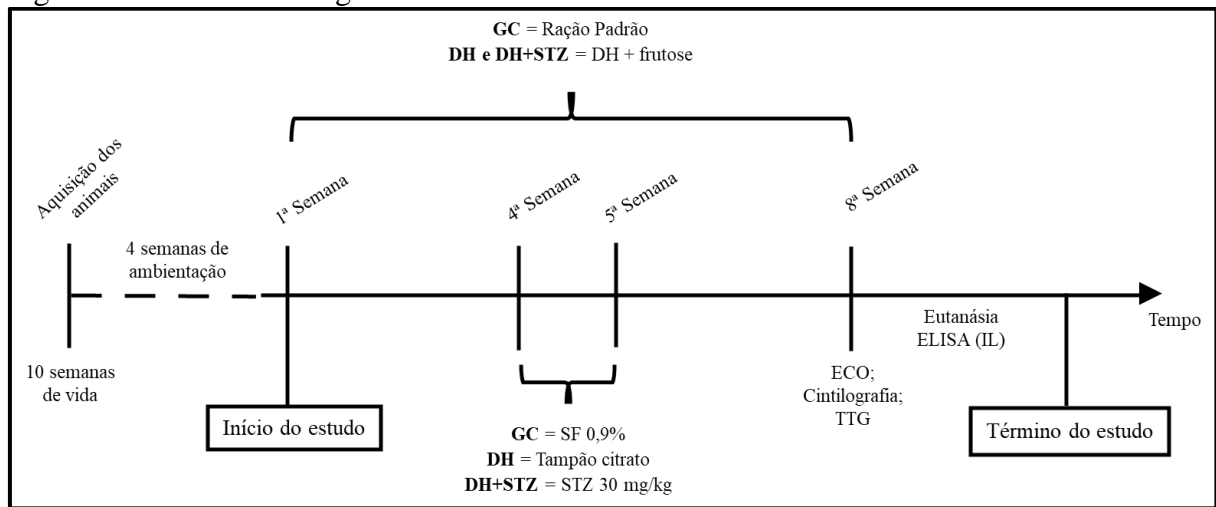
Os animais do grupo DH receberam ao longo de oito semanas dieta preparada com 50% de ração padrão e 50% de banha suína, associada a 20% de frutose diluída na água. Os animais receberam uma injeção de solução tampão citrato de sódio via intraperitoneal na quarta e quinta semana de experimentação, sendo a glicemia sanguínea dosada semanalmente para avaliar a condição glicêmica dos animais deste grupo.

Os animais do grupo DH+STZ receberam ao longo de oito semanas a mesma dieta do grupo DH. Esses animais receberam ainda uma injeção de 30 mg/kg de STZ via intraperitoneal na quarta e quinta semana de experimentação, em seguida, a glicemia sanguínea foi avaliada semanalmente para confirmação do quadro permanente de hiperglicemia.

Todos os grupos foram submetidos aos exames de imagens *in vivo* (Doppler-ecocardiograma e cintilografia de perfusão miocárdica com Sestamibi-99mTc) e ao teste de tolerância à glicose após o período de oito semanas de experimentação.

Em seguida, os animais foram eutanasiados para retirada de amostras de soro sanguíneo para quantificação de citocinas inflamatórias, figura 1.

Figura 1 – Delineamento geral do estudo.



Fonte: SIQUEIRA, A.L.F. (2021)

3.4 Indução da Obesidade e Hiperglicemia

Para indução da obesidade e hiperglicemia no grupo DH, foi estabelecido um protocolo longitudinal de aumento de peso e glicemia sanguínea, na qual os animais foram alimentados com dieta rica em gordura, fabricada em laboratório próprio, por meio da adição de banha suína (17 g de proteína, 6 g de gorduras totais, 1 g de gorduras saturadas, 17 mg de colesterol, 372 mg de sódio e 3 mg de cálcio) à ração padrão (Nuvilab® - 220 g/kg de proteína bruta, 40 g/kg de extrato etéreo, 90 g/kg de matéria mineral, 70 g/kg de fibra bruta, 10-14 g/kg de cálcio e 8.000 mg/kg de fósforo), na proporção de 50% cada, além da adição de 20% de frutose refinada (Synth®) na água (RAMOS; BATISTA; ALBUQUERQUE, 2017).

A obesidade e hiperglicemia no grupo DH+STZ foi induzida pela associação do protocolo estabelecido para o grupo DH e um protocolo químico experimental. Foi feita a administração de uma solução de STZ (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) dissolvida em tampão citrato de sódio 0,01 Molar e pH 4,5, em duas doses de 30 mg/kg, com intervalo de uma semana entre as doses, injetada por via intraperitoneal (SHAO *et al.*, 2019).

Para indução da hiperglicemia, por meio da aplicação de doses de STZ, os animais foram privados de alimentação sólida por um período de oito horas, sendo mantidos apenas com água (VATANDOUST *et al.*, 2018).

3.5 Avaliação da Glicemia Sanguínea

Para a avaliação da glicemia, amostras de sangue foram coletadas via veia caudal em todos os grupos, no período da manhã e após a privação da ração por um período de três horas. Foi utilizado um glicosímetro da marca Accu-Chek Active®.

Foi considerada para diagnóstico de hiperglicemia, glicemia de jejum superior a 100 mg/dL, a partir da quarta semana de consumo da ração preparada e após aplicação da primeira dose do STZ. E para confirmação da manutenção do quadro hiperglicêmico, novas testagens foram realizadas semanalmente, seguindo o mesmo protocolo.

3.6 Teste de Tolerância à Glicose

O teste de tolerância à glicose (TTG) foi realizado no final das oito semanas do experimento.

Após jejum noturno de oito horas, os animais receberam uma carga de glicose de 1,5 g/kg, via intraperitoneal. Amostras de sangue foram coletadas a partir de um corte na ponta da cauda para medir os níveis de glicose no sangue antes ($t = 0$) e após a administração da glicose (15, 30, 60, 90 e 120 minutos), utilizando um glicosímetro (Accu-Chek Active®) (SOLTANI; KESHAVARZ; DEHPOUR, 2007).

3.7 Métodos de Imagem

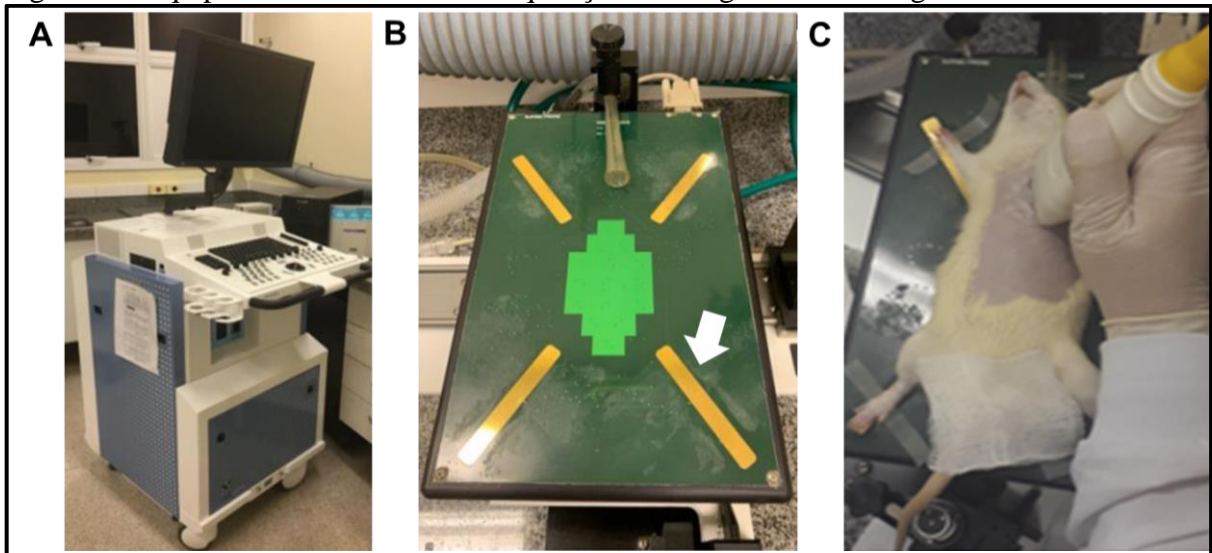
3.7.1 Ecocardiograma – Avaliação da Função Ventricular e Reserva de Fluxo Coronário

O ecocardiograma foi realizado no laboratório de Ecocardiografia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto utilizando um transdutor linear de 20 MHz de frequência fundamental com interface para um sistema de imagem de alta resolução Vevo 2100 (VisualSonics, Toronto, ON, Canadá), figura 2A.

Após a sedação com Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg, respectivamente) por injeção intramuscular e devida preparação, incluindo tricotomia e depilação da face anterior do tórax com creme depilatório, os animais foram pesados e posicionados sobre uma plataforma inclinável (VisualSonics Inc, Toronto, Canadá), com controle de temperatura para evitar hipotermia. A seguir, foram monitorizados com eletrocardiograma de superfície, que foi mantido durante toda realização do exame, figura 2B.

Os animais permaneceram em ventilação espontânea, e o ecocardiograma transtorácico foi realizado utilizando o transdutor de alta frequência, que foi posicionado levemente a esquerda do esterno, entre a quarta e sexta costela, tomando-se o cuidado de não realizar pressão excessiva, figura 2C.

Figura 2 – Equipamentos utilizados na aquisição de imagens ecocardiográficas.



A: Imagem ilustrativa do equipamento Vevo utilizado para aquisição das imagens ecocardiográficas. **B:** Plataforma inclinável para o posicionamento do animal, com sensor de ECG. **C:** Posicionamento do transdutor para realização do exame. Fonte: SIQUEIRA, A.L.F. (2021)

As sequências de vídeos foram adquiridas com pelo menos três ciclos cardíacos nas seguintes projeções: 1 projeção paraesternal do eixo longo e 2 paraesternal eixo curto em nível dos músculos papilares. Foi adquirida uma imagem estática em modo M guiado pela imagem bidimensional na janela paraesternal em eixo longo, obtida perpendicularmente às paredes do VE, para a medida da espessura do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo, tanto em sístole quanto em diástole, figura 3.

As medidas dos diâmetros sistólicos e diastólicos foram feitas de acordo com a Sociedade Americana de Ecocardiografia e da Sociedade Europeia de Imagem Cardiovascular (LANG *et al.*, 2014). Para o cálculo da FEVE pelo modo bidimensional, foi selecionado o melhor vídeo representativo da projeção paraesternal longitudinal e com a melhor definição das bordas do endocárdio. A seguir, foi selecionado o quadro com maior volume diastólico, seguido da marcação das bordas do endocárdio em diástole. No mesmo ciclo cardíaco, foi escolhido o quadro com menor volume sistólico e realizada a marcação das bordas do endocárdio em sístole.

A massa do VE foi calculada seguindo as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia, pela fórmula: $0,8 \times [1,04 \times [(\text{septo interventricular} + \text{dimensão interna ventricular esquerda} + \text{parede posterior})^3 - \text{dimensão interna ventricular esquerda}^3]] + 0,6 \text{ g}$ (LANG *et al.*, 2005).

O índice de massa foi obtido a partir da divisão da massa do VE pela superfície corporal (DUBOIS; DUBOIS, 1916). A espessura relativa (ER) da parede ventricular foi calculada de acordo com a fórmula estabelecida pela Sociedade Americana de Ecocardiografia: $2 \times \text{espessura da parede posterior} / \text{diâmetro diastólico do VE}$ (LANG *et al.*, 2005).

Foram adquiridas imagens de Doppler no plano apical quatro câmaras no nível da válvula mitral para medidas de função diastólica através da curva de fluxo mitral (onda E, onda A e relação E/A). Posteriormente, foram adquiridas imagens do fluxo da artéria coronária descendente anterior em repouso e sob estresse farmacológico com dobutamina ($25 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$, endovenoso), a partir da janela paraesternal eixo curto, figura 4, seguindo protocolo descrito anteriormente (KELM; BEARE; LeBLANC, 2019).

Figura 3 – Imagem ilustrativa adquirida durante o exame de ecocardiograma.

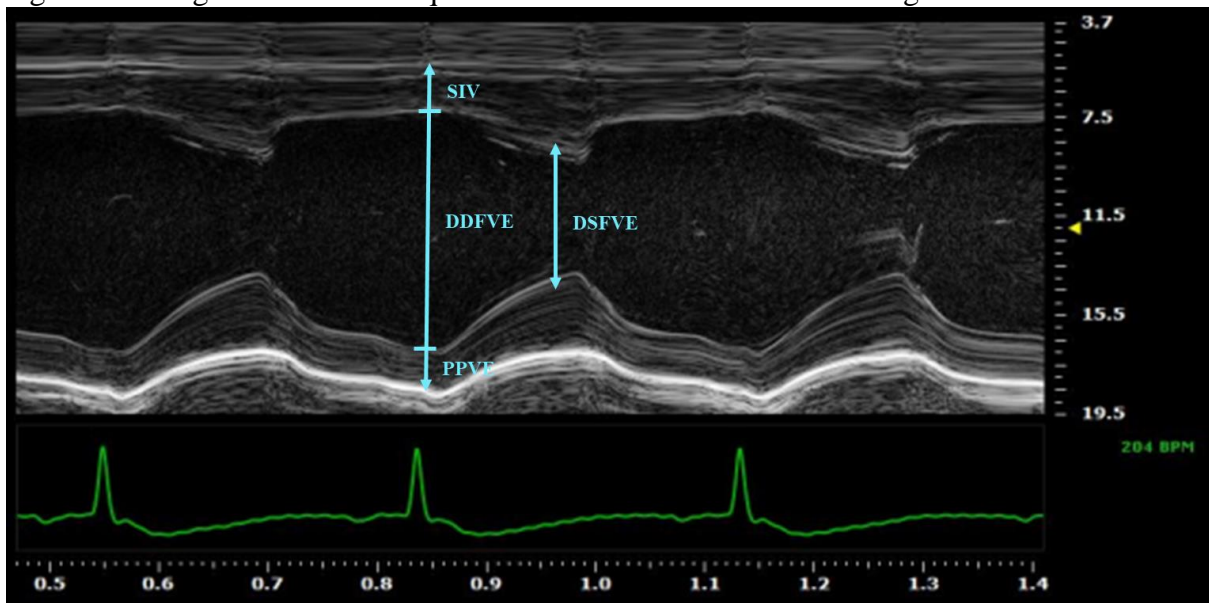


Imagem em Modo M ilustrando as medidas do septo interventricular (SIV), diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (DDFVE), parede posterior do ventrículo esquerdo (PPVE) e diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (DSFVE). Fonte: SIQUEIRA, A.L.F. (2021)

A reserva de fluxo coronário foi calculada como a relação entre a velocidade pico da onda de fluxo sob estresse e a velocidade pico da onda de fluxo em repouso (pré-infusão de dobutamina).

As imagens foram adquiridas por um único examinador habilitado, com mais de dois anos de treinamento e com experiência na realização de ecocardiograma em roedores.

Figura 4 – Imagem ilustrativa adquirida durante o exame de Doppler.

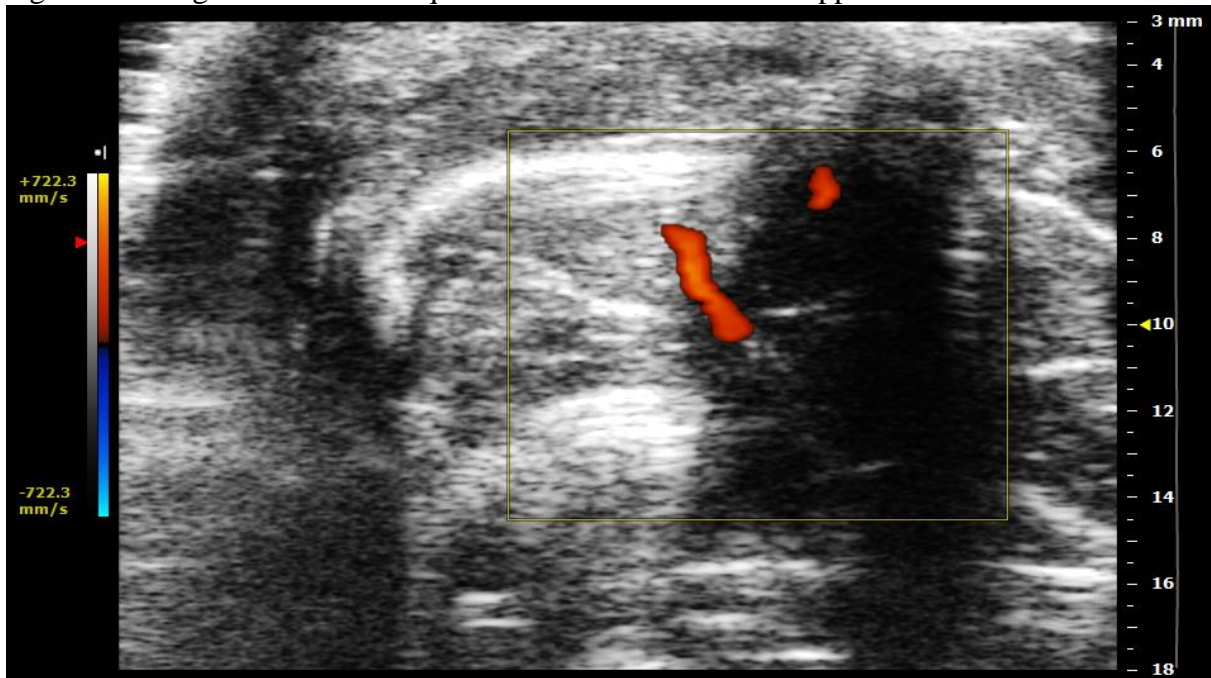


Imagem do fluxo da artéria coronária descendente anterior. Fonte: SIQUEIRA, A.L.F. (2021)

3.7.2 Cintilografia de Perfusão Miocárdica de Alta Resolução com Sestamibi-Tc-99m (SPECT) em Repouso e sob Estresse Farmacológico

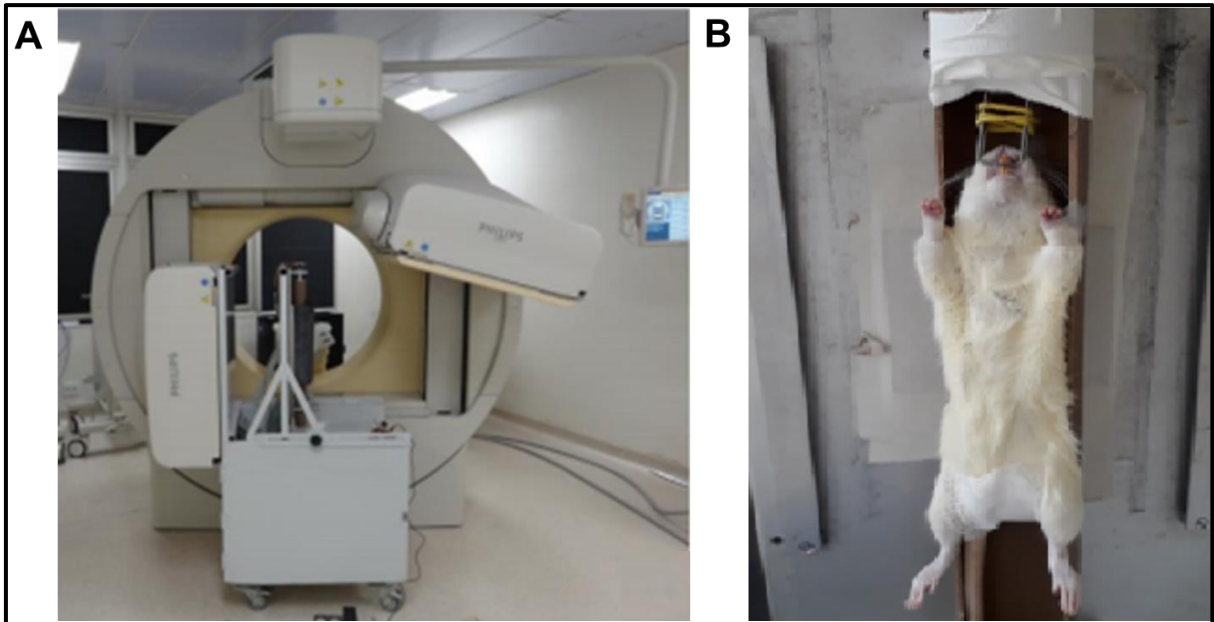
3.7.2.1 Sistema de Aquisição de Imagens Tomográficas

A obtenção das imagens cintilográficas de alta resolução pela técnica de SPECT foi realizada no laboratório de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto utilizando um sistema de aquisição de imagens desenvolvido localmente e validado para pequenos animais (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Sucintamente, o sistema consiste de um sistema de blindagem que permite o encaixe de um colimador de orifício simples (“pinhole”), com diâmetro de 1,5 mm e ângulo de abertura total de 150°.

Para o posicionamento do animal foi desenvolvido um suporte rotacional cilíndrico, que se acopla a um sistema motorizado permitindo o movimento rotacional do alvo para as diferentes posições angulares, de acordo com o número de projeções a serem registradas ao longo dos 360° da aquisição tomográfica, figura 5A e 5B.

Para o registro das imagens, esse sistema foi conectado à uma gama câmara de uso clínico (BrightViewXCT; Philips Medical Systems Inc., Cleveland, OH). Sincronizada com o protocolo de aquisição dinâmico da gama câmara, a sequência de projeções foi registrada e armazenada em formato DICOM.

Figura 5 – Sistema SPECT de alta resolução e posicionamento do animal.



A: Sistema posicionado em uma das duas cabeças da gama câmara clínica Bright View XT. **B:** Animal posicionado em suporte rotacional. Fonte: SIQUEIRA, A.L.F. (2021)

3.7.2.2 Aquisição de Imagens de Perfusão Miocárdica em Repouso e sob Estresse Farmacológico

Para o protocolo de imagens em repouso, os animais foram rapidamente anestesiados com isoflurano a 3%, durante um minuto, e uma atividade 555 MBq de Sestamibi-Tc99m foi injetada na veia sublingual, permitindo que o animal despertasse em seguida. Noventa minutos após a injeção do radiofármaco os animais foram novamente anestesiados com uma combinação de Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg) e posicionados no sistema para a aquisição das imagens.

Foram adquiridas quarenta projeções, igualmente espaçadas em 360 graus, em todos os protocolos de imagens. As projeções foram registradas em uma matriz de 128 x 128 elementos, cada elemento com uma área de 3,4 mm x 3,4 mm. Um fator de magnificação de 6,3 vezes foi adotado para todos os experimentos, o que corresponde a uma dimensão lateral

de elemento do volume do objeto (ou voxel) de 0,54 mm, alcançando uma resolução espacial de 2,4 mm. Uma janela de energia simétrica de 20% foi centrada no fotopico de energia do Tc99m (140 keV). O tempo de aquisição de cada projeção foi de 30 segundos, totalizando aproximadamente 23 minutos de tempo de aquisição por animal.

O protocolo de imagens sob estresse aconteceu após 2 a 3 dias do protocolo em repouso. Inicialmente os animais foram anestesiados com uma combinação de Ketamina e Xilazina (100 e 10 mg/kg) e, após estarem sedados, o cloridrato de dobutamina foi infundido em cateter posicionado na veia caudal. A administração do cloridrato de dobutamina foi realizada em infusão contínua de 25 µg/kg/min, por um minuto, com auxílio de uma bomba de infusão. Ao final da infusão da dobutamina, o Sestamibi-Tc99m (555 MBq) foi injetado em veia sublingual seguindo o mesmo protocolo estabelecido para as imagens em repouso. Durante todo o procedimento a frequência cardíaca dos animais foi monitorada por um eletrocardiograma.

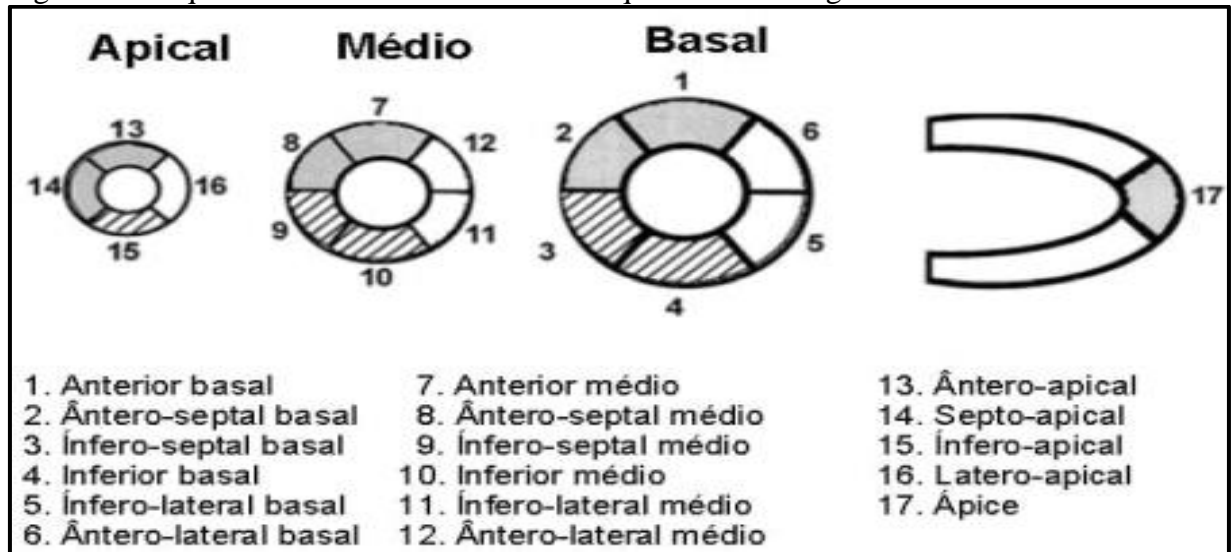
3.7.2.3 Processamento e Análise das Imagens

Após a aquisição das projeções, as imagens foram exportadas em formato DICOM para um computador pessoal, onde foram processadas para obtenção do modelo tridimensional da distribuição do radiofármaco no órgão alvo (MEJIA *et al.*, 2010).

Para isso, foi utilizado um software de reconstruções iterativas de imagens baseado no algoritmo de ordered-subsets expectation maximization (OSEM). A ferramenta foi implementada em Linguagem C, usando um compilador freeware Dev-C++ (Bloodshed Software). Para visualização final das reconstruções, foi utilizado o freeware AMIDE Medical Image Data Examiner (LOENING; GAMBHIR, 2003).

Em seguida, a perfusão miocárdica foi analisada pelo software MunichHeart® que permite uma análise completa da distribuição de radiotraçadores nos 17 segmentos das paredes do VE, figura 6, gerando um mapa polar da distribuição relativa do radiofármaco em relação ao pixel de máxima contagem, para avaliação semi-quantitativa (planimetria) das áreas de defeitos perfusionais detectados no estresse, repouso e a diferença entre eles (reversibilidade), figura 7.

Figura 6 – Esquema de divisão do ventrículo esquerdo em 17 segmentos.



Fonte: CHALELA *et al.*, (2002).

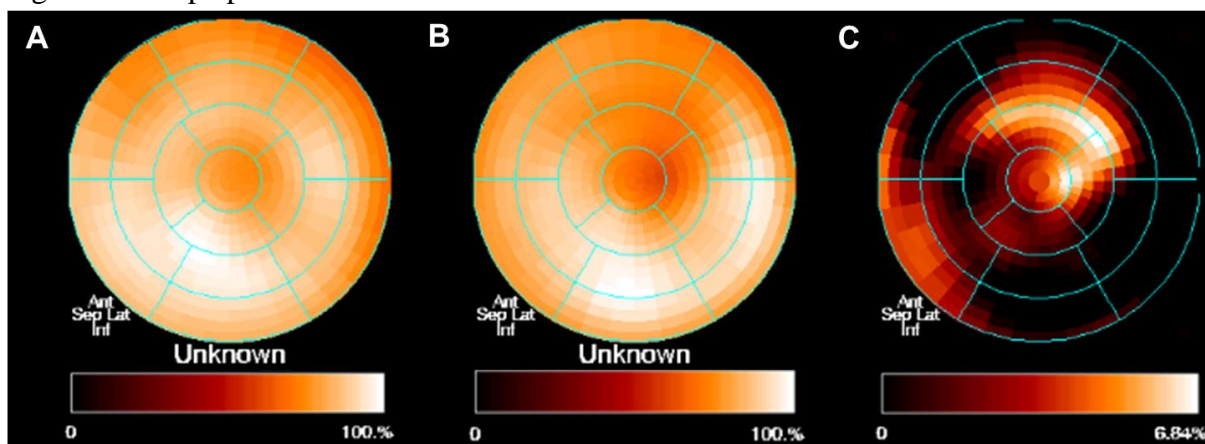
Para a análise da perfusão miocárdica, o VE foi dividido em 17 segmentos, sendo cada um deles classificado de acordo com a porcentagem de captação do radiofármaco, tanto em repouso quanto em estresse, com os seguintes escores: normal ou escore 0, com contagens entre 80% a 100%; defeito perfusional leve ou escore 1, com contagens entre 75% a 79,9%; defeito perfusional moderado ou escore 2, com contagens entre 50% a 74,9%; e defeito perfusional grave ou escore 3, com contagens inferior a 50% (HACHAMOVITCH *et al.*, 1996; CHALELA *et al.*, 2002; KLOCKE *et al.*, 2003; FARIA; CARVALHO, 2020).

Após a classificação em escores, os defeitos perfusionais apresentados nos segmentos em repouso foram denominados como ESR (escore somado em repouso) e ESE (escore somado em estresse) quando apresentados no estresse. O grau de reversibilidade ou hipocaptação transitória também foi medido através da diferença entre ESE e ESR, e chamado de ESD (escore somado da diferença).

Para a avaliação da distribuição topográfica dos defeitos de perfusão reversíveis ao longo dos 17 segmentos, foi realizada a soma do número de segmentos com distúrbios de captação no repouso e no estresse, como também a análise da diferença entre o estresse e o repouso.

Para avaliar a gravidade dos defeitos reversíveis e suas severidades no repouso, estresse e na diferença entre o estresse pelo repouso, a divisão do escore somado pelo número de segmentos com defeitos foi realizada.

Figura 7 – Mapa polar.



A: Imagem ilustrativa do mapa polar de um animal controle em estresse. **B:** Comparação das áreas de captação do radiotraçador do mesmo animal controle em repouso. **C:** Mapa polar resultante dessa diferença do mesmo animal controle. Fonte: SIQUEIRA, A.L.F. (2021)

3.7.2.4 Eutanásia e obtenção do Soro Sanguíneo

Após anestesia em níveis mais profundos (Ketamina e Xilazina – 300 e 30 mg/kg), os animais foram eutanasiados mediante abertura do tórax.

O sangue foi coletado via punção cardíaca e, posteriormente, centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos para obtenção do soro, que foi dividido em alíquotas, congelado e armazenado a uma temperatura de -20°C até o momento do uso.

3.7.2.5 Determinações das Concentrações das Citocinas Inflamatórias

Um Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tipo sanduíche foi realizado no laboratório do Instituto de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro para quantificar as concentrações de IL- 1β , TNF- α e IL-6 no soro do sangue periférico dos animais.

Utilizando pares de anticorpos monoclonais comerciais disponíveis da BD OptEIATM, o procedimento foi realizado conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Placas de 96 poços, foram sensibilizadas com 100 μl de anticorpos monoclonais específicos para a captura da citocina desejada diluída em “coating buffer”. Em cada placa foram adicionados 100 μl de citocina padrão recombinante seguindo diluições seriadas 1:2 em “assay diluent” a partir das concentrações iniciais indicadas. Às outras fileiras foram adicionados 100 μl /poço do soro. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por duas horas e lavadas por cinco vezes com uma solução contendo PBS 20%. A seguir, foram adicionados 100

$\mu\text{l/poço}$ do anticorpo detector da citocina a ser dosada. As placas foram incubadas por 1 hora à temperatura ambiente e novamente lavadas por cinco vezes em PBS. Após esta etapa, foram adicionadas 100 $\mu\text{l/poço}$ de TMB Substrate Reagent Set (BD OptEIA™) e após 30 minutos foram adicionados 50 $\mu\text{l/poço}$ de ácido fosfórico 2N. Após adição do ácido foi realizado a leitura da placa de ELISA através do leitor automático Spectramax 384 Plus, sendo os resultados obtidos pela diferença entre as absorvâncias 450 e 570nm.

A concentração de cada citocina do soro dos animais foram dosadas em pg/ml através da comparação com as absorvâncias obtidas da curva padrão da respectiva citocina, sendo realizada simultaneamente.

3.8 Aspectos Éticos de Investigação Animal

Os animais foram submetidos aos procedimentos sob anestesia, de forma a não induzir estresse ou dor. Não foram utilizados métodos cruentos. O projeto foi executado após a devida aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, sob Protocolo nº 159/2020, anexo 1.

3.9 Análise Estatística

Os resultados das variáveis contínuas são apresentados como média \pm desvio padrão da média. As variáveis nominais foram descritas como frequência absoluta (n) e relativa (%).

O teste de Kolmogorov-Smirnov foi usado para determinar se as variáveis apresentavam distribuição gaussiana. Para a avaliação das diferenças entre os grupos ao longo do tempo, foi realizada a análise de variância (*Mixed Model ANOVA*) para modelos mistos de medidas repetidas.

Para comparação simultânea das médias das variáveis entre os grupos, foi realizado a análise de variância (ANOVA One-Way), assumindo a distribuição gaussiana das variáveis, e o teste de Kruskal-Wallis, quando a distribuição foi não normal.

Para análise específica do aumento do fluxo coronário do repouso para o pico do estresse de um mesmo grupo, foi realizado o Test T pareado.

O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$, bicaudal.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da Amostra

4.1.1 Mortalidade e Exclusão

Durante o período de intervenções foram registrados óbitos em dois grupos, sendo, 12 animais no grupo DH+STZ e um no grupo DH.

Houve também a exclusão de alguns animais devido à qualidade sub-ótima das imagens por artefatos sugestivos de contaminação. Neste caso, foram excluídos três animais do grupo controle.

Além disso, devido à pandemia por COVID-19, foi preciso interromper as atividades em dois dos laboratórios utilizados para realização dos experimentos, fato que impossibilitou a coleta das imagens do exame de cintilografia de perfusão miocárdica sob estresse farmacológico em alguns animais, sendo necessária a exclusão de três animais do grupo DH.

Desse modo, o estudo foi concluído com 7 (sete) animais no grupo controle, 8 (oito) animais no grupo DH e 6 (seis) animais no grupo DH+STZ.

4.1.2 Peso Corporal

Os valores do peso corporal dos animais, basal e final, estão apresentados na tabela 1.

Na avaliação basal, ambos os grupos alimentados com a dieta hipercalórica associada à frutose, ou seja, os animais selecionados para compor os grupos DH e DH+STZ, apresentaram peso corporal estatisticamente menor quando comparados ao grupo controle (GC vs DH, $p < 0,02$; GC vs DH+STZ, $p = 0,001$).

Na avaliação final, ao compararmos os três grupos estudados, observamos diferença estatisticamente significativa apenas do grupo DH para o grupo DH+STZ ($p < 0,03$), com os animais do grupo DH apresentando maiores valores de peso corporal.

Ao comparar os grupos e o intervalo de tempo entre as avaliações basal e final, observamos diferença significativa nos grupos DH ($p < 0,0001$) e DH+STZ ($p = 0,004$) o que indica que esses animais apresentaram uma condição de aumento significativo do peso ao final do período de experimentação (*Mixed Model ANOVA*).

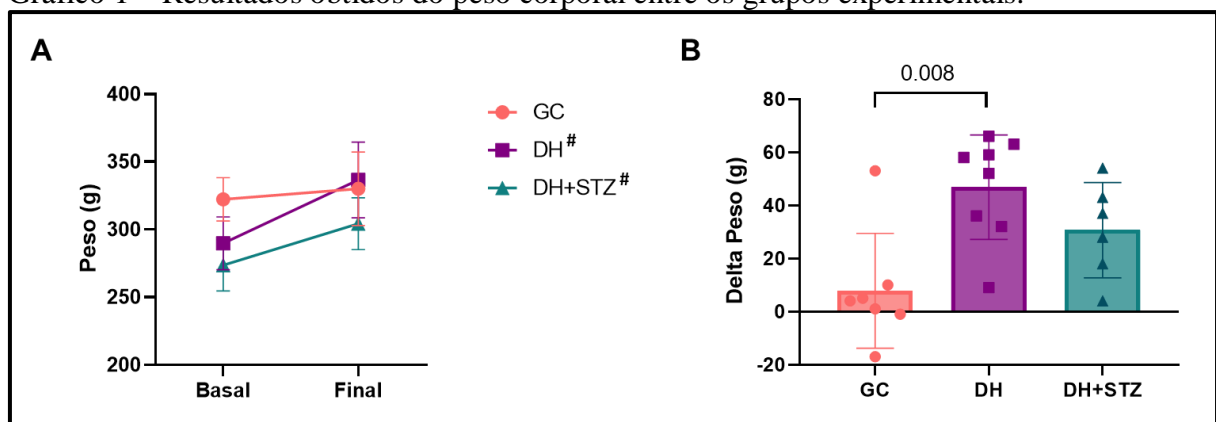
Tabela 1 – Média do peso corporal dos grupos experimentais.

Peso (g)	Grupo Controle (n = 7)	Grupo DH (n = 8)	Grupo DH+STZ (n = 6)	p
<i>Basal</i>	322,3 ± 16,0	289,8 ± 19,5*	273,5 ± 19,0*	0,005
<i>Final</i>	330,1 ± 27,2	336,6 ± 28,1 [#]	304,2 ± 19,2 ^{†#}	
<i>Delta</i>	7,9 ± 21,6	46,9 ± 19,6*	30,7 ± 18,0	0,007

Valores em média ± desvio padrão. **Mixed Model ANOVA** *em relação ao GC; †em relação ao DH, Tukey's multiple comparisons test (pós-teste) [#]em relação ao basal vs final, Sidak's multiple comparisons test (pós-teste). Delta: **Kruskal-Wallis Test** *em relação ao GC, Dunn's multiple comparisons test (pós-teste).

Observa-se ainda que todos os grupos ganharam peso ao longo do estudo, gráfico 1A, entretanto, esse incremento foi estatisticamente significativo apenas nos animais dos grupos DH e DH+STZ. Quando analisamos o delta de incremento do peso corporal, apenas o grupo que recebeu a dieta hipercalórica apresentou valores significativamente maiores do que os controles (p = 0,008), gráfico 1B (Kruskal-Wallis Test).

Gráfico 1 – Resultados obtidos do peso corporal entre os grupos experimentais.



A: Representação gráfica dos valores do peso corporal basal e final dos grupos experimentais, *Mixed Model ANOVA*. B: Representação gráfica do incremento de peso corporal entre os grupos experimentais ao final do estudo, *Kruskal-Wallis Test*.

4.1.3 Glicemia Sanguínea

Os valores de glicemia sanguínea basal e final de cada grupo experimental estão apresentados na tabela 2.

Na avaliação basal, foram observados valores de glicemia semelhantes entre os três grupos estudados (p > 0,05).

Na avaliação final, houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos, com maiores valores do grupo DH+STZ em comparação ao GC ($p < 0,0001$) e ao DH ($p < 0,03$), bem como do grupo DH em relação ao grupo controle ($p < 0,005$). Ao comparar os grupos e o intervalo de tempo entre as avaliações basal e final, por meio do teste de ANOVA para modelos mistos, foi observada uma interação significativa entre os grupos ($p < 0,01$), tabela 2 (*Mixed Model ANOVA*).

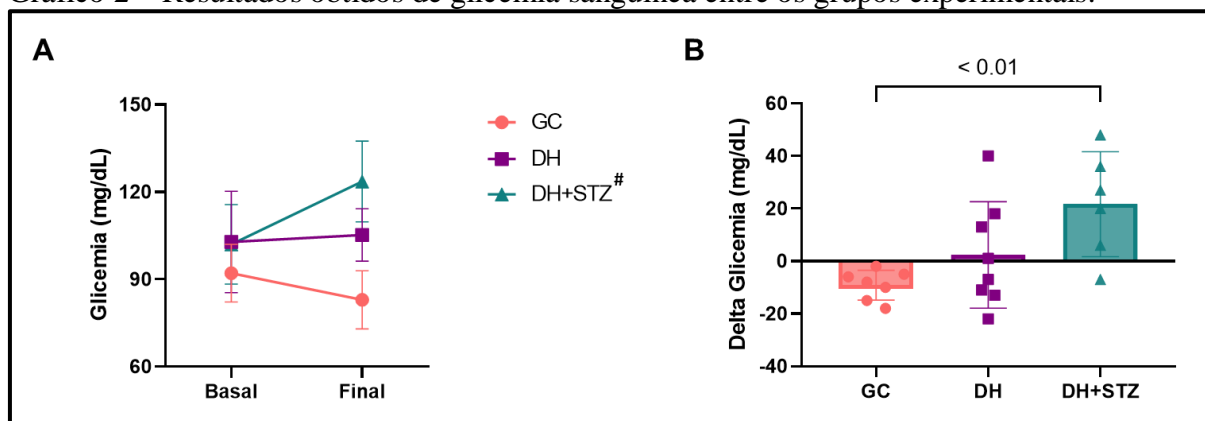
Tabela 2 – Média da glicemia sanguínea dos grupos experimentais.

Glicemia (mg/dL)	Grupo Controle (n = 7)	Grupo DH (n = 8)	Grupo DH+STZ (n = 6)	p
Basal	92,1 ± 9,9	102,9 ± 17,4	102,0 ± 13,7	0,01
Final	83,0 ± 10,0	105,3 ± 9,0*	123,7 ± 13,9*+†	
Delta	-9,1 ± 5,7	2,4 ± 20,3	21,7 ± 20,0*	0,01

Valores em média ± desvio padrão. *Mixed Model ANOVA* *em relação ao GC; †em relação ao DH, Tukey's multiple comparisons test (pós-teste) #em relação ao basal vs final, Sidak's multiple comparisons test (pós-teste). Delta: *ANOVA One-Way* *em relação ao GC, Tukey's multiple comparisons test (pós-teste).

Observa-se ainda que os animais do grupo STZ foram os únicos que apresentaram um aumento significativo da glicemia de jejum, do início para o final do estudo ($p < 0,02$), gráfico 2A. O delta de incremento da glicemia do grupo STZ apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle ($p < 0,01$), gráfico 2B (*ANOVA One-Way*).

Gráfico 2 – Resultados obtidos de glicemia sanguínea entre os grupos experimentais.



A: Representação gráfica dos valores de glicemia sanguínea basal e final dos grupos experimentais, *Mixed Model ANOVA*. B: Incremento de glicemia sanguínea entre os grupos experimentais ao final do estudo, *ANOVA One-Way*.

4.1.4 Teste de Tolerância à Glicose

Os resultados do TTG estão apresentados na tabela 3.

Ao analisar as curvas glicêmicas obtidas no teste da área sob a curva (AUC), tabela 3 e gráfico 3A, nota-se que esta foi maior no grupo DH+STZ e que houve diferença significativa nos valores obtidos da AUC entre todos os grupos experimentais ($p < 0,05$), gráfico 3B.

Em análise mais detalhada, gráfico 3C, observa-se que quinze minutos após a sobrecarga de glicose os níveis de glicemia aumentaram em todos os grupos, sendo mais expressivo e estatisticamente significativo entre os animais do DH e DH+STZ quando comparados aos controles (GC vs DH, $p < 0,004$; GC vs DH+STZ, $p = 0,0006$).

Após 30 minutos a glicemia atinge seu pico, sendo o transporte de glicose ainda significativo em ambos os grupos que receberam intervenção em comparação ao GC (GC vs DH, $p = 0,0002$; GC vs DH+STZ, $p < 0,0001$).

Após 60 minutos, observa-se declínio da glicemia no GC e DH, ao contrário do DH+STZ que ainda mostra-se elevada e diferente estatisticamente quando comparado aos demais grupos (GC vs DH+STZ, $p < 0,0001$; DH vs DH+STZ, $p < 0,0001$). Noventa minutos após a administração da glicose, a glicemia dos animais do grupo DH+STZ apresenta uma maior redução, porém ainda significativamente maior quando comparados aos animais controles e DH (GC vs DH+STZ, $p = 0,0003$; DH vs DH+STZ, $p < 0,003$).

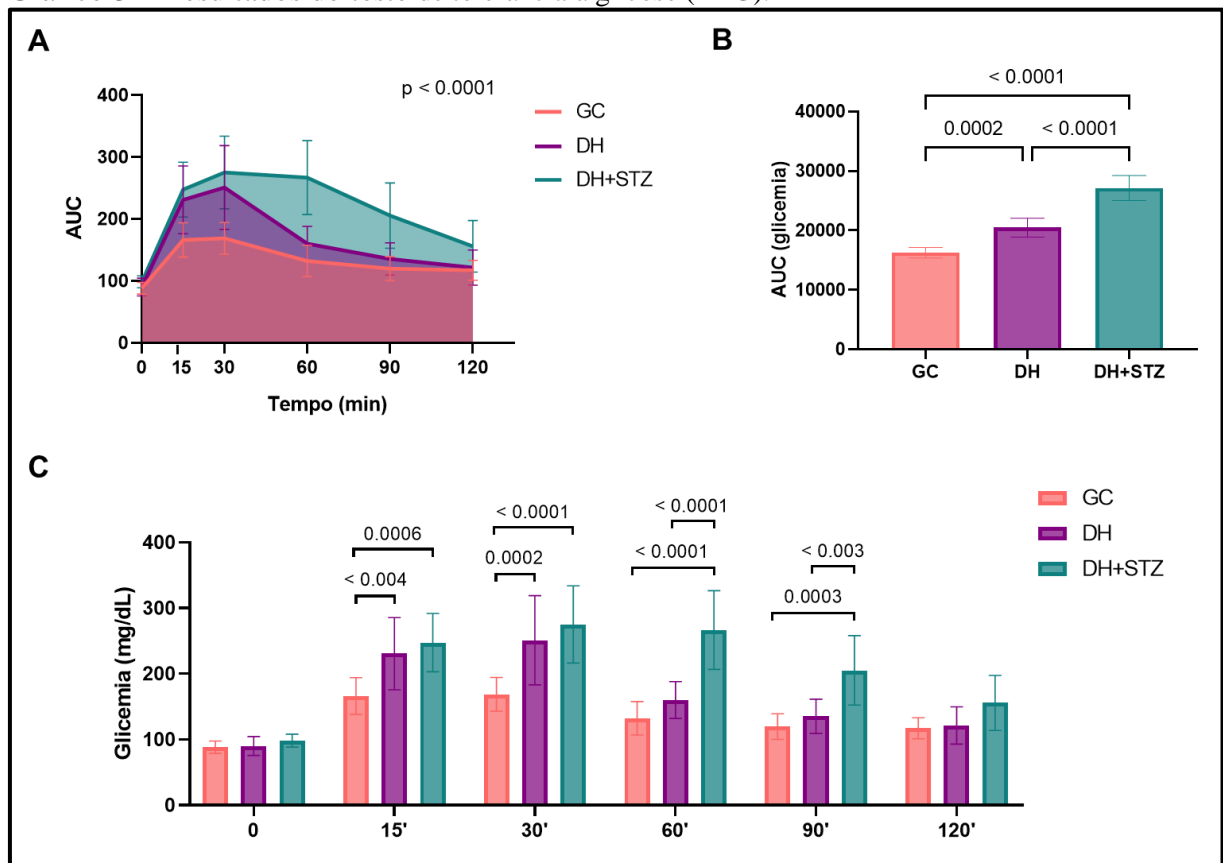
Apenas no final da avaliação, após 120 minutos do estímulo, os níveis de glicemia mostram-se novamente semelhantes entre os três grupos, não apresentando diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Tabela 3 – Teste de tolerância à glicose dos grupos experimentais em mg/dL.

Tempo (min)	Grupo Controle (n = 7)	Grupo DH (n = 8)	Grupo DH+STZ (n = 6)	p
0	88,3 ± 9,6	90,3 ± 14,4	98,3 ± 9,8	
15	166,3 ± 27,9	230,8 ± 54,9*	247,5 ± 44,5*	
30	168,9 ± 25,6	250,9 ± 67,8*	275,2 ± 58,5*	
60	132,3 ± 25,5	160,1 ± 28,1	266,7 ± 59,7*†	0,0004
90	119,7 ± 19,5	135,5 ± 26,0	205,3 ± 52,9*†	
120	117,1 ± 16,0	121,4 ± 28,3	155,7 ± 41,8	

Valores em média ± desvio padrão. *Mixed Model ANOVA* *em relação ao GC; †em relação ao DH, Bonferroni's multiple comparisons test (pós-teste).

Gráfico 3 – Resultados do teste de tolerância à glicose (TTG).



A: Área sob a curva (AUC) do TTG. **B:** Comparação média das glicemias resultantes da AUC, Tukey's multiple comparisons test (pós-teste). **C:** Glicemia obtida nos períodos avaliados no TTG entre os grupos experimentais.

4.1.5 Ecocardiograma

Os parâmetros ecocardiográficos estão apresentados na tabela 4.

Foi encontrado valores de FEVE (%) preservado nos três grupos, sendo GC $69,0 \pm 1,8$, DH $64,6 \pm 6,2$ e DH+ STZ $64,3 \pm 6,4$ ($p > 0,05$).

Demais parâmetros avaliados apresentaram-se semelhantes entre os grupos experimentais ($p > 0,05$).

Apenas a variável SIVs apresentou diferença significativa nos animais do grupo DH+STZ em comparação aos animais do GC ($p < 0,04$) (ANOVA One-Way).

4.1.6 Fluxo Coronário

Os valores do fluxo coronário de cada grupo no repouso, estresse e da reserva do fluxo coronário estão apresentados na tabela 4.

Não foram documentadas diferenças significantes nos valores obtidos dessa variável entre os três grupos experimentais ($p > 0,05$).

A reserva de fluxo também mostrou-se semelhante entre todos os grupos ($p > 0,05$).

Foi observado um aumento expressivo e significativo do fluxo coronário do repouso para o pico do estresse com dobutamina nos grupos estudados, sendo: $35,6 \pm 10,3$ vs $76,3 \pm 11,7$ cm/s ($p < 0,0001$) no grupo controle, $33,0 \pm 9,9$ vs $76,8 \pm 9,3$ cm/s ($p < 0,0001$) no grupo DH e $29,2 \pm 5,9$ vs $71,1 \pm 15,3$ cm/s ($p < 0,0001$) no grupo DH+STZ (Test T pareado).

4.1.7 Cintilografia de Perfusão Miocárdica

4.1.7.1 Análise Descritiva da Distribuição Topográfica dos Defeitos de Perfusão Miocárdica

A distribuição topográfica dos defeitos de perfusão miocárdica está apresentada no gráfico 4.

Baseando-se na divisão do VE em 17 segmentos, figura 6, verifica-se que todos os grupos experimentais apresentaram redução da captação do radiofármaco em alguns seguimentos ventriculares em repouso, gráfico 4A, e em estresse, gráfico 4B.

Nota-se ainda que nos três grupos estudados os defeitos de perfusão miocárdica reversíveis (isquemia miocárdica) apresentaram-se difusos, gráfico 4C.

Tabela 4 – Resultados dos parâmetros ecocardiográficos e fluxo coronário entre os grupos experimentais.

Variáveis	Grupo Controle (n = 7)	Grupo DH (n = 8)	Grupo DH+STZ (n = 6)	p
<i>FEVE (%)</i>	69,0 ± 1,8	64,6 ± 6,2	64,3 ± 6,4	0,2
<i>FE (%)</i>	17,0 ± 4,5	19,5 ± 4,2	18,9 ± 3,2	0,5
<i>DDFVE (cm)</i>	0,76 ± 0,09	0,82 ± 0,07	0,77 ± 0,04	0,3
<i>DSFVE (cm)</i>	0,46 ± 0,06	0,53 ± 0,06	0,50 ± 0,03	0,2
<i>SIVd (cm)</i>	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,01	0,1
<i>SIVs (cm)</i>	0,28 ± 0,02	0,25 ± 0,02	0,24 ± 0,02*	0,03
<i>PPVEd (cm)</i>	0,16 ± 0,02	0,15 ± 0,02	0,16 ± 0,03	0,9
<i>PPVEs (cm)</i>	0,25 ± 0,02	0,25 ± 0,04	0,26 ± 0,6	0,9
<i>MV A (cm)</i>	41,0 ± 5,5	44,2 ± 7,5	48,0 ± 4,6	0,1
<i>MV E (cm)</i>	87,7 ± 5,3	96,9 ± 21,3	98,6 ± 13,9	0,5
<i>MV E/A (cm)</i>	0,22 ± 0,03	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,03	0,6
<i>IMVE (g/Kg)</i>	2,21 ± 0,37	2,29 ± 0,35	2,36 ± 0,41	0,8
<i>ER</i>	0,40 ± 0,08	0,38 ± 0,07	0,42 ± 0,08	0,5
Fluxo coronário				
<i>Repouso (cm/s)</i>	35,6 ± 10,3	33,0 ± 9,9	29,2 ± 5,9	0,5
<i>Estresse (cm/s)</i>	76,3 ± 11,7 [#]	76,8 ± 9,3 [#]	71,1 ± 15,3 [#]	0,7
<i>Delta (cm/s)</i>	40,7 ± 10,8	43,8 ± 5,3	41,9 ± 18,7	0,9
Reserva de fluxo coronário	2,1 ± 0,5	2,3 ± 0,6	2,4 ± 0,9	0,9

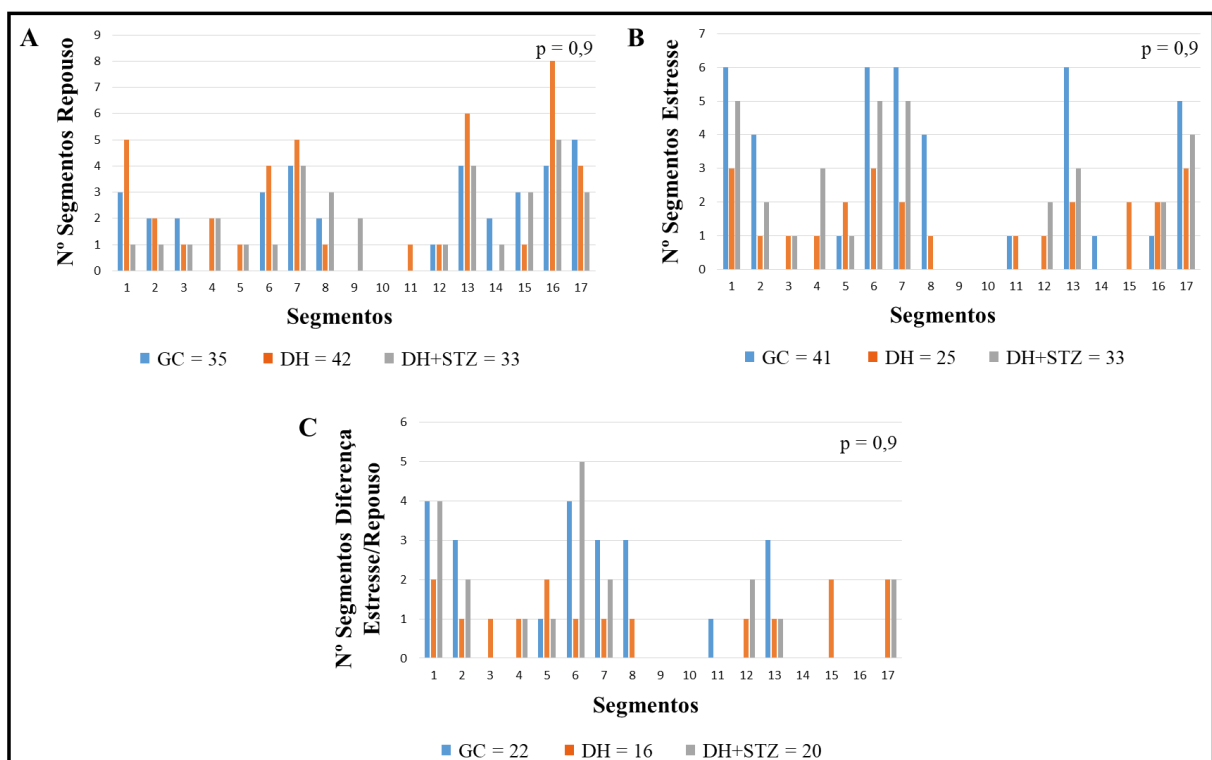
Valores em média ± desvio padrão. FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo; FE: fração de encurtamento; DDFVE: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo; DSFVE: diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo; SIVd: septo interventricular em diástole; SIVs: septo interventricular em sístole; PPVEd: parede posterior do ventrículo esquerdo em diástole; PPVEs: parede posterior do ventrículo esquerdo em sístole; MV A: amplitude onda A; MV E: amplitude onde E; MV E/A: relação onda A e E; IMVE: Índice de massa do ventrículo esquerdo; ER: Espessura relativa da parede ventricular. **ANOVA One-Way** *em relação ao GC, Tukey's multiple comparisons test (pós-teste). **Test T pareado** [#]em relação ao repouso vs estresse.

No grupo controle, os defeitos isquêmicos foram nos segmentos basais (1-6), médio ventriculares (7-12) e em apenas um segmento apical (13-17), sendo eles: anterior basal (57,1%), ântero septal basal (42,9%), ínfero lateral basal (14,3%), ântero lateral basal (57,1%), anterior médio (42,9%), ântero septal médio (42,9%), ínfero lateral médio (14,3%) e ântero apical (42,9%).

No grupo DH, houve predominância de defeitos isquêmicos nos três segmentos, basal (1-6), médio ventricular (7-12) e apical (13-17), porém de forma discreta, sendo eles: anterior basal (25%), ântero septal basal (12,5%), ínfero septal basal (12,5%), inferior basal (12,5%), ínfero lateral basal (25%), ântero lateral basal (12,5%), anterior médio (12,5%), ântero septal médio (12,5%), ântero lateral médio (12,5%), ântero apical (12,5%), ínfero apical (25%) e apical (25%).

No grupo DH+STZ, a predominância dos defeitos isquêmicos foi nos segmentos basais (1-6) e em alguns segmentos médio ventriculares (7-12) e apicais (13-17), sendo eles: anterior basal (66,7%), ântero septal basal (33,3%), inferior basal (16,7%), ínfero lateral basal (16,7%), ântero lateral basal (83,3%), anterior médio (33,3%), ântero lateral médio (33,3%), ântero apical (16,7%) e apical (33,3%).

Gráfico 4 – Frequência dos defeitos isquêmicos por segmento em repouso, estresse e a diferença.



A: Representação gráfica da frequência em que cada segmento do VE apresentou algum grau de isquemia durante a avaliação em repouso, entre os grupos GC, DH e DH+STZ. **B:** Representação gráfica da frequência em que cada segmento do VE apresentou algum grau de isquemia durante a avaliação em estresse, entre os grupos GC, DH e DH+STZ. **C:** Representação gráfica da comparação entre a avaliação em repouso e estresse da frequência de isquemia em cada segmento ventricular do VE, entre os grupos GC, DH e DH+STZ.

4.1.7.2 Análise Visual Semiquantitativa

As variáveis obtidas no exame de cintilografia de perfusão miocárdica que expressão a análise visual semiquantitativa, estão apresentadas na tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos na cintilografia de perfusão miocárdica entre os grupos experimentais.

Variáveis	Grupo Controle (n = 7)	Grupo DH (n = 8)	Grupo DH+STZ (n = 6)	p
FC				
<i>Basal (bpm)</i>	194,3 ± 10,1	230,6 ± 13,5*	222,3 ± 13,0*	0,0001
<i>Pico (bpm)</i>	284,4 ± 14,5	308,9 ± 4,5*	302,7 ± 10,6*	0,0008
<i>Delta</i>	90,1 ± 20,8	78,3 ± 11,9	80,3 ± 12,7	0,6
<i>ESR</i>	7,1 ± 5,3	7,8 ± 5,4	8,0 ± 6,1	0,9
<i>ESE</i>	7,9 ± 3,5	4,5 ± 6,6	6,8 ± 2,1	0,4
<i>ESD</i>	4,4 ± 4,2	2,4 ± 4,0	3,8 ± 1,5	0,1
Nº de segmentos com defeitos				
	5,0 ± 3,9	5,4 ± 3,0	5,5 ± 3,6	0,9
Repouso				
Nº de segmentos com defeitos				
	5,9 ± 2,0	3,1 ± 3,8*	5,5 ± 1,2	0,02
Estresse				
Nº de segmentos com defeitos				
	3,1 ± 2,3	2,0 ± 3,3	3,3 ± 1,0	0,1
Diferença				
<i>GDR</i>	1,0 ± 0,7	1,4 ± 0,4	1,3 ± 0,3	0,4
<i>GDE</i>	1,3 ± 0,4	0,9 ± 0,6	1,2 ± 0,1	0,5
<i>GDD</i>	1,0 ± 0,7	0,8 ± 0,7	1,0 ± 0,5	0,7

Valores em média ± desvio padrão. FC: frequência cardíaca; ESR: escore somado em repouso; ESE: escore somado em estresse; ESD: escore somado da diferença do estresse pelo repouso; GDR: gravidade dos defeitos em repouso; GDE: gravidade dos defeitos em estresse; GDD: diferença da gravidade dos defeitos do estresse pelo repouso. **ANOVA One-Way** *em relação ao controle, Tukey's multiple comparisons test (pós-teste)/Dunn's multiple comparisons test (pós-teste).

Foi documentado que a FC os animais dos grupos DH e DH+STZ foi significativamente maior em comparação aos animais do grupo controle, tanto no basal (GC vs DH, $p < 0,0001$; GC vs DH+STZ, $p < 0,002$) quanto no pico (GC vs DH, $p = 0,0007$; GC vs DH+STZ, $p < 0,01$), após infusão de dobutamina. No entanto, não houve diferença significativa entre o delta de incremento da FC, basal e final, indicando que o aumento provocado pelo estímulo com a dobutamina foi semelhante entre os três grupos ($p > 0,05$).

Em relação aos defeitos de perfusão miocárdico, observa-se que foram semelhantes entre todos os grupos, não apresentando diferença significativa no repouso, estresse e na diferença do estresse pelo repouso ($p > 0,05$).

Na avaliação do número de segmentos com defeitos isquêmicos de cada grupo, nota-se que estes foram similares tanto em repouso quanto na diferença do estresse pelo repouso ($p > 0,05$), apresentando diferença significativa apenas em estresse, entre o GC e DH ($p < 0,04$). Observa-se ainda que a gravidade média dos defeitos reversíveis em repouso, estresse e na diferença do estresse pelo repouso apresentaram-se semelhantes entre os três grupos experimentais ($p > 0,05$).

4.1.7.3 Imagem Ilustrativa do Estudo de Perfusão Miocárdica

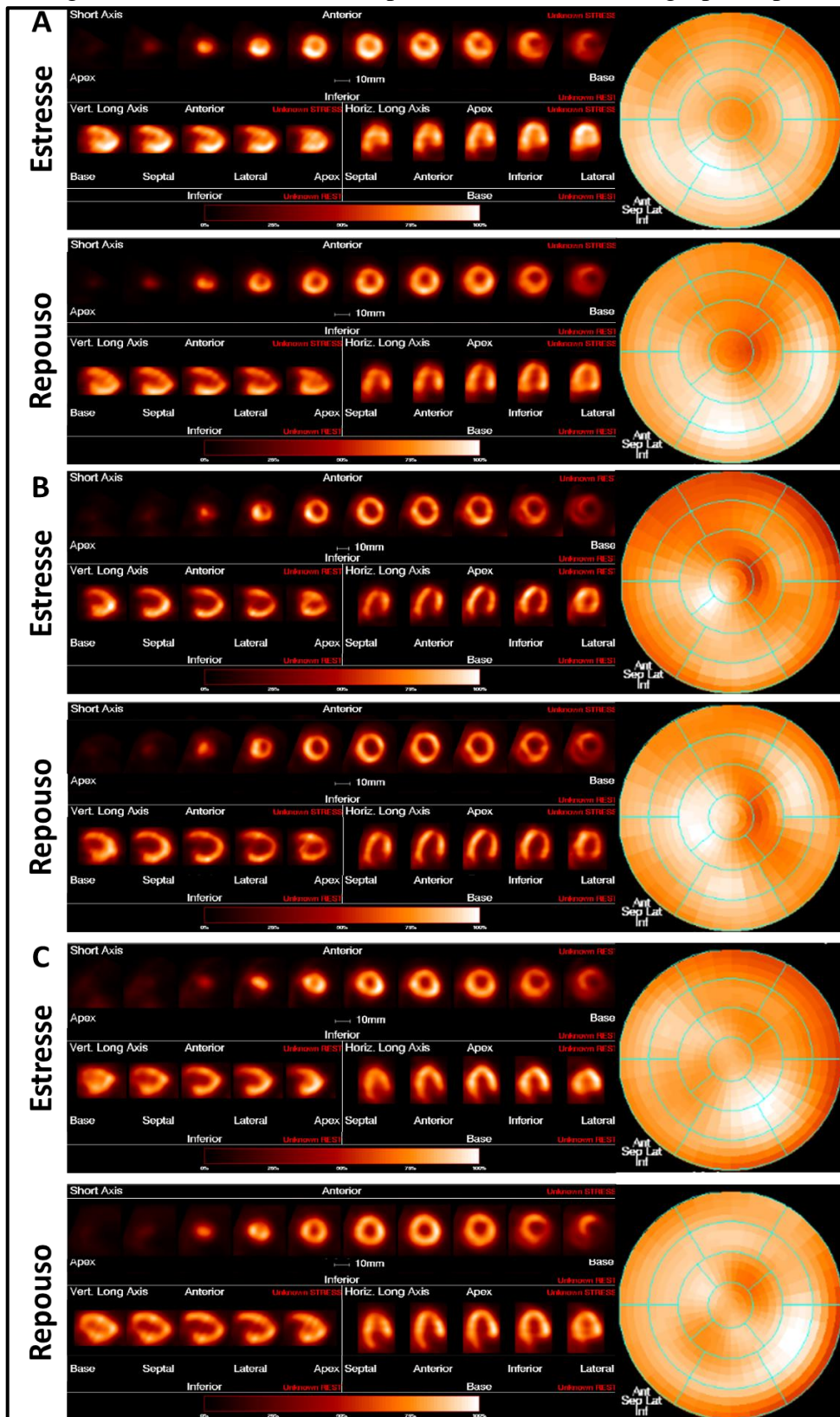
A figura 8 exemplifica a distribuição da captação do radiotraçador, em estresse e repouso, em cada grupo experimental.

Observa-se que o animal controle, figura 8A, não apresenta defeitos perfusionais reversíveis em nenhum segmento do VE.

No animal DH, figura 8B, nota-se que há defeitos perfusionais reversíveis moderados nos segmentos: ântero septal basal e ínfero septal basal, e defeitos perfusionais reversíveis leves nos segmentos: anterior basal, ínfero lateral basal, ântero lateral basal, anterior médio, ântero septal médio, ântero lateral médio, ântero apical e apical.

No animal DH+STZ, figura 8C, foram observados defeitos perfusionais reversíveis moderados apenas no segmento anterior basal e defeitos perfusionais reversíveis leves nos segmentos: ínfero lateral basal, ântero lateral basal, anterior médio e ântero lateral médio.

Figura 8 – Imagem ilustrativa do estudo de perfusão miocárdica dos grupos experimentais.



A: Animal controle. **B:** Animal DH. **C:** Animal DH+STZ. São mostrados cortes representativos das imagens tomográficas (SPECT) obtidas da cavidade ventricular esquerda (basal, médio ventricular e apical) nos eixos curto e longos vertical e horizontal, no estresse e repouso, com o mapa polar resultante exemplificado na extremidade direita da figura. Fonte: SIQUEIRA, A. L. F. (2021)

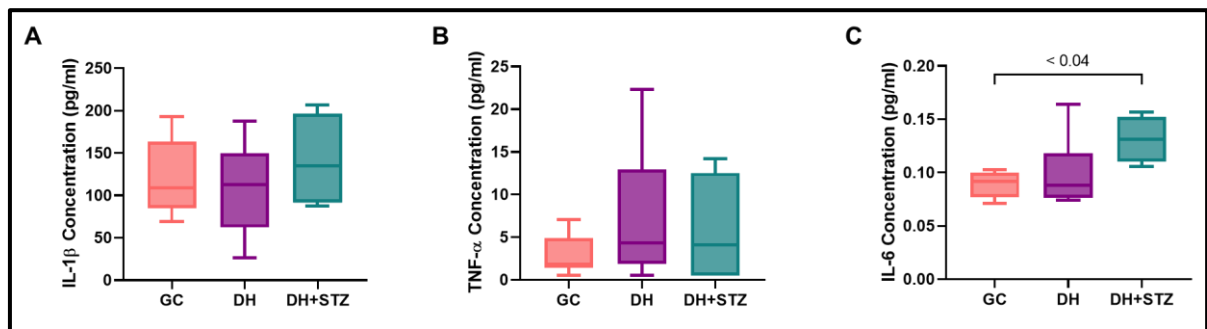
4.1.8 Avaliação das Citocinas Inflamatórias

As concentrações obtidas de citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-6, nos grupos controle (n = 8), DH (n = 10) e DH+STZ (n = 4) estão apresentadas no gráfico 5.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos estudados na comparação das IL-1 β , gráfico 5A. Do mesmo modo, na análise do TNF- α , mesmo que tenha apresentado valores de concentração mais altos nos grupos DH e DH+STZ, não foi observada diferença significativa entre os grupos, gráfico 5B.

No entanto, foi documentado valores maiores e significativos nas IL-6 dos animais do grupo DH-STZ em relação ao grupo controle (p < 0,04), gráfico 5C.

Gráfico 5 – Quantificação das citocinas inflamatórias entre os grupos experimentais.



Representação gráfica da concentração de IL-1 β (A), TNF- α (B) e IL-6 (C) nos grupos experimentais, Kruskal-Wallis Test. *em relação ao controle, Dunn's multiple comparisons test (pós-teste).

5 DISCUSSÃO

Nossos principais resultados demonstraram que a combinação de uma dieta hipercalórica com frutose na água de ratos *Wistar Kyoto*, por um período de oito semanas, foi capaz de induzir obesidade nesses animais, levando ao aumento dos níveis de glicemia sanguínea e intolerância à glicose. Documentamos também que quando essa dieta é associada a doses de estreptozotocina, as alterações no metabolismo da glicose são mais evidentes e acompanhadas do aumento da concentração de citocinas inflamatórias.

Nossos dados também evidenciaram que o tempo de oito semanas de exposição à dieta experimental e as doses da droga diabetogênica, não foram suficientes em induzir defeitos de perfusão miocárdica/isquemia miocárdica, remodelamento/disfunção ventricular e alterações no fluxo coronário.

Dessa forma, é plausível considerar que novas investigações para projetos futuros, com desenho longitudinal, utilizando o mesmo modelo experimental, no entanto, com maior tempo de exposição à doença, sejam eficazes para documentarmos alterações cardíacas compatíveis com disfunção microvascular, defeitos de perfusão miocárdica e remodelamento ventricular, associado à redução da função do ventrículo esquerdo.

5.1 Modelo Experimental

Há décadas modelos animais vêm sendo utilizados para simular os distúrbios metabólicos envolvidos na obesidade e a sua contribuição para o desenvolvimento de outras patologias associadas ao excesso de peso (MICKELSEN; TAKAIASHI; CRAIG, 1955; NASCIMENTO *et al.*, 2013; KUWABARA *et al.*, 2017).

O modelo de dieta rica em gordura associada a drogas diabetogênicas como a STZ, tem se mostrado bastante adequado para a investigação da fisiopatologia e tratamento de diversas doenças metabólicas em roedores, por reproduzir aspectos semelhantes do padrão de estabelecimento e de desenvolvimento natural da doença em humanos, ainda na fase adulta jovem, como o desenvolvimento da obesidade, hiperglicemia, intolerância à glicose e deficiência de insulina. Ao contrário do que ocorre com os humanos, os modelos animais desenvolvem alterações metabólicas em um prazo relativamente curto, de poucas semanas, possibilitando o monitoramento dessas desordens ainda em sua fase inicial, permitindo determinar de maneira controlada cada um dos componentes envolvidos na progressão da

doença (FUCHS *et al.*, 2018; RODRÍGUEZ-CORREA *et al.*, 2020; CESARETTI; KOHLMANN JÚNIOR, 2006).

O uso de dietas que envolvem em sua composição altos níveis de gordura ou carboidratos, isolados ou em associação, tem sido amplamente utilizado em pesquisas científicas por ser a dieta que mais se aproxima da alimentação humana e, conseqüentemente, da gênese da obesidade humana (NASCIMENTO *et al.*, 2008). O emprego de ácidos graxos saturados como principal fonte de gordura e da sobrecarga de frutose, além de estarem relacionados à obesidade, também apresentam forte associação ao desenvolvimento de hiperglicemia, intolerância à glicose, hipertrigliceridemia e hiperinsulinemia (LIMA *et al.*, 2000; RAMOS; BATISTA; ALBUQUERQUE, 2017).

A STZ, por sua vez, quando administrada em dose(s) baixa(s), compromete de forma leve e gradual a secreção de insulina, podendo reproduzir desordens metabólicas ainda mais graves como o desenvolvimento de diabetes do tipo 2 (ZHANG *et al.*, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2018). No entanto, a reprodução bem sucedida dessas características é dependente tanto do tempo de exposição e da composição da dieta, quanto da dose e do número de doses escolhidas, bem como intervalo de tempo entre elas (SKOVVSØ, 2014).

Ainda, por ser um agente químico potencialmente tóxico para as células betas com indução de um estado hiperglicêmico altamente variável, a morte prematura dos animais nos primeiros dias por toxicidade aguda ou pelo agravamento das complicações metabólicas ao longo do estudo devem ser consideradas (DEEDS *et al.*, 2011).

A taxa de mortalidade em decorrência do efeito citotóxico da STZ na primeira semana após indução varia de 3 a 87%, podendo atingir até mesmo 100% dos animais no decorrer do período de experimentação. Ao que parece, a alta mortalidade está mais relacionada a idade na qual os animais recebem a droga do que a quantidade injetada. Isto significa que animais injetados com STZ com idade entre 12 e 23 semanas tendem a morrer mais do que aqueles que recebem o agente químico com idade entre 6 (seis) e 11 semanas (WANG-FISCHER; GARYANTES, 2018).

Em estudo realizado com roedores de 19 a 22 semanas durante acompanhamento por 40 semanas, além das mortes relacionadas à toxicidade da STZ e gravidade dos distúrbios metabólicos, perdas durante a manipulação animal (anestesia inalatória com éter) também foram relatadas. Neste caso, a taxa de mortalidade total entre todos os animais que receberam a droga diabetogênica foi de 37% (DELFINO *et al.*, 2002).

Em nosso estudo, dos 18 animais expostos à ação da STZ, 12 foram a óbito, sendo: 3 (três) animais seis dias após a segunda dose de STZ; 1 (um) uma semana após a segunda dose

de STZ; 4 (quatro) dez dias após a segunda dose de STZ e 4 (quatro) na 22^a semana de vida, totalizando uma taxa de mortalidade de 67%. Destaca-se que nossos animais receberam duas doses de STZ, sendo uma na 18^a semana e a outra na 19^a semana de vida (faixa etária propícia a alta mortalidade), e já estavam sendo alimentados com a dieta hipercalórica, que perdurou até o final da 22^a semana, desencadeando um estado inflamatório devido a obesidade, o que podem ter potencializado a agressão da droga no organismo desses animais.

Na literatura tem sido descrito que o surgimento das primeiras alterações metabólicas promovidas por dieta hipercalórica (25,7% de banha e 46,5% de frutose) e múltiplas doses de STZ (25 mg/kg, três vezes, a cada seis semanas) ocorrem de forma progressiva podendo ocorrer em uma fase inicial, segunda semana após a aplicação, até a 18^a semana, na qual os animais apresentam intolerância moderada à glicose caracterizada por hiperglicemia em jejum após o TTG. Entre 18 e 42 semanas, há uma transição do estado de pré-diabetes (intolerância à glicose) e de resistência à insulina para DM2, sendo esta segunda fase caracterizada por hiperglicemia franca, altas concentrações de triglicerídeos, níveis elevados de hemoglobina glicada, disfunção das células beta pancreáticas e diminuição dos níveis de peptídeo C, com lesões de órgãos-alvos e complicações cardiovasculares ao final de 56 semanas (BARRIÈRE *et al.*, 2018).

Em nosso estudo foram utilizados ratos *Wistar Kyoto* com 22 semanas de vida, submetidos à dieta hipercalórica associada à frutose por um período de oito semanas, sendo expostos à ação da STZ nas quatro semanas finais. Embora os animais nessa idade já sejam considerados adultos, a exposição aos eventos metabólicos desencadeados pela dieta ainda não é crônica, o que limitou a documentação de lesões em órgão alvo.

A fim de desenvolver um modelo experimental de obesidade com progressão gradual para o estágio de diabetes, Vatandoust e colaboradores (2018) alimentaram ratos *Wistar* (150 ± 5 g) com dieta rica em gordura e carboidratos (30% de frutose adicionada na água) por dez semanas, associando duas doses de STZ (30 mg/kg) com intervalo de uma semana. Após o período de experimentação, foi verificado aumento significativo no peso ($191,6 \pm 6,5$ g vs $223,5 \pm 3,2$ g, $p < 0,05$) e nos níveis de glicemia de jejum ($5,3 \pm 0,4$ mmol/L vs $5,8 \pm 0,1$ mmol/L, $p < 0,05$) e de triglicerídeos ($1,2 \pm 0,1$ mmol/L vs $2,1 \pm 0,3$ mmol/L, $p < 0,05$) nos animais que receberam a dieta experimental e a droga ($n = 8$) quando comparados aos animais que receberam somente ração padrão ($n = 8$). Além disso, os níveis de insulina apresentaram-se menores ($1,3 \pm 0,2$ µg/L vs $0,5 \pm 0,03$ µg/L, $p > 0,05$) e hiperglicemia e intolerância à glicose foram demonstradas nesse grupo após o TTG (VATANDOUST *et al.*, 2018).

Com o intuito de identificar qual o modelo mais apropriado para a investigação dos mecanismos envolvidos nas doenças metabólicas, Melo e colaboradores (2019) avaliaram diferentes dietas hipercalóricas (alto teor de gordura; alto teor de sacarose; alto teor de gordura + alto teor de sacarose; alto teor de gordura + STZ - 25 mg/kg) em diferentes tempos de exposição (3, 4, 16, 19 e 25 semanas) em ratos *Wistar* (200-300 g). Concluíram que o modelo de dieta com 60% de gordura ofertado por 19 semanas é o mais eficiente em induzir distúrbios metabólicos, uma vez que desenvolveu obesidade, alterou glicemia de jejum, promoveu intolerância à glicose, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, além de deposição de gordura no fígado nos roedores (MELO *et al.*, 2019).

Em outro estudo, ratos *Wistar* (6 semanas de idade) foram alimentados com diferentes tipos de dieta, sendo elas padrão, de cafeteria, pobre em gordura, rica em gordura e rica em sacarose, por dez semanas. Foi verificado que a dieta de cafeteria desencadeou manifestações mais pronunciadas de obesidade e resistência à insulina. Os animais desse grupo ganharam mais peso, apresentaram dislipidemia, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e esteatose hepática em comparação aos demais animais. Observou-se ainda que as dietas ricas em gordura e em sacarose também promoveram obesidade e hiperglicemia, embora esta última não significativa (GUAL-GRAU *et al.*, 2019).

Sampey e colaboradores (2011) também estudaram a influência das dietas padrão, de cafeteria, com baixo teor de gordura e rica em gordura nos modelos animais de obesidade. Neste estudo, ratos *Wistar* (9-10 semanas de idade) receberam suas respectivas dietas por 15 semanas. Ao término do período experimental, foi constatado que a obesidade, bem como os níveis de hiperglicemia, hiperinsulinemia e intolerância à glicose, estavam mais exacerbados nos animais alimentados com dieta de cafeteria, quando comparados aos outros três grupos ($p < 0,05$). No entanto, animais alimentados com dieta rica em gordura também apresentaram sobrepeso, intolerância à glicose e resistência à insulina em comparação aos animais controles ($p < 0,05$) (SAMPEY *et al.*, 2011).

Desta forma, observamos que na literatura existem algumas variações quanto ao tipo de dieta, tempo de exposição, quantidade de doses de STZ e idade dos animais. Em nosso estudo, embora os animais injetados com STZ apresentaram os maiores níveis glicêmicos entre todos os grupos e esse incremento foi estatisticamente significativo quando comparado aos animais controles, que permanecerem normoglicêmicos ($p < 0,01$), os valores atingidos estão abaixo do que a maioria dos estudos tem considerado como uma condição de diabetes (≥ 200 mg/dL) (LIANG *et al.*, 2019).

No entanto, nossos dados evidenciaram que a alimentação de oito semanas com 50% de banha associada à 20% de frutose na água e duas doses de STZ (30 mg/kg) foi eficiente em induzir os animais à obesidade com consequente alteração da glicemia sanguínea de jejum, promovendo um estado hiperglicêmico com prejuízo da tolerância à glicose revelado através do TTG, desencadeando assim um quadro de pré-diabetes nos animais do grupo STZ+DH. Ainda, animais do grupo DH também tornaram-se obesos e também sofreram comprometimento no metabolismo da glicose, indicando que independente da glicemia de jejum não estar altamente elevada, esses animais também podem ser considerados pré-diabéticos ao compararmos os seus resultados com os dos animais controles, em especial pelos resultados do TTG.

Ressalta-se que a glicemia de jejum alterada/prejudicada e a tolerância à glicose diminuída/intolerância à glicose são condições em que os níveis de glicemia sanguínea estão superiores ao que é consideração como normal, porém abaixo dos valores para diagnóstico de diabetes estabelecido. Este estado também pode ser denominado como pré-diabetes, hiperglicemia não diabética ou hiperglicemia intermediária (WHO, 2016; NCVIN, 2015; IDF, 2019).

5.2 Métodos de Imagem

5.2.1 Ecocardiografia

Em nosso estudo, medidas não invasivas da função sistólica e da estrutura ventricular esquerda foram utilizadas por meio da ecocardiografia transtorácica. O ecocardiograma é um método de avaliação *in vivo* amplamente utilizado em animais de pequeno porte por fornecer informações importantes sobre a função e anatomia cardiovascular através da análise da geometria do VE, espessura da parede, volume e massa (SCHWARZ *et al.*, 1998; LITWIN *et al.*, 1994; LITWIN *et al.*, 1995). É ainda uma técnica versátil, indolor, não invasiva, de baixo custo, que produz imagens de alta resolução espacial, temporal e seriadas do mesmo animal, que causa menos alterações fisiológicas ou perda do animal em comparação com as técnicas invasivas, permitindo assim o acompanhamento longitudinal de eventos tanto naturais, quanto patológicos (BREGAGNOLLO *et al.*, 2007; TANAKA *et al.*, 1996; SLAMA *et al.*, 2003).

Em estudo realizado com ratos *Wistar* obesos alimentados com dieta rica em gordura e frutose por 20 semanas, observou-se aumento da massa ventricular esquerda ($1,56 \pm 0,32$ g vs $2,03 \pm 0,23$ g, $p < 0,05$), do DSFVE ($2,68 \pm 0,34$ mm vs $3,31 \pm 0,44$ mm, $p < 0,05$), da PPVEd

($1,54 \pm 0,11$ mm vs $1,97 \pm 0,11$ mm, $p < 0,05$) e da ER ($0,45 \pm 0,03$ vs $0,58 \pm 0,06$, $p < 0,05$), com diminuição do DDFVE ($7,50 \pm 0,40$ mm vs $6,53 \pm 0,49$ mm, $p < 0,05$) e da FEVE ($0,92 \pm 0,01\%$ vs $0,89 \pm 0,03\%$, $p < 0,05$) em comparação aos animais controles. Além da disfunção e remodelamento ventricular, esses animais apresentaram ainda níveis mais elevados de glicemia, insulina e pressão arterial sistólica e alterações do perfil lipídico ($p < 0,05$) (FERRON *et al.*, 2018).

Em outro estudo, ratos *Wistar* obesos com intolerância à glicose e resistência à insulina, alimentados com dieta rica em gordura por 15 semanas, também apresentaram aumento da massa do VE ($0,84 \pm 0,10$ g vs $0,96 \pm 0,07$ g, $p < 0,05$), do DSFVE ($3,54 \pm 0,44$ mm vs $3,90 \pm 0,42$ mm, $p < 0,05$) e da PPVEd ($1,42 \pm 0,06$ mm vs $1,50 \pm 0,05$ mm, $p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. Apesar da obesidade não ter alterado a função diastólica, o DDFVE ($8,18 \pm 0,53$ mm vs $8,52 \pm 0,35$ mm, $p > 0,05$) também estava aumentado nesses animais. No entanto, em análise do músculo papilar isolado, foi possível observar maior rigidez miocárdica nos ratos obesos e hiperglicêmicos em decorrência da deposição de colágeno no miocárdio e alterações ultraestruturais nos cardiomiócitos, como ausência e/ou desorganização dos miofilamentos, vesículas do retículo sarcoplasmático dilatadas, presença de grandes quantidades de gotículas de lipídios entre as miofibrilas e alterações nas mitocôndrias (LEOPOLDO *et al.*, 2010).

A obesidade e intolerância à glicose também induziram alterações cardiovasculares em animais tratados com dieta hipercalórica por 30 semanas. Ratos *Wistar Kyoto* apresentaram valores menores de DDFVE ($8,4 \pm 0,7$ mm vs $8,2 \pm 0,4$ mm, $p < 0,05$) e DSFVE ($4,6 \pm 0,5$ mm vs $4,1 \pm 0,5$ mm, $p < 0,05$), maior espessura do SIVd ($1,5 \pm 0,04$ mm vs $1,6 \pm 0,08$ mm, $p < 0,05$), da PPVEd ($1,5 \pm 0,04$ mm vs $1,5 \pm 0,09$ mm, $p < 0,05$) e da ER ($0,36 \pm 0,03$ vs $0,39 \pm 0,02$, $p < 0,05$), além de maiores valores de FEVE ($0,84 \pm 0,02\%$ vs $0,87 \pm 0,03\%$, $p < 0,05$), fração de encurtamento endocárdica ($45,8 \pm 2,3$ mm vs $50,1 \pm 4,0$ mm, $p < 0,05$) e velocidade de encurtamento da parede posterior ($34,1 \pm 3,0$ mm/s vs $38,4 \pm 3,9$ mm/s, $p < 0,05$), quando comparados aos animais controles (OLIVEIRA-JUNIOR *et al.*, 2014).

No entanto, Martins e colaboradores (2015) não evidenciaram alterações importantes ao avaliar a função cardíaca de ratos *Wistar* obesos e hiperglicêmicos tratados com dieta hipercalórica por 20 semanas. Com relação a estrutura, apenas o diâmetro do átrio esquerdo mostrou-se aumentado nos animais que receberam a dieta, que apresentaram também maiores medidas de área seccional transversa dos cardiomiócitos e fração intersticial de colágeno quando comparados aos animais não obesos e normoglicêmicos (MARTINS *et al.*, 2015).

Reforçando esses achados, Vileigas e colaboradores (2019) também não observaram alterações significativas na geometria ventricular de ratos *Wistar* obesos. Após 41 semanas de experimentação, a ecocardiografia não demonstrou sinais de remodelamento cardíaco nos animais alimentados com dieta rica em gordura (VILEIGAS *et al.*, 2019).

Observa-se que estudos experimentais relacionando distúrbios metabólicos e comprometimento da função cardíaca apresentam resultados divergentes. Em nosso estudo, embora os animais tenham apresentado obesidade, alteração da glicemia de jejum e intolerância à glicose, as medidas ecocardiográficas revelaram que o tempo de exposição a doença foi suficiente em promover alterações metabólicas mas não em alterar a função e estrutura cardíaca de ratos *Wistar Kyoto* com 22 semanas de vida, provavelmente por estar ainda em uma fase inicial da doença.

5.2.2 Fluxo Coronário

Diversas técnicas podem ser utilizadas para medir a velocidade do fluxo coronariano e a reserva de fluxo coronário (RFC). As avaliações desses parâmetros expressam a carga aterosclerótica coronariana global, a função endotelial e o estado da microvasculatura, tanto no cenário clínico quanto no experimental, sendo um complemento para a ecocardiografia sob estresse farmacológico com vasodilatador (SIMOVA, 2015). Ressalta-se ainda que alterações no fluxo coronário podem preceder disfunção do VE (CHANG *et al.*, 2015).

Em nosso estudo, essas medições foram realizadas por meio da ecocardiografia transtorácica com Doppler em repouso e em estresse farmacológico com dobutamina, um método de avaliação *in vivo*, não invasivo, prático, amplamente disponível, de baixo custo operacional, realizado de forma rápido e sem exposição à radiação.

A RFC é uma técnica objetiva e validada na análise funcional das artérias coronárias, sendo utilizada como ferramenta tanto diagnóstica quanto prognóstica em diferentes situações clínicas (ABREU *et al.*, 2013; SIMOVA, 2015). Através desta técnica, é possível diagnosticar estenose coronariana grave, avaliar a microcirculação coronariana no contexto de outras patologias, como hipertensão arterial, diabetes, cardiopatias e valvopatias, avaliar a eficácia de intervenções terapêuticas, como angioplastia coronária e revascularização do miocárdio e a estratificação de risco em pacientes com cardiomiopatia dilatada, doença arterial coronariana e após transplante cardíaco (MEIMOUN; TRIBOUILLOY, 2008).

A literatura aponta que RFC prejudicada é fator de risco independente para desfecho desfavorável em pacientes cardiopatas. Pacientes com cardiomiopatia hipertrófica

apresentaram RFC reduzida quando comparados a pacientes clinicamente saudáveis do ponto de vista cardiológico. Além disso, a taxa de eventos cardiovasculares, como morte súbita, infarto agudo do miocárdio não fatal, hospitalizações por insuficiência cardíaca, angina instável e fibrilação atrial, foi maior nos pacientes com RFC prejudicada do que naqueles com RFC normal (79% vs 17%, $p < 0,0001$), após três anos de acompanhamento (CORTIGIANI *et al.*, 2008).

Menor RFC também está relacionada a maior mortalidade em pacientes com doença arterial coronariana conhecida ou suspeita. Neste caso, pacientes com $RFC < 1,5$, apresentaram risco de mortalidade cardíaca 5,7 vezes maior quando comparados com aqueles com $RFC > 2,0$. Além da diminuição da RFC, esses pacientes também apresentavam isquemia miocárdica, com FEVE reduzida em repouso e ausência de aumento da FEVE induzida por estresse (MURTHY *et al.*, 2011).

RFC também prediz pior prognóstico em pacientes com DM2, sem doença arterial coronariana evidente. Durante acompanhamento médio de 79 meses, foram verificados 20 eventos cardiovasculares (5 mortes, 7 síndromes coronárias agudas, 8 revascularizações coronárias), sendo a taxa de eventos significativamente maior nos pacientes com $CFR < 2,5$ em comparação com os pacientes com $CFR \geq 2,5$ (KAWATA *et al.*, 2013).

Com relação aos modelos experimentais, a RFC também mostrou-se reduzida em estudos com animais que apresentavam algum comprometimento cardiovascular. Camundongos com aterosclerose apresentaram RFC menor quando comparados aos controles. Menor RFC também estava correlacionada com estreitamento do lúmen ($r = -0,91$, $p = 0,001$) (SARASTE *et al.*, 2008). Também foi verificado RFC diminuída em camundongos com miocardite viral. Nesses animais, a infecção precedeu a piora progressiva da função sistólica e o aumento do DDFVE na miocardite grave (SARASTE *et al.*, 2006).

Revisando a literatura científica, observamos que estudos relacionando a obesidade e intolerância à glicose, com a disfunção microvascular são limitados. Não encontramos, até o momento, estudos que utilizaram a medida de RFC como método de avaliação do estado funcional da microvasculatura em modelos animais de obesidade e pré-diabetes. Os achados do nosso estudo evidenciaram que embora o estímulo com dobutamina tenha se mostrado eficiente em aumentar expressivamente o fluxo coronário do repouso para o estresse nos grupos estudados, ratos obesos e com tolerância à glicose diminuída com 22 semanas de vida apresentaram RFC normal, sem comprometimento da microcirculação coronariana. Assim como aconteceu com as medidas de função ventricular, acreditamos também que o tempo de

exposição aos agentes causadores da doença pode ter sido determinante para o não desenvolvimento de um maior comprometimento da RFC no presente estudo.

5.2.3 Cintilografia de Perfusão Miocárdica

Neste estudo, com o intuito de detectar as implicações advindas da obesidade e hiperglicemia em modelo animal, áreas de defeitos de perfusão foram avaliadas por meio da cintilografia de perfusão miocárdica com Sestamibi-Tc99m pelo método de SPECT de alta-resolução. No modelo proposto em nosso desenho de estudo, ratos *Wistar Kyoto* com 22 semanas de vida obesos e intolerantes à glicose, devido a oito semanas de exposição à dieta hipercalórica e/ou doses de STZ, não foi possível documentar áreas com déficit perfusionais nas paredes ventriculares em repouso e em estresse, quando comparados aos ratos controles.

Diante da necessidade de aquisição de imagens cintilográficas de alta resolução espacial em torno de 2 mm, que representa uma resolução 10 vezes maior do que a obtida por uma gama câmara convencional de uso clínico, um grupo de pesquisadores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) desenvolveram um sistema de aquisição e processamento de imagens cintilográficas de alta resolução em pequenos animais (SPECT) baseado em um colimador “*pinhole*” e um sistema de suporte rotacional, que são adaptados a uma gama câmara de uso clínico (MEIJA *et al.*, 2010).

Considerando que esse sistema gera imagens de perfusão miocárdica com elevada resolução espacial em ratos controles submetidos a infarto miocárdico experimental, com qualidade comparável às imagens obtidas em humanos, este método torna-se viável e reprodutível para a avaliação de defeitos de perfusão miocárdica. É importante destacar que esta técnica permite a visualização das paredes e da cavidade ventricular esquerda, sendo relatado também forte correlação entre a medida da extensão e da topografia dos defeitos perfusionais com as áreas de infarto avaliadas na histopatologia (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Após extensiva busca da literatura científica, não encontramos até o momento, estudos que utilizaram cintilografia de perfusão miocárdica com Sestamibi-Tc99m pelo método de SPECT de alta-resolução, para avaliação da perfusão miocárdica em repouso e em estresse, em modelo de ratos obesos e hiperglicêmicos. Dessa forma, devido à originalidade do estudo, utilizamos alguns parâmetros de comparação de estudos clínicos, realizados em população com diagnóstico de obesidade e quadros de hiperglicemia.

Estudos realizados em pacientes com síndrome metabólica documentaram que essa patologia está associada a alterações perfusionais cintilográficas. Pacientes com síndrome

metabólica apresentaram mais defeitos de perfusão fixos e reversíveis, maior número de segmentos isquêmicos e maior extensão e gravidade dos defeitos de perfusão (RUBBO-BLANCO *et al.*, 2015; SHAW *et al.*, 2006).

Em estudo realizado com pacientes adultos pré-diabéticos e com obesidade visceral, foi verificado que esses pacientes apresentam defeitos de perfusão miocárdica mesmo na ausência de doença cardíaca sintomática. Isto significa que alterações na microcirculação coronariana podem desencadear o aparecimento de defeitos de perfusão miocárdica, antes do surgimento da doença cardíaca, sendo um marcador de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares futuras (NASR; SLIEM, 2010).

Em outro estudo realizado com indivíduos obesos através de tomografia computadorizada por fóton único, defeitos de perfusão miocárdica fixos foram verificados em 24% dos pacientes, enquanto que defeitos de perfusão reversíveis estavam presentes em 34% da população estudada. Esses pacientes também apresentaram pior prognóstico em comparação com aqueles com perfusão miocárdica normal (42%) (KORBEE *et al.*, 2013).

Em estudo clínico com pacientes diabéticos sem diagnóstico prévio ou sintomas de doença microvascular, foi verificado que 25,4% dos pacientes apresentaram imagens de perfusão miocárdica anormais com defeitos fixos ou com isquemia (reversíveis) com alto risco substancial para desenvolvimento de eventos cardiovasculares (OKI *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, embora animais do grupo DH e DH+STZ tenha apresentado áreas com defeitos perfusionais de leve a moderada intensidade, esses defeitos não foram significativos, provavelmente pelo curto período de exposição aos distúrbios metabólicos de apenas oito semanas.

Como já mencionado anteriormente, uma vez que não há estudos prévios utilizando a técnica de imagens cintilográficas para perfusão miocárdica em animais obesos e hiperglicêmicos, comparamos também, por extrapolação, outros estudos que utilizaram dessa mesma metodologia em outros modelos experimentais.

Em modelos de animais com cardiomiopatia crônica da doença de Chagas, afecção que também causa comprometimento da microcirculação coronariana, foi relatado que *hamsters* chagásicos apresentaram defeitos de perfusão miocárdica difusos nos segmentos apical, anterior basal, ântero septal basal, ínfero septal basal e inferior médio (TANAKA *et al.*, 2017).

Em estudo semelhante, Oliveira e colaboradores (2018) também documentaram defeitos de perfusão miocárdica difusos em *hamsters* chagásicos com 10 meses de infecção, com acometimento de $27,7 \pm 19$ % do ventrículo esquerdo (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Em modelos de animais com hipertensão arterial crônica, ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentaram defeitos de perfusão reversíveis difusos, de intensidade leve a moderada, envolvendo os segmentos anterior basal, ântero septal basal, ínfero septal basal, inferior basal, ínfero lateral basal, ântero lateral basal, anterior médio, ântero septal médio, ínfero septal médio, ínfero lateral médio, ântero lateral médio, ântero apical, septo apical e apical, sugerindo que o mecanismo causador desse déficit perfusional seja um dano na microcirculação e não em grandes vasos coronários (FARIA; CARVALHO, 2020).

5.3 Citocinas Inflamatórias

A obesidade está associada a um estado de inflamação crônica, caracterizado pela presença de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , entre outras, produzidas no tecido adiposo pelos adipócitos e em menor quantidade pelos macrófagos, células musculares e hepáticas (HOTAMISLIGIL, 2006; SHOELSON; LEE; GOLDFINE, 2006). Além do processo inflamatório associado à obesidade, a superexpressão dessas citocinas altera a sensibilidade à insulina, induzindo a um estado de hiperinsulinemia, representando uma ligação da inflamação à patogênese da obesidade e resistência à insulina (NEELS *et al.*, 2006).

Estudos em humanos revelam que as concentrações séricas de citocinas inflamatórias estão aumentadas em indivíduos obesos quando comparados aos não obesos, existindo ainda uma associação com o IMC elevado. Esses estudos evidenciaram relação significativa entre obesidade total e relação cintura-quadril aumentadas com maiores concentrações de TNF- α e IL-6 ($p < 0,05$) em mulheres obesas (IMC: $37,2 \pm 2,2$ kg/m²) (ZICCARDI *et al.*, 2002). Ainda observaram que IMC ≥ 30 kg/m² correlacionou-se positivamente com maiores níveis de IL-6 (IMC $\geq 30 - 40$ kg/m², $r = 62$, $p < 0,001$; IMC ≥ 40 kg/m², $r = 61$, $p = 0,005$) (KHAODHIAR *et al.*, 2004).

Em situações de hiperglicemia, como no DM2, o aumento dos níveis de glicemia sanguínea também altera as concentrações de citocinas e quimiocinas específicas, ativando os genes envolvidos na inflamação (DONATH; SHOELSON, 2011). Desta forma, indivíduos diabéticos apresentam aumento expressivo de células T CD4, IFN- γ , TNF- α , IL-8, IL-6, IL-1 β e IL-17, sugerindo que a inflamação sistêmica de baixo grau neste distúrbio está associada ao desenvolvimento de complicações diabéticas e à sua patogênese (MAHMOUD; AL-OZAIRI, 2013). O aumento desordenado de citocinas pró-inflamatórias também foi relacionado a

ocorrência de cetoacidose diabética ou hiperglicemia não cetótica (LI; HUANG; SHEN, 2014).

Em modelos de animais obesos e pré-diabéticos, a expressão de algumas citocinas também estavam aumentadas. Ratos *Wistar* alimentados com dieta hipercalórica apresentaram tecido adiposo retroperitoneal inflamado, com maiores níveis de TNF- α ($p < 0,001$), IL-1 β ($p < 0,01$) e IL-6 ($p < 0,01$), além de maior infiltrado inflamatório, hiperglicemia e leve resistência à insulina quando comparados aos animais controles ($p < 0,001$) (KUWABARA *et al.*, 2017).

O aumento da produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6 também foi observado no soro de animais obesos e hiperglicêmicos tratados com dieta rica em gordura associada a frutose 15%. Tanto TNF- α , quanto IL-1 β e IL-6 foram expressas em maior quantidade nesse grupo em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$), atribuindo ao estado de inflamação o fator causal da hiperglicemia, intolerância à glicose e resistência à insulina associada à obesidade (ZHAO *et al.*, 2020).

Em nosso estudo, apenas a citocina inflamatória IL-6 mostrou-se alterada no grupo DH+STZ quando comparado ao GC. Embora as concentrações de IL-1 β apresentem-se maiores nos animais DH+STZ e dos níveis de TNF- α ter sido maiores em ambos os grupos que foram alimentados com a dieta hipercalórica, não houve diferença estatística. No entanto, essas citocinas juntamente com a IL-6 podem prejudicar a sinalização da glicose e insulina, contribuindo para a hiperglicemia, intolerância à glicose e resistência à insulina em humanos e roedores obesos, uma vez que IL-6 está fortemente relacionada ao desenvolvimento dessas disfunções associada à obesidade.

6 CONCLUSÕES

A alimentação por um período de oito semanas com uma dieta hipercalórica associada à frutose na água induziu obesidade e intolerância à glicose nos animais.

A aplicação de duas doses de 30 mg/kg de STZ, associada a essa dieta, foi capaz de provocar maior aumento dos níveis glicêmicos em jejum e durante o teste de tolerância a glicose, bem como permitiu documentarmos o aumento da concentração de citocinas inflamatórias.

Na fase da evolução dos distúrbios metabólicos, induzidos pela obesidade e hiperglicemia, em que os animais foram estudados, não foi possível documentar defeitos de perfusão miocárdica, remodelamento ventricular e alterações no fluxo coronariano.

REFERÊNCIAS

- ABREU, J. S., *et al.* Coronary Flow Velocity Reserve during Dobutamine Stress Echocardiography. **Arq Bras Cardiol**, v. 102, n. 2, p. 134-142, 2013.
- ALBERTI, K. G.; ZIMMET, P.; SHAW, J. The metabolic syndrome: a new worldwide definition. **Lancet**, v. 366, n. 9491, p. 1059-1062, 2005.
- ARAÚJO, T. M. V.; FELIPINI, R. C. **Descrição do método de indução de diabetes mellitus para testes de novas drogas e procedimentos específicos**. 2010. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA OBESIDADE E DA SÍNDROME METABÓLICA. **Diretrizes Brasileiras de Obesidade 2016**. São Paulo, 2016.
- BAHIA, L. R.; ARAÚJO, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. **Revista HUPE**, v. 13, n. 1, p. 13-17, 2014.
- BARRIÈRE, D. A., *et al.* Combination of high-fat/high-fructose diet and low-dose streptozotocin to model long-term type-2 diabetes complications. **Sci Rep**, v. 8, n. 1, p. 424, 2018.
- BECKMAN, J. A.; CREAGER, M. A.; LIBBY, P. Diabetes and atherosclerosis: epidemiology, pathophysiology, and management. **JAMA**, v. 287, n. 19, p. 2570-2581, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Vigitel Brasil 2019: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde, 2020. 135 p.
- BREGAGNOLLO, E. A., *et al.* Relative role of left ventricular geometric remodeling and of morphological and functional myocardial remodeling in the transition from compensated hypertrophy to heart failure in rats with supra-avalvular aortic stenosis. **Arq Bras Cardiol**, v. 88, n. 2, p. 225-233, 2007.
- BROUWERS, F. P., *et al.* Incidence and epidemiology of new onset heart failure with preserved vs. reduced ejection fraction in a community-based cohort: 11-year follow-up of PREVEND. **Eur Heart J**, v. 34, n. 19, p. 1424-1431, 2013.
- CARVALHO, M. H. C.; COLAÇO, A. L.; FORTES, Z. B. Citocinas, Disfunção Endotelial e Resistência à Insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 1-9, 2006.
- CASTRO, C. A., *et al.* Experimental type 2 diabetes induction reduces serum vaspin, but not serum omentin, in Wistar rats. **Int J Exp Pathol**, v. 98, n. 1, p. 26-33, 2017.
- CECCHI, F., *et al.* Coronary microvascular dysfunction and prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. **N Engl J Med**, v. 349, n. 11, p. 1027-1035, 2003.
- CESARETTI, M. L. R.; KOHLMANN JÚNIOR, O. Modelos Experimentais de RI e Obesidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.
- CHADDERDON, S. M., *et al.* Proinflammatory endothelial activation detected by molecular imaging in obese nonhuman primates coincides with onset of insulin resistance and progressively increases with duration of insulin resistance. **Circulation**, v. 129, n. 4, p. 471-478, 2014.

CHALELA, W. A. *et al.*, Primeira Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia Sobre Cardiologia Nuclear. **Arq Bras Cardiol**, v. 78, p. 16-20, 2002.

CHANG, W. T., *et al.* Avaliação baseada em ultrassom do fluxo da artéria coronária e reserva de fluxo coronário usando o modelo de sobrecarga de pressão em camundongos. **J Vis Exp**, v. 98, p. e52598, 2015.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 28, p. 11-23, 2007.

CLEMENT, K.; LANGIN, D. Regulation of inflammation related genes in human adipose tissue. **J Intern Med**, v. 262, n. 4, p. 422-30, 2007.

CORTIGIANI, L., *et al.* Prognostic implications of coronary flow reserve on left anterior descending coronary artery in hypertrophic cardiomyopathy. **Am J Cardiol**, v. 102, n. 12, p. 1718-1723, 2008.

CZECH, M. P.; CORVERA, S. Signaling mechanisms that regulate glucose transport. **J Biol Chem**, v. 274, n. 4, p. 1865-1868, 1999.

DEEDS, M. C., *et al.* Single dose streptozotocin-induced diabetes: considerations for study design in islet transplantation models. **Lab Anim**, v. 45, n. 3, p. 131-140, 2011.

DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.32, n.2, p.157-163, 2009.

DELFINO, V. D. A., *et al.* Diabetes mellitus induzido por estreptozotocina: comparação em longo prazo entre duas vias de administração. **J Bras Nefrol**, v. 24, n. 1, p. 31-36, 2002.

DI CARLI, M. F., *et al.* Role of Chronic Hyperglycemia in the Pathogenesis of Coronary Microvascular Dysfunction in Diabetes. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, n. 8, p. 1387-1393, 2003.

DONATH, M. Y.; SHOELSON, S. E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 98-107, 2011.

DUBOIS, D.; DUBOIS, E. F. A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known. **Arch Intern Med**, v. 17, p. 863-71, 1916.

ELLULU, M., *et al.* **Epidemiology of obesity in developing countries: challenges and prevention.** **Glob Epidemi Obes**, v. 2, n. 2, p. 1-6, 2014.

EVERETT, B. M., *et al.* The relative strength of C-reactive protein and lipid levels as determinants of ischemic stroke compared with coronary heart disease in women. **J. Am. Coll. Cardiol.** n. 48, p. 2235–2242, 2006.

FAJANS, S. S.; BELL, G. I.; POLONSKY, K. S. Molecular mechanisms and clinical pathophysiology of maturity-onset diabetes of the young. **N Engl J Med**, n. 345, v. 13, p. 971-980, 2001.

FARIA, G. S.; CARVALHO, E. E. V. **Caracterização da perfusão miocárdica e remodelamento ventricular em modelo experimental de hipertensão arterial crônica.** 2020. 75 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2020.

- FAROOQI, S.; O'RAHILLY, S. Genetics of Obesity in Humans. *Endocrine Reviews*, v. 27, n. 7, p. 710–718, 2006.
- FERRON, A. J. T., *et al.* Association between Cardiac Remodeling and Metabolic Alteration in an Experimental Model of Obesity Induced by Western Diet. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1675-1687, 2018.
- FRANSSEN, C., *et al.* Myocardial Microvascular Inflammatory Endothelial Activation in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. *JACC Heart Fail*, v. 4, n. 4, p. 312-324, 2016.
- FUCHS, T., *et al.* Modelos animais na síndrome metabólica. *Rev Col Bras Cir*, v. 45, n. 5, p. 1-10, 2018.
- GIANNINI, C., *et al.* Macrovascular angiopathy in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*, v. 27, n. 5, p. 436-460, 2011.
- GUAL-GRAU, A., *et al.* Impact of different hypercaloric diets on obesity features in rats: a metagenomics and metabolomics integrative approach. *J Nutr Biochem*, v. 71, p. 122-131, 2019.
- GUERRE-MILLO, M. Adipose tissue and adipokine: for better or worse. *Diabetes Metab*, v.3, p.13-19, 2004.
- HACHAMOVITCH, R., *et al.* Exercise myocardial perfusion SPECT in patient without known coronary artery disease: incremental prognostic value and use in risk stratification. *Circulation*, v. 93, p. 905-14, 1996.
- HARRISON, D. G. Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. *J Clin Invest*, v. 100, n. 9, p. 2153-2157, 1997.
- HAVEL, P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes*, v. 53, n. 1, p. 143-151, 2004.
- HOTAMISLIGIL, G. S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*, v. 444, n. 7121, p. 860-867, 2006.
- HSUEH, W. A.; LYON, C. J.; QUIÑONES, M. J. Insulin resistance and the endothelium. *Am J Med*, v. 117, n. 2, p. 109-117, 2004.
- HSUEH, W. A.; QUIÑONES, M. J. Role of endothelial dysfunction in insulin resistance. *Am J Cardiol*, v. 92, n. 4A, p. 10J-17J, 2003.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas*. 7th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015.
- INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. *IDF Diabetes Atlas*. 9th ed. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2019.
- JAMES, P. T.; RIGBY, N.; LEACH, R. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, v. 11, n.1, p. 3-8, 2004.

KALINOWSKI, L.; MALINSKI, T. Endothelial NADH/NADPH-dependent enzymatic sources of superoxide production: relationship to endothelial dysfunction. **Acta Bioch Pol**, v. 51, n. 2, p. 459-469, 2004.

KAMADA, Y.; TAKEHARA, T.; HAYASHI, N. Adipocytokines and liver disease. **J Gastroenterol**, v. 43, n. 11, p. 811-22, 2008.

KAWATA, T., *et al.* Prognostic value of coronary flow reserve assessed by transthoracic Doppler echocardiography on long-term outcome in asymptomatic patients with type 2 diabetes without overt coronary artery disease. **Cardiovasc Diabetol**, v. 12, p. 121, 2013.

KHAODHIAR, L., *et al.* Serum Levels of Interleukin-6 and C-Reactive Protein Correlate With Body Mass Index Across the Broad Range of Obesity. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 410-415, 2004.

KATZ, D. H., *et al.* Association of low-grade albuminuria with adverse cardiac mechanics: findings from the hypertension genetic epidemiology network (HyperGEN) study. **Circulation**, v. 129, n. 1, p. 42–50, 2014.

KELM, N. Q.; BEARE, J. E.; LeBLANC, A. J. Evaluation of Coronary Flow Reserve After Myocardial Ischemia Reperfusion in Rats. **J Vis Exp**, v. 148, 2019.

KLOCKE, F. J., *et al.* ACC/AHA/ASNC guidelines for the clinical use of cardiac radionuclide imaging--executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (ACC/AHA/ASNC Committee to Revise the 1995 Guidelines for the Clinical Use of Cardiac Radionuclide Imaging). **J Am Coll Cardiol**, v. 42, n. 7, p. 1318-1333, 2003.

KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-643, 2000.

KORBEE, R. S., *et al.* What is the value of stress (99m) Tc-tetrofosmin myocardial perfusion imaging for the assessment of very long-term outcome in obese patients? **J Nucl Cardiol**, v. 20, n. 2, p. 227-233, 2013.

KUWABARA, W. M. T., *et al.* Comparison of Goto-Kakizaki rats and high fat diet-induced obese rats: Are they reliable models to study Type 2 Diabetes mellitus? **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0189622, 2017.

LANG, R. M., *et al.* Recommendations for Cardiac Chamber Quantification by Echocardiography in Adults: An Update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. **Journal of the American Society of Echocardiography**, v. 28, n. 1, p 1-39. 2014.

LANG, R. M., *et al.* Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **J Am Soc Echocardiogr**. v. 18, p. 1440-63, 2005.

LEOPOLDO, A. S., *et al.* Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. **Can J Cardiol**, v. 26, n. 8, p. 423-429, 2010.

- LI, J.; HUANG, M.; SHEN, X. The association of oxidative stress and pro-inflammatory cytokines in diabetic patients with hyperglycemic crisis. **J Diabetes Complications**, v. 28, n. 5, p. 662-666, 2014.
- LIANG, L., *et al.* Urinary metabolomics analysis reveals the anti-diabetic effect of stachyose in high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 229, 2019.
- LIMA, F. E. L., *et al.* Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. **Rev Nutr**. v. 13, n. 2, p. 73-80, 2000.
- LITWIN, S. E., *et al.* Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. **Circulation**, v. 89, n. 14, p. 345-354, 1994.
- LITWIN, S. E., *et al.* Serial echocardiographic-Doppler assessment of left ventricular geometry and function in rats with pressure-overload hypertrophy. Chronic angiotensin-converting enzyme inhibition attenuates the transition to heart failure. **Circulation**, v. 91, p. 2642-2654, 1995.
- LOENING, A. M.; GAMBHIR, S. S. AMIDE: A Free Software Tool for Multimodality Medical Image Analysis. **Molecular Imaging**, v. 2, p. 131-37, 2003.
- LUSCHER, T. F.; SEO, B. G.; BUHLER, F. R. Potential role of endothelin in hypertension. Controversy on endothelin in hypertension. **Hypertension**, v. 21, n. 6, p. 752-757, 1993.
- MACHADO, J. L. M.; ORTOLANI, E. V. P.; SPADELLA, C. T. Anastomotic healing in ileum and colon of alloxan-induced diabetic rats. **Acta Cir. Bras**, v. 24, n. 1, p. 57-61, 2009.
- MAGALHÃES, D. A., *et al.* High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. **An Acad Bras Cienc**, v. 91, n. 1, p. e20180314, 2019.
- MAHMOUD, F.; AL-OZAIRI, E. Inflammatory cytokines and the risk of cardiovascular complications in type 2 diabetes. **Dis Markers**, v. 35, n. 4, p. 235-241, 2013.
- MANO, T., *et al.* Endothelial dysfunction in the early stage of atherosclerosis precedes appearance of intimal lesions assessable with intravascular ultrasound. **Am Heart J**, v. 131, n. 2, p. 231-238, 1996.
- MANSUR, A. P.; FAVARATO, D. Mortalidade por doenças cardiovasculares no Brasil e na região metropolitana de São Paulo: atualização 2011. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 99, n. 2, p. 755-761, 2012.
- MARON, M. S., *et al.* The case for myocardial ischemia in hypertrophic cardiomyopathy. **J Am Coll Cardiol**, v. 54, n. 9, p. 866-875, 2009.
- MARTINS, F., *et al.* High-fat Diet Promotes Cardiac Remodeling in an Experimental Model of Obesity. **Arq. Bras. Cardiol**, v. 105, n. 5, p. 479-486, 2015.
- MASERI, A., *et al.* Mechanisms of angina pectoris in syndrome X. **J Am Coll Cardiol**, v. 17, n. 2, p. 499-506, 1991.
- MEIGS, J. B. Body mass index, metabolic syndrome, and risk of type 2 diabetes or cardiovascular disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 91, n. 8, p. 2906-2912, 2006.

- MEIMOUN, P.; TRIBOUILLOY, C. Non-invasive assessment of coronary flow and coronary flow reserve by transthoracic Doppler echocardiography: a magic tool for the real world. **European Journal of Echocardiography**, v. 9, n. 4, July 2008, p. 449–457, 2008.
- MEJIA, J., *et al.* A clinical gamma camera-based pinhole collimated system for high resolution small animal SPECT imaging. **Braz J Med Biol Res**, v. 43, n. 12, p. 1160-66, 2010.
- MELO, B. F., *et al.* Evaluating the Impact of Different Hypercaloric Diets on Weight Gain, Insulin Resistance, Glucose Intolerance, and its Comorbidities in Rats. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1-19, 2019.
- MÉNARD, S. L., *et al.* Abnormal in vivo myocardial energy substrate uptake in diet-induced type 2 diabetic cardiomyopathy in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 298, n. 5, p. E1049–E1057, 2010.
- MICKELSEN, O.; TAKAHASHI, S.; CRAIG, C. Experimental obesity: I. production of obesity in rats by feeding high-fat diets: three figures. **J. Nutr**, v. 57, p. 541–554, 1955.
- MURTHY, V. L., *et al.* Improved cardiac risk assessment with noninvasive measures of coronary flow reserve. **Circulation**, v. 124, n. 20, p. 2215-2224, 2011.
- NASCIMENTO, A. F., *et al.* A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and comorbidities in wistar rats. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 52, n. 6, p. 968-974, 2008.
- NASCIMENTO, A. R., *et al.* Structural and functional microvascular alterations in a rat model of metabolic syndrome induced by a high-fat diet. **Obesity**, v. 21, n. 10, p. 2046-2054, 2013.
- NASR, G.; SLIEM, H. Silent myocardial ischemia in prediabetics in relation to insulin resistance. **J Cardiovasc Dis Res**, v. 1, n. 3, p. 116-121, 2010.
- NATIONAL CARDIOVASCULAR INTELLIGENCE NETWORK AND NHS DIABETES PREVENTION PROGRAMME. Nondiabetic hyperglycaemia. London: **Public Health England**, 2015.
- NEELS, J. G., *et al.* Autoamplification of Tumor Necrosis Factor- α - A Potential Mechanism for the Maintenance of Elevated Tumor Necrosis Factor- α in Male but Not Female Obese Mice. **Am J Pathol**, v. 168, n. 2, p. 435-444, 2006.
- NILSON, E. A. F., *et al.* Custos atribuíveis a obesidade, hipertensão e diabetes no Sistema Único de Saúde, Brasil, 2018. **Rev Panam Salud Publica**, v. 44, p. 1-7, 2020.
- NILSSON, C., *et al.* Laboratory animals as surrogate models of human obesity. **Acta Pharmacol Sin**, v. 33, n. 2, p. 173-181, 2012.
- OKI, G. C. R., *et al.* Myocardial perfusion scintigraphy in the detection of silent ischemia in asymptomatic diabetic patients. **Radiol Bras**, v. 46, n. 1, p. 7-14, 2013.
- OLIVEIRA, L. F. L., *et al.* Rest myocardial perfusion disturbance is related to inflammation but not to fibrosis in experimental chronic chagas cardiomyopathy. **European Heart Journal**, v. 34, p. 978, 2013.

- OLIVEIRA, L. F. L., *et al.* Regional Myocardial perfusion disturbance in experimental chronic chagas cardiomyopathy. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 59, n. 9, p. 1430-1436, 2018.
- OLIVEIRA-JUNIOR, S. A., *et al.* AT1 receptor blockade attenuates insulin resistance and myocardial remodeling in rats with diet-induced obesity. **PLoS One**, v. 9, n. 1, p. e86447, 2014.
- OLIVOTTO, I., *et al.* Microvascular function is selectively impaired in patients with hypertrophic cardiomyopathy and sarcomeremyofilament gene mutations. **J Am Coll Cardiol**, v. 58, n. 8, p. 839–848, 2011.
- PANKOW, J. S., *et al.* Fasting plasma free fatty acids and risk of type 2 diabetes: atherosclerosis risk in communities study. **Diabetes Care**, v. 27, n. 1, p. 77-82, 2004.
- PATEL, M. R., *et al.* Low diagnostic yield of elective coronary angiography. **N Engl J Med**, v. 362, n. 10, p. 886-895, 2010.
- PAULUS, W. J.; TSCHÖPE, C. A novel paradigm for heart failure with preserved ejection fraction: comorbidities drive myocardial dysfunction and remodeling through coronary microvascular endothelial inflammation. **J Am Coll Cardiol**, v. 62, n. 4, p. 263–271, 2013.
- PENALVA, D. Q. F. Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento. **Rev Med**, v. 87, n. 4, p. 245-250, 2008.
- PICCHI, A., *et al.* Coronary microvascular dysfunction in diabetes mellitus: a review. **World J Cardiol**, n. 2, v. 11, p. 377-390, 2010.
- QURESHI, K.; ABRAMS, G. A. Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 26, p. 3540-3553, 2007.
- QUYYUMI, A. A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease. **Am J Med**, v. 105, n. 1, p. 32S–39S, 1998.
- RAMOS, V. W.; BATISTA, L. O.; ALBUQUERQUE, K. T. Effects of fructose consumption on food intake and biochemical and body parameters in Wistar rats. **Rev Port Cardiol**, v. 36, n.12, p. 937-941, 2017.
- REAVEN, G. M. Role of insulin resistance in human disease (syndrome X): an expanded definition. **Annu Rev Med**, v. 44, n. 1, p. 121–131, 1993.
- RODRÍGUEZ-CORREA, E., *et al.* Biochemical and nutritional overview of diet-induced metabolic syndrome models in rats: what is the best choice? **Nutr Diabetes**, v. 10, n. 24, p. 1-15, 2020.
- ROSS, R. Atherosclerosis: an inflammatory disease. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 115–126, 1999.
- RUBBO-BLANCO, M. L., *et al.* Metabolic Syndrome Is the Main Predictor of Myocardial Ischemia in SPECT. **Int J Cardiovasc Sci**, v. 28, n. 3, p. 189-199, 2015.
- SAMPEY, B. P., *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity (Silver Spring)**, v. 19, n. 6, p. 1109-1117, 2011.

SARASTE, A., *et al.* Severe coronary artery stenoses and reduced coronary flow velocity reserve in atherosclerotic mouse model: Doppler echocardiography validation study. **Atherosclerosis**, v. 200, n. 1, p. 89-94, 2008.

SARASTE, A., *et al.* Coronary flow reserve and heart failure in experimental coxsackievirus myocarditis. A transthoracic Doppler echocardiography study. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 291, n. 2, p. H871-5, 2006.

SCHWARZ, E. R., *et al.* Evaluation of cardiac structures and function in small experimental animals: transthoracic, transesophageal, and intraventricular echocardiography to assess contractile function in rat heart. **Basic Res Cardiol**, v. 93, n. 6, p. 477-486, 1998.

SENA, C. M.; PEREIRA, A. M.; SEIÇA, R. Endothelial dysfunction-a major mediator of diabetic vascular disease. **Biochim Biophys Acta**, v. 1832, n. 12, p. 2216–2231, 2013.

SHAH, A.; KANAYA, A. M. Diabetes and associated complications in the South Asian population. **Current Cardiology Reports**, v. 16, n. 5, p. 1-16, 2014.

SHAO, Q., *et al.* Empagliflozin, a sodium glucose co-transporter-2 inhibitor, alleviates atrial remodeling and improves mitochondrial function in high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rats. **Cardiovasc Diabetol**, v. 18, n. 1, p. 165, 2019.

SHAW, L. J., *et al.* Cardiovascular disease risk stratification with stress single-photon emission computed tomography technetium-99m tetrofosmin imaging in patients with the metabolic syndrome and diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v. 97, n. 10, p. 1538-1544, 2006.

SHEETZ, M. J.; KING, G. I. Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. **JAMA**, v. 288, n. 20, p. 2579-2588, 2002.

SHOELSON, S. E.; LEE, J.; GOLDFINE, A. B. Inflammation and insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 1793-1801, 2006.

SIMOVA, I. Coronary Flow Velocity Reserve Assessment with Transthoracic Doppler Echocardiography. **Eur Cardiol**, v. 10, n. 1, p. 12-18, 2015.

SIQUEIRA, A. S. E.; SIQUEIRA-FILHO, A. G.; LAND, M. G. P. Analysis of the Economic Impact of Cardiovascular Diseases in the Last Five Years in Brazil. **Arq Bras Cardiol**, v. 109, n. 1, p. 39-46, 2017.

SKOVSKØ, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **J Diabetes Investig**, v. 5, n. 4, p. 349–358, 2014.

SLAMA, M., *et al.* Echocardiographic measurement of cardiac output in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 284, p. 691-697, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes 2017-2018**. São Paulo: Editora Clannad, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes 2019-2020**. São Paulo: Editora Clannad, 2021.

SOLTANI, N.; KESHAVARZ, M.; DEHPOUR, A. R. Effect of oral magnesium sulfate administration on blood pressure and lipid profile in streptozocin diabetic rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 560, p. 201-205, 2007.

TABÁK, A. G., *et al.* Trajectories of glycaemia, insulin sensitivity, and insulin secretion before diagnosis of type 2 diabetes: an analysis from the Whitehall II study. **Lancet**, v. 373, n. 9682, p. 2215–2221, 2009.

TABIT, C. E., *et al.* Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. **Rev Endocr Metab Disord**. v. 11, n. 1, p. 61-74, 2010.

TANAKA, D. M., *et al.* Prolonged dipyridamole administration reduces myocardial perfusion defects in experimental chronic Chagas cardiomyopathy. **Journal of Nuclear Cardiology**, v. 26, n. 5, p. 1569-1579, 2017.

TANAKA, N., *et al.* Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. **Circulation**, v. 94, n. 5, p. 1109-1117, 1996.

TAYLOR, P. D.; POSTON, L. The effect of hyperglycaemia on function of rat isolated mesenteric resistance artery. **Br J Pharmacol**, v. 113, n. 3, p. 801-808, 1994.

TIROSH, A., *et al.* Adolescent BMI Trajectory and Risk of Diabetes versus Coronary Disease. **N Engl J Med**, v. 364, n.14, p. 1315-1325, 2011.

TOOKE, J. E. Microvascular function in human diabetes: a physiologic perspective. **Diabetes**. v. 44, n. 7, p. 721–726, 1995.

VAN HAARE, J., *et al.* Metformin and sulodexide restore cardiac microvascular perfusion capacity in diet-induced obese rats. **Cardiovasc Diabetol**, v. 16, n. 47, 2017.

VAN HAARE, J., *et al.* Early impairment of coronary microvascular perfusion capacity in rats on a high fat diet. **Cardiovasc Diabetol**, v. 14, n. 150, 2015.

VATANDOUST, N., *et al.* Novel High-Fat Diet Formulation and Streptozotocin Treatment for Induction of Prediabetes and Type 2 Diabetes in Rats. **Adv Biomed Res.**, v. 7, p. 1-9, 2018.

VILEIGAS, D. F., *et al.* Temporal Measures in Cardiac Structure and Function During the Development of Obesity Induced by Different Types of Western Diet in a Rat Model. **Nutrients**, v. 12, n. 1, p. 68-83, 2019.

WANG-FISCHER, Y.; GARYANTES, T. Improving the Reliability and Utility of Streptozotocin-Induced Rat Diabetic Model. **J Diabetes Res**, v. 2018, p. 8054073, 2018.

WILLIAMS, S. B., *et al.* Acute hyperglycaemia attenuates endothelium-dependent vasodilation in humans in vivo. **Circulation**, v. 97, n. 17, p. 1695-1701, 1998.

WHITLOCK, G., *et al.* Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: collaborative analyses of 57 prospective studies. **Lancet**, v. 373, n. 9669, p. 1083-1096, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global report on diabetes. Geneva, 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: **World Health Organization**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and Overweight: Fact Sheet**, n. 311, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Geneva: **World Health Organization**, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION AND INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycaemia. **Report of a WHO/IDF Consultation**. Geneva, 2016.

ZICCARDI, P., *et al.* Reduction of Inflammatory Cytokine Concentrations and Improvement of Endothelial Functions in Obese Women After Weight Loss Over One Year. **Circulation**, v. 105, n. 7, p. 804-809, 2002.

ZHANG, M., *et al.* The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. **Exp Diabetes Res**, v. 2008, p. 1-9, 2008.

ZHAO, Q., *et al.* Kukoamine B Ameliorate Insulin Resistance, Oxidative Stress, Inflammation and Other Metabolic Abnormalities in High-Fat/High-Fructose-Fed Rats. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 13, p. 1843-1853, 2020.

ANEXO 1 – COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



A U T O R I Z A Ç Ã O

A CEUA-FMRP autoriza a execução do projeto intitulado: *“Estudo do efeito do diabetes mellitus induzido por estreptozotocina sobre a disfunção endotelial, perfusão miocárdica e a função ventricular em ratos wistar”*, registrado com o número do protocolo **159/2020**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Marcus Vinícius Simões**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O Protocolo foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 25 de janeiro de 2021.

Colaboradores: Denise Mayumi Tamaka
Eduardo Elias Vieira de Carvalho
Antônio Oswaldo Pintya
Rafael Broilo Pavão
Ana Luísa Freitas Siqueira

Lembramos da obrigatoriedade do Relatório Final, em modelo da CEUA, para emissão do Certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	25/01/2021 a 01/03/2024
Espécie/Linkagem	Rato / Wistar Kyoto
Nº de animais	45
Possibilidade	120g / 98 dias
Sexo	Macho
Origem	Instituto de Ciências Biomédicas - USP

Ribeirão Preto, 25 de janeiro de 2021

Profa. Dra. Katuchia Uzzon Sales
Coordenadora da CEUA-FMRP-USP