



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

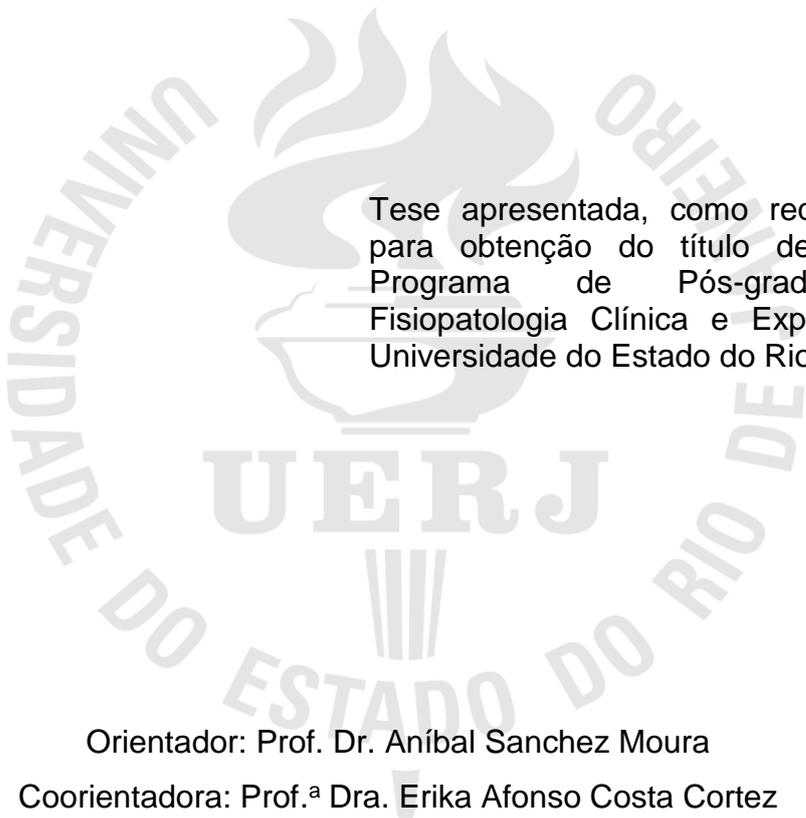
Fabiana Alves Neves

**Efeito do consumo da dieta ocidental sobre o metabolismo
energético cardíaco em camundongos *Swiss***

Rio de Janeiro
2016

Fabiana Alves Neves

**Efeito do consumo da dieta ocidental sobre o metabolismo energético cardíaco
em camundongos *Swiss***



Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Coorientadora: Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Cortez

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

N518 Neves, Fabiana Alves.

Efeito do consumo da dieta ocidental sobre o metabolismo energético cardíaco em camundongos Swiss / Fabiana Alves Neves. – 2016.
126 f.

Orientador: Aníbal Sanchez Moura.
Coorientadora: Erika Afonso Costa Cortez.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Obesidade - Teses. 2. Dieta ocidental. 3. Mitocôndrias cardíacas. 4. Metabolismo energético. I. Moura, Aníbal Sanchez. II. Cortez, Erika Afonso Costa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 613.24

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fabiana Alves Neves

**Efeito do consumo da dieta ocidental sobre o metabolismo energético cardíaco
em camundongos *Swiss***

Tese apresentada, como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor, ao
Programa de Pós-graduação em
Fisiopatologia Clínica e Experimental, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 24 de fevereiro de 2016.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ
Coorientadora: Prof.^a Dra. Erika Afonso Costa Cortez
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Juliana Camacho Pereira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dr. José Geraldo Mill
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof.^a Dra. Márcia Cristina Paes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Elicia e Fernando Neves, que sempre me deram apoio para seguir em frente na vida acadêmica. Em MEMÓRIA ao meu avô, Ruy Avelino Neves, que sempre me incentivou afirmando que a única coisa que ninguém tira de uma pessoa é o estudo. Sem eles, não teria chegado aonde eu cheguei. Obrigada por tudo, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar forças para lutar a cada dia pelos meus objetivos sem me deixar abater.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Aníbal Sanchez por acreditar na minha capacidade desde a iniciação científica. Agradeço também por todos os ensinamentos transmitidos ao longo destes 10 anos de vida científica que contribuíram para a formação do meu caráter profissional.

À minha coorientadora, Prof.^a Dra. Erika Cortez, minha “mãe na ciência”, por toda a dedicação desde a criação até a finalização deste projeto. Pelo carinho e por ser um exemplo de competência profissional para mim. Agradeço pela amizade e por me acalmar sempre que algo sai do controle.

À Prof.^a Dra. Érica Patrícia Garcia, por ter insistido para eu continuar no laboratório quando pensei em desistir de tudo ainda na época da iniciação científica. Sempre serei grata por isso, pois sem o seu apoio eu não teria chegado aonde cheguei.

À minha “irmã Angolana” e Comadre Amélia Bernardo, pela amizade e incentivo constante nestes últimos anos. Por ter me entregado sua princesa Jade Lyra para eu ser madrinha, me deixando participar não só da sua vida profissional como pessoal. Saiba que nossa amizade é eterna.

Às minhas companheiras de laboratório Anátalia Kutianski, Glauciane Lacerda, Patrícia Pacheco, Roberta Guedes, Tayanne Malafaia e Vivian Soares pelo companheirismo e fé de que tudo no final vai dar certo. Agradeço por todo apoio desde a bancada até às risadas nos momentos de descontração.

À minha “anjinha” Camila Linche, não tenho palavras para descrever todo o meu sentimento de gratidão por ti. Foi você quem mais ralou comigo na construção deste trabalho, sem contar todo o carinho e apoio psicológico que você me deu. Muito obrigada mesmo por tudo e saiba que sinto muito orgulho de ti. Você vai longe, não desista dos seus sonhos.

Aos queridos alunos de iniciação científica do LFND, Bernardo Rezende e Gabriel Torres por terem dado todo o suporte necessário para a construção deste trabalho.

As minhas amigas Érika Venceslau, Emília Magalhães, Elaine Oliveira e Fernanda Ornellas, que apesar de não estarmos grudadas como na época da

graduação as carrego sempre no meu coração. Amo estar com vocês, nossos encontros são sempre revigorantes.

A minha melhor amiga, minha mãe Elicia Neves, por me amar incondicionalmente e sempre me apoiar no que quer que seja. Muito obrigada por me transformar no que sou hoje. Digo e repito: - Você é o meu alicerce.

Ao meu pai Fernando Neves e ao meu irmão Felipe Neves, por terem orgulho de mim e pelo apoio durante toda essa jornada.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram dando apoio e incentivo.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes.

Marthin Luther King

RESUMO

NEVES, Fabiana Alves. *Efeito do consumo da dieta ocidental sobre o metabolismo energético cardíaco em camundongos Swiss*. 2016. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A obesidade, doença resultante do acúmulo excessivo de gordura corporal, é importante fator de risco para diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias e doenças cardiovasculares, doenças de alta prevalência no mundo. O processo de transição nutricional decorrente da urbanização contribuiu para o crescente número de indivíduos com obesidade, principalmente pela modificação nos hábitos alimentares da população, com inclusão de produtos industrializados, ricos em gordura saturada, sal e açúcar, denominada dieta ocidental. Os mecanismos pelos quais a obesidade induzida por dieta leva ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares não estão completamente esclarecidos, porém sabe-se que a obesidade leva ao comprometimento da função cardíaca e metabolismo energético, aumentando a morbidade e mortalidade. Na maioria dos estudos sobre obesidade, o metabolismo energético celular comprometido associa-se à disfunção mitocondrial. Neste contexto, torna-se importante avaliar o efeito da obesidade induzida por dieta ocidental sobre o metabolismo energético cardíaco. No presente estudo, avaliamos em camundongos *Swiss*, o efeito da dieta ocidental pelos períodos de 1, 2, 6, 10 e 16 semanas após o desmame. Para tal, analisamos parâmetros biométricos, ingestão alimentar, bioquímica plasmática, tolerância à glicose, consumo de oxigênio mitocondrial das fibras cardíacas frente aos substratos para carboidratos (CHO) e ácidos graxos (AG), produção de ATP cardíaco, conteúdo das proteínas envolvidas no metabolismo energético: CPT1, UCP2, PGC-1 α , GLUT1, GLUT4, IR β , PI3K, IRS-1, AMPK, pAMPK, FABPpm, CD36 e os complexos mitocondriais I-V, além da expressão gênica das proteínas: CPT1, UCP2, UCP3, GLUT4, PPAR- α e MHC- β , histologia do coração e do fígado. As diferenças entre os grupos foram analisadas por *Two-way* ANOVA, com significância $p < 0,05$. Com 1 semana, o GO apresentou redução da oxidação e RCR para CHO com aumento de mRNA CPT-1. Após 2 semanas observou-se, redução da oxidação e RCR para AG, e do conteúdo de ATP cardíaco, IRS-1 e mRNA UCP2 e 3, aumento da glicemia de jejum, HOMA-IR, colesterol total, conteúdo de CPT-1 e FABPpm. O GO alimentado por 6 semanas apresentou aumento da ingestão calórica, gordura epididimal (GE), glicemia de jejum, HOMA-IR e mRNA MHC- β . Diminuição da tolerância à glicose, dos conteúdos de GLUT4 FM, IRS-1 e PI3K. Com 10 e 16 semanas, houve aumento no GO da massa corporal, das gorduras GE e retroperitoneal, peso do fígado e estimativa para esteatose hepática, peso do VE e da razão VE/CT, colesterol total e triglicerídeos, glicemia e insulina de jejum, HOMA-IR e mRNA MHC- β . Redução da oxidação e RCR de CHO e AG, conteúdo de ATP cardíaco, da tolerância à glicose, dos conteúdos de GLUT4 FM, IRS-1, PI3K, FABPpm, mRNA das proteínas PPAR- α , UCP2 e 3. O acúmulo ectópico de gordura no fígado e desorganização e fibrose dos cardiomiócitos foi observado no GO a partir de 2 semanas. Aumento da razão pAMPK/AMPK, somente com 10 semanas. Aumento do índice de Lee e menor conteúdo de PGC-1 α , CD36 e mRNA GLUT4 apenas com 16 semanas de dieta. Com base nestes resultados, sugerimos que o consumo da dieta ocidental à curto prazo altera o metabolismo energético cardíaco, tendo como consequência à longo prazo o estabelecimento da obesidade.

Palavras-chave: Dieta ocidental. Disfunção mitocondrial. Metabolismo energético cardíaco. Obesidade induzida por dieta.

ABSTRACT

NEVES, Fabiana Alves. *Effect of Western diet consumption on the cardiac energetic metabolism in Swiss mice*. 2016. 126 f. Tese (Doutorado em Ciências - Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Obesity, a disease resulting from excessive accumulation of body fat, is a risk factor for type 2 diabetes, dyslipidemia and cardiovascular diseases, which are of high prevalence worldwide. Nutritional transition, a process associated with urbanization, has contributed to growing obesity, mainly by changing eating habits of the population, with broad inclusion of industrial products high in saturated fat, salt and sugar, called Western diet. The mechanisms by which diet-induced obesity leads to cardiovascular disease are not completely understood, but it is known that obesity leads to impairment of energy metabolism and cardiac function, increasing morbidity and mortality. In most obesity studies, the related cellular energy metabolism is compromised associated with mitochondrial dysfunction. In this context, it becomes important to investigate the effect of Western diet induced obesity in cardiac energy metabolism. In the present study, we evaluated the Western diet effect in *Swiss mice* for 1, 2, 6, 10 and 16 weeks from weaning. We analyzed biometric parameters, food intake, plasma biochemistry, glucose tolerance, mitochondrial oxygen consumption of cardiac fibers by carbohydrates (CHO) and fatty acids (AG) substrates, cardiac ATP content, the content of proteins involved in energy metabolism: CPT1, UCP2, PGC-1 α , GLUT1, GLUT4, IR β , PI3K, IRS-1, AMPK, pAMPK, FABPpm, CD36 and the mitochondrial complexes (I-V), in addition to the mRNA expression of proteins CPT1, UCP2, UCP3, GLUT4, PPAR- α and MHC- β , cardiac and liver histology. The differences between groups were analyzed by *Two-way* ANOVA, significance level $p < 0.05$. Over 1 week the GO showed reduced CHO oxidation and RCR with increased CPT-1 mRNA. After 2 weeks we observed reduced AG oxidation and RCR, lower cardiac ATP content, IRS-1 and UCP2/UCP3 mRNA, increased fasting glucose, HOMA-IR, total cholesterol, CPT-1 and FABPpm contents. The GO fed for 6 weeks showed increased food intake (Kcal), epididymal fat, fasting glucose, HOMA-IR and the MHC- β mRNA. Reduced glucose tolerance, GLUT4 FM, IRS-1 and PI3K contents. 10 and 16 weeks of diet consumption caused increase in body mass, epididymal and retroperitoneal fat, liver weight and liver/body weight ratio, left ventricular weight and left ventricular weight/tibia length ratio, total cholesterol and triglycerides, glucose and fasted insulin, HOMA-IR and the MHC- β mRNA. Reduced oxidation and RCR of CHO and AG, cardiac ATP content, glucose tolerance, GLUT4 FM, IRS-1, PI3K and FABPpm contents, and PPAR- α , UCP2/UCP3 mRNA. Ectopic fat accumulation in the liver, disorganization and fibrosis of cardiomyocytes was observed in GO after 2 weeks. Increased pAMPK/AMPK ratio was demonstrated only with 10 weeks. Increased Lee index and lower content of PGC-1 α , CD36 and GLUT4 mRNA, only after 16 weeks of diet. According to the results, we suggest that short-term Western diet consumption leads to cardiac energy metabolism impairment, resulting in the long-term the obesity establishment.

Keywords: Cardiac energy metabolism. Diet-induced obesity. Mitochondrial dysfunction. Western diet.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Metabolismo energético: Fornecimento de energia celular	29
Figura 2 -	Estrutura mitocondrial	34
Figura 3 -	Sistema de transporte de elétrons mitocondrial	37
Figura 4 -	Geração de calor por desacoplamento mitocondrial	38
Figura 5 -	Disfunção mitocondrial na obesidade.....	41
Figura 6 -	Esquema do modelo experimental dos camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental	44
Quadro 1 -	Composição das dietas controle e ocidental	45
Figura 7 -	Ingestão alimentar e energética de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental	56
Figura 8 -	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental	60
Figura 9 -	Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de animais dos grupos controle e dieta ocidental submetidas aos substratos relacionados à oxidação de carboidratos	62
Figura 10 -	Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de animais dos grupos controle e dieta ocidental submetidas aos substratos relacionados à oxidação de ácidos graxos	63
Figura 11 -	Conteúdo de ATP cardíaco de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental	64
Figura 12 -	Conteúdo total da proteína GLUT1 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	65
Figura 13 -	Conteúdo total da proteína GLUT4 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	66
Figura 14 -	Conteúdo total da proteína GLUT4 nas frações citosólica e de membrana nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental	68
Figura 15 -	Conteúdo total da proteína IR β nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	69

Figura 16 -	Conteúdo total de proteína IRS-1 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	70
Figura 17 -	Conteúdo total da proteína PI3K nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	71
Figura 18 -	Conteúdo total das proteínas AMPK, pAMPK e pAMPK/AMPK nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	73
Figura 19 -	Conteúdo total da proteína CD36 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	74
Figura 20 -	Conteúdo total da proteína FABPpm nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	75
Figura 21 -	Conteúdo total da proteína CPT-1 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	76
Figura 22 -	Conteúdo total da proteína UCP2 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	77
Figura 23 -	Conteúdo total da proteína PGC-1 α nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	78
Figura 24 -	Conteúdo total dos complexos respiratórios do sistema de transporte de elétrons (I, II, III, IV e V) nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	80
Figura 25 -	Expressão de mRNA da proteína CPT1 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	81
Figura 26 -	Expressão de mRNA da proteína UCP2 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	82
Figura 27 -	Expressão de mRNA da proteína UCP3 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	83
Figura 28 -	Expressão de mRNA da proteína GLUT4 nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	84
Figura 29 -	Expressão de mRNA da proteína PPAR- α nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	85
Figura 30 -	Expressão de mRNA da proteína MHC- β nos cardiomiócitos de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental ..	86
Figura 31 -	Histologia do fígado de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às	

	dietas controle e ocidental por 1 semana	88
Figura 32 -	Histologia do fígado de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 2 semanas	89
Figura 33 -	Histologia do fígado de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 6 semanas	90
Figura 34 -	Histologia do fígado de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 10 semanas	91
Figura 35 -	Histologia do fígado de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 16 semanas	92
Figura 36 -	Histologia do coração de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 1 semana	94
Figura 37 -	Histologia do coração de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 2 semanas	95
Figura 38 -	Histologia do coração de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 6 semanas	96
Figura 39 -	Histologia do coração de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 10 semanas	97
Figura 40 -	Histologia do coração de camundongos <i>Swiss</i> submetidos às dietas controle e ocidental por 16 semanas	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACT	Ciclo do ácido tricarboxílico
ADP	Adenosina difosfato
AGCLCoA	Ácidos graxos de cadeia longa acil coenzima A
AGL	Ácidos graxos livres
AGM	Ácidos graxos monoinsaturados
AGP	Ácidos graxos poliinsaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
Akt	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA	Análise de variância
ANT	Transportador de nucleotídeo de adenina
ASC	Área sob a curva
ATP	Adenosina trifosfato
°C	Grau centígrado
Cecal	Centro de criação de animais de laboratório da FIOCRUZ
cm	Centímetro
CPT1	Carnitina palmitoil transferase 1
CS	Citrato sintase
CT	Comprimento da tíbia
DALY	Anos de vida ajustados
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EP	Espaço porta
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FABPpm	Proteína de ligação de ácidos graxos da membrana plasmática
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FAT/CD36	Proteína transportadora de ácidos graxos integrada à membrana

FATP1 e 6	Proteínas transportadoras de ácidos graxos
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GC	Grupo com dieta controle
GO	Grupo com dieta ocidental
g/Kg	Gramas por quilograma
GLUTs	Transportadores de glicose
GLUT1	Transportador de glicose 1
GLUT4	Transportador de glicose 4
GLUT4 FC	Transportador de glicose 4 da fração citosólica
GLUT4 FM	Transportador de glicose 4 da fração de membrana plasmática
H ⁺	Íon hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HE-	Hematoxilina-Eosina
HK	Hexoquinase
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMC	Índice de massa corporal
IR β	Receptor de insulina β
IRS-1	Substrato do receptor de insulina 1
KAT	Cetoacil-CoA Tiolase
Kcal	Quilocaloria
KDa	Kilodaltons
LDH	Lactato desidrogenase
M	Mol
MC	Massa corporal
mg	Miligrama
MHC- β	Miosina de cadeia pesada β
μ g	Micrograma
μ g/ml	Micrograma por mililitro
mg/dl	Miligrama por decilitro
ml/g	Mililitro por grama
ml	Mililitro

mm	Milimetro
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
mRNA	RNA mensageiro
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
nmol	Nanomolar
O ₂	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
pAMPK	Proteína quinase ativada por AMP fosforilada
PDH	Piruvato desidrogenase
PDK	Piruvato desidrogenase quinase
PDP	Fosfatase piruvato desidrogenase
PFK-1	Fosfofrutoquinase-1
PFK-2	Fosfofrutoquinase-2/frutose-2,6-bisfosfatase
PGC1	Coativador 1 do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
PGC-1 α	Coativador-1 α do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
PKC	Proteína quinase C
Pi	Fosfato inorgânico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
pmol	Picomolar
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR- α	Receptor ativado do proliferador de peroxissoma
PRC	PGC coativador relacionado
RCR	Razão do controle respiratório
RIA	Radioimunoensaio
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
STE	Sistema de transporte de elétrons
TITG	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
TMB	Taxa metabólica basal
UCP	Proteína desacopladora

VC	Veia centrolobular
VE	Ventrículo esquerdo
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
ΔP	Força próton-motriz
$\times g$	Força gravitacional
3-KAT	3 cetoacil-CoA Tiolase

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	OBESIDADE	20
1.1	Obesidade e alterações da dieta	22
1.2	Obesidade e doenças cardiovasculares	24
2	METABOLISMO ENERGÉTICO DO CORAÇÃO	26
2.1	Metabolismo de lipídios	26
2.2	Metabolismo de carboidratos	30
3	BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	33
3.1	Estrutura mitocondrial	33
3.2	Fosforilação oxidativa	35
3.3	Obesidade, doenças cardiovasculares e disfunção mitocondrial ...	39
4	OBJETIVOS	42
4.1	Objetivo geral	42
4.2	Objetivos específicos	42
5	MATERIAIS E MÉTODOS	43
5.1	Animais	43
5.2	Dietas	45
5.3	Eutanásia	46
5.4	Análises	47
5.4.1	<u>Respiração mitocondrial</u>	47
5.4.2	<u>Dosagem de ATP</u>	48
5.4.3	<u>Análise de Western blotting</u>	48
5.4.4	<u>Fracionamento de membrana para a avaliação da translocação do GLUT4</u>	50
5.4.5	<u>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)</u>	50
5.4.6	<u>Determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos</u>	52
5.4.7	<u>Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)</u>	52
5.4.8	<u>Análise da morfologia do fígado e do coração</u>	52
5.4.9	<u>Análise estatística</u>	53
6	RESULTADOS	54
6.1	Parâmetros biométricos e ingestão alimentar e energética	54

6.2	Bioquímica plasmática e teste intraperitoneal de tolerância à glicose	58
6.3	Respiração mitocondrial, consumo de oxigênio e produção de ATP cardíaco	61
6.4	Conteúdo de proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco	65
6.4.1	<u>Transportador de Glicose 1 (GLUT1)</u>	65
6.4.2	<u>Transportador de Glicose 4 (GLUT4)</u>	66
6.4.3	<u>Transportador GLUT4 nas frações citosólica e de membrana</u>	67
6.4.4	<u>Receptor de insulina β (IRβ)</u>	69
6.4.5	<u>Substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1)</u>	70
6.4.6	<u>Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)</u>	71
6.4.7	<u>Proteína ativada por AMP (AMPK), Proteína ativada por AMP fosforilada (pAMPK) e razão entre pAMPK/AMPK</u>	72
6.4.8	<u>Proteína transportadora de ácidos graxos integrada à membrana (CD36)</u>	74
6.4.9	<u>Proteína de ligação de ácidos graxos da membrana plasmática (FABPpm)</u>	75
6.4.10	<u>Carnitina Palmitoil transferase 1 (CPT-1)</u>	76
6.4.11	<u>Proteína desacopladora 2 (UCP2)</u>	77
6.4.12	<u>Coativador-1α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1α)</u>	78
6.4.13	<u>Conteúdo total dos complexos respiratórios do sistema de transporte de elétrons</u>	79
6.5	Expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco	81
6.5.1	<u>Carnitina Palmitoil transferase 1 (CPT1)</u>	81
6.5.2	<u>Proteína desacopladora 2 (UCP2)</u>	82
6.5.3	<u>Proteína desacopladora 3 (UCP3)</u>	83
6.5.4	<u>Transportador de glicose 4 (GLUT4)</u>	84
6.5.5	<u>Receptor ativado do proliferador de peroxissoma α (PPAR-α)</u>	85
6.5.6	<u>Miosina de cadeia pesada β (MHC-β)</u>	86
6.6	Histologia	87

6.6.1	<u>Fígado</u>	87
6.6.2	<u>Coração</u>	93
7	DISCUSSÃO	99
	CONCLUSÕES	108
	REFERÊNCIAS	109

INTRODUÇÃO

A obesidade é importante fator de risco para diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias e doenças cardiovasculares e se tornou um problema grave em todo o mundo.

O processo de transição nutricional decorrente da urbanização contribuiu para o crescente número de indivíduos com obesidade, principalmente pela modificação nos hábitos alimentares, com ampla inclusão de produtos industrializados ricos em gordura saturada, sal e açúcar.

Grande parte destes estudos apresenta relação positiva entre a ingestão de gordura e a incidência de obesidade, assim como o consumo excessivo de carboidratos simples também tem sido associado a doenças crônicas, como obesidade, câncer de cólon, diabetes e doenças cardiovasculares.

Os mecanismos pelos quais a obesidade induzida por dieta leva ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares ainda não estão bem esclarecidos, porém sabe-se que a obesidade, quando não tratada, leva ao comprometimento da função cardíaca e do metabolismo energético, aumentando a morbidade e mortalidade. Em grande parte dos estudos relacionados à obesidade, o metabolismo energético celular está comprometido associado à disfunção mitocondrial.

Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar o metabolismo energético cardíaco em modelo experimental de obesidade induzida por dieta ocidental.

1 OBESIDADE

A obesidade, doença resultante do acúmulo excessivo de gordura corporal, associa-se a doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemias, esteatose hepática não-alcoólica e alguns tipos de câncer (OMS, 1998 e 2000).

Os dados publicados em 2008 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) da população com sobrepeso e obesidade, utilizando o índice de massa corporal (IMC - massa corporal (kg)/estatura (m)²) (OMS, 1998), estimou que 35% dos adultos no mundo, com idade igual ou superior a 20 anos, apresentavam excesso de peso (IMC \geq 25 kg/m²) (34% homens e 35% das mulheres) e que 10% dos homens e 14% das mulheres eram obesos (IMC \geq 30 kg/m²). Constatou-se, ainda, que os índices de obesidade praticamente dobraram entre 1980 e 2008, visto que em 1980 somente 5% da população de homens e 8% de mulheres eram obesos (OMS, 2008).

A OMS relatou que pelo menos 2,8 milhões de pessoas morrem a cada ano como resultado do sobrepeso ou obesidade, e estima-se que 35,8 milhões das mortes prematuras ou de indivíduos incapacitados, avaliados pelo indicador DALY (Anos de vida ajustados), são causados por excesso de peso ou obesidade (OMS, 2013).

Nos anos de 2010 e 2015, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Ministério da Saúde divulgaram dois grandes levantamentos sobre o excesso de peso e obesidade no Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF) e a VIGITEL Brasil 2014 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), respectivamente. A POF apontou que 16,6% dos meninos e 11,8% das meninas na faixa etária de 5 a 9 anos eram obesos. Foi observado na população com mais de 20 anos de idade um aumento contínuo de excesso de peso e obesidade ao longo de 35 anos, onde o excesso de peso quase triplicou entre homens, passando de 18,5% para 50,1%, e entre mulheres o aumento foi menor, de 28,7% para 48% (IBGE, 1976; IBGE, 2010). A VIGITEL 2014 constatou uma frequência de 52,5% de excesso de peso em indivíduos adultos, sendo maior entre homens (56,5%) do que em mulheres (49,1%), e frequência de 17,9% de adultos obesos. Os dados de ambas as pesquisas são preocupantes, visto que evidenciam um grande aumento na frequência tanto de

sobrepeso quanto de obesidade entre crianças e adultos (IBGE, 2010; BRASIL, 2014).

Neste contexto, a crescente prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil e no mundo tem contribuído para a elevação da morbimortalidade e, conseqüentemente, maiores custos nos setores diretamente relacionados aos serviços de saúde e naqueles indiretamente relacionados ao impacto sobre a qualidade de vida e produtividade. Como todos esses fatores têm conseqüências econômicas relevantes, a obesidade tem se tornado um problema de saúde pública com forte impacto na economia de um país (RTVELADZE *et al.*, 2013; ATELLA *et al.*, 2015).

No intuito de compreender melhor os fatores relacionados ao desenvolvimento da obesidade, visando criação de estratégias na redução da incidência de obesidade e suas comorbidades, inúmeras investigações têm sido desenvolvidas. A maioria destas investigações conclui que, apesar do caráter multifatorial da obesidade, as modificações oriundas da globalização nos fatores ambientais e socioeconômicos contribuíram para que a população modificasse seus hábitos alimentares, processo conhecido como transição nutricional. Ou seja, a população passou a consumir alimentos mais calóricos e ricos em gordura, sal e açúcar (POPKIN, 2011; BEZERRA *et al.*, 2015; MUSTAJOKI, 2015). Concomitante às mudanças nos hábitos alimentares, a redução da prática de atividade física, ou seja, redução do gasto calórico, tem contribuído de forma significativa com o desequilíbrio energético global (POPKIN, 2011).

Em conseqüência desta nova tendência alimentar, conhecida também como dieta ocidental (Western diet), podem ser observados efeitos negativos na saúde da população no que diz respeito ao acúmulo excessivo de gordura corporal, sobrepeso e obesidade. Assim, a dieta ocidental é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como as doenças cardiovasculares e a síndrome metabólica (MENDONÇA & ANJOS, 2004; ZAMBON *et al.*, 2009; DINICOLANTONIO *et al.*, 2015; SANDERS, 2015).

1.1 Obesidade e alterações da dieta

Dada a importância da obesidade na promoção de uma cascata de doenças secundárias e importante fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV) (ZALESIN *et al.*, 2011; LANDINI *et al.*, 2015; TURKER *et al.*, 2015) estudos epidemiológicos têm sido realizados para a compreensão dos fatores envolvidos na sua patogênese. Grande parte destes estudos apresenta relação positiva entre a ingestão de gordura e a incidência de obesidade (SMILOWITZ *et al.*, 2010; SAN-CRISTOBAL *et al.*, 2015; MARTINEZ-USEROS & GARCIA-FONCILLAS, 2016). Porém, de acordo com WILLET & LEIBEL (2002) e TAUBES (2001), dietas ricas em gordura não parecem ser a causa primária da alta prevalência do excesso de peso em nossa sociedade e a redução do consumo de gordura não seria a solução, visto que dietas ricas em carboidratos podem ser ainda piores por serem mais palatáveis, o que levaria ao aumento do consumo calórico. Além disso, o consumo excessivo de carboidrato simples também tem sido associado a doenças crônicas, como obesidade, diabetes, DCV e câncer de cólon (TE MORENGA *et al.*, 2014; OKRĘGLICKA, 2015). Em animais de laboratório, o uso de dietas com alto teor de gordura induz ganho excessivo de peso com sucesso (HARIRI & THIBAUT, 2010; BAGNOL *et al.*, 2012; ASSAAD *et al.*, 2014; EWIJK PA, *et al.*, 2015). Porém, não só o aumento da ingestão de gordura tem relevância, a qualidade da gordura também é uma variável extremamente importante para o desenvolvimento da obesidade nutricional, visto que nem todos os ácidos graxos tem caráter obesogênico (CRESCENZO *et al.*, 2015a). Um dos principais vieses encontrados em estudos epidemiológicos está relacionado à informação sobre a dieta, principalmente quanto à sua qualidade (DELANY *et al.*, 2000; STORLIEN *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2002; MOUSSAVI *et al.*, 2008).

Neste contexto, modelos experimentais de obesidade induzida por dieta são considerados adequados para estudar os mecanismos relacionados ao desenvolvimento desta doença, pois além de permitirem maior controle da qualidade e quantidade da dieta ingerida, permitem avaliar com maior precisão o ganho de peso corporal dos animais e as modificações do metabolismo energético (BUETTNER *et al.*, 2007; CRESCENZO *et al.*, 2015a; MITTWEDE *et al.*, 2015; ORNELLAS *et al.*, 2015).

Em modelos animais, a obesidade pode ser avaliada por critérios baseados no ganho de peso corporal ou índice de obesidade, conhecido como Índice de Lee, e/ou pelo aumento da massa de gordura corporal. Quanto ao ganho de peso corporal, o grau de obesidade tem sido classificado da seguinte forma: valores entre 10-25% de incremento no peso corporal, classifica-se como obesidade moderada (HARROLD *et al.*, 2000; WOODS *et al.*, 2003), e quando o percentual no ganho de peso é superior a 40%, classifica-se como obesidade severa (LEVIN & DUNN-MEYNELL, 2002). Já o índice de Lee é um parâmetro para avaliar a obesidade em roedores, semelhante ao índice de massa corporal (IMC) em seres humanos. Tal índice foi definido por Lee em 1929 através do seguinte cálculo: raiz cúbica do peso corporal (g) dividido pelo comprimento naso-anal (cm), multiplicado por 1000 (LEE, 1929).

Quanto à qualidade da gordura da dieta, os diferentes estudos evidenciam que uma dieta rica em ácidos graxos saturados (AGS) configura efeito obesogênico mais pronunciado do que dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados (AGP), conferindo maior massa corporal e acúmulo de gordura corporal (HARIRI *et al.*, 2010a; CRESCENZO *et al.*, 2015a; GUASH-FERRÉ *et al.*, 2015; MORIO *et al.*, 2016).

O efeito obesogênico dos AGS pode ser explicado por sua reduzida utilização na geração de energia, sendo estes continuamente acilados em triglicerídeos e armazenados no tecido adiposo, enquanto que os AGP e monoinsaturados (AGM) são facilmente utilizados para a produção de energia e, conseqüentemente, pouco armazenados (PIERS *et al.*, 2002; CASAS-AGUSTENCH *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2016).

Outro fator importante para a obtenção de animais obesos com o modelo de obesidade induzida pela dieta é a idade na qual os animais serão submetidos à dieta. Estudos com roedores alimentados com dieta hiperlipídica desde a infância evidenciam maior propensão à obesidade na vida adulta (MILLER, 1979; ROSINI *et al.*, 2012).

1.2 Obesidade e doenças cardiovasculares

Os mecanismos pelos quais a obesidade induzida por dieta leva ao remodelamento e disfunção cardíaca ainda não estão bem esclarecidos na literatura, porém sabe-se que a obesidade, quando não tratada, leva à hipertrofia cardíaca e comprometimento da função do miocárdio e metabolismo energético, contribuindo para o aumento da morbidade e mortalidade cardíaca (KO *et al.*, 2009; LEOPOLDO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A hipertrofia cardíaca é definida como um processo celular marcado pelo aumento de tamanho dos cardiomiócitos, acúmulo de proteínas sarcoméricas e reorganização da estrutura miofibrilar (YANG *et al.*, 2007). É considerada uma resposta adaptativa do coração frente a alterações hemodinâmicas devido a estímulos fisiológicos (crescimento, exercício, gravidez e etc.) ou a condições patológicas, como: hipertensão, disfunção ventricular, insuficiência cardíaca, entre outros. Os mecanismos que levam à hipertrofia cardíaca durante os estados fisiológicos e patológicos são bem diferentes. Na hipertrofia fisiológica, o trabalho hemodinâmico em excesso gera um estresse mecânico no coração e resulta no alongamento dos cardiomiócitos e na indução da expressão gênica de fatores de crescimento cardíaco. Além disso, estudos recentes demonstraram que, enquanto a hipertrofia fisiológica está associada ao aumento da capacidade mitocondrial em oxidar ácidos graxos no coração, a hipertrofia patológica está associada à redução na oxidação de ácidos graxos e consequente aumento na utilização da glicose (ALLARD, 2004).

Em condições patológicas, o descompasso entre a captação e utilização de ácidos graxos, que em cardiomiócitos é regulada pelo PPAR- α (receptor ativado do proliferador de peroxissomo), resulta no acúmulo ectópico de triglicerídeos nos cardiomiócitos. Essa condição adaptativa é conhecida como esteatose cardíaca e gera um efeito tóxico nos cardiomiócitos, conhecido como cardiomiopatia lipotóxica (GLENN *et al.*, 2015; WEI *et al.*, 2016). Essa infiltração lipídica inicia o processo de apoptose das células cardíacas, levando ao remodelamento do ventrículo esquerdo, e consequente desordem na interação entre o metabolismo e a contração, progredindo para a disfunção e falência cardíaca, o que contribui para o aumento de morte por doenças cardiovasculares em indivíduos obesos (GUSTAFSSON & GOTTLIEB, 2003).

A insuficiência cardíaca é uma síndrome complexa e multicausal crônica, caracterizada por incapacidade da bomba cardíaca em atender às exigências do organismo. Esta incapacidade pode ser decorrente de oferta diminuída de oxigênio e/ou da redução de disponibilidade de substratos por doença arterial coronária, ou disfunção mitocondrial induzida por fatores genéticos ou tóxicos. Ou ainda, pode resultar do aumento da carga de trabalho do miocárdio, após hipertensão, por exemplo, a partir de alterações na estrutura cardíaca ou utilização ineficiente de ATP, levando a uma perda na utilização de energia. Sendo assim, sugere-se que as alterações no metabolismo energético são eventos-chave na progressão da doença (TAEGTMEYER, 2004; NEUBAUER, 2007; INGWALL, 2009) com efeitos também nos músculos periféricos, criando um estado deficiente de energia caracterizado por miopatia metabólica generalizada (METTAUER *et al.*, 2006; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2011).

A combinação dos fatores de risco cardiometabólicos, incluindo a obesidade visceral, intolerância à glicose ou diabetes tipo 2, hipertrigliceridemia, redução nos níveis de HDL colesterol e hipertensão representam a síndrome metabólica. Tal síndrome tem aumentado rapidamente sua prevalência mundial como consequência da "epidemia" de obesidade, com impacto considerável sobre a incidência global de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (DI CHIARA *et al.*, 2012; DOMINGUEZ & BARBAGALLO, 2016).

Visto que a obesidade é um potencial mediador de morbidade e mortalidade cardiovascular, existe o crescente interesse sobre a investigação do papel do acúmulo de gordura na ocorrência de modificações no metabolismo energético, visando futuros tratamentos e intervenções de impacto favorável na saúde pública quanto à prevenção da síndrome metabólica (ZALESIN *et al.*, 2011).

2 METABOLISMO ENERGÉTICO DO CORAÇÃO

O coração é o órgão responsável por bombear sangue dos vasos sanguíneos para a periferia por repetidas contrações rítmica com intensidade variável. Como tal, o coração apresenta uma flexibilidade metabólica, ou seja, ele é capaz de metabolizar vários substratos, incluindo ácidos graxos, glicose, corpos cetônicos, lactato e até mesmo aminoácidos, em resposta às mudanças de carga de trabalho, disponibilidade de substratos, hormônios, fluxo coronariano e metabolismo energético, selecionando o substrato adequado no momento certo para atender a contínua demanda de energia sob a forma de ATP (STANLEY *et al.*, 2005; HUE & TAEGTMEYER, 2009; ROGGE, 2009; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2011).

Apesar da flexibilidade metabólica do coração, os cardiomiócitos adultos utilizam preferencialmente os ácidos graxos (60-70%) como substrato, seguido da glicose (20%) e lactato (10%), sendo o fornecimento destes substratos cruciais para manter a atividade contrátil sob condições fisiológicas (RUSSELL *et al.*, 2005).

2.1 Metabolismo de lipídios

Em condições saudáveis, o coração utiliza os ácidos graxos de cadeia longa, que podem ser transportados ligados à albumina (não esterificados), por quilomícrons (triglicerídeos da dieta) ou por lipoproteínas de muito baixa densidade (triglicerídeos sintetizados endogenamente), conhecidas como VLDL (VAN DER VUSSE *et al.*, 1992; VAN DER VUSSE *et al.*, 2000).

Os cardiomiócitos utilizam preferencialmente os triglicerídeos ligados à albumina e os contidos em quilomícrons aos transportados por VLDL, indicando seletividade na utilização de lipídeos (HAUTON *et al.*, 2001; AUGUSTUS, *et al.*, 2003; NIU, *et al.*, 2004). Inicialmente, os triglicerídeos exógenos e endógenos são hidrolisados pela lipoproteína lipase ligada na superfície dos cardiomiócitos para a liberação de ácidos graxos livres (MERKEL *et al.*, 2002; AUGUSTUS *et al.*, 2003; YAGYU *et al.*, 2003; YOKOYAMA *et al.*, 2004). Uma vez livres, os ácidos graxos são transportados por proteínas através do sarcolema mediado por uma translocase (FAT/CD36), ou por uma proteína de ligação de ácidos graxos da membrana plasmática (FABPpm) ou, ainda, por proteínas transportadoras de ácidos graxos

(FATP1 e 6) (VAN DER VUSSE *et al.*, 2000; GLATZ *et al.*, 2001; LUIKEN *et al.*, 2002; SCHAFFER, 2002; LUIKEN *et al.*, 2003).

A FAT/CD36 pode translocar-se entre vesículas intracelulares e o sarcolema em resposta a estímulos, incluindo insulina e a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), para aumentar agudamente a taxa de absorção de ácidos graxos (LUIKEN *et al.*, 2002; LUIKEN *et al.*, 2003). Uma vez dentro do citosol, os ácidos graxos de cadeia longa são esterificados a ácidos graxos de cadeia longa acil coenzima A (AGCLCoA), e, dependendo da demanda metabólica do coração, podem ser transportados para o interior da mitocôndria para iniciar a β -oxidação (Figura 1) ou são esterificados no citosol. A captação e a determinação da taxa de entrada de ácidos graxos na β -oxidação mitocondrial são reguladas pela carnitina palmitoil-L transferase 1 (CPT1), que se encontra entre as membranas interna e externa da mitocôndria (Figura 1), sendo considerada uma proteína-chave da captação de ácidos graxos pelas mitocôndrias (LOPASCHUK *et al.*, 1994; KERNER & HOPPEL, 2000; KERNER *et al.*, 2014).

A atividade da CPT-1 é fortemente inibida pela malonil-CoA, que se liga a CPT1 no lado citosólico da enzima (ZAMMIT *et al.*, 1997; KERNER & HOPPEL, 2000). Existem duas isoformas da CPT1: CPT1 α , predominante no fígado, e CPT1 β encontrada principalmente no coração (MCGARRY & BROWN, 1997). A CPT1 β é 30 vezes mais sensível à inibição pela malonil-CoA que a CPT1 α (WEIS *et al.*, 1994; MCGARRY & BROWN, 1997). A malonil-CoA é uma enzima chave na regulação da oxidação fisiológica dos ácidos graxos no coração, visto que a redução desta enzima aumenta a absorção e a oxidação de ácidos graxos (KUDO *et al.*, 1995; HALL *et al.*, 1996; ABU-ELHEIGA *et al.*, 2001), ao passo que seu aumento suprime a oxidação dos ácidos graxos (SADDIK *et al.*, 1993; STANLEY *et al.*, 1996). A malonil-CoA é formada a partir da carboxilação de acetil-CoA pela acetil-CoA carboxilase (ACC) (SADDIK *et al.*, 1993; KUDO *et al.*, 1995; HALL *et al.*, 1996; GOODWIN & TAEGTMEYER, 1999; RUDERMAN *et al.*, 1999) e tem uma rápida taxa de turnover no coração (RESZKO *et al.*, 2001; RESZKO *et al.*, 2004). A maioria do acetil-CoA dos cardiomiócitos se encontra na mitocôndria, no entanto, a atividade da CPT1 é regulada pela malonil-CoA formada a partir da carboxilação de acetil-CoA extramitocondrial.

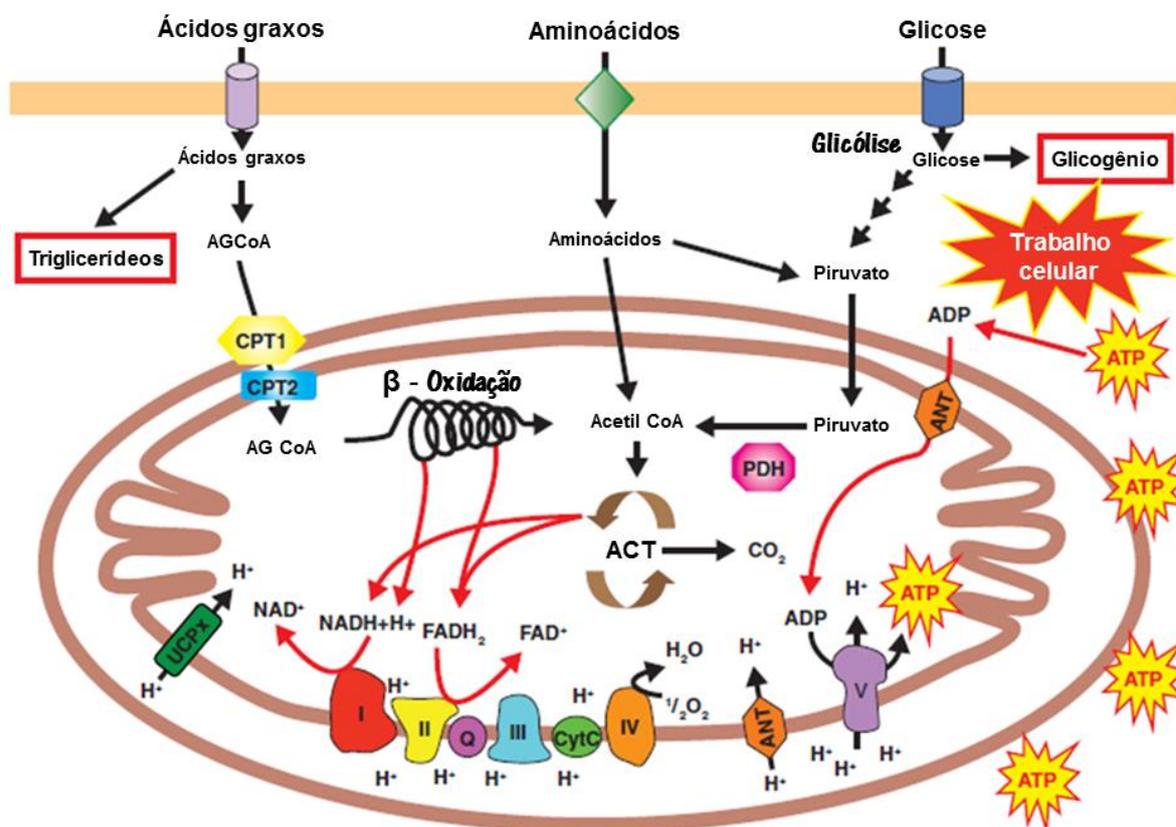
A atividade da acetil-CoA carboxilase (ACC) é inibida pela fosforilação da AMPK (KUDO *et al.*, 1995; MUOIO *et al.*, 1999; SAHA *et al.*, 2000), assim a ativação

de AMPK pode resultar em redução da formação de malonil-CoA, aumento da oxidação dos ácidos graxos (DYCK *et al.*, 1999; DYCK & LOPASCHUK, 2002), translocação do transportador de glicose e captação de glicose (RUSSELL *et al.*, 1999; COVEN *et al.*, 2003; XING *et al.*, 2003). Ou seja, a ativação da AMPK pode resultar no aumento do metabolismo de carboidratos e lipídios. Assim, quando a taxa metabólica do coração é elevada, como ocorre durante o exercício, o aumento da atividade de AMPK aumenta a produção de acetil-CoA de ambos os substratos (carboidratos e lipídios) para assegurar o fornecimento adequado de substrato para a mitocôndria (COVEN *et al.*, 2003).

Após a captação dos ácidos graxos pela CPT1 para o interior da mitocôndria, inicia-se o processo de β -oxidação, gerando NADH e FADH₂. Este processo envolve quatro reações com enzimas específicas para cada passo. O primeiro passo é catalisado pela acil-CoA desidrogenase, seguida pela 2-enoil-CoA hidratase, e o terceiro passo pela 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase. O último passo é catalisado pela 3 cetoacil-CoA Tiolase (3-KAT), que regenera o acil-CoA para uma nova β -oxidação, liberando o acetil-CoA para o ciclo de Krebs. A acil-CoA desidrogenase e a 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase geram FADH₂ e o NADH respectivamente, e o acetil-CoA formado a partir da β -oxidação gera mais NADH e FADH₂ no ciclo de Krebs, conhecido também como ciclo do ácido tricarboxílico ou ciclo do ácido cítrico (figura 1) (STANLEY *et al.*, 2005).

Os corpos cetônicos, sintetizados a partir de ácidos graxos livres no fígado, podem também ser metabolizados em acetil-CoA no coração para a entrada no ciclo de Krebs. O aumento da utilização de corpos cetônicos suprime tanto a utilização de ácidos graxos como de glicose, tal processo é conhecido como integração metabólica entre os substratos fisiológicos (VANOVERSCHELDE *et al.*, 1993; TARDIF *et al.*, 2001; HASSELBAINK *et al.*, 2003; STANLEY *et al.*, 2003; PELLETIER & CODERRE, 2007).

Figura 1 - Metabolismo energético: fornecimento de energia celular



Legenda: ACT = ciclo do ácido tricarboxílico; ADP = adenosina difosfato; ATP = adenosina trifosfato; CPT= carnitina palmitoil transferase; FADH₂ = dinucleotídeo de flavina e adenina; NADH = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, O₂ = oxigênio; PDH = Piruvato desidrogenase, H⁺ = íon hidrogênio.

Nota: Vias de substratos no metabolismo muscular. Oxidação de glicose, ácidos graxos e aminoácidos geram Acetil Coa. A energia da oxidação é conservada como NADH+H⁺ e FADH₂, que são utilizados pelo sistema de transporte de elétrons para produzir um gradiente quimiostático (força próton-motriz) no espaço intermembranas mitocondrial. Esta força próton-motriz é dissipada para a síntese de ATP e pelo "Próton leak" via transportador de nucleotídeo de adenina (ANT) e ativa proteínas desacopladoras (UCPx). A demanda por ATP e "Próton leak" são mais determinantes do consumo de oxigênio e produção de calor do que o substrato a ser oxidado.

Fonte: Adaptação: TURNER, N. *et al.* Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J Endocrinol.* v. 220, n. 2, p. T61-T79, Jan. 2014.

2.2 Metabolismo de carboidratos

A via glicolítica é o centro do metabolismo dos carboidratos, utilizada em todos os tecidos para a quebra da glicose com o objetivo de fornecer energia em forma de ATP e intermediários para outras vias metabólicas. Os substratos glicolíticos são derivados da glicose exógena e dos estoques de glicogênio (STANLEY, 2005).

A captação de glicose nos cardiomiócitos ocorre por transporte facilitado e é regulada pelos transportadores de glicose, GLUT1 e GLUT4, sendo captada em maior proporção pelo GLUT4 (MUECKLER, 1994; FISCHER *et al.*, 1997; LUIKEN *et al.*, 2015). Ambos os GLUTs não se localizam apenas no sarcolema, mas também em compartimentos de armazenamento intracelular (ZORZANO *et al.*, 1997). O GLUT4 é translocado para o sarcolema por vesículas intracelulares para aumentar a captação de glicose em resposta à estimulação de insulina e ativação da AMPK (FISCHER *et al.*, 1995; PATEL *et al.*, 2016).

Quando o nível de glicose no sangue se encontra elevado, há estímulos para a secreção de insulina pelas células β -pancreáticas. Uma vez liberada na corrente sanguínea, a insulina se liga ao seu receptor na subunidade β (IR β), desencadeando uma cascata de fosforilação de proteínas que consistem na ativação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), proteína quinase B (Akt) e proteína quinase C (PKC) (HUANG & CZECH, 2007; MACKENZIE & ELLIOT, 2014). Finalmente, o sinal é transmitido para as vesículas de armazenamento do GLUT4, estimulando sua translocação para a membrana plasmática, culminando na captação da glicose pelas células. Este sistema é importante para manter a homeostase da glicose, sendo a insulina o hormônio capaz de reduzir os níveis de glicose no sangue. Portanto, um sistema de transporte deficiente de glicose no músculo esquelético ou cardíaco leva à hiperglicemia e subsequente resistência à insulina (NISHIUMI *et al.*, 2010; BRADLEY *et al.*, 2015).

Após a captação da glicose, esta é rapidamente fosforilada pela hexoquinase (HK) em glicose-6-fosfato. Deste ponto em diante, a glicose pode participar de diferentes vias, sendo as principais: glicólise e glicogênese (HEATHER & CLARKE, 2011).

A fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) é uma enzima chave na regulação da via glicolítica, visto que catalisa o primeiro passo irreversível da via. A PFK-1 utiliza

adenosina trifosfato (ATP) para produzir frutose 1,6-bifosfato, sendo ativada por adenosina difosfato (ADP), adenosina monofosfato (AMP) e fosfato inorgânico (Pi). É inibida por ATP e pela frutose 1,6-bifosfato quando há uma redução do pH, sendo assim, o aumento na concentração de H^+ inibe a PFK-1 quando os níveis de ATP se encontram elevados. Quando há o acúmulo de AMP, a sensibilidade da PFK-1 em relação à concentração de H^+ reduz. O acúmulo de citrato diminui a glicólise em vários tecidos quando há um aumento na oxidação de ácidos graxos, logo, o citrato é um regulador alostérico negativo da PFK-1 ligado às alterações no metabolismo oxidativo mitocondrial, fato este proposto por Randle (RANDLE *et al.*, 1968; RANDLE *et al.*, 1970; COORT *et al.*, 2007).

A partir da frutose-6-fosfato e da enzima bifuncional fosfofrutoquinase-2/frutose-2,6-bisfosfatase (PFK-2) é formada a enzima F2,6BP que estimula potencialmente a PFK-1 (HUE *et al.*, 1995), através do aumento da afinidade da PFK-1 pela frutose 6-fosfato, reduzindo os efeitos inibitórios do ATP. A produção de F2,6BP em si é altamente regulada pela atividade da PFK-2 por três principais mecanismos: 1) por modulação alostérica da atividade da PFK-2; 2) pelo controle da fosforilação da atividade da PFK-2; e 3) pelo controle transcricional da atividade enzimática (RIDER *et al.*, 1992). Sua inibição ocorre alostericamente por citrato, que ao reduzir os níveis de F2,6BP pode inibir a atividade da PFK-1. Uma série de hormônios que ativam a glicólise, incluindo a insulina, glucagon, epinefrina, norepinefrina e hormônio da tireóide, exerce controle sobre a fosforilação da PFK-2 (KANTOR, 2004). Além disso, a AMPK também pode fosforilar a PFK-2. Tal mecanismo é interessante para a compreensão da aceleração da glicólise induzida por AMP (MARSIN *et al.*, 2000).

A enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) catalisa a conversão de gliceraldeído 3-fosfato em 1,3-difosfoglicerato produzindo duas moléculas de NADH que se originam da glicólise. A GAPDH é uma enzima importante na regulação da via glicolítica, uma vez que o acúmulo de NADH no citoplasma inibe a taxa de reação da GAPDH. Ao passo que o aumento de NAD^+ ativa a GAPDH. Altas concentrações de lactato inibem a regeneração de NAD^+ a partir de NADH, reduzindo o fluxo através de GAPDH que é reduzido, assim como altas concentrações de 1,3-difosfoglicerato (STANLEY, 2005).

O piruvato é o produto final da glicólise, que, dependendo da disponibilidade de oxigênio, pode entrar na mitocôndria para oxidação ou ser reduzido a lactato no

citossol pela ação da lactato desidrogenase (LDH - glicólise anaeróbica). A piruvato desidrogenase mitocondrial (PDH) é responsável pela descarboxilação oxidativa do piruvato a acetil-CoA, permitindo sua entrada no ciclo do ácido cítrico. A PDH é fosforilada e inibida pelas enzimas piruvato desidrogenase quinase (PDK) 1-4, que são ativadas por NADH e acetil-CoA, gerado quando o status de energia dos cardiomiócitos é elevado ou quando os ácidos graxos e corpos cetônicos são predominantemente utilizados como combustíveis (BOWKER-KINLEY *et al.*, 1998). Em contraste, a PDH é desfosforilada e ativada pela fosfatase piruvato desidrogenase (PDP), que é ativada pelo cálcio, e intensamente ativada pela insulina no músculo e fígado, mediada por uma proteína quinase C δ que induz a fosforilação da PDP (CARUSO *et al.*, 2001).

A oxidação de glicose e piruvato e a atividade da PDH no coração são reduzidas quando a taxa de oxidação de ácidos graxos se encontra elevada. Além disso, a oxidação do piruvato é aumentada quando a oxidação de ácidos graxos se encontra reduzida, ou por redução dos níveis plasmáticos de AGL ou por uma inibição direta da oxidação de ácidos graxos (LOPASCHUK *et al.*, 1994; SCHWARTZ *et al.*, 1994; CLARKE *et al.*, 1996; STANLEY *et al.*, 1997). Como discutido acima, as altas taxas de oxidação dos ácidos graxos também inibem a PFK-1 e a PFK-2 (e, portanto, a glicólise) através de um aumento na concentração de citrato citossólico. A taxa máxima de oxidação do piruvato é determinada pelo grau de fosforilação da PDH, no entanto, o fluxo real é determinado pelas concentrações de substratos e produtos na matriz mitocondrial (STANLEY, 1995).

3 BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

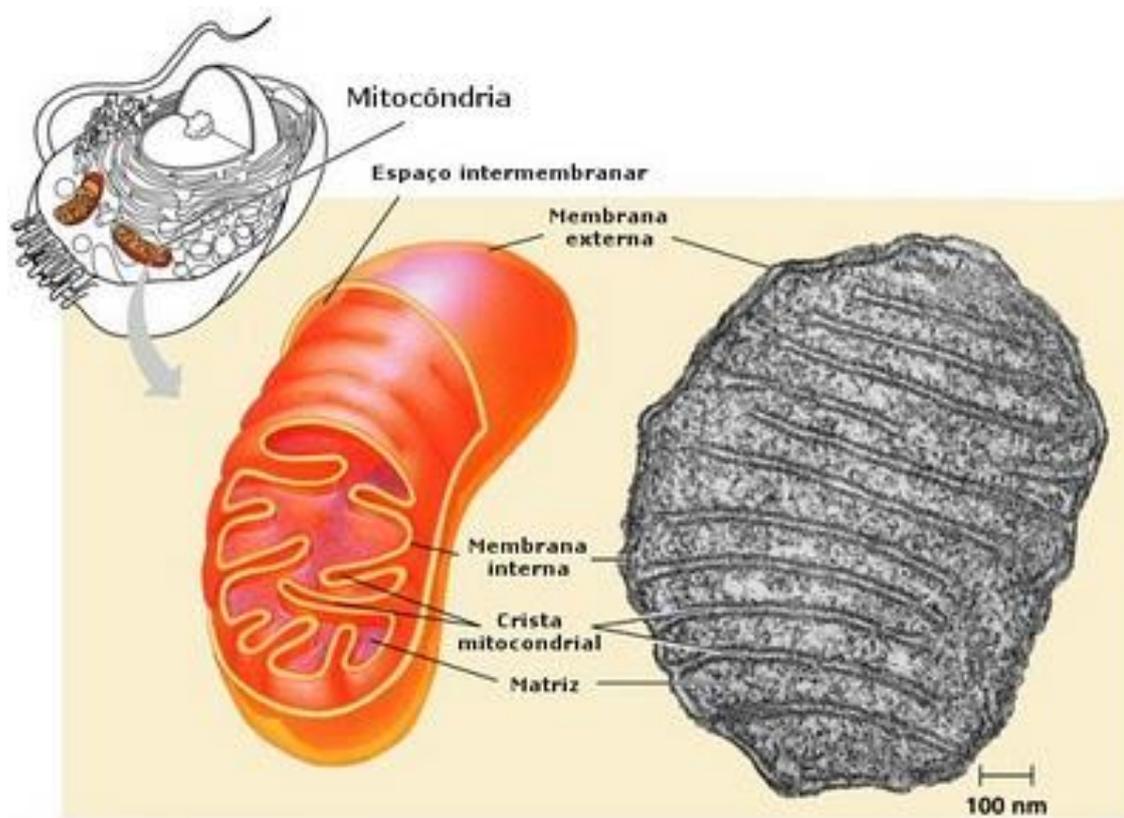
3.1 Estrutura mitocondrial

A mitocôndria é uma organela existente em todas as células nucleadas e abundantes em tecidos com alta demanda de energia, como o músculo esquelético e o cardíaco (JOHANNSEN & RAVUSSIN, 2009). Sua principal função é a produção de energia através da geração de ATP utilizando como substrato os carboidratos, lipídios e proteínas através do processo conhecido como fosforilação oxidativa (ROGGE, 2009; WHITAKER *et al.*, 2016).

Estruturalmente, as mitocôndrias possuem uma membrana externa e uma membrana interna, separadas por um espaço intermembranar. A membrana externa contém várias proteínas transportadoras, chamadas de porinas, que formam grandes canais aquosos assemelhando-se a um filtro permeável, por onde várias moléculas podem entrar no espaço intermembranar, mas a maioria delas não pode passar através da membrana interna. A membrana interna é altamente especializada, contém uma variedade de proteínas transportadoras que a tornam seletivamente permeável àquelas pequenas moléculas que são metabolizadas ou requeridas pelas várias enzimas mitocondriais concentradas na matriz. Esta membrana é geralmente pregueada, formando reentrâncias na matriz chamadas de cristas, que aumentam a área da membrana interna (Figura 2) (NELSON & COX, 2006; BRUCE *et al.*, 2010). O espaço intermembranar contém várias enzimas e é o local onde se acumulam os prótons transportados da matriz (NELSON & COX, 2006; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

A região limitada pela membrana interna é conhecida como matriz mitocondrial, onde proteínas, ribossomos e o DNA mitocondrial estão contidos para manter as funções da mitocôndria (NELSON & COX, 2006; KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

Figura 2 - Estrutura mitocondrial



Fonte: ©CienTIC - José Salsa, 2004 - otimizado para 1024 x 768.

3.2 Fosforilação oxidativa

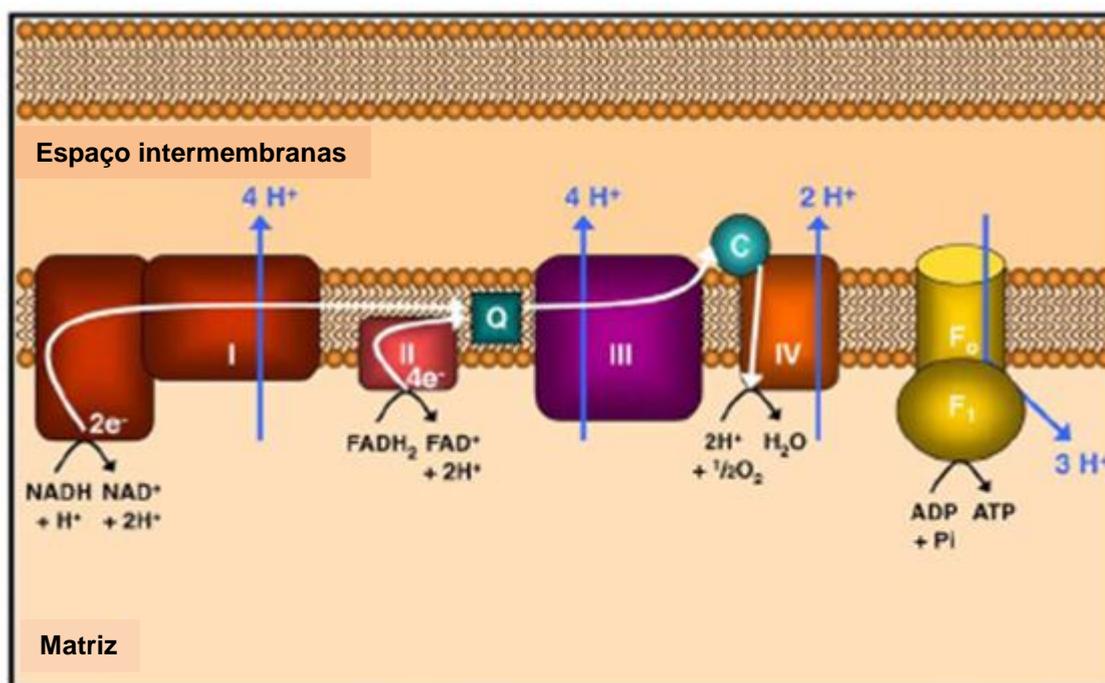
O processo de fosforilação oxidativa é dado pelo sistema de transporte de elétrons (STE) localizado na membrana mitocondrial interna, composta por cinco subunidades polipeptídicas: complexo I (NADH-CoQ redutase), complexo II (succinato-CoQ redutase), complexo III (CoQ-citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (F₀-F₁ ATP sintase), localizados na membrana mitocondrial interna (Figura 3) (NELSON & COX, 2006; MCFARLAND & TURNBULL, 2009; BERARDO *et al.*, 2011; LI *et al.*, 2015).

Os elétrons do NADH⁺ e do FADH² (gerados a partir da oxidação do acetil-CoA no ciclo de Krebs, como descritos anteriormente) são transferidos para os complexos I e II do STE (Figura 3). Estes elétrons são transferidos ao longo do STE e são doados para o oxigênio (1/2O₂), receptor final de elétrons no complexo IV, formando H₂O (OPIE, 2004). A energia é liberada como fluxo de elétrons ao longo do STE, sendo utilizada para bombear prótons através da membrana mitocondrial interna para o espaço intermembranar por meio dos complexos I, III e IV. Através deste bombeamento, cria-se o gradiente eletroquímico de prótons ou força próton-motriz (ΔP), e o potencial de energia armazenado no ΔP pode ser usado para importação de proteínas e Ca²⁺ para o interior da mitocôndria, para gerar calor e sintetizar ATP na matriz mitocondrial (Figura 3). Para a síntese de ATP, o fluxo de prótons do espaço intermembranar para a matriz ocorre através da ATP-sintase. O ATP da matriz mitocondrial é então trocado por ADP citosólico através do transportador de nucleotídeo de adenina (ANT) (JOHANNSEN & RAVUSSIN, 2009).

A eficiência pela qual os equivalentes redutores (a partir da oxidação de acetil-CoA) são convertidos em ATP pela fosforilação oxidativa é chamada de acoplamento mitocondrial (JOHANNSEN & RAVUSSIN, 2009). Quando as mitocôndrias não são perfeitamente acopladas (desacopladas), a força próton-motriz gerada pela fosforilação oxidativa normal é dissipada sob a forma de calor ao invés de ser utilizada para impulsionar a ATP-sintase na produção de ATP, processo conhecido como “Próton leak” (Figura 4). O desacoplamento mitocondrial pode ser responsável por 20 a 25% da taxa metabólica basal (TMB) (ROLFE & BRAND, 1997). Este processo é realizado por proteínas desacopladoras (UCPs) situadas na membrana interna da mitocôndria (Figura 4), sendo a UCP1 a primeira isoforma descoberta e encontrada somente na gordura marrom de mamíferos, inclusive

humanos (JOHANNSEN & RAVUSSIN, 2009). No indivíduo adulto, a expressão da UCP1 é limitada, visto que o tecido adiposo marrom está diminuído. Em 1997, duas novas isoformas de UCPs (UCP2 e UCP3) foram descobertas, sendo ambas homólogas à UCP1 e expressas em adultos. A UCP2 é expressa em vários tecidos (incluindo o tecido adiposo, músculo, coração, rins, sistema digestório e cérebro), enquanto que a expressão da UCP3 se limita ao músculo esquelético (ROUSSET *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2015). Tanto a UCP2 quanto a UCP3 tem sido relacionadas à determinação da taxa metabólica basal (TMB). Walder *et al.* (1998), avaliaram o conteúdo de UCP2 e UCP3 em índios Pima e comprovaram a associação de ambas as proteínas com a taxa metabólica durante o sono e com o gasto energético de 24h. Tal fato explica a variação genética na eficiência da utilização de energia. A isoforma UCP4 é encontrada somente no cérebro e a sua expressão em células de mamíferos reduz o potencial de membrana mitocondrial. Yu *et al.* (2000) observou em seu estudo abundante expressão de UCP5 no cérebro humano, testículos, rins, útero, coração, pulmão, estômago, fígado e músculo esquelético, com a maior expressão no cérebro e testículos. Em ratos o mesmo estudo relatou expressão de UCP5 no cérebro, testículos, tecido adiposo branco, rim, tecido adiposo marrom, músculo esquelético, fígado e coração. A expressão de mRNA das proteínas UCP4 e UCP5 é modulada por meio de manipulações nutricionais e de temperatura em tecidos específicos, suportando a hipótese de que estas proteínas estão envolvidas em adaptações metabólicas associadas a tais condições (YU *et al.*, 2000; RUPPRECHT *et al.*, 2014).

Figura 3 - Sistema de transporte de elétrons mitocondrial



Nota: A energia obtida através da transferência de elétrons (setas brancas) entre os complexos multienzimáticos é utilizada para bombear prótons (setas azuis) da matriz para o espaço intermembranar, criando um gradiente eletroquímico de prótons através da membrana mitocondrial interna. Este gradiente permite que a ATP sintase utilize o fluxo de H⁺ através da enzima para voltar a matriz mitocondrial para gerar ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico. O complexo I (NADH redutase coenzima Q) recebe os elétrons transportados pelo dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADH), e passa estes para a coenzima Q (ubiquinona), que também recebe os elétrons do complexo II (succinato desidrogenase). A Ubiquinona passa os elétrons para o complexo III (citocromo bc1), que passa para o citocromo c (cit c). O citocromo c passa os elétrons para o complexo IV (citocromo c oxidase), que utiliza estes elétrons e íons de hidrogênio para reduzir o oxigênio molecular à água. A produção de radicais superóxido ocorre principalmente nos complexos I e III, especialmente sob condições de aumento excessivo do gradiente de prótons.

Fonte: Obesity Online Slide Library, www.obesityonline.org

3.3 Obesidade, doenças cardiovasculares e disfunção mitocondrial

Muitos estudos experimentais tentam elucidar os mecanismos da disfunção cardíaca na obesidade, porém, a estreita associação entre obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 dificultam a distinção entre as modificações verdadeiramente atribuíveis à obesidade em relação às alterações metabólicas secundárias causadas pela resistência à insulina. No entanto, evidências sugerem que a resistência à insulina e a obesidade podem estar associadas a uma série de eventos fisiopatológicos com consequências intrínsecas aos cardiomiócitos que podem acarretar na disfunção do ventrículo esquerdo (VE). Estas alterações incluem a utilização de substratos pelo miocárdio (captação e utilização de glicose diminuída), disfunção mitocondrial (fosforilação oxidativa reduzida e desacoplamento mitocondrial) (Figura 4 e 5), estresse oxidativo, aumento de apoptose, acúmulo intracelular de lipídios tóxicos (lipotoxicidade), ação alterada da insulina no miocárdio e utilização alterada de cálcio miocárdico (BUGGER & ABEL, 2008; ABEL, 2011).

Estudos em humanos, realizados em indivíduos com obesidade, resistência à insulina, ou diabetes tipo 2 evidenciam modificações similares na utilização de substratos pelo miocárdio, diminuição da eficiência cardíaca, aumento do acúmulo de lipídios no miocárdio, redução nas concentrações de ATP, que podem ser resultantes da disfunção mitocondrial (BOUDINA & ABEL, 2007; BOUDINA & ABEL, 2010; LUO *et al.*, 2015).

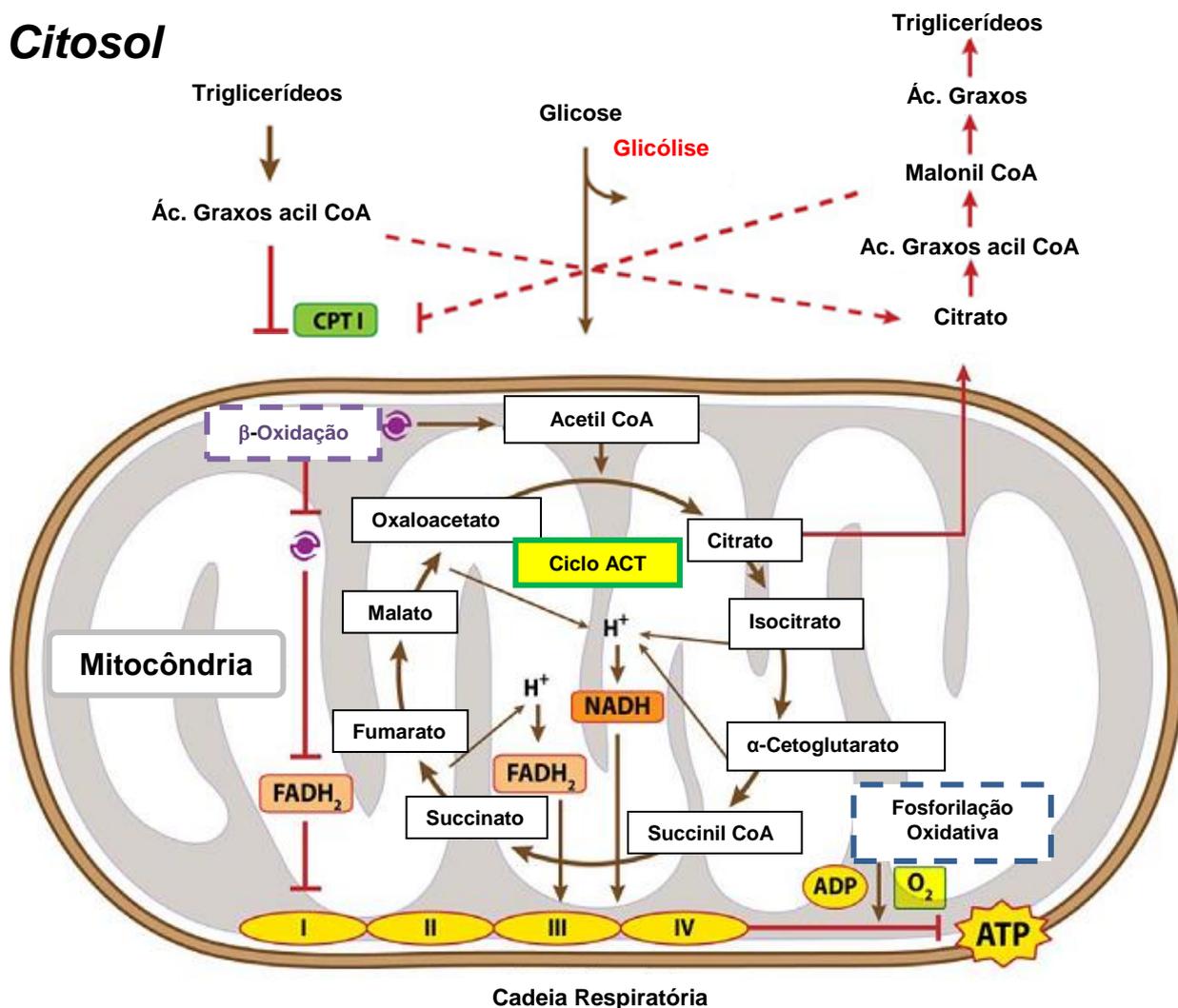
Niemann *et al.* (2011) avaliaram cardiomiócitos de indivíduos não diabéticos e com função do VE preservada. Neste estudo observou-se que os indivíduos jovens com obesidade exibiram disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, dano mitocondrial e ativação dos mecanismos de apoptose, em níveis semelhantes aos observados em idosos, com ou sem obesidade. Foram avaliados, também, os efeitos da obesidade em modelo animal (ratos Zucker obesos com diabetes), observando-se que os padrões de expressão gênica que codificam proteínas mitocondriais e marcadores de apoptose estavam alterados, corroborando o estudo com humanos. Assim, este estudo sugeriu que a obesidade, por si só, poderia ser suficiente para prejudicar a função mitocondrial nos cardiomiócitos, e que a disfunção mitocondrial pode potencialmente contribuir para o aumento da suscetibilidade à insuficiência cardíaca em indivíduos obesos.

Além destes relatos, a disfunção mitocondrial ajuda a explicar outros sinais e sintomas comuns da obesidade, incluindo baixo gasto energético, ingestão crônica e excessiva de alimentos, e aumento dos marcadores de inflamação sistêmica. A produção mitocondrial ineficiente de ATP apresenta também uma importante relação entre fatores genéticos e ambientais que podem levar ao desenvolvimento da obesidade (ROGGE, 2009; CRESCENZO *et al.*, 2015).

Dados recentes do nosso grupo reforçam essa associação entre obesidade e disfunção mitocondrial, demonstrando que camundongos *Swiss* adultos com obesidade induzida por dieta ocidental, apresentam acúmulo de gordura nos cardiomiócitos, intolerância à glicose, desacoplamento e disfunção mitocondrial cardíaca tanto para a oxidação de carboidratos e lipídios, sugerindo redução na produção de ATP (NEVES *et al.*, 2014). Tais consequências nos levaram a questionar quais eventos são primários no desenlace entre obesidade induzida por dieta e alterações do metabolismo energético acompanhado de disfunção mitocondrial cardíaca.

Neste contexto, o estudo detalhado sobre as alterações do metabolismo energético e disfunção mitocondrial cardíaca na obesidade induzida por dieta pode auxiliar na melhor compreensão dos fatores envolvidos no desenvolvimento desta doença.

Figura 5 - Disfunção mitocondrial na obesidade



Legenda: ADP = adenosina difosfato; ATP = adenosina trifosfato; FADH_2 = dinucleotídeo de flavina e adenina; NADH = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina; O_2 = oxigênio; H^+ = íon hidrogênio.

Nota: Na obesidade, a intolerância à glicose e diabetes tipo 2 são presentes e a β -oxidação reduzida no músculo cardíaco. A atividade da carnitina palmitoil transferase (CPT1), necessária para o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da célula, é diminuída, levando ao acúmulo de ácidos graxos acil-CoA no citosol. Sob a influência da enzima acetil-CoA carboxilase (ACC), o acil-CoA não metabolizados são convertidos em malonil CoA que os resintetizam em ácidos graxos, que podem se acumular dentro da célula ou ser transportados para outros tecidos como triglicerídeos. A redução da capacidade de utilização dos ácidos graxos para produção de ATP aumenta em indivíduos obesos, levando a um aumento na dependência da glicólise.

Fonte: Adaptação: ROGGE, M. M. The Role of Impaired Mitochondrial Lipid Oxidation in Obesity. *Biol Res Nurs* v.10, n.4, p. 356-73, Apr. 2009.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da dieta ocidental sobre o metabolismo energético e a função mitocondrial cardíaca em camundongos *Swiss*.

4.2 Objetivos específicos

Avaliar o metabolismo mitocondrial cardíaco em diferentes tempos de exposição às dietas controle e ocidental (1, 2, 6, 10 e 16 semanas), pela observação dos:

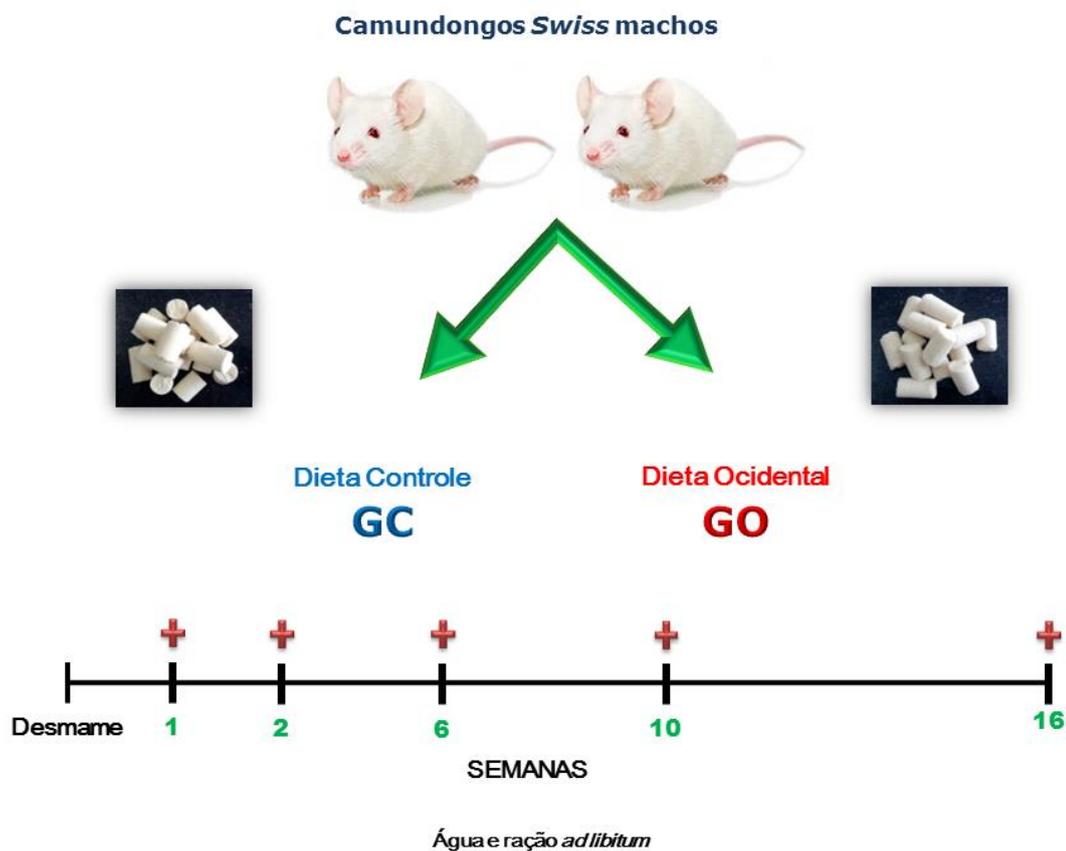
- a) Parâmetros biométricos e ingestão alimentar;
- b) Tolerância à glicose;
- c) Função mitocondrial de cardiomiócitos isolados através do consumo de oxigênio frente a diferentes substratos energéticos;
- d) Produção de ATP cardíaco;
- e) Conteúdo de proteínas que participam do metabolismo energético mitocondrial cardíaco e da sinalização de insulina (CPT1, UCP2, PGC-1 α , GLUT1, GLUT4, IR β , PI3K, IRS-1, AMPK, pAMPK, FABPpm, CD36 e os complexos mitocondriais I-V);
- f) Expressão gênica de proteínas que participam do metabolismo energético cardíaco (CPT1, UCP2, UCP3, GLUT4, PPAR- α , MHC- β);
- g) Morfologia do coração e do fígado;
- h) Bioquímica do sangue (Glicose, Insulina, triglicerídeos e colesterol total).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos *Swiss* machos de ninhadas diferentes foram adquiridos no Centro de Criação de Animais de Laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Cecal/FIOCRUZ) no dia do desmame, aos 21 dias. Os mesmos foram divididos aleatoriamente e submetidos à dieta controle (Grupo com dieta controle - GC) ou à dieta ocidental (Grupo com dieta ocidental - GO) por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas oferecidas *ad libitum*, assim como a água (Figura 6). Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, 2 animais por caixa, sob condições padrão de temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade controlada ($60\pm 10\%$) com ciclo claro e escuro de 12/12h (07:00h às 19:00h) e de exaustão de ar a cada 15 min/hora.

Figura 6 - Esquema do modelo experimental dos camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental



Legenda: Dietas controle (GC) e ocidental (GO).

Fonte: A autora, 2016.

5.2 Dietas

A escolha da dieta ocidental publicada por TIKELLIS *et al.* (2008) e atualmente corroborada pelo nosso grupo (NEVES *et al.*, 2014), SF05-031 com manteiga clarificada – Ghee, foi determinada por ser rica principalmente em gordura saturada e carboidrato simples, representando de forma similar a dieta ocidental. A dieta controle utilizada no presente estudo também foi a mesma aplicada pelos autores supracitados, AIN93G. Ambas as dietas foram adaptadas de acordo com os componentes disponíveis na empresa onde estas foram confeccionadas, PragSoluções Ltda (Jaú - SP, Brasil). A composição final de macronutrientes das dietas encontra-se descritas no quadro 1.

Quadro 1 - Composição das dietas controle e ocidental

Composição	Dieta controle	Dieta Ocidental
Kcal/g	3,69	4,49
Carboidratos	65,6%	43,8%
• Complexo	53,7%	12,6%
• Simples	11,9%	31,2%
Proteínas	17,3%	13,9%
Lipídeos	17,1%	42,4%
• Gordura saturada	2,4%	22,3%
• Gordura Monoinsaturada	4,3%	-----
• Gordura Poliinsaturada	10,5%	-----
• Gordura Trans	0%	1,7%
• Colesterol	0%	0,3%

Legenda: ----- Não informado.

Fonte: A autora, 2016.

5.3 Eutanásia

Ao final do período de exposição às dietas (1, 2, 6, 10 e 16 semanas), os animais GC e GO foram submetidos ao jejum de 6 horas (07:00h as 13:00h) e uma gota de sangue foi coletada da veia da cauda para a determinação da glicose plasmática com o auxílio de glicosímetro e fitas teste (Accu-Chek Active®). Os resultados foram expressos em mg/dl.

Em seguida, foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Avertin® (2,2,2-tribromoethanol, 2-metil-2-butanol) - 0,02 ml/g de peso corporal - e mensurou-se o comprimento naso-anal com o auxílio de um paquímetro para obtenção do índice de Lee (raiz cúbica da massa corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) x 1000).

Sob efeito da anestesia, o tórax foi aberto e o sangue coletado por punção cardíaca. O coração foi retirado e rapidamente imerso em solução de relaxamento e preservação BIOPS (em mM: CaK₂EGTA 2.77, K₂EGTA 7.23, MgCl₂ 6.56, ditiotretitol 0.5, K-MES 50, imidazol 20, taurina 20, Na₂ATP 5.77, fosfocreatina 15, pH 7.1 ajustado a 25°C) contida em uma placa de petri, sobre gelo. O ventrículo esquerdo foi retirado e pesado em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N®). Em seguida, o ventrículo esquerdo foi dividido em diferentes partes para sua utilização nas técnicas de respirometria, western blotting, PCR, dosagem de ATP e morfologia cardíaca (fixado em formol 10%). O fígado e o tecido adiposo branco (gordura epididimal e retroperitoneal) foram retirados e pesados em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N®), sendo o fígado fixado em formol 10% para posterior análise morfológica. Corrigimos o peso do fígado (g) pelo peso corporal (g) para avaliarmos possível esteatose hepática, visto que esta razão tem sido associada a tal comprometimento hepático (SERVIDDIO *et al.*, 2011). A tíbia esquerda foi dissecada e o seu comprimento (CT) foi aferido com auxílio de um paquímetro. A estimativa de hipertrofia cardíaca foi obtida através da razão entre o peso do ventrículo esquerdo e o comprimento da tíbia (YIN *et al.*, 1982).

Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os guias convencionais para experimentação em animais (BAYNE, 1996) e com a Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Alberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Protocolo nº CEUA/051/2011).

5.4 Análises

5.4.1 Respiração mitocondrial

Obtenção de fibras cardíacas permeabilizadas

Após imersão do coração em solução de relaxamento e preservação, BIOPS, gelada, o ventrículo esquerdo foi isolado e fatias do músculo entre 2-4 mm de comprimento, 1-1,5 mm de diâmetro, 5-7 mg de peso úmido, aproximadamente foram retiradas seguindo a orientação da fibra para evitar danos mecânicos às células. Usando pinças microcirúrgicas, as fibras musculares foram parcialmente separadas umas das outras, deixando pequenas áreas de contato. O grau de separação pode ser avaliado observando a mudança de coloração de vermelho para pálido. Em seguida, as fibras foram transferidas para um recipiente com solução BIOPS gelada contendo 50µg/ml de saponina e incubadas no gelo, com agitação suave, por 30 minutos para a solubilização do sarcolema. As fibras permeabilizadas foram, então, lavadas por 10 minutos em meio de respiração mitocondrial MIR05 (em mM: EGTA 0.5, MgCl₂ 3.0, K-MES 60, taurina 20, K₂HPO₄ 10, HEPES 20, Sacarose 110 e BSA 1g/L, pH 7.1 ajustado a 25°C) no gelo.

Respirometria de alta resolução

Após a permeabilização, as fibras foram pesadas em balança analítica e 2 a 3 mg de tecido foram adicionados à câmara do oxígrafo OROBOROS® Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) contendo 2 ml de MIR05 a 37°C. Todas as análises foram realizadas em concentrações de oxigênio superiores a 400 nmol O₂.ml⁻¹. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de O₂.s⁻¹.mg de peso úmido⁻¹. O estudo foi realizado com dois grupos de substratos independentes em cada câmara: (câmara A, em mM) glutamato 10, malato 2, succinato 10 e ADP 5, para a análise da oxidação de carboidratos (com entrada de elétrons pelos complexos I e II da cadeia respiratória) e (câmara B, em mM) palmitoil-carnitina 0,02, malato 2 e ADP 5, para a análise da oxidação de ácidos graxos. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: estado 3 - taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM), e estado 4 - taxa respiratória na

ausência de fosforilação de ADP, após a adição de oligomicina (2 µg/ml), um inibidor da ATP-sintase. Para examinar a integridade da membrana mitocondrial através de todas as preparações, a respiração foi mensurada em presença de 10µM de citocromo c (GNAIGER, 2014).

Com base na razão entre as taxas respiratórias dos estados 3 e 4, pode-se calcular a razão do controle respiratório (RCR - Estado 3/Estado 4), indicador do acoplamento mitocondrial (GNAIGER, 2014).

5.4.2 Dosagem de ATP

No dia da eutanásia, ~50 mg do ventrículo esquerdo do coração foi clivado e homogeneizado manualmente sob gelo com o homogenizador potter-Elvehjem® em 1 ml de ácido tricloroacético (1%) para precipitação das proteínas e preservação do ATP, conforme descrito previamente por KARL (1980) e STANLEY (1986). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min à 4°C (Centrifuge 5430 R®, Eppendorf). O sobrenadante foi coletado e o pH ajustado para 7,0, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C. As concentrações de ATP foram determinadas por ensaio de bioluminescência luciferina/ luciferase, utilizando kit específico ATP Determination A22066® (Molecular Probes™, Invitrogen, EUA), e os valores foram expressos em µM/mg de peso do ventrículo esquerdo.

5.4.3 Análise de Western blotting

Após a eutanásia, parte do ventrículo esquerdo retirado dos animais foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise do conteúdo proteico através da técnica de Western Blotting. O material foi picotado e em seguida homogeneizado em solução de lise gelada (em mmol: HEPES 30 pH 7,4, Na₄P₂O₇ 50, NaF 100, EDTA 1, Na₃VO₄ 10, Tritón X-100 1%,) contendo coquetel de inibidores (Complete, EDTA-Free, Roche Diagnostic®), por trituração manual com o homogenizador potter-Elvehjem® até tornar-se líquido. O homogeneizado foi colocado em repouso no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos, a 4°C (Centrifuge 5430 R®, Eppendorf) e o sobrenadante foi

coletado e congelado a -70°C . A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de detecção através do Kit Pierce[®] BCA Protein Assay (Thermo Scientific USA, Rockford, IL). Em seguida as amostras foram fervidas por 3 minutos com 20% de solução tampão (glicerol 10%, 2- β -mercaptoetanol 5%, SDS 10% NaOH 10N e azul de bromofenol 0,0001%) a 100°C , para desnaturação das proteínas.

As proteínas totais (15 μg de proteína) foram aplicadas no gel de poliacrilamida de 12% (acrilamida 30%, bis-acrilamida 1,6%, APS 10%, TEMED, SDS 0,4 %, Tris 1,5 M) juntamente com o padrão de peso molecular para proteínas de 12/250 KDA (GE-Healthcare Life Sciences[®]) e submetidas à eletroforese SDS-PAGE em cuba de eletroforese (Hoefer MiGOty Small[®]). Após a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular, estas foram transferidas para uma membrana PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech[®]), utilizando o sistema semi-dry (Bio-Rad Laboratories, Inc.[®]). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio Tween-TBS (NaCl 0,5M, Tris-HCl 20mM, pH 7,5, Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado.

Para analisarmos o conteúdo de proteínas envolvidas no metabolismo energético mitocondrial as membranas foram incubadas (overnight) com anticorpos primários específicos para detecção de proteínas chaves: anti-Actina (Sigma-Aldrich[®]), anti-CD36, anti-CPT1 M, anti-FABPpm anti-GLUT1, anti-GLUT4, anti-IR β , anti-PI3K e anti-VDAC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.[®]), anti-AMPK e anti-pAMPK (Cell Signaling Technology[®]), ambos obtidos em coelho, e anti-IRS-1, anti-PGC-1 α (Santa Cruz Biotechnology, Inc.[®]) e anti-UCP2 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.[®]) obtidos em cabra, e anti-OXPHOS (Abcam, MA, USA[®]) obtido em camundongo. Após o período overnight, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos biotilado apropriado anti-coelho e anti-cabra (Zymed[®] Laboratories, Inc., South San Francisco, CA, USA). Em seguida, as membranas foram incubadas com streptavidina conjugada com peroxidase (Invitrogen Life Technologies[®]). Entre a incubação dos anticorpos primários e secundários e a streptavidina, realizou-se 3 lavagens/5 minutos cada com Tween-TBS. A revelação foi realizada por ECL-Plus (GE Healthcare-Life Sciences[®]) e as imagens capturadas no ChemiDoc[™] MP System (Bio-Rad Laboratories, Inc.[®]). As bandas obtidas foram quantificadas por densitometria, seguida de correção pelo controle endógeno (Actina), utilizando o software ImageJ (NIH, USA).

5.4.4 Fracionamento de membrana para a avaliação da translocação do GLUT4

Através da metodologia adaptada por Neves *et al.* (2014), com base nos estudos de Bilan *et al.* (1992) e Hundal *et al.* (1992), o ventrículo esquerdo dos animais dos grupos GC e GO foram lisados para a obtenção das frações citosólica e de membrana plasmática. Para tal, utilizou-se o tampão de lise HES contendo 10 mmol/L HEPES, 5 mmol/L EDTA, 250 mmol/L sacarose e coquetel de inibidores de protease (Complete, EDTA-Free, Roche Diagnostic®). O homogenato obtido foi sonicado e colocado em repouso no gelo por 30 minutos. Após este período, o mesmo foi centrifugado a 750×g/5 min a 4°C (Centrifuge 5430 R®, Eppendorf). O sobrenadante (SN1) foi coletado e deixado sob o gelo. O pellet (P1) foi ressuscitado em 1 ml do tampão HES, homogeneizado e centrifugado a 750×g/5 min a 4°C. O sobrenadante (SN2) foi coletado e adicionado ao SN1, compondo a fração citosólica, e o pellet (P2) foi descartado. Uma parte da fração citosólica (~650 µl) foi ultracentrifugada a 31000×g/60 min a 4°C. O pellet obtido foi ressuscitado em 400 µl do tampão HES e sonicado para homogeneização da fração de membrana plasmática. A concentração de proteínas totais nas frações foi determinada pelo método colorimétrico de detecção do Kit Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific USA, Rockford, IL®). O conteúdo de GLUT4 das frações citosólica e de membrana, assim como o controle endógeno GP91, foi determinado por western blotting através dos anticorpos primários específicos anti-GLUT4 e anti-GP91 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.®), ambos obtidos em coelho.

5.4.5 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

Para análise da expressão gênica das enzimas CPT1, UCP2 e GLUT4, fragmentos de tecido cardíaco foram homogeneizados com 1 ml de Trizol™ (Life Technologies®), conforme protocolo do fabricante. O homogenato foi transferido para um microtubo onde permaneceu à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 µl de clorofórmio, misturando-se vigorosamente por cerca de 15 segundos e, novamente, deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 3 minutos. O homogenato foi centrifugado a 12000 rpm, a 4°C (Centrifuge 5430 R®, Eppendorf), por 15 minutos, para separação das frações de proteína, DNA e RNA.

A fração aquosa de RNA (sobrenadante) foi cuidadosamente transferida para outro microtubo. Em seguida, foram acrescentados 500 µl de isopropanol, homogeneizou-se e foi colocado em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente. Nova precipitação foi realizada a 12000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 1 ml de etanol a 75%. Após 5 minutos de centrifugação a 9500 rpm, a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente no fluxo laminar. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 50 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60°C, por 10 minutos, para melhor dissolução do RNA.

As concentrações do RNA total foram determinadas pela leitura da densidade óptica, no espectrofotômetro NanoVue® (Ge healthcare Life Sciences). Alíquotas do RNA total foram diluídas 50 vezes em água DEPC estéril. As leituras foram realizadas nos comprimentos de ondas de 260nm para ácido nucléico e 280nm para contaminantes proteicos. A relação entre essas leituras demonstrou uma razão maior que 1,6, garantindo a qualidade do RNA obtido, segundo as exigências vigentes para a biologia molecular.

O RNA total extraído (2,0 µg) foi reversamente transcrito em cDNA a 42°C, na presença da enzima transcriptase reversa e de Random primers. As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas utilizando Taq-Man Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems) com volume de reação de 25 µl. Todas as reações foram realizadas em triplicatas com controle negativo. As reações de PCR foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism 7500® (Applied Biosystems) nas seguintes condições de amplificação: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. A quantificação relativa de cDNA foi obtida pelo software do sistema 7500, que utiliza o método comparativo ($\Delta\Delta CT$). Primers e sondas específicas para TaqMan CPT1, UCP2, UCP3, GLUT4, PPAR- α , MHC- β e actina foram obtidos a partir do catálogo de expressão gênica ABI TaqMan® (Foster City, CA, EUA). Este kit de ensaio contém uma mistura de reação mix 20x, de detecção de junções éxon-éxon otimizado para se obter aproximadamente 100% de eficiência.

5.4.6 Determinação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos

Ao final do período de exposição às dietas (1, 2, 6, 10 e 16 semanas), os animais foram submetidos ao jejum de 6 horas. Em seguida, as amostras de sangue foram coletadas e posteriormente, vertidas em tubos de ensaio contendo EDTA K3 (concentração final de 1.735 mg/mL). Imediatamente, centrifugados a 3000 rpm (Centrifuge 5430 R®, Eppendorf) durante 15 minutos a 4°C para a separação do plasma. Em seguida, o plasma foi alíquotado e mantido a -80°C, para posterior quantificação da insulina plasmática pelo método de radioimunoensaio (RIA) utilizando o kit Immuchem™ Insulin Assay ¹²⁵I® (MP Biomedicals, São Francisco, CA, USA). O índice de resistência à insulina (HOMA-IR) foi calculado usando a seguinte fórmula: [insulina de jejum (μUI/ml) x glicemia de jejum (mmol/L)] / 22,5 (MATTHEWS *et al.*, 1985). Outra alíquota foi reservada para as análises do conteúdo plasmático de colesterol totais e triglicerídeos através de ensaios enzimáticos colorimétricos (BIOCLIN®, Brasil).

5.4.7 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

Após o jejum de 6 horas, foram realizados testes de tolerância à glicose nos camundongos de ambos os grupos ao final dos períodos de exposição às dietas. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (1g/Kg de peso) e a glicemia foi verificada através do sangue retirado da veia da cauda do animal com o auxílio de glicosímetro (Accu-Check Active®, Roche Diagnostics, Germany). As amostras de sangue foram coletadas antes da injeção de glicose (tempo 0) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose. Para a avaliação da intolerância à glicose foi considerada a área sob a curva (ASC), mensurada a partir da utilização do software *Graph Pad Prisma* 6.01 (San Diego, CA, USA).

5.4.8 Análise da morfologia do fígado e do coração

O fígado e o coração foram fixados em formol 10% e submetidos ao processo de desidratação, através de baterias crescentes de álcool e diafanizado com xilol. Em seguida, foram banhados e incluídos em parafina líquida. Os blocos formados foram seccionados em cortes seriados de 5 μm, coletados em lâminas e

posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As secções histológicas coradas foram observadas ao microscópio de luz Olympus BX-51® e as imagens foram capturadas utilizando um sistema de vídeo-microscopia para avaliação de esteatose hepática e cardíaca, mensurada através de gotículas de gordura presentes nos tecidos.

5.4.9 Análise estatística

Todos os dados foram testados para a curva de distribuição normal através do teste Kolmogorov-Smirnov, sendo expressos como média \pm desvio padrão da média. O efeito da dieta ocidental e o tempo de exposição à mesma sob as variáveis estudadas foram analisados por *Two way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações, através do software *Graph Pad Prisma* 6.01 (San Diego, CA, USA), considerando nível de significância de $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Parâmetros biométricos e ingestão alimentar e energética

Não houve diferença significativa quanto à ingestão alimentar entre os grupos nos diferentes períodos de dieta. Ao passo que a ingestão energética se apresentou maior no grupo GO alimentados por 6, 10 e 16 semanas (+20%, +20%, +29%, $P < 0,05$), quando comparados com seus respectivos controles (Figura 7A e B). Tanto a ingestão alimentar quanto a energética sofreram maior influência do fator tempo de exposição à dieta (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

A alta ingestão energética pelo GO alimentados por 6, 10 e 16 semanas contribuiu para o aumento da deposição de gordura epididimal nos mesmos (+44%, +66%, +56%, $P < 0,0001$), comparados aos seus respectivos controles (Tabela 1). Já o conteúdo de gordura retroperitoneal foi maior nos períodos de 10 e 16 semanas de exposição à dieta pelo GO (+57%, +74%, $P < 0,0001$) (Tabela 1), período este onde os mesmos também apresentaram aumento progressivo da massa corporal (+17%, +29%, $P < 0,0001$) (Tabela 1). Ambos os parâmetros foram maximizados pela interação dos fatores tipo e tempo de dieta (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

O comprimento naso-anal e da tíbia (CT) não foi diferente entre os grupos, sendo influenciados somente pelo fator tempo de exposição à dieta (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

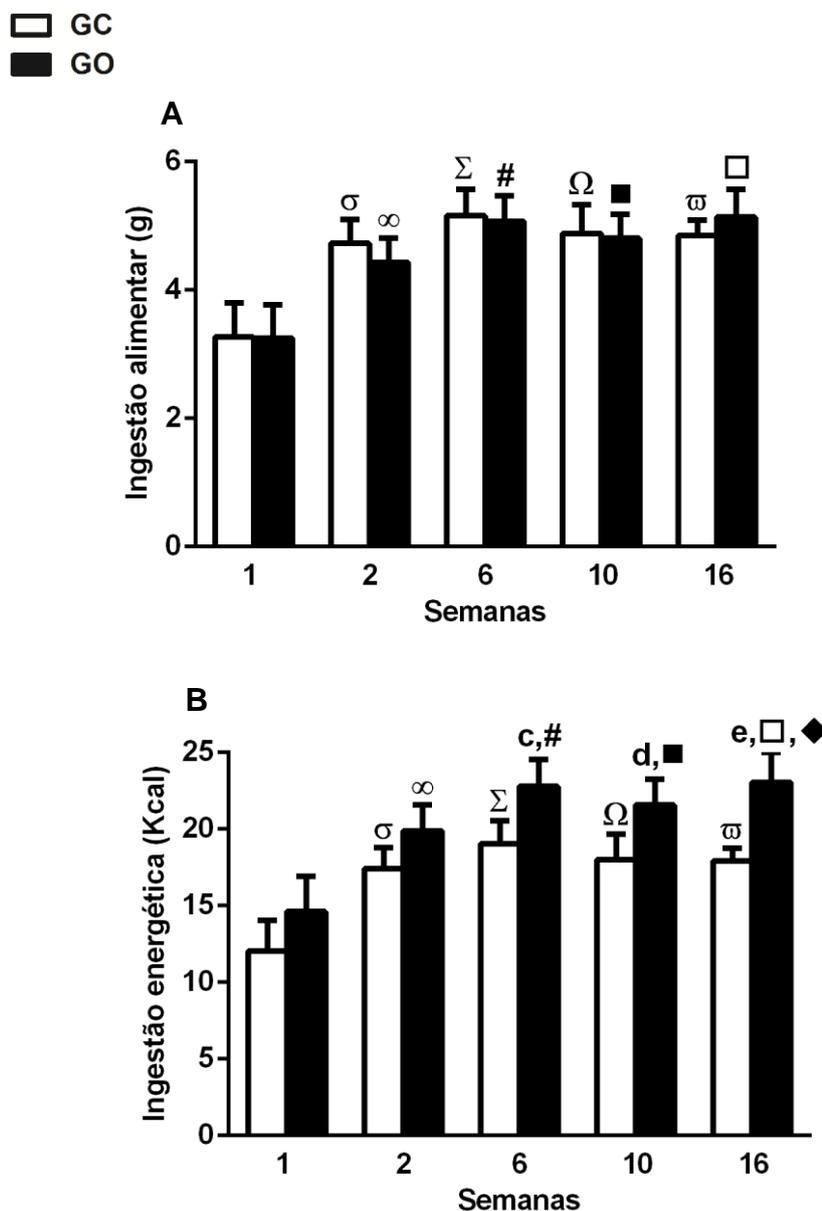
O Índice de Lee foi significativamente maior no GO submetido a 16 semanas de dieta (+4%, $P < 0,001$) (Tabela 1). Tal resultado foi maximizado pela interação entre os fatores tipo de dieta e o tempo de exposição à mesma (*Two way ANOVA*, $P = 0,0052$).

O peso do ventrículo esquerdo (VE) e a estimativa de hipertrofia cardíaca (razão VE/CT) foram significativamente maior no grupo GO submetido à dieta por 10 e 16 semanas (+22%, +17%; +14%, +14%, respectivamente, $P < 0,05$) (Tabela 1). Os fatores tipo e tempo de dieta influenciaram o peso do ventrículo esquerdo independentemente (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$), ao passo que ambos os fatores interagiram potencializando o parâmetro razão VE/CT (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

O peso do fígado e a estimativa para esteatose hepática (razão entre o peso do fígado/peso corporal) foi significativamente maior no GO exposto à dieta por 10 e

16 semanas (+41%, +37%; +41%, +31%, respectivamente, $P < 0,0001$) (Tabela 1), com interação entre os fatores estudados (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$; $P = 0,0201$).

Figura 7 - Ingestão alimentar e energética de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas



Legenda: Ingestão alimentar (A) e energética (B). Os valores foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [c] GC vs GO 6 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [σ] GC 1 semana vs GC 2 semanas, [Σ] GC 1 semana vs GC 6 semanas, [Ω] GC 1 semana vs GC 10 semanas, [ϖ] GC 1 semana vs GC 16 semanas, [∞] GO 1 semana vs GO 2 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas, [◆] GO 2 semanas vs GO 16 semanas. $n=16$ /grupo.

Tabela 1 - Parâmetros biométricos dos grupos com dieta controle e ocidental

	1		2		6		10		16	
	GC	GO	GC	GO	GC	GO	GC	GO	GC	GO
Massa corporal (g)	21,9±2,0	22,9±2,8	33,7±3,5 ^σ	32,7±3,9 [∞]	46,9±4,9 ^{Σ,Δ}	50,2±4,1 ^{#,•}	53,6±5,2 ^{Ω,θ,ξ}	62,7±2,1 ^{d,■,∅,£}	56,9±3,4 ^{ω,Φ,Ξ}	73,6±3,5 ^{e,□,♦,ε,θ}
Comprimento naso-anal (cm)	8,7±0,2	8,6±0,3	9,5±0,5 ^σ	9,4±0,3 [∞]	10,6±0,5 ^{Σ,Δ}	10,6±0,6 ^{#,•}	11,0±0,2 ^{Ω,θ}	11,2±0,4 ^{■,∅,£}	11,2±0,3 ^{ω,Φ,Ξ}	11,6±0,1 ^{□,♦,ε,θ}
Índice Lee	322,4±7,7	333,3±9,8	338,8±7,6 ^σ	342,5±9,0	343,0±6,7 ^Σ	341,5±4,6	349,8±4,9 ^Ω	347,3±6,7 [■]	352,7±7,1 ^ω	362,6±5,4 ^{e,□,♦,ε}
Gordura epididimal (g)	0,24±0,04	0,27±0,06	0,49±0,10	0,86±0,12 [∞]	1,83±0,47 ^{Σ,Δ}	2,65±0,38 ^{c,#,•}	1,86±0,34 ^{Ω,θ}	3,09±0,50 ^{d,■,∅}	1,96±0,22 ^{ω,Φ}	3,06±0,32 ^{e,□,♦}
Gordura retroperitoneal (g)	0,05±0,01	0,05±0,02	0,21±0,06	0,21±0,08	0,64±0,17 ^{Σ,Δ}	0,80±0,14 ^{#,•}	0,66±0,09 ^{Ω,θ}	1,04±0,04 ^{d,■,∅,£}	0,81±0,23 ^{ω,Φ}	1,42±0,25 ^{e,□,♦,ε,θ}
Peso do VE (mg)	111,2±8,6	127,5±6,9	117,6±18,7	128,6±18,7	157,4±15,3 ^{Σ,Δ}	174,3±18,8 ^{#,•}	171,8±17,6 ^{Ω,θ}	209,2±23,4 ^{d,■,∅,£}	170,2±16,2 ^{ω,Φ}	198,8±17,9 ^{e,□,♦}
Comprimento da Tíbia (cm)	1,7±0,08	1,7±0,07	1,9±0,12	1,9±0,18	2,1±0,21 ^Σ	2,1±0,24 ^{#,•}	2,2±0,11 ^{Ω,θ}	2,2±0,12 ^{■,∅}	2,4±0,12 ^{ω,Φ,Ξ}	2,4±0,13 ^{□,♦,ε}
Razão VE/CT (mg/cm)	59,8±4,2	65,7±5,8	57,5±8,1	61,3±8,7	68,7±3,6 ^Δ	64,1±5,0	78,8±4,8 ^{Ω,θ}	90,2±9,2 ^{d,■,∅,£}	80,4±4,1 ^{ω,Φ,Ξ}	91,7±4,1 ^{e,□,♦,ε}
Peso do fígado (g)	1,17±0,07	1,22±0,16	1,68±0,18 ^σ	1,68±0,22 [∞]	2,06±0,36 ^Σ	2,40±0,16 ^{#,•}	2,47±0,31 ^{Ω,θ}	3,48±0,39 ^{d,■,∅,£}	2,62±0,31 ^{ω,Φ,Ξ}	3,61±0,31 ^{e,□,♦,ε}
Razão peso do fígado/ Massa corporal (g)	0,05±0,005	0,05±0,006	0,05±0,004	0,06±0,008	0,04±0,009	0,05±0,008	0,04±0,003	0,06±0,005 ^d	0,04±0,004	0,05±0,010 ^e

Legenda: VE: Ventrículo esquerdo; CT: Comprimento da Tíbia. Os valores foram representados como média ± desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [c] GC vs GO 6 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [σ] GC 1 semana vs GC 2 semanas, [Σ] GC 1 semana vs GC 6 semanas, [Ω] GC 1 semana vs GC 10 semanas, [ω] GC 1 semana vs GC 16 semanas, [Δ] GC 2 semanas vs GC 6 semanas, [θ] GC 2 semanas vs GC 10 semanas, [Φ] GC 2 semanas vs GC 16 semanas, [ξ] GC 6 semanas vs GC 10 semanas, [Ξ] GC 6 semanas vs GC 16 semanas, [∞] GO 1 semana vs GO 2 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas, [♦] GO 2 semanas vs GO 6 semanas, [∅] GO 2 semanas vs GO 10 semanas, [♦] GO 2 semanas vs GO 16 semanas, [£] GO 6 semanas vs GO 10 semanas, [ε] GO 6 semanas vs GO 16 semanas, [θ] GO 10 semanas vs GO 16 semanas. n=12/grupo.

6.2 Bioquímica plasmática e teste intraperitoneal de tolerância à glicose

A glicemia de jejum apresentou-se aumentada nos animais GO expostos à dieta por 2, 6, 10 e 16 semanas (+21%, +25%, +19%, +23%, $P<0,01$), quando comparado ao GC (Tabela 2). Houve interação entre os fatores tipo e tempo de dieta contribuindo para o aumento da glicemia (*Two way ANOVA*, $P=0,0015$).

Com 10 e 16 semanas de ingestão da dieta ocidental, o GO apresentou aumento da insulina de jejum sérica (53%, $P<0,01$ e 23%, $P<0,05$) (Tabela 2). Sendo este parâmetro influenciado independentemente pelos fatores tipo e tempo de dieta (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$).

Com os resultados de glicemia e insulina de jejum pode-se calcular o índice de resistência à insulina (HOMA-IR). Os animais GO apresentaram aumento neste índice quando alimentados por 2, 6, 10 e 16 semanas (+67%, +46%, +91%, +67%, $P<0,01$) (Tabela 2). Já a área sob a curva, obtida com o teste de tolerância à glicose, foi maior no GO quando expostos à dieta por 6, 10 e 16 semanas (+32%, +49%, +62%, $P<0,01$) (Figura 8). A interação entre os fatores tipo e tempo de dieta potencializaram positivamente o índice de resistência à insulina e o teste de tolerância à glicose (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$).

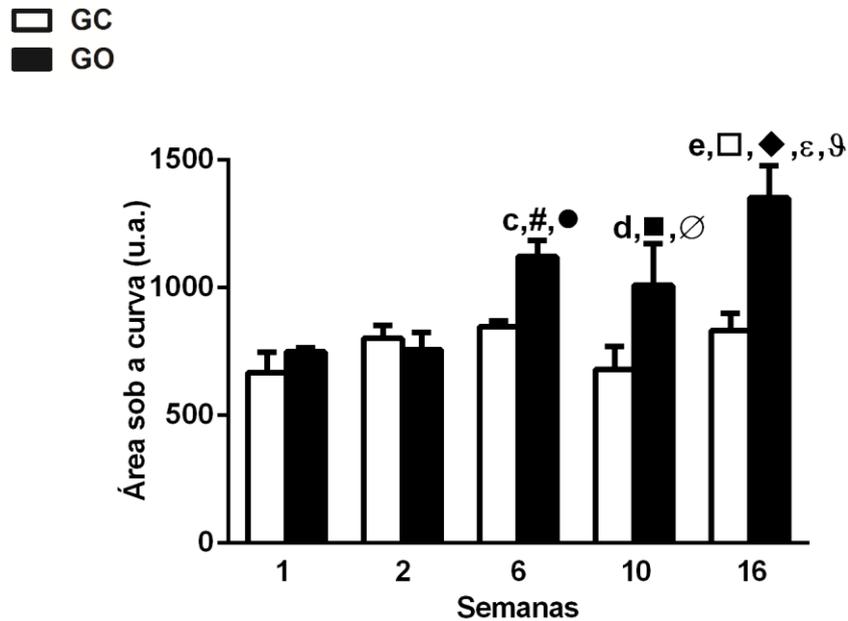
Quanto ao perfil lipídico observamos maior conteúdo sérico de colesterol total quando o GO foi alimentado por 2, 10 e 16 semanas (+55%, +70%, +79%, $P<0,01$) e de triglicerídeos com 10 e 16 semanas (+43%, +32%, $P<0,01$) (Tabela 2). Tais parâmetros foram influenciados pela interação dos fatores estudados (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$).

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos e teste intraperitoneal de tolerância à glicose dos grupos com dieta controle e ocidental

	1		2		6		10		16	
	GC	GO	GC	GO	GC	GO	GC	GO	GC	GO
Glicemia (mg/dL)	138,1±10,1	143,2±10,8	168,6±14,6 ^σ	204,2±15,1 ^{b,∞}	174,6±8,1 ^Σ	219,0±18,3 ^{c,#}	178,6±13,2 ^Ω	212,0±10,9 ^{d,■}	181,7±13,5 ^ω	224,2±7,6 ^{e,□}
Insulina (mIU/mL)	9,3±2,8	10,6±1,8	12,6±1,8	17,4±3,7	16,1±3,2	18,7±3,2 [#]	16,0±6,2	25,4±5,1 ^{d,■,∅}	19,7±2,3 ^ω	26,5±3,9 ^{e,□,*,ε}
HOMA-IR	3,2±0,9	3,8±0,6	5,2±0,8	8,7±1,3 ^{b,∞}	6,9±0,9 ^Σ	10,1±1,6 ^{c,#}	6,9±2,1 ^Ω	13,2±2,3 ^{d,■,∅,£}	8,8±1,2 ^{ω,Φ}	14,7±2,2 ^{e,□,ε}
Colesterol total (mg/dL)	47,9±5,3	59,1±2,2	43,1±3,7	66,9±11,1 ^b	50,5±5,3	58,5±6,5	45,7±14,9	77,8±15,1 ^{d,■,£}	45,5±9,3	81,5±4,9 ^{e,□,ε}
Triglicerídeos (mg/dL)	43,9±6,6	55,8±5,9	101,6±6,7 ^σ	109,7±7,7 [∞]	70,0±6,0 ^{Σ,Δ}	68,2±5,7 [•]	74,5±4,3 ^{Ω,θ}	106,6±7,8 ^{d,■,£}	89,7±7,2 ^{ω,Ξ,λ}	118,4±6,3 ^{e,□,ε}

Legenda: Os valores foram representados como média ± desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [b] GC vs GO 2 semanas, [c] GC vs GO 6 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [σ] GC 1 semana vs GC 2 semanas, [Σ] GC 1 semana vs GC 6 semanas, [Ω] GC 1 semana vs GC 10 semanas, [ω] GC 1 semana vs GC 16 semanas, [Δ] GC 2 semanas vs GC 6 semanas, [θ] GC 2 semanas vs GC 10 semanas, [Φ] GC 2 semanas vs GC 16 semanas, [Ξ] GC 6 semanas vs GC 16 semanas, [λ] GC 10 semanas vs GC 16 semanas, [∞] GO 1 semana vs GO 2 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas, [•] GO 2 semanas vs GO 6 semanas, [∅] GO 2 semanas vs GO 10 semanas, [♦] GO 2 semanas vs GO 16 semanas, [£] GO 6 semanas vs GO 10 semanas, [ε] GO 6 semanas vs GO 16 semanas. n=12/grupo.

Figura 8 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas



Legenda: Os valores foram representados como média da área sob a curva \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [c] GC vs GO 6 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas, [●] GO 2 semanas vs GO 6 semanas, [Ø] GO 2 semanas vs GO 10 semanas, [◆] GO 2 semanas vs GO 16 semanas, [ε] GO 6 semanas vs GO 16 semanas, [ϑ] GO 10 semanas vs GO 16 semanas. $n=6$ /grupo.

6.3 Respiração mitocondrial, consumo de oxigênio e produção de ATP cardíaco

O GO apresentou diminuição da oxidação de carboidratos nos períodos de exposição à dieta de 1, 10 e 16 semanas (-57%, -47%, -46%, $P<0,01$), acompanhada de menor eficiência no acoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial, observado através da diminuição do RCR (-50%, -31%, -41%, $P<0,01$) (Figura 9A e B). A diminuição da oxidação de carboidratos e do acoplamento mitocondrial foi maximizada pela interação dos fatores tipo e tempo de dieta (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$).

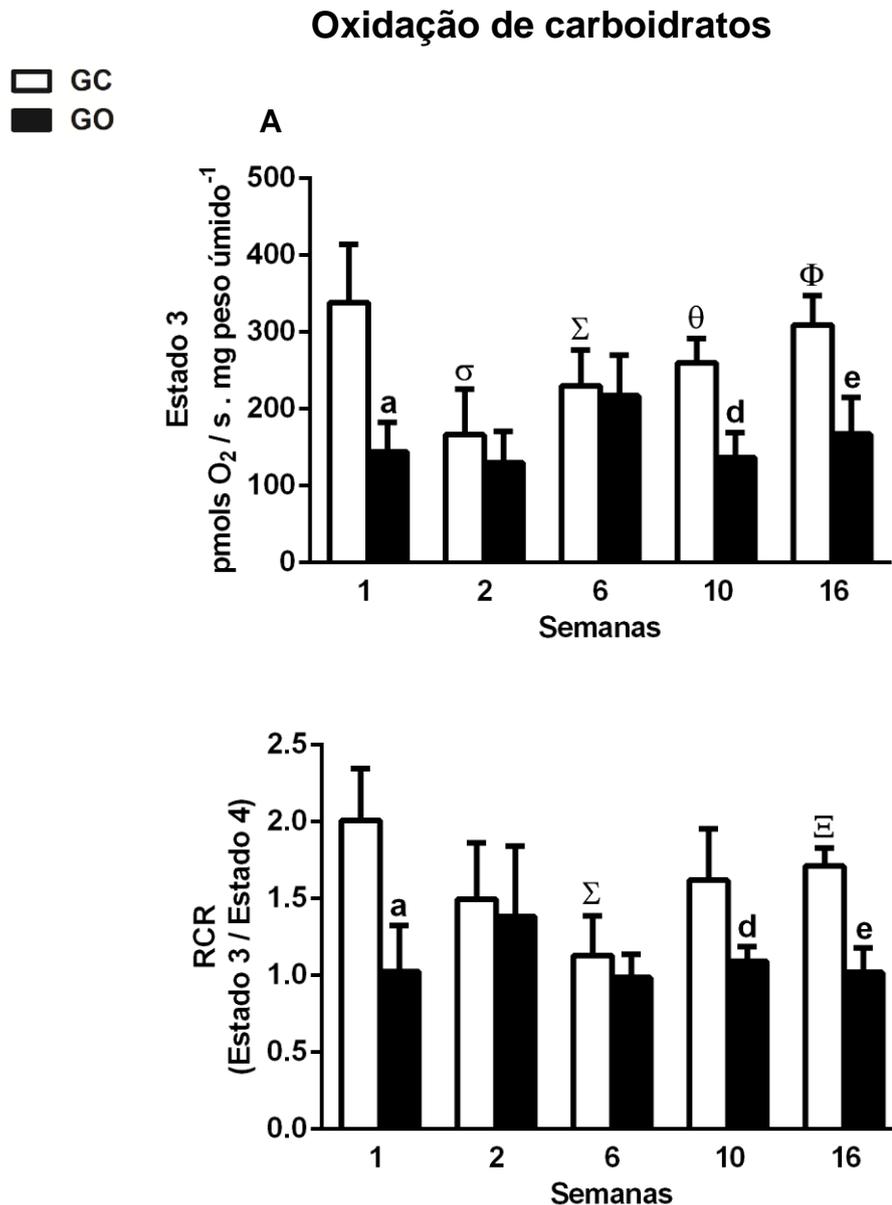
Quanto aos ácidos graxos, o GO apresentou menor oxidação quando alimentados com a dieta por 2, 10 e 16 semanas (-56%, -41%, -34%, $P<0,01$), juntamente com menor eficiência no acoplamento da fosforilação oxidativa, observada através da diminuição do RCR (-36%, -44%, -52%, $P<0,01$), quando comparado ao GC (Figura 10A e B). A redução da oxidação de ácidos graxos e aumento do desacoplamento mitocondrial também sofreram influência da interação entre os fatores estudados (*Two way ANOVA*, $P<0,01$).

Em suma, o GO expostos à dieta por 1, 2, 10 e 16 semanas foram caracterizados com disfunção mitocondrial cardíaca, visto que apresentaram redução na oxidação de carboidratos e/ou ácidos graxos com redução significativa na taxa respiratória máxima estimulada por ADP (Estado 3), acompanhados de desacoplamento mitocondrial.

Avaliamos também a integridade da membrana mitocondrial utilizando citocromo c em todos os experimentos e observamos que não houve aumento do fluxo respiratório em nenhum dos grupos, indicando ausência de danos na membrana mitocondrial (dados não apresentados).

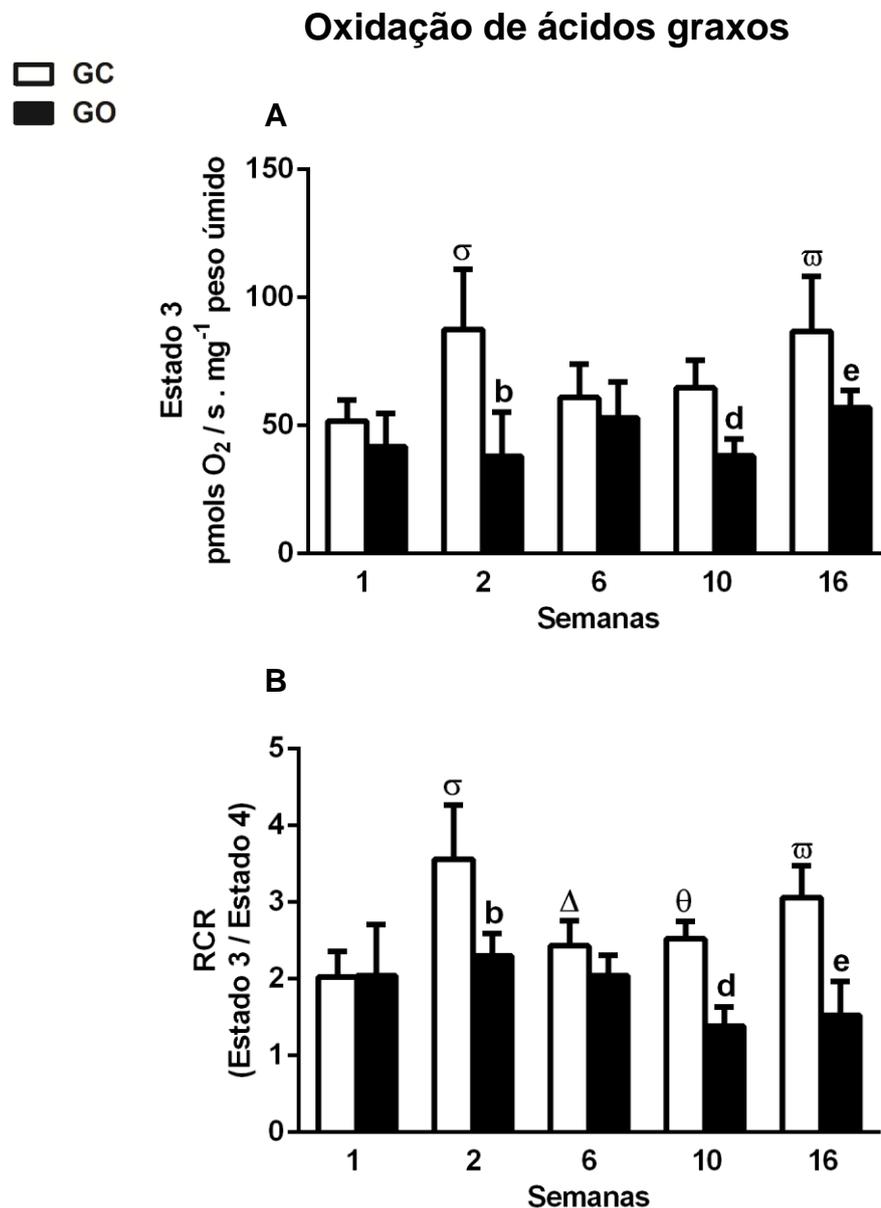
A dosagem de ATP cardíaco revelou redução no GO submetido à dieta por 2, 10 e 16 semanas (-40%, -35%, -35%, $P<0,01$) (Figura 11), havendo influência dos fatores tipo e tempo de dieta de forma independente (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$). O presente resultado corroborou a disfunção mitocondrial existente no GO alimentados por 2, 10 e 16 semanas. Não houve diferença no GO alimentados por 1 semana, sugerindo que a oxidação de ácidos graxos manteve a produção de ATP neste grupo.

Figura 9 - Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas, frente aos substratos relacionados aos protocolos de oxidação de carboidratos



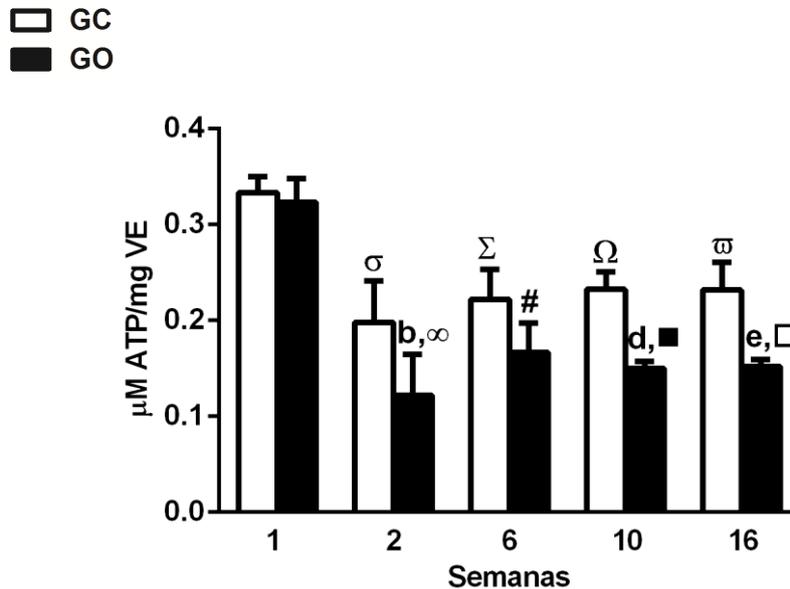
Legenda: (A) Estado 3 – Respiração máxima. (B) Razão do controle respiratório (RCR), calculada como a razão do Estado3/Estado4. Os valores foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [a] GC vs GO 1 semana, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [σ] GC 1 semana vs GC 2 semanas, [Σ] GC 1 semana vs GC 6 semanas, [θ] GC 2 semanas vs GC 10 semanas, [Φ] GC 2 semanas vs GC 16 semanas, [Ξ] GC 6 semanas vs GC 16 semanas. n=8/grupo.

Figura 10 - Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas, frente aos substratos relacionados aos protocolos de oxidação de ácidos graxos



Legenda: (A) Estado 3 – Respiração máxima. (B) Razão do controle respiratório (RCR), calculada como a razão do Estado3/Estado4. Os valores foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [b] GC vs GO 2 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [σ] GC 1 semana vs GC 2 semanas, [ω] GC 1 semana vs GC 16 semanas, [Δ] GC 2 semanas vs GC 6 semanas, [θ] GC 2 semanas vs GC 10 semanas. $n=8$ /grupo.

Figura 11 - Conteúdo de ATP cardíaco de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas



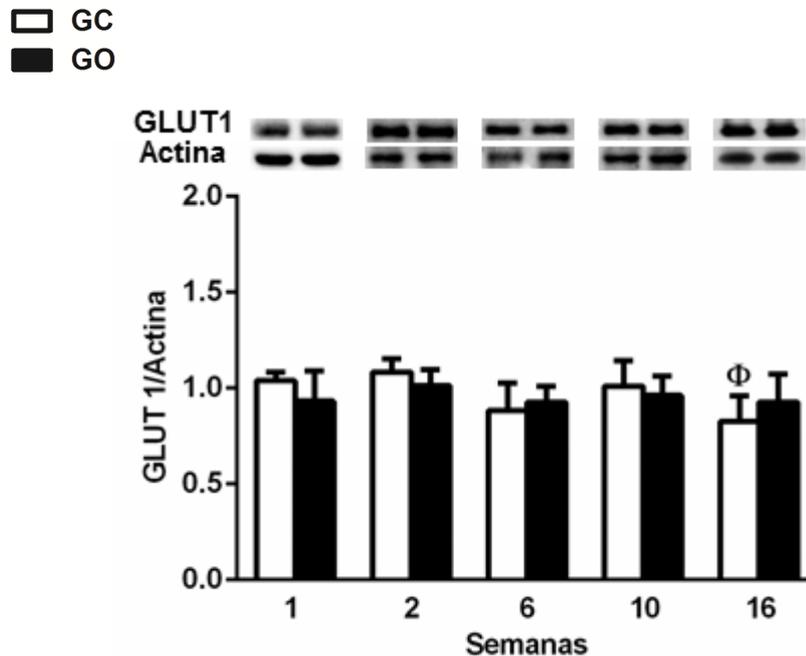
Legenda: Os valores foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [b] GC vs GO 2 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [σ] GC 1 semana vs GC 2 semanas, [Σ] GC 1 semana vs GC 6 semanas, [Ω] GC 1 semana vs GC 10 semanas, [ϖ] GC 1 semana vs GC 16 semanas, [∞] GO 1 semana vs GO 2 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4 Conteúdo de proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco

6.4.1 Transportador de Glicose 1 (GLUT1)

O conteúdo de GLUT1 não foi diferente estatisticamente entre os grupos analisados (Figura 12). Este resultado apresentou maior influência do fator tempo de exposição à dieta (*Two way ANOVA*, $P < 0,0013$).

Figura 12 - Conteúdo total da proteína GLUT1 nos cardiomiócitos de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

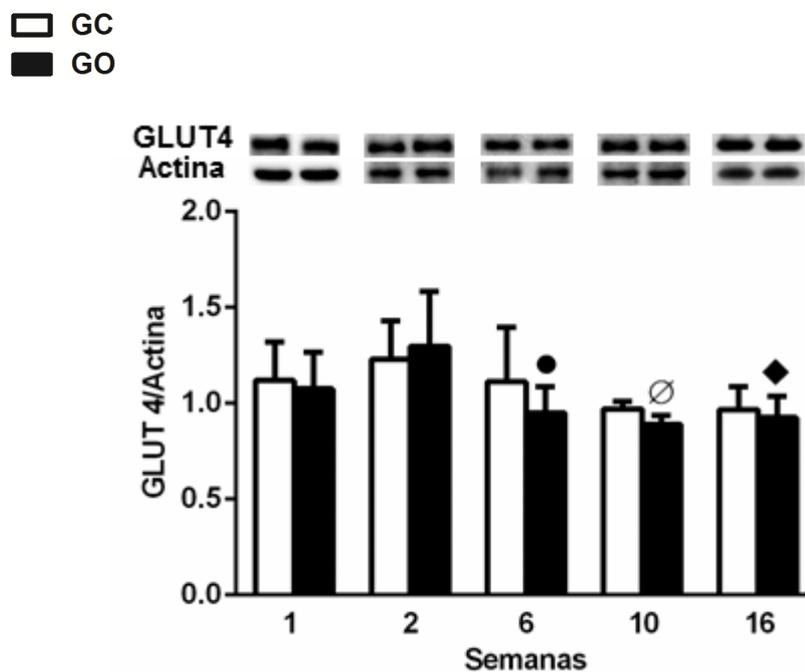


Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [Φ] GC 2 semanas vs GC 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.2 Transportador de Glicose 4 (GLUT4)

O conteúdo de GLUT4 não foi diferente estatisticamente entre os grupos analisados (Figura 13). Este resultado apresentou maior influência do fator tempo de exposição à dieta (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

Figura 13 - Conteúdo total da proteína GLUT4 nos cardiomiócitos de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

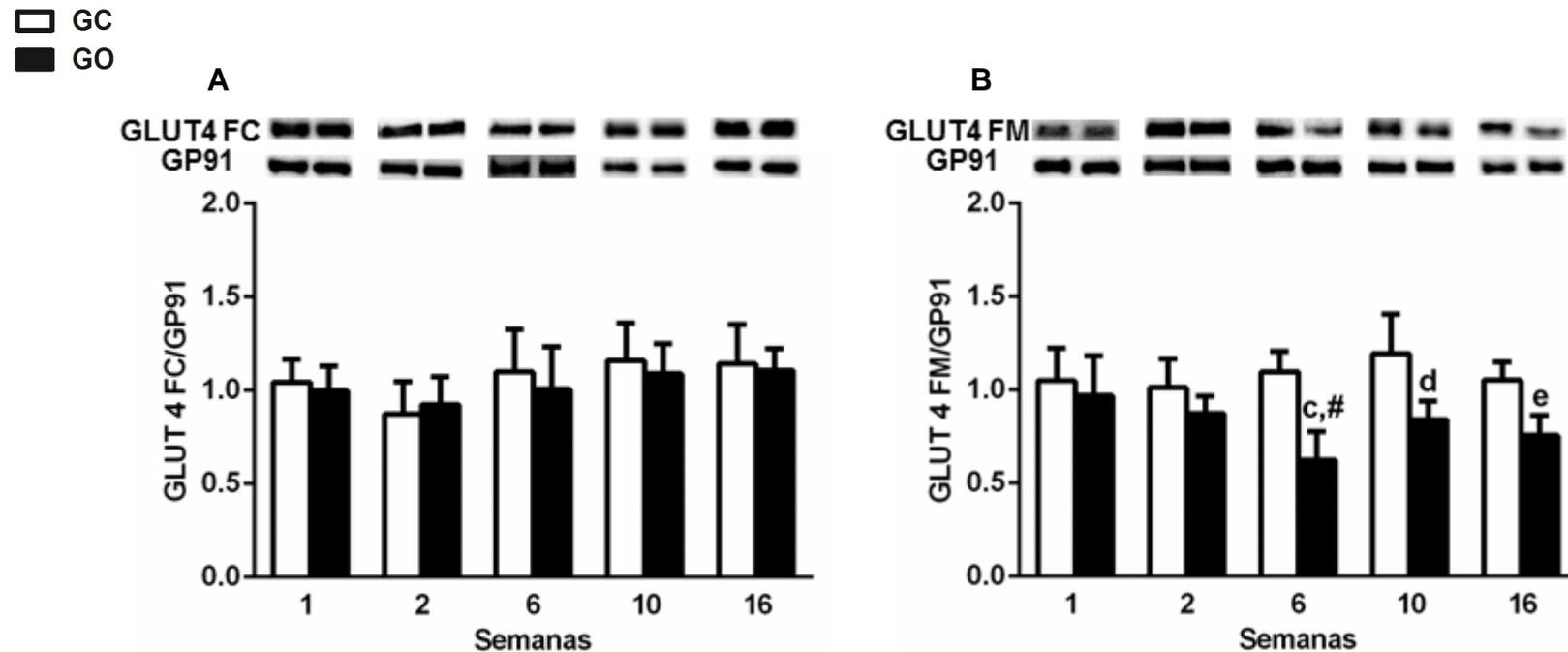


Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [●] GO 2 semanas vs GO 6 semanas, [Ø] GO 2 semanas vs GO 10 semanas, [◆] GO 2 semanas vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.3 Transportador GLUT4 nas frações citosólica e de membrana

O conteúdo de GLUT4 da fração citosólica (FC) não foi diferente estatisticamente entre os grupos analisados (Figura 14A). Este resultado apresentou maior influência do fator tempo de exposição à dieta (*Two way ANOVA*, $P < 0,01$). Já o conteúdo da fração de membrana apresentou-se reduzido no GO expostos à dieta por 6, 10 e 16 semanas (-45%, -33%, -27%, $P < 0,01$) (Figura 14B). Este resultado foi maximizado pela interação entre os fatores tipo e tempo de exposição à dieta (*Two way ANOVA*, $P < 0,01$).

Figura 14 - Conteúdo total da proteína GLUT4 nas frações citosólica e de membrana nos cardiomiócitos de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

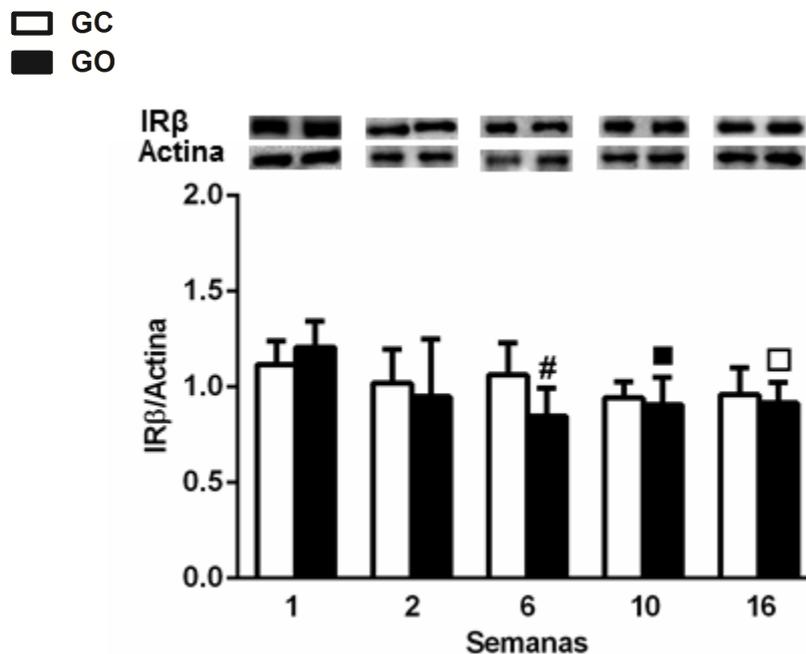


Legenda: Conteúdo total da proteína GLUT4 nas frações citosólica (A) e de membrana (B). Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [c] GC vs GO 6 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas. n=8/grupo.

6.4.4 Receptor de insulina β (IR β)

O conteúdo de IR β foi semelhante entre os grupos GC e GO, não havendo diferença estatística entre eles (Figura 15). Este resultado apresentou maior influência do fator tempo de exposição à dieta (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

Figura 15 - Conteúdo total de proteína IR β nos cardiomiócitos de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

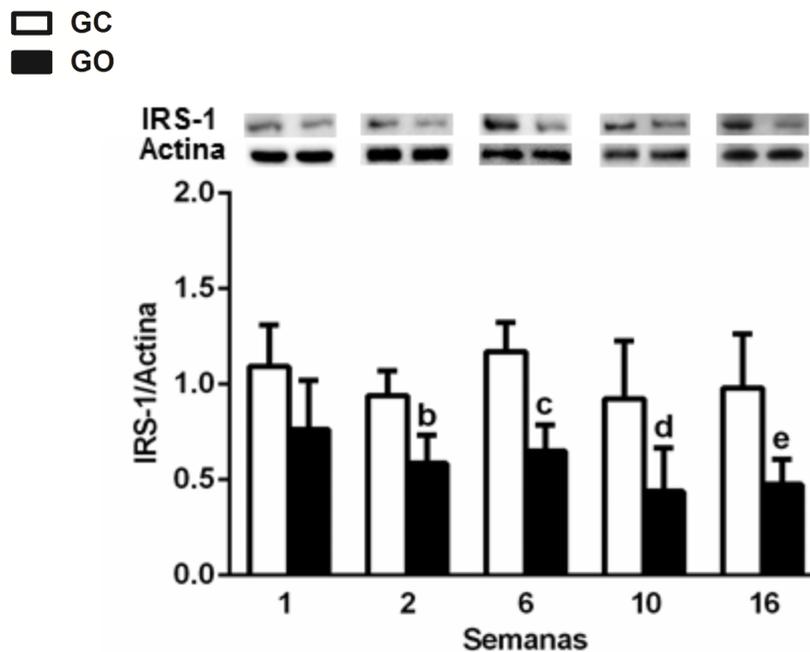


Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.5 Substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1)

O conteúdo de IRS-1 foi significativamente menor no GO alimentados por 2, 6, 10 e 16 semanas (-33%, -42%, -55%, -50%, $P<0,05$), quando comparado ao GC (Figura 16). Os fatores tipo e tempo de exposição à dieta interferiram independentemente neste resultado (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$; $P=0,0062$).

Figura 16 - Conteúdo total de proteína IRS-1 nos cardiomiócitos de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

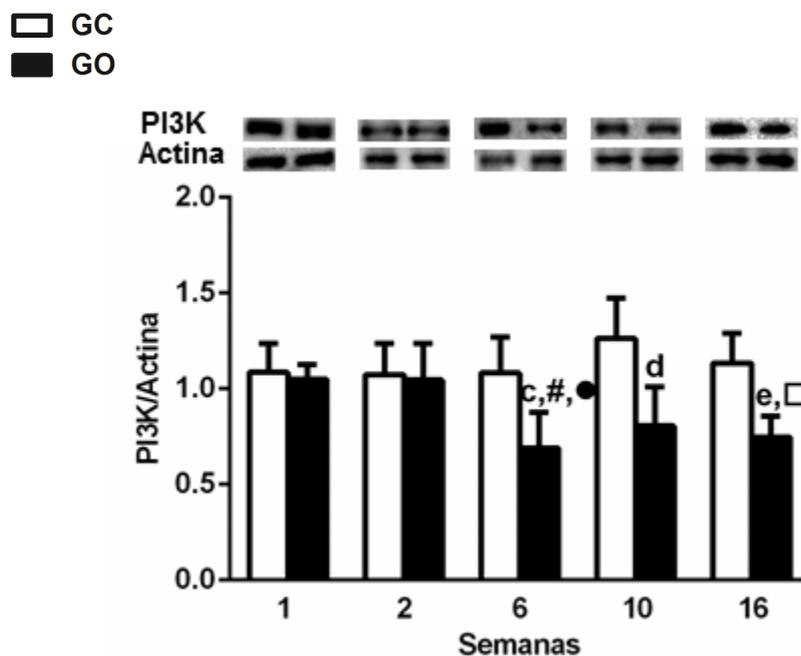


Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras indicam diferença significativa para $P<0,05$, comparando com: [b] GC vs GO 2 semanas, [c] GC vs GO 6 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.6 Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)

O conteúdo de PI3K apresentou-se diminuído significativamente no GO em relação ao GC alimentados por 6, 10 e 16 semanas (-36%, -38%, -36%, $P<0,05$), de acordo com a figura 17. Houve interação dos fatores tipo e tempo de exposição à dieta maximizando o presente resultado (*Two way ANOVA*, $P<0,001$).

Figura 17 - Conteúdo total da proteína PI3K nos cardiomiócitos de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas



Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P<0,05$, comparando com: [c] GC vs GO 6 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas, [•] GO 2 semanas vs GO 6 semanas. $n=8$ /grupo.

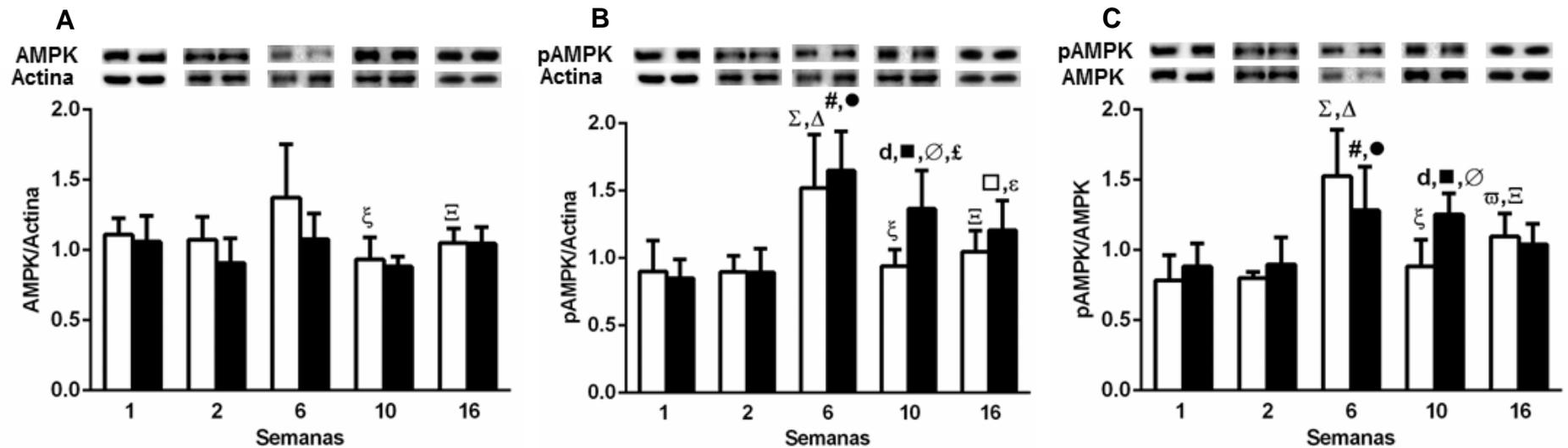
6.4.7 Proteína ativada por AMP (AMPK), Proteína ativada por AMP fosforilada (pAMPK) e razão entre pAMPK/AMPK

O conteúdo de AMPK não foi diferente entre os grupos GC e GO (Figura 18A). Os fatores tipo e tempo de exposição à dieta interferiram independentemente neste resultado (*Two way ANOVA*, $P=0,0067$; $P=0,0003$).

Observou-se aumento do conteúdo de pAMPK e da razão pAMPK/AMPK no GO somente com 10 semanas de exposição à dieta (+55% e +44, respectivamente, $P<0,05$) (Figura 18B e C). Houve interação dos fatores tipo e tempo de exposição à dieta maximizando o presente resultado (*Two way ANOVA*, $P<0,05$ e $P<0,01$).

Figura 18 - Conteúdo total das proteínas AMPK, pAMPK e pAMPK/AMPK nos cardiomiócitos de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

□ GC
■ GO

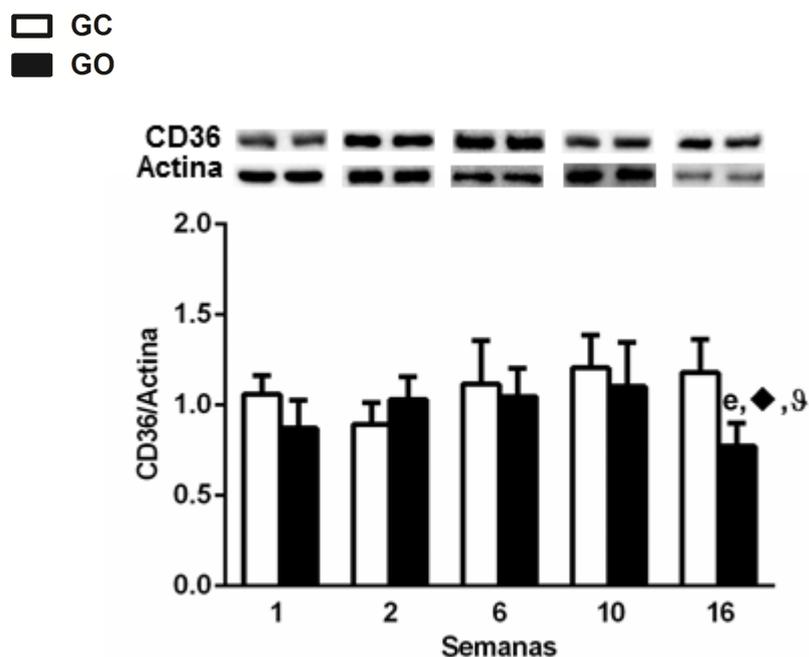


Legenda: Conteúdo total das proteínas AMPK (A), pAMPK (B) e pAMPK/AMPK (C). Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [d] GC vs GO 10 semanas, [Σ] GC 1 semana vs GC 6 semanas, [ϖ] GC 1 semana vs GC 16 semanas, [Δ] GC 2 semanas vs GC 6 semanas, [ξ] GC 6 semanas vs GC 10 semanas, [Ξ] GC 6 semanas vs GC 16 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas, [●] GO 2 semanas vs GO 6 semanas, [∅] GO 2 semanas vs GO 10 semanas, [ε] GO 6 semanas vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.8 Proteína transportadora de ácidos graxos integrada à membrana (CD36)

Como podemos observar na figura 19, o conteúdo de CD36 foi reduzido nos animais GO alimentados por 16 semanas (-33%, $P<0,05$), comparado ao GC. A interação entre os fatores tipo e tempo de dieta maximizaram a presente variável (*Two way ANOVA*, $P=0,0019$).

Figura 19 - Conteúdo total da proteína CD36 nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

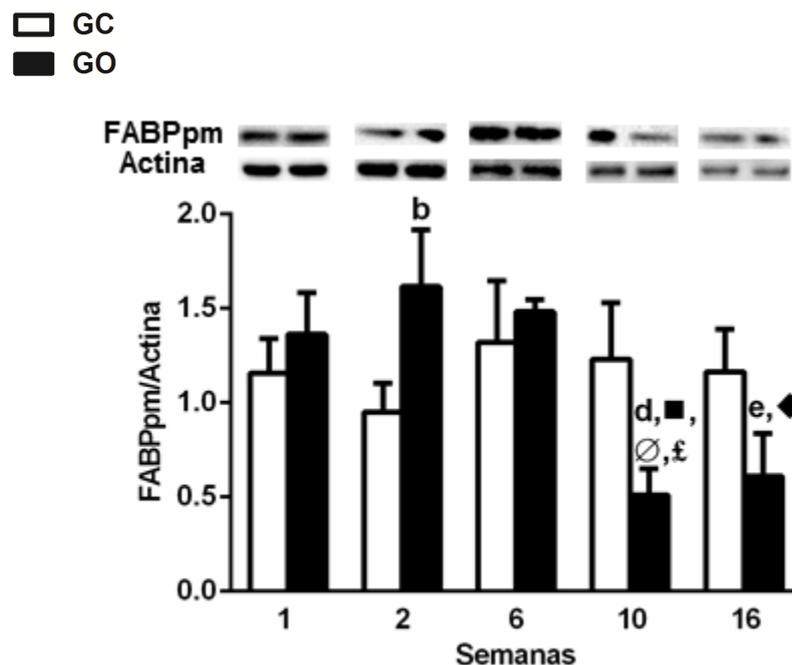


Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P<0,05$, comparando com: [e] GC vs GO 16 semanas, [♦] GO 2 semanas vs GO 16 semanas, [¶] GO 10 semanas vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.9 Proteína de ligação de ácidos graxos da membrana plasmática (FABPpm)

Os animais alimentados por 2 semanas com a dieta ocidental apresentaram aumento do conteúdo de FABPpm (+60%, $P<0,0001$) (Figura 20). Já nos alimentados por 10 e 16 semanas observou-se redução do conteúdo de FABPpm (-58%, $P<0,0001$; -50%, $P<0,01$), comparado ao GC (Figura 20). A interação entre os fatores tipo e tempo de dieta maximizaram estes resultados (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$).

Figura 20 - Conteúdo total da proteína FABPpm nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

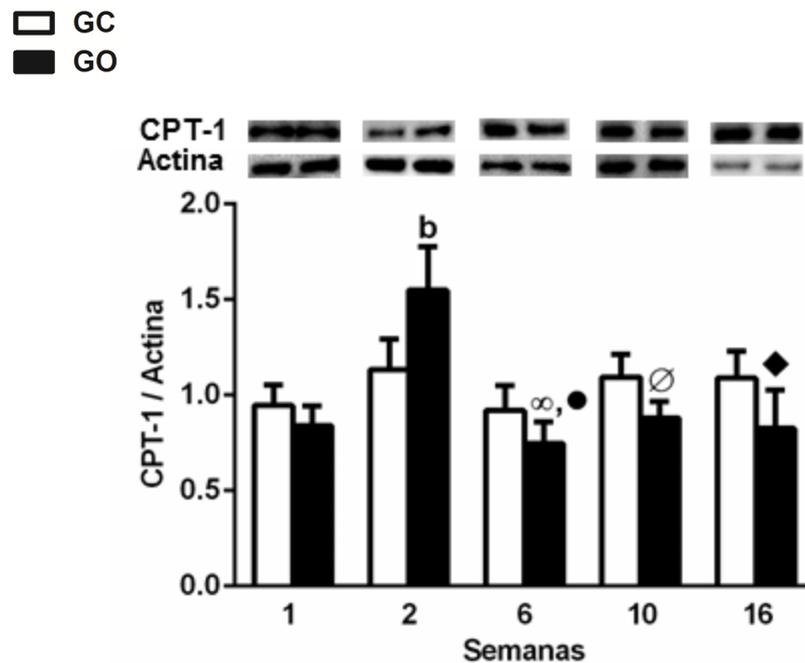


Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P<0,05$, comparando com: [b] GC vs GO 2 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [∅] GO 2 semanas vs GO 10 semanas, [♦] GO 2 semanas vs GO 16 semanas, [£] GO 6 semanas vs GO 10 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.10 Carnitina Palmitoil transferase 1 (CPT-1)

O conteúdo de CPT-1 foi significativamente maior no GO exposto à dieta por 2 semanas (+36%, $P < 0,0001$) (Figura 21), quando comparado ao GC. A interação entre os fatores tipo e tempo de dieta maximizaram o aumento no conteúdo desta proteína (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

Figura 21 - Conteúdo total da proteína CPT-1 nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

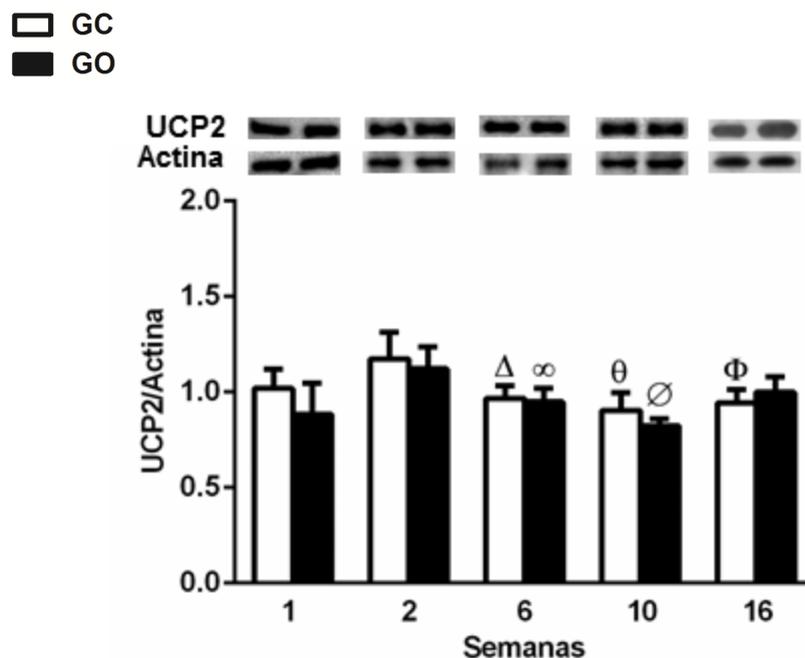


Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [b] GC vs GO 2 semanas, [∞] GO 1 semana vs GO 2 semanas, [●] GO 2 semanas vs GO 6 semanas, [\emptyset] GO 2 semanas vs GO 10 semanas, [♦] GO 2 semanas vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.11 Proteína desacopladora 2 (UCP2)

O conteúdo de UCP2 não apresentou diferença entre os grupos GC e GO (Figura 22). O fator tempo de dieta influenciou independentemente o conteúdo de UCP2 (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

Figura 22 - Conteúdo total da proteína UCP2 nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

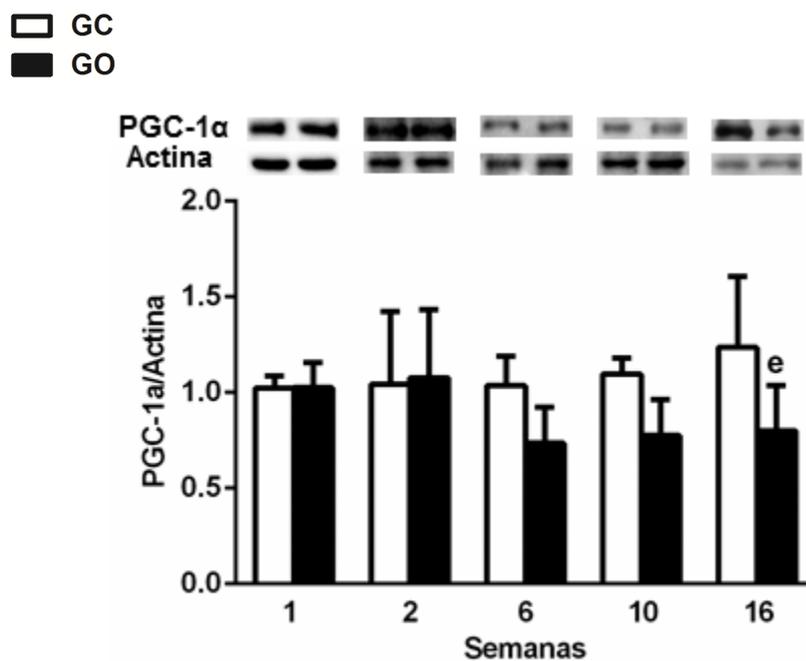


Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [Δ] GC 2 semanas vs GC 6 semanas, [θ] GC 2 semanas vs GC 10 semanas, [Φ] GC 2 semanas vs GC 16 semanas, [∞] GO 1 semana vs GO 2 semanas, [\emptyset] GO 2 semanas vs GO 10 semanas. $n=8$ /grupo.

6.4.12 Coativador-1 α do receptor ativado por proliferador de peroxissoma (PGC-1 α)

O GO apresentou redução do conteúdo de PGC-1 α apenas quando submetido à dieta por 16 semanas (-33%, $P<0,01$) (Figura 23). Tal parâmetro sofreu interação entre os fatores tipo e tempo de dieta reforçando a redução do conteúdo de PGC-1 α (*Two way ANOVA*, $P=0,0241$).

Figura 23 - Conteúdo total da proteína PGC-1 α nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas



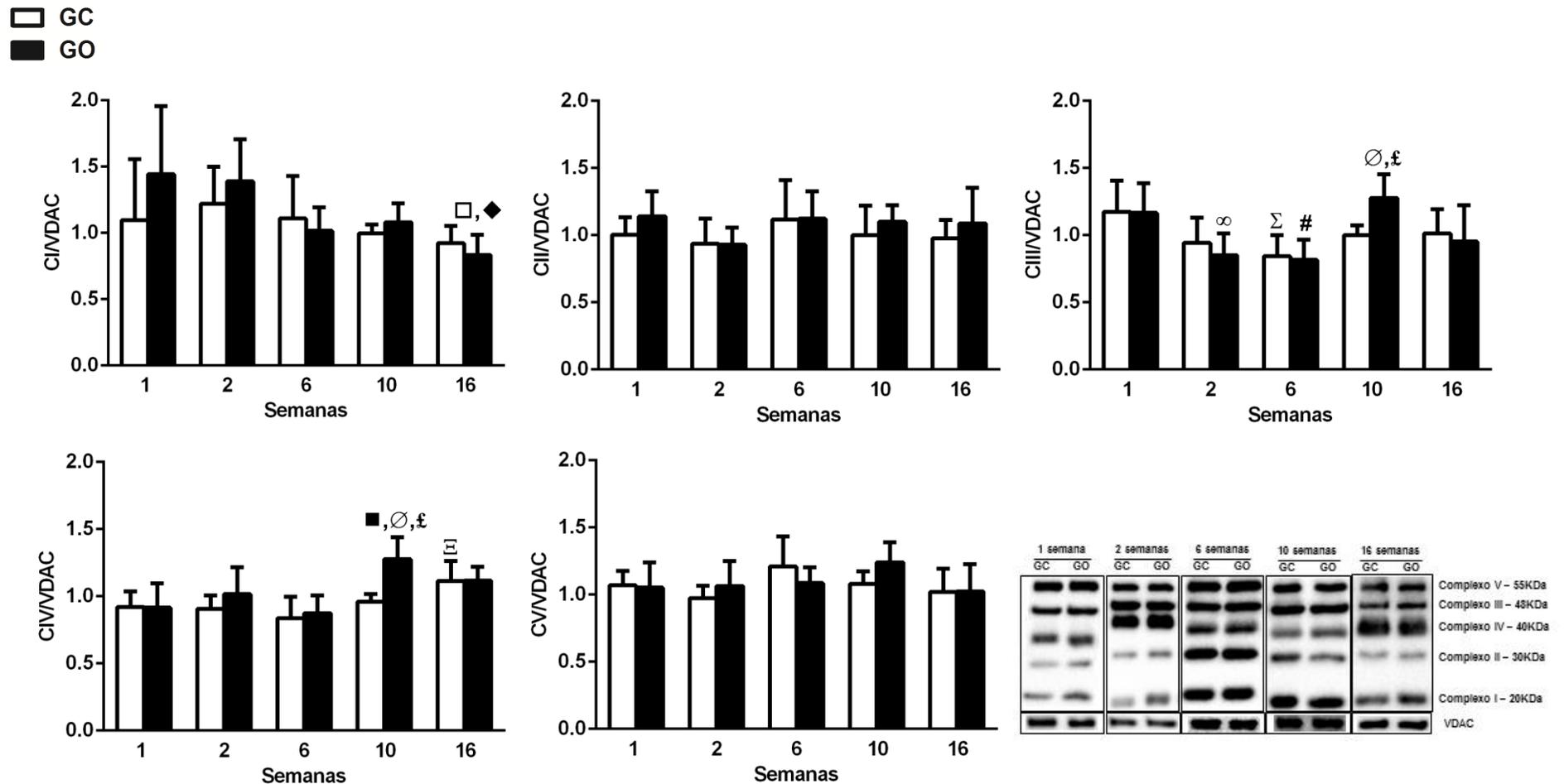
Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras indicam diferença significativa para $P<0,05$, comparando com: [e] GC vs GO 16 semanas. n=8/grupo.

6.4.13 Conteúdo total dos complexos respiratórios do sistema de transporte de elétrons

Avaliamos o conteúdo dos complexos I, II, III, IV e V do sistema de transporte de elétrons. Observamos que os animais do GO não apresentaram diferença estatística do conteúdo dos complexos respiratórios quando comparados aos respectivos GC (Figura 24A-E).

Os conteúdos dos complexos I e V sofreram influência do fator tempo de dieta de forma independente (*Two way ANOVA*, $P < 0,001$ e $P = 0,0371$). Houve interação entre os fatores tipo e tempo de dieta quanto aos conteúdos dos complexos III e IV (*Two way ANOVA*, $P = 0,0484$ e $P = 0,0152$).

Figura 24 - Conteúdo total dos complexos respiratórios do sistema de transporte de elétrons (I, II, III, IV e V) nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas



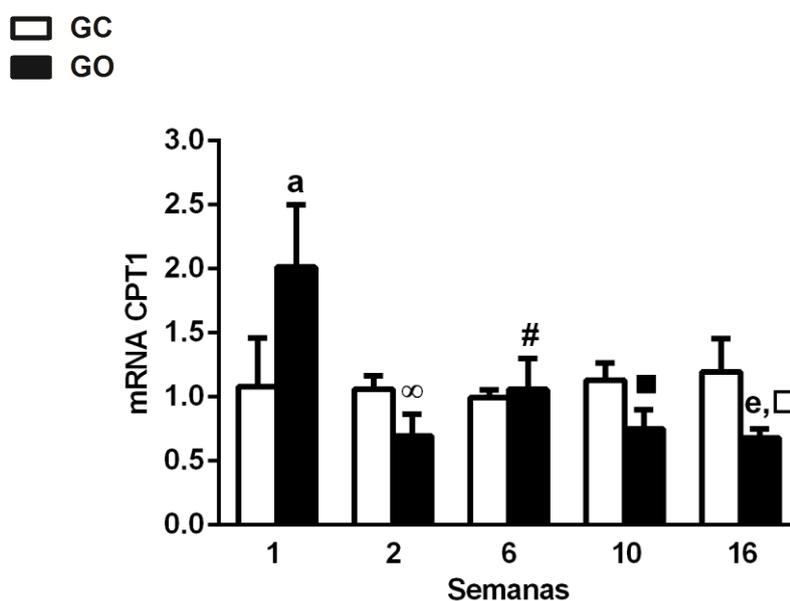
Legenda: Os valores de densidade relativa foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way* ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [Σ] GC 1 semana vs GC 6 semanas, [Ξ] GC 6 semanas vs GC 16 semanas, [∞] GO 1 semana vs GO 2 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas, [∅] GO 2 semanas vs GO 10 semanas, [£] GO 6 semanas vs GO 10 semanas, [♦] GO 2 semanas vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.5 Expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco

6.5.1 Carnitina Palmitoil transferase 1 (CPT1)

Com relação à expressão de mRNA da proteína CPT1, observou-se aumento do significativo no GO alimentado por 1 semana de dieta, ao passo que houve redução quando alimentado por 16 semanas (+100%, $P < 0,0001$; -42%, $P < 0,05$, respectivamente) (Figura 25). A interação entre os fatores tipo e tempo de dieta maximizaram os resultados quanto à expressão de mRNA da CPT1 (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$).

Figura 25 - Expressão de mRNA da proteína CPT1 nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

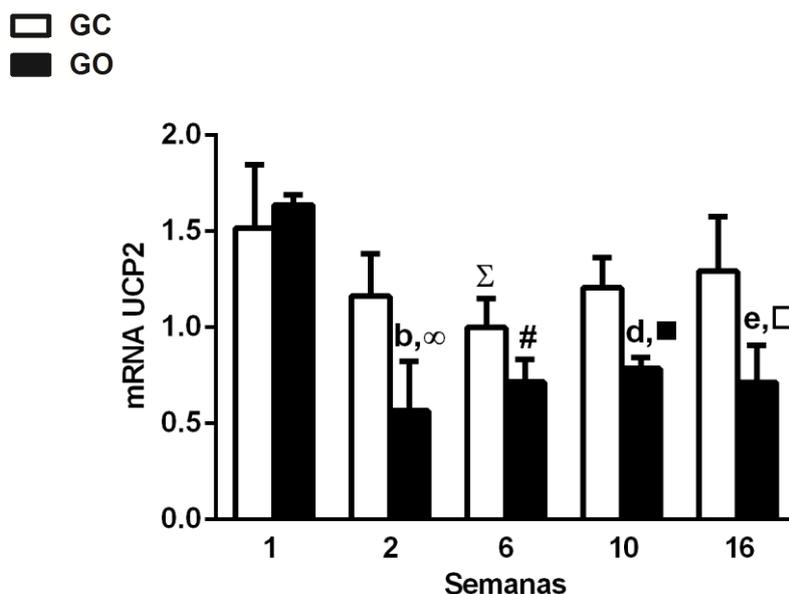


Legenda: Os valores da razão da quantificação relativa de CPT1 (mRNA) foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [a] GC vs GO 1 semana, [e] GC vs GO 16 semanas, [∞] GO 1 semana vs GO 2 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.5.2 Proteína desacopladora 2 (UCP2)

A expressão de mRNA da proteína UCP2 apresentou redução significativa no GO alimentados 2, 10 e 16 semanas (-50%, $P < 0,0001$; -33%, $P < 0,05$; -46%, $P < 0,01$, respectivamente) (Figura 26). A interação entre os fatores tipo e tempo de dieta maximizaram os resultados quanto a expressão de mRNA da UCP2 (*Two way ANOVA*, $P = 0,0028$).

Figura 26 - Expressão de mRNA da proteína UCP2 nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

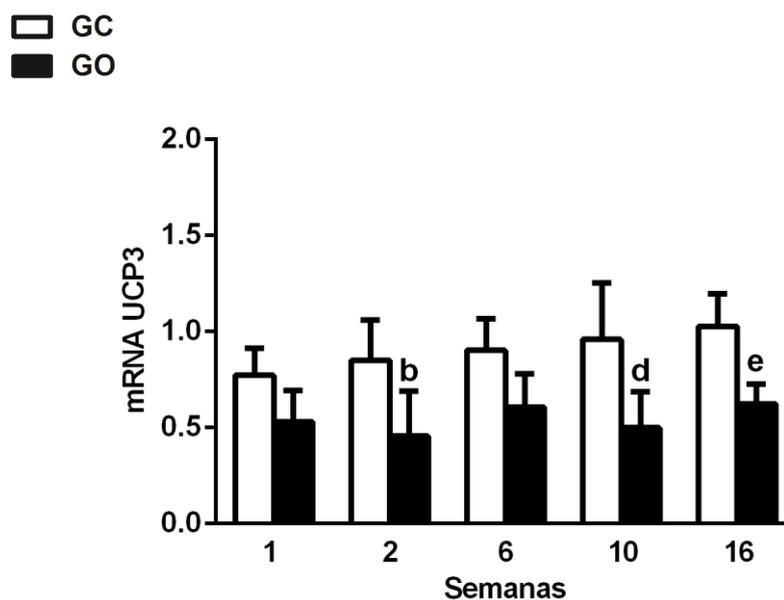


Legenda: Os valores da razão da quantificação relativa de UCP2 (mRNA) foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [b] GC vs GO 2 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [Σ] GC 1 semana vs GC 6 semanas, [∞] GO 1 semana vs GC 6 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas, [■] GO 1 semana vs GO 10 semanas, [□] GO 1 semana vs GO 16 semanas. $n = 8$ /grupo.

6.5.3 Proteína desacopladora 3 (UCP3)

A expressão de mRNA da proteína UCP3 apresentou redução significativa no GO alimentados por 2, 10 e 16 semanas (-44%, $P<0,05$; -50%, $P<0,01$; -40%, $P<0,05$, respectivamente) (Figura 27). O fator tipo de dieta interferiu independentemente sob os resultados de expressão de mRNA da UCP3 (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$).

Figura 27 - Expressão de mRNA da proteína UCP3 nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

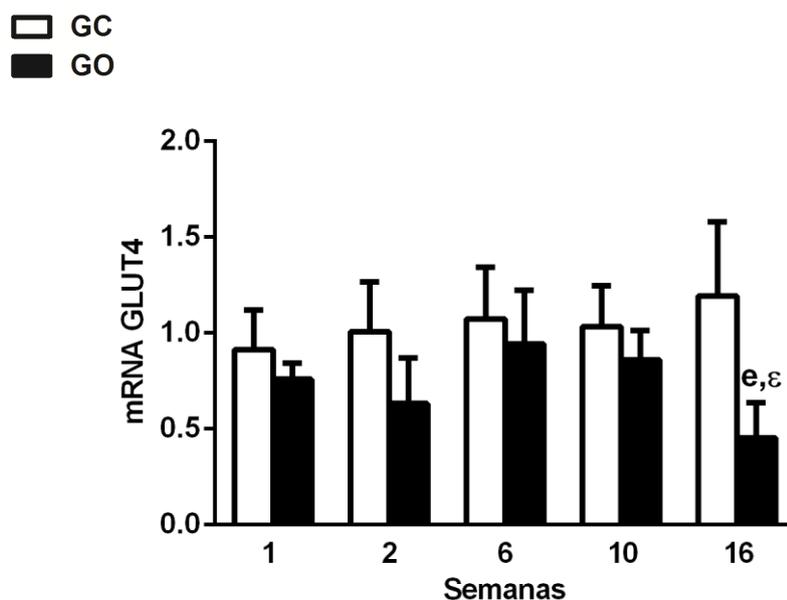


Legenda: Os valores da razão da quantificação relativa de UCP3 (mRNA) foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras indicam diferença significativa para $P<0,05$, comparando com: [b] GC vs GO 2 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.5.4 Transportador de glicose 4 (GLUT4)

Quanto à expressão de mRNA da proteína GLUT4, o GO foi significativamente reduzido apenas com 16 semanas de exposição à dieta (-58%, $P < 0,0001$) (Figura 28). Houve interação entre os fatores tipo e tempo de dieta sob a redução da expressão de mRNA de GLUT4 (*Two way ANOVA*, $P = 0,0051$).

Figura 28 - Expressão de mRNA da proteína GLUT4 nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

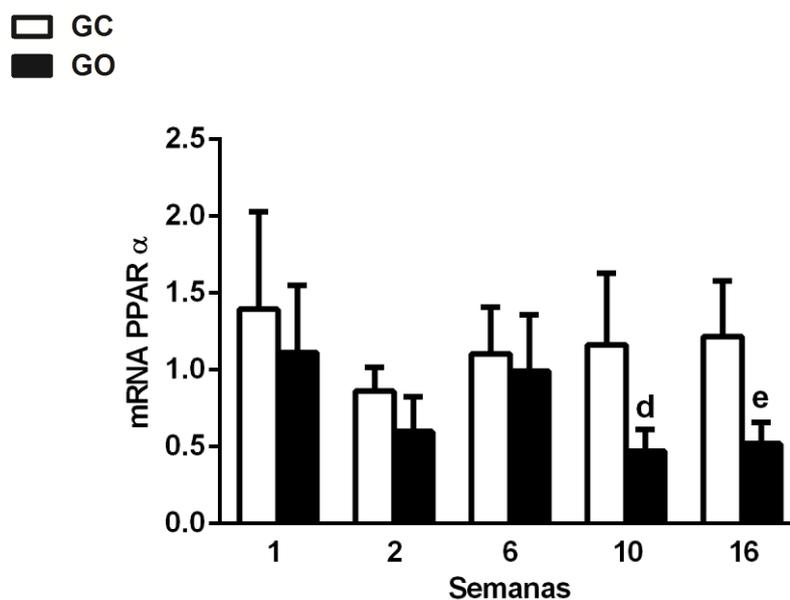


Legenda: Os valores da razão da quantificação relativa de GLUT4 (mRNA) foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [e] GC vs GO 16 semanas, [ε] GO 6 semanas vs GO 16 semanas. $n = 8$ /grupo.

6.5.5 Receptor ativado do proliferador de peroxissoma α (PPAR- α)

A expressão gênica da proteína PPAR- α foi significativamente menor no GO quando alimentados pela dieta por 10 e 16 semanas (-58%, -58%, $P < 0,05$) (Figura 29). Os fatores tipo e tempo de dieta interferiram independentemente sob os resultados de expressão de PPAR- α (*Two way ANOVA*, $P < 0,0001$ e $P = 0,0024$, respectivamente).

Figura 29 - Expressão de mRNA da proteína PPAR- α nos cardiomiócitos de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas

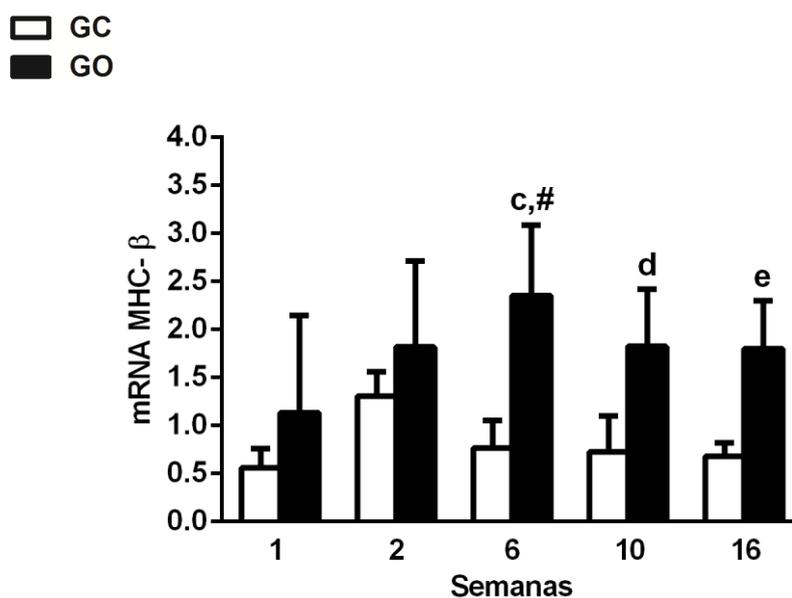


Legenda: Os valores da razão da quantificação relativa de PPAR- α (mRNA) foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras indicam diferença significativa para $P < 0,05$, comparando com: [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas. $n=8$ /grupo.

6.5.6 Miosina de cadeia pesada β (MHC- β)

A expressão de mRNA da proteína MHC- β foi significativamente maior no GO alimentados por 6, 10 e 16 semanas (+200%, $P<0,0001$; +157%, +157%, $P<0,05$) (Figura 30). Os fatores tipo e tempo de dieta interferiram independentemente sob os resultados de expressão de MHC- β (*Two way ANOVA*, $P<0,0001$ e $P=0,0066$, respectivamente).

Figura 30 - Expressão de mRNA da proteína MHC- β nos cardiomiócitos de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1, 2, 6, 10 e 16 semanas



Legenda: Os valores da razão da quantificação relativa de MHC- β (mRNA) foram representados como média \pm desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com *Two-way ANOVA* seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras indicam diferença significativa para $P<0,05$, comparando com: [c] GC vs GO 6 semanas, [d] GC vs GO 10 semanas, [e] GC vs GO 16 semanas, [#] GO 1 semana vs GO 6 semanas. n=8/grupo.

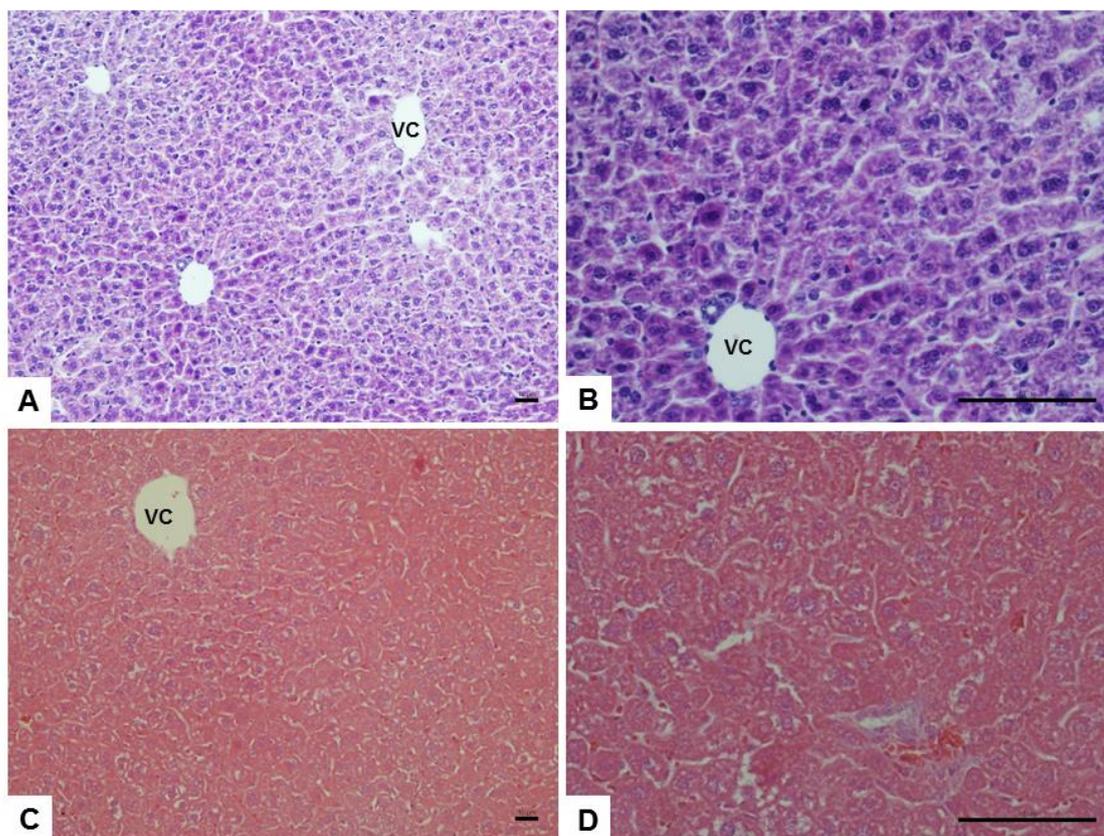
6.6 Histologia

6.6.1 Fígado

A análise histológica de seções do fígado coradas por hematoxilina e eosina, demonstrou que o fígado dos camundongos alimentados com a dieta controle nos diferentes períodos e pela dieta ocidental por 1 semana apresentaram parênquima hepático normal (Figuras 31, 32, 33, 34, 35 A e B; Figura 31 C e D). Entretanto, o fígado dos camundongos do grupo submetido à dieta ocidental apresentou-se com pequenas gotículas de gordura características de microesteatose já no período de 2 semanas (Figura 32C e D). Com 6 semanas, além da microesteatose, foi observado também a macroesteatose, caracterizada por grandes gotículas de gordura nos hepatócitos (Figura 33C e D). O aumento no período de exposição à dieta para 10 e 16 semanas contribuiu para o surgimento da macroesteatose acompanhada de infiltrado inflamatório no parênquima hepático (Figuras 34, 35 C e D).

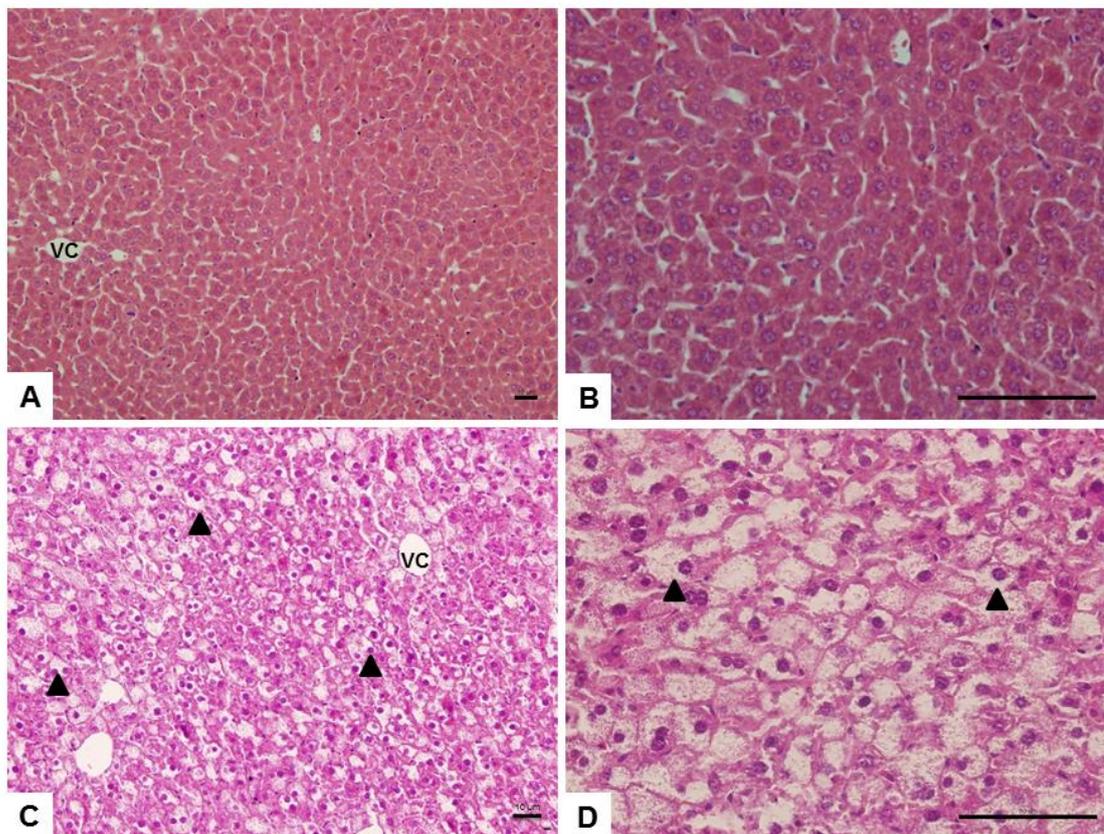
Em suma, o consumo da dieta ocidental favoreceu o acúmulo de grande quantidade de gordura nos hepatócitos e citoplasma, caracterizando esteatose hepática não-alcoólica no GO a partir do período de 2 semanas.

Figura 31 - Histologia do fígado de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 1 semana



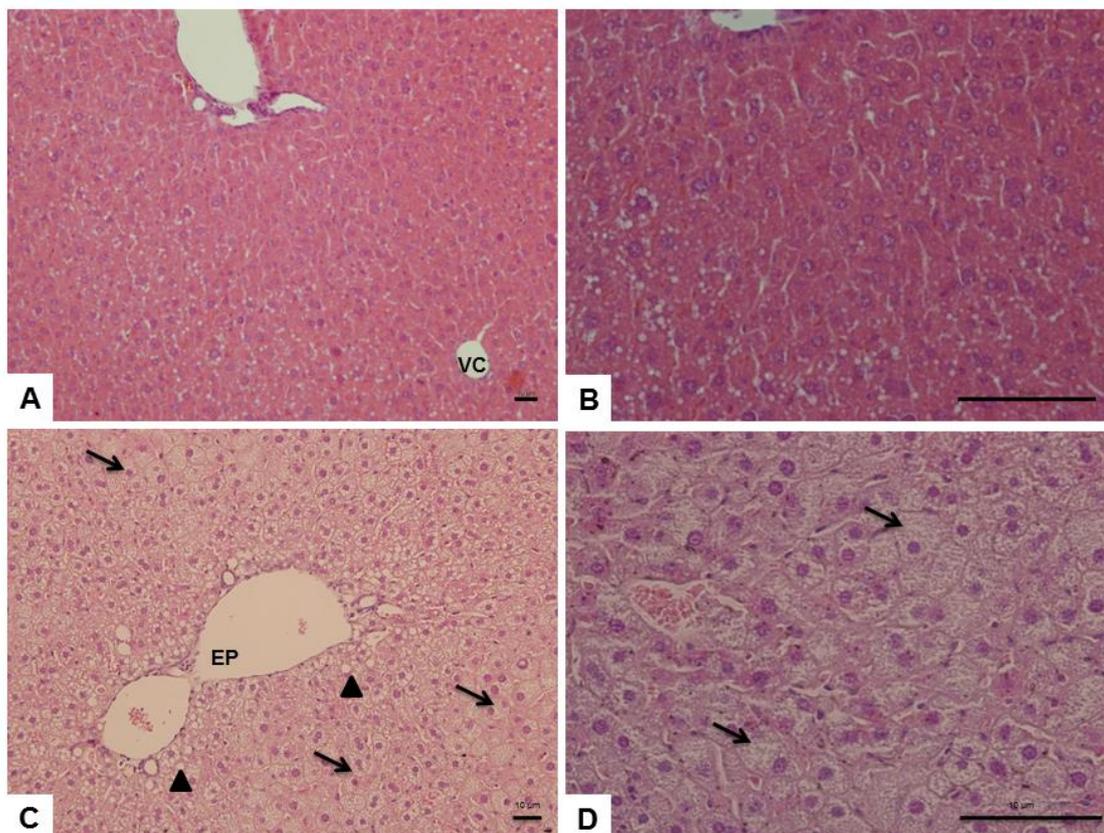
Legenda: A coloração HE mostrou a morfologia do parênquima hepático dos animais do grupo controle (A, B) e ocidental (C, D) com cordões de hepatócitos e veia centrolobular (VC) (A, B, C). Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

Figura 32 - Histologia do fígado de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 2 semanas



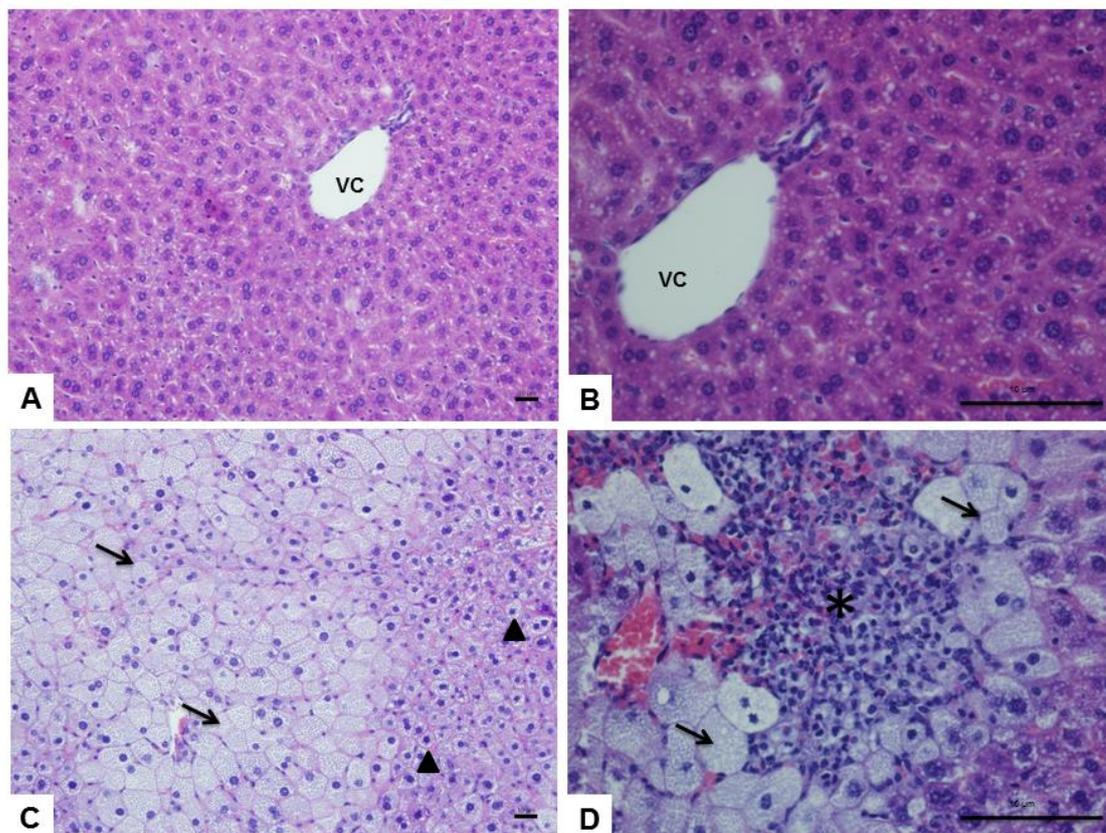
Legenda: A coloração HE mostrou a morfologia do parênquima hepático dos animais do grupo controle (A, B) e ocidental (C, D) com cordões de hepatócitos e veia centrolobular (VC) (A e C). No grupo ocidental observamos microesteatose (cabeça de seta) (C e D). Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

Figura 33 - Histologia do fígado de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 6 semanas



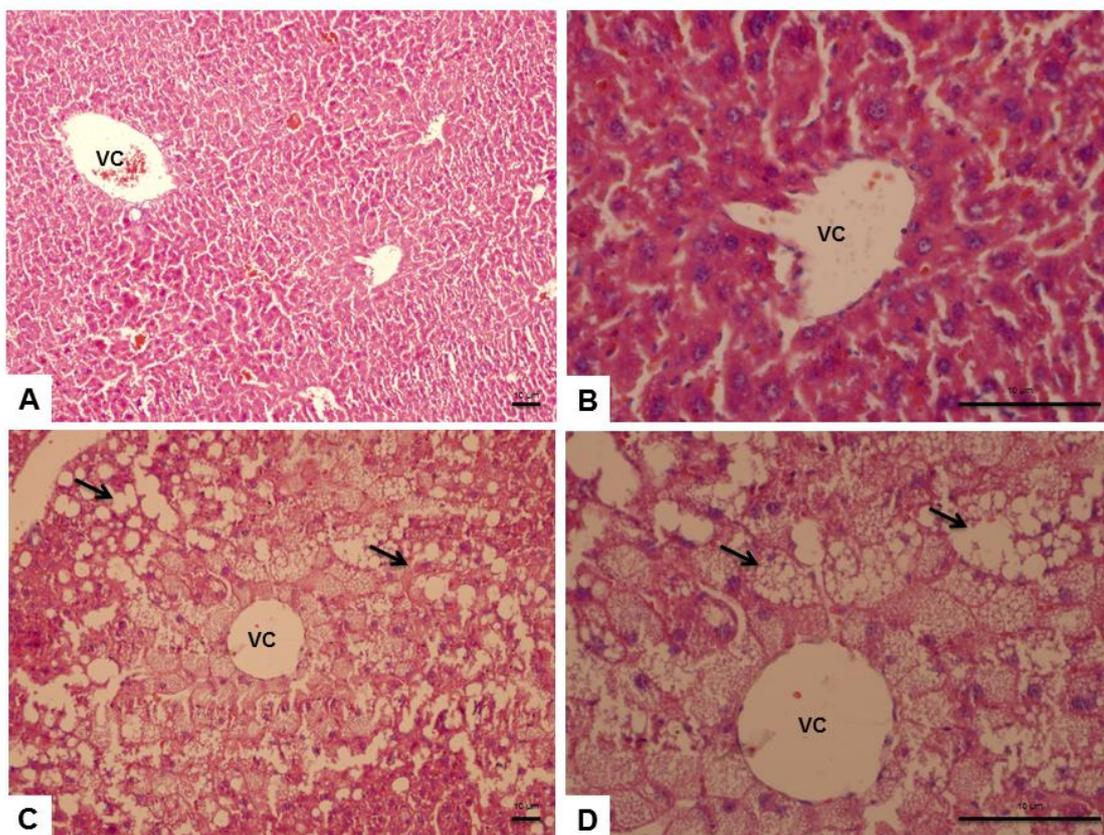
Legenda: A coloração HE mostrou a morfologia do parênquima hepático dos animais do grupo controle (A, B) e ocidental (C, D) com cordões de hepatócitos, veia centrolobular (VC) (A) e espaço porta (EP) (C). No grupo ocidental observamos microesteatose em torno do espaço porta (cabeça de seta) e esteatose (seta) (C e D). Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

Figura 34 - Histologia do fígado de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 10 semanas



Legenda: A coloração HE mostrou a morfologia do parênquima hepático dos animais do grupo controle (A, B) e ocidental (C, D) com cordões de hepatócitos e veia centrolobular (VC) (A e B). No grupo ocidental observamos microesteatose (cabeça de seta) (C), esteatose (seta) (C e D) e infiltrado inflamatório (*) (D). Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

Figura 35 - Histologia do fígado de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental por 16 semanas



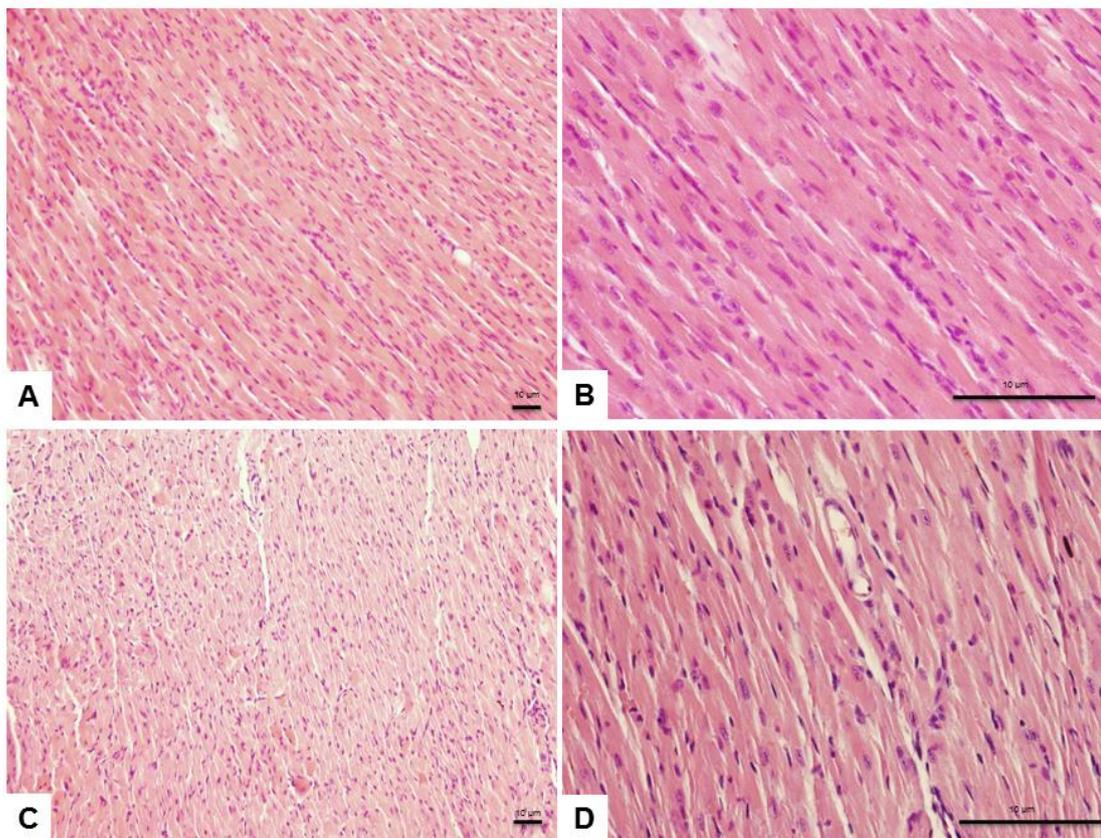
Legenda: A coloração HE mostrou a morfologia do parênquima hepático dos animais do grupo controle (A, B) e ocidental (C, D) com cordões de hepatócitos e veia centrolobular (VC) (A e B). No grupo ocidental observamos esteatose (seta) (C e D). Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

6.6.2 Coração

A análise histológica do coração coradas por hematoxilina e eosina, demonstrou que os camundongos alimentados com a dieta controle nos diferentes períodos e pela dieta ocidental por 1 semana apresentaram cardiomiócitos típicos bifurcados e com núcleo central (Figuras 36, 37, 38, 39, 40 A e B; Figura 37 C e D). Ao passo que o coração dos camundongos do grupo submetido à dieta ocidental apresentou-se com desorganização dos cardiomiócitos (37, 38, 39 e 40C e D), infiltrado inflamatório (38C e D) e fibrose (40C e D), à medida que o período de exposição à dieta foi aumentado.

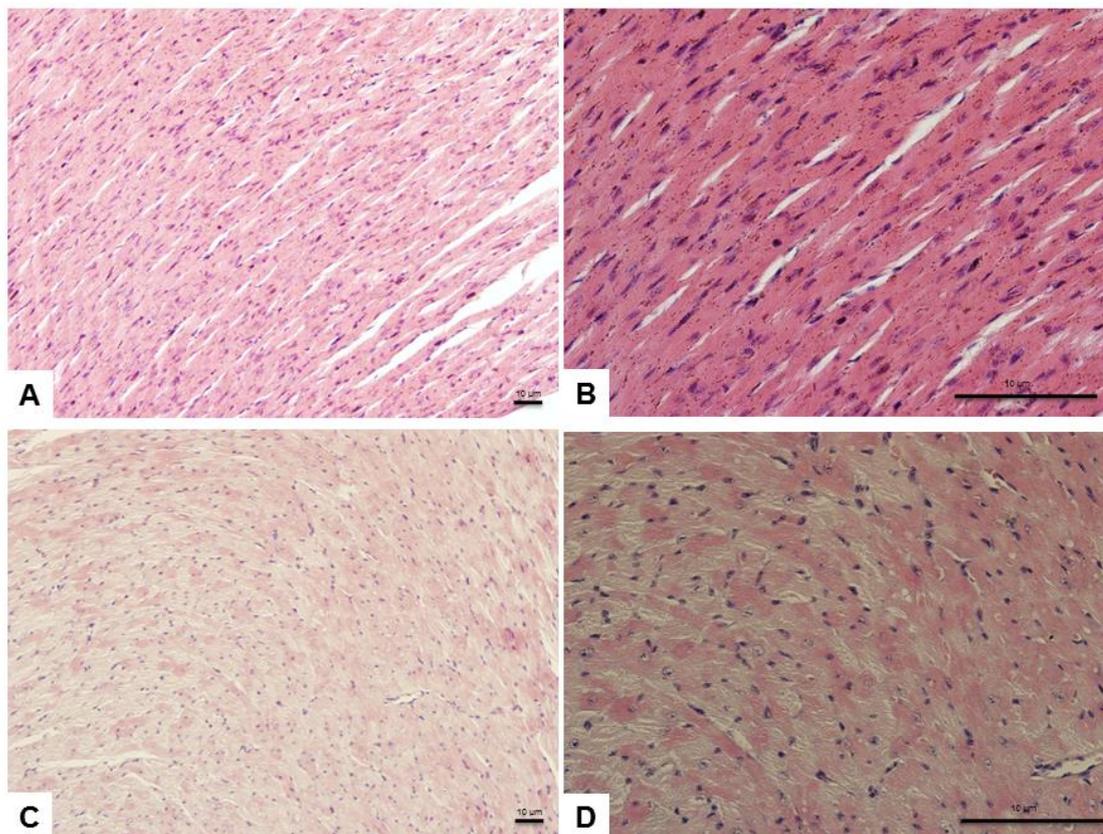
Logo, o consumo da dieta ocidental favoreceu o remodelamento cardíaco, sugestivo de hipertrofia cardíaca.

Figura 36 - Histologia do coração de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 1 semana



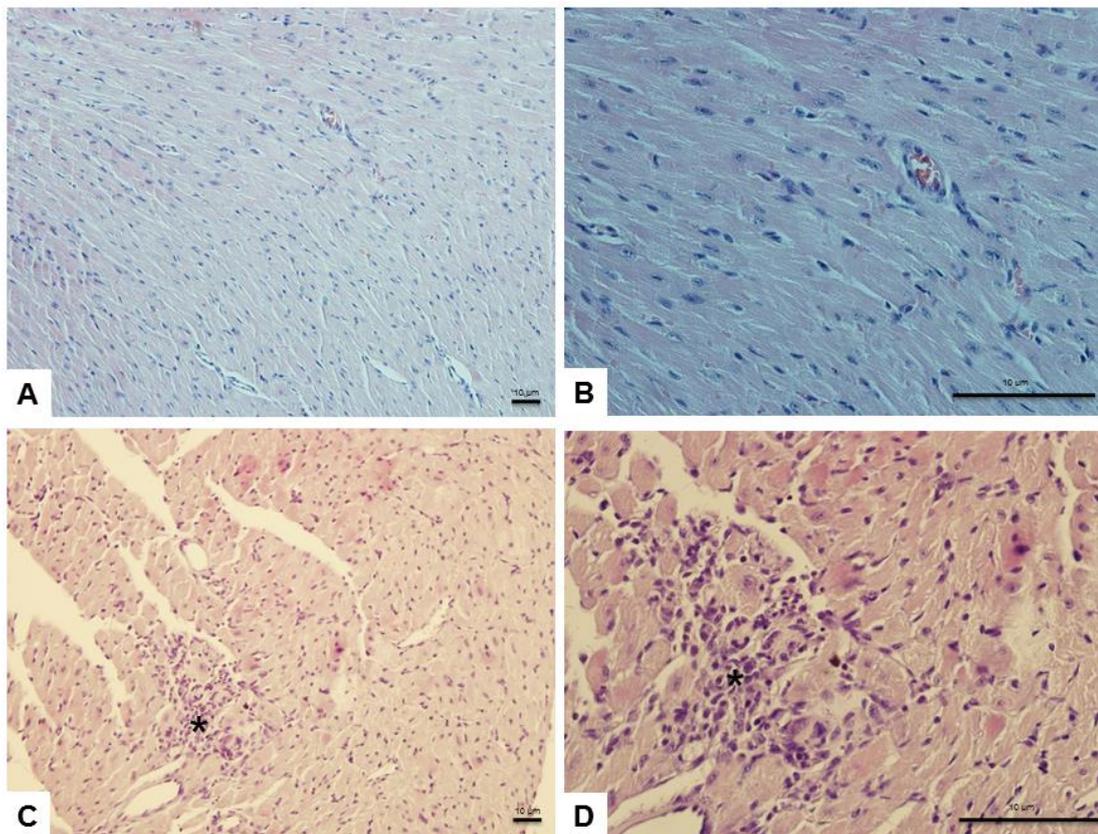
Legenda: A coloração HE demonstra a morfologia dos animais do grupo controle (A, B) e ocidental (C, D) com cardiomiócitos típicos bifurcados e com núcleo central. Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

Figura 37 - Histologia do coração de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 2 semanas



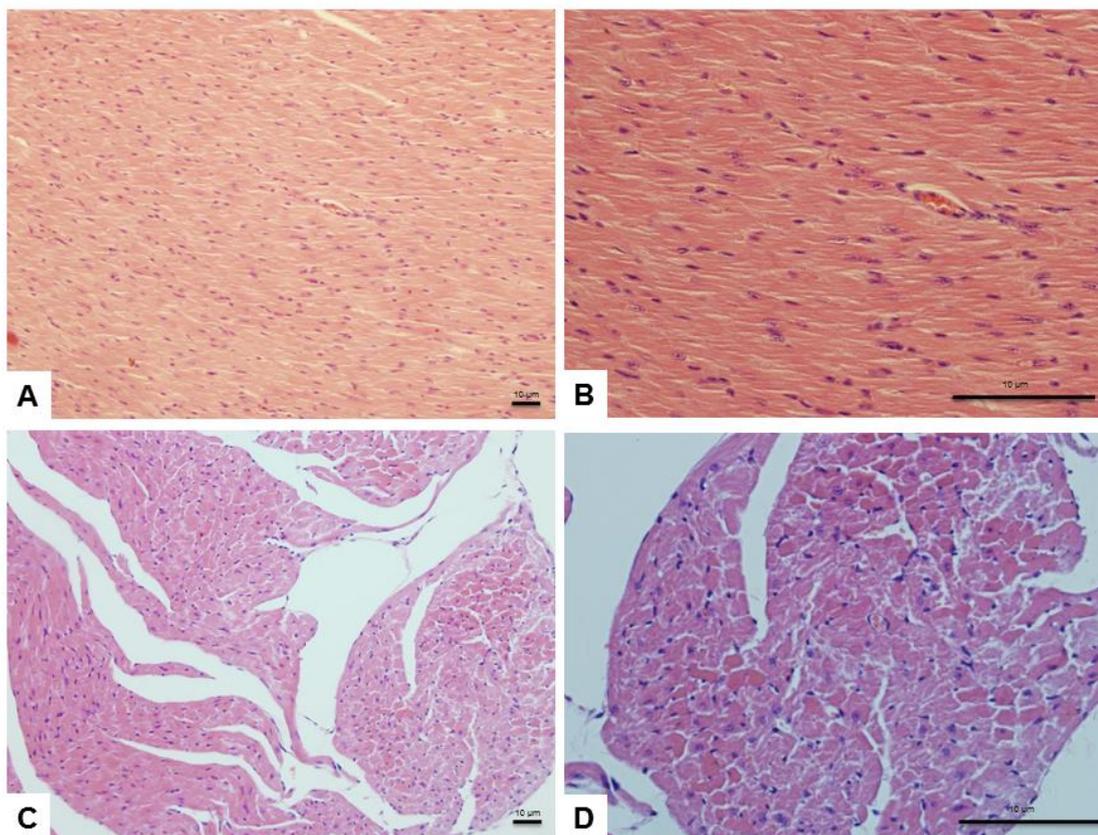
Legenda: A coloração HE demonstra a morfologia dos animais do grupo controle (A, B) com cardiomiócitos típicos bifurcados e com núcleo central. O grupo ocidental (C, D) apresentou desorganização dos cardiomiócitos. Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

Figura 38 - Histologia do coração de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 6 semanas



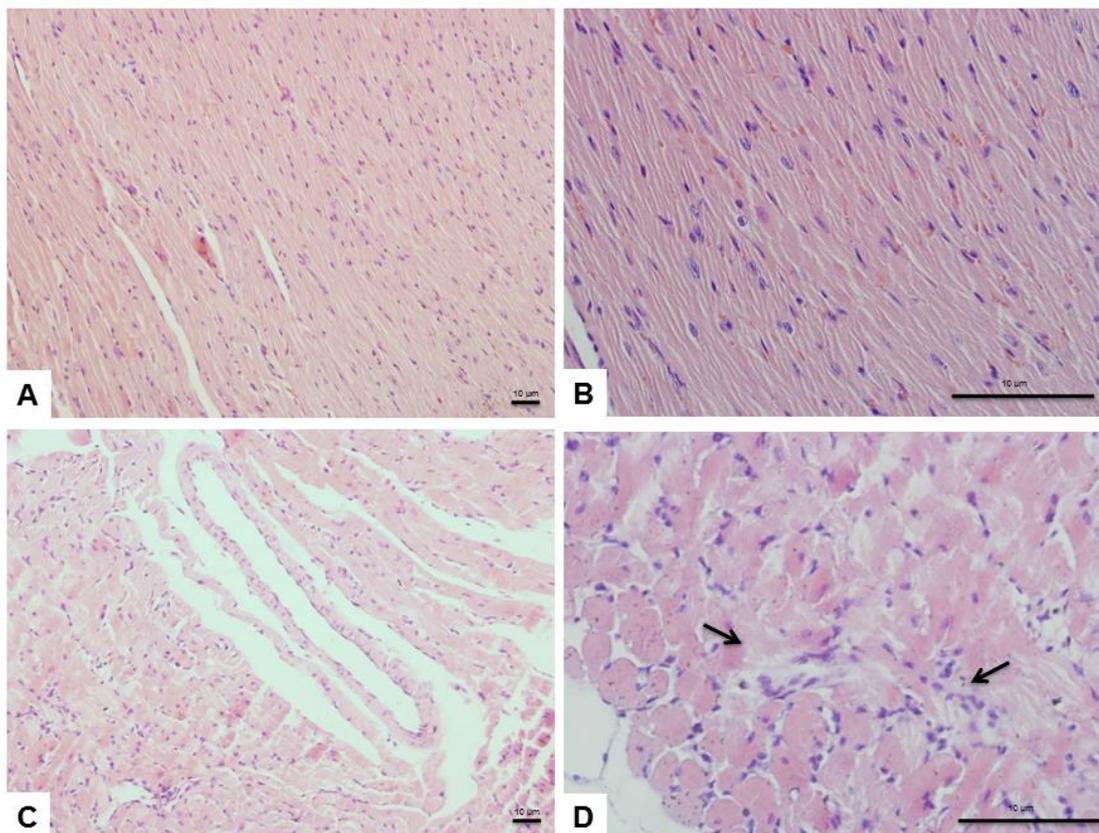
Legenda: A coloração HE demonstra a morfologia dos animais do grupo controle (A, B) com cardiomiócitos típicos bifurcados e com núcleo central. O grupo ocidental (C, D) apresentou desorganização dos cardiomiócitos e infiltrado inflamatório (*). Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

Figura 39 - Histologia do coração de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 10 semanas



Legenda: A coloração HE demonstra a morfologia dos animais do grupo controle (A, B) com cardiomiócitos típicos bifurcados e com núcleo central. O grupo ocidental (C, D) apresentou desorganização dos cardiomiócitos. Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

Figura 40 - Histologia do coração de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental por 16 semanas



Legenda: A coloração HE demonstra a morfologia dos animais do grupo controle (A, B) com cardiomiócitos típicos bifurcados e com núcleo central. O grupo ocidental (C, D) apresentou desorganização dos cardiomiócitos e evidência de fibrose (seta). Objetivas de 20x (A e C) e 40x (B e D). n=8/grupo.

7 DISCUSSÃO

Ao longo do estudo observamos que o ganho de massa corporal apresentou aumento significativo no grupo submetido à dieta ocidental por 10 e 16 semanas. Este aumento na massa corporal foi acompanhado do aumento do conteúdo de gordura retroperitoneal. Interessantemente, o conteúdo de gordura epididimal apresentou-se aumentado no GO na metade do estudo, período de 6 semanas de exposição à dieta, apesar de não haver diferença na massa corporal entre os grupos. Este aumento se manteve nos subsequentes períodos estudados (10 e 16 semanas).

Apesar dos animais GO apresentarem modificações relevantes no que diz respeito ao ganho de peso e conteúdo de gordura visceral quando alimentados por 6, 10 e 16 semanas, o índice de obesidade (índice de Lee) foi positivo somente no maior período de dieta. Resultados semelhantes a estes foram observados por Tikellis *et al.* (2008) e Neves *et al.* (2014), onde camundongos foram submetidos à mesma dieta utilizada no presente estudo, por um período de 15 e 16 semanas, resultando em aumento significativo na massa corporal.

O desenvolvimento da obesidade neste modelo experimental de dieta, como observado anteriormente pelo nosso grupo (NEVES *et al.*, 2014), se deve ao fato dos camundongos submetidos à dieta ocidental apresentarem maior consumo energético e, por isso, são considerados hiperfágicos, ou seja, independente da quantidade ingerida em gramas de ração, estes ingeriram uma quantidade calórica (Kcal) superior às suas necessidades fisiológicas. Estes dados são corroborados por outros autores (LIN *et al.*, 2000; GHIBAUDI *et al.*, 2002; WOODS *et al.*, 2003; HUANG *et al.*, 2004; GALLOU-KABANI *et al.*, 2007).

Como consequência da obesidade, observamos um aumento significativo do peso do ventrículo esquerdo (VE) e da razão entre VE/comprimento da tibia (CT) no GO somente quando alimentados com a dieta por igual ou superior período de 10 semanas, sugerindo possível hipertrofia cardíaca. Tikellis *et al.* (2008), utilizando a mesma dieta, observou em camundongos C57Bl/6 aumento da espessura da parede do VE e acúmulo de partículas lipídicas intramiocárdicas. Outros estudos com modelo de obesidade induzida por dieta ocidental observaram resultados semelhantes a estes, e concluíram que dietas ricas em gordura saturada aumentam

o espessamento do VE, caracterizando a hipertrofia dos cardiomiócitos (FANG *et al.*, 2008; JECKEL *et al.*, 2011).

Outro resultado importante no que diz respeito à hipertrofia cardíaca foi o obtido com a análise da expressão gênica da proteína MHC- β . A reexpressão de genes fetais, como o MHC- β , comprometem a função contrátil do coração com o aumento do tamanho dos cardiomiócitos, caracterizando a hipertrofia cardíaca patológica (PATRIZIO *et al.*, 2013). O grupo de animais alimentados com a dieta ocidental a partir de 6 semanas apresentaram aumento significativo quanto a expressão gênica da proteína MHC- β , sugerindo hipertrofia patológica nos cardiomiócitos desses animais. Além disso, a partir de 2 semanas foi observado desorganização e evidência de fibrose nos cardiomiócitos. Estes dados são corroborados com outros estudos relacionados ao consumo de dietas ricas em gordura saturada e açúcar simples (CHESS *et al.*, 2007; TIKELLIS *et al.*, 2008; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2013). Tais alterações miocárdicas no decorrer do tempo acarretam em modificações progressivas da geometria ventricular que contribuem de maneira significativa para a piora da função cardíaca global.

Ao avaliarmos os parâmetros referentes às alterações do fígado, observamos aumento significativo do peso do fígado no GO a partir de 10 semanas de consumo da dieta ocidental, assim como a relação positiva para esteatose hepática através da análise da relação peso do fígado/massa corporal. Quanto a análise morfológica do fígado, esta evidenciou esteatose hepática não-alcoólica a partir de 2 semanas de dieta. Estes dados são corroborados pelo estudo de Serviddio *et al.* (2011), onde o fígado de ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentaram esteatose hepática não-alcoólica com aumento do peso do fígado e, como consequência, o aumento da relação peso do fígado/massa corporal. A esteatose hepática não-alcoólica (decorrente do aumento no consumo de dietas hiperlipídicas) se constitui em fator de risco independente para aterosclerose e doenças cardiovasculares (CLARK & DIEHL, 2002; TARGHER *et al.*, 2005; HEMAGUCHI *et al.*, 2007). Em indivíduos obesos, o acúmulo ectópico de gordura também pode ser observado no tecido muscular cardíaco, onde o excesso de lipídios nocivos aos cardiomiócitos resultam na lipotoxicidade cardíaca (ZHOU *et al.*, 2000), que pode ser decorrente do descompasso entre a captação e utilização de ácidos graxos durante o processo de adaptação sob condições fisiológicas ou patológicas (THAKKER *et al.*, 2008; HARMANCEY *et al.*, 2010). Tais alterações do metabolismo cardíaco podem

contribuir para o desenvolvimento e a progressão da insuficiência cardíaca (THAKKER *et al.*, 2008).

No presente estudo, os camundongos submetidos à dieta ocidental apresentaram hiperglicemia de jejum e aumento do índice HOMA-IR (a partir de 2 semanas de dieta), hiperinsulinemia (10 e 16 semanas de dieta), com conteúdo intramiocárdico de GLUT1, GLUT4 e IR β normais nos diferentes tempos de exposição à dieta, expressão gênica de GLUT4 reduzida (16 semanas) e diminuição do conteúdo de IRS-1 (à partir de 2 semanas) e PI3K (à partir de 6 semanas). Como descrito na literatura, os efeitos benéficos da insulina no coração são mediados pela via de sinalização IRS-1/PI3K/Akt, que promove a captação de glicose no miocárdio, mediado pelo fluxo sanguíneo de óxido nítrico, e relaxamento diastólico. Por conseguinte, a interação entre as ações metabólicas e hemodinâmicas ocorrem como resultado da sinalização metabólica da insulina no coração (TREMBLAY *et al.*, 2005; ZHOU *et al.*, 2010; STEINBUSCH *et al.*, 2011). Além disso, a ativação da via IRS-1/PI3K é necessária para a fosforilação e ativação da serina/treonina quinase Akt, que se transloca para as mitocôndrias, em resposta à insulina (BIJUR *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2009). Recentemente, nós observamos no mesmo modelo experimental, menor conteúdo de IRS-1 associado a menor translocação do GLUT4 nos animais submetidos à dieta ocidental após 16 semanas após a indução da obesidade por dieta, que por sua vez contribuiu para o desenvolvimento da resistência à insulina (NEVES *et al.*, 2014).

Com base nestes achados, realizamos a avaliação da translocação de GLUT4 para captação de glicose através da análise dos conteúdos das frações citosólica e de membrana deste transportador. Observamos menor conteúdo de GLUT4 da fração de membrana no GO a partir de 6 semanas de exposição à dieta, ao passo que não houve diferença na fração citosólica em todos os períodos estudados, corroborando nossos dados referentes à resistência a insulina e ao nosso trabalho publicado anteriormente (NEVES *et al.*, 2014).

Além da avaliação da glicemia e insulinemia de jejum e do HOMA-IR, submetemos os camundongos alimentados pelas dietas controle e ocidental em todos os períodos estudados ao teste intraperitoneal de tolerância à glicose. Através da área sob a curva obtida, observamos menor tolerância à glicose a partir de 6 semanas de dieta ocidental no GO. Este resultado é corroborado por outros estudos

relacionados ao consumo de dietas ricas em gordura saturada (NEVES *et al.*, 2014; HWANG, J. S. *et al.*, 2015; JANSSENS *et al.*, 2015).

Estes dados nos permitem dizer que o consumo de dieta ocidental no presente estudo favoreceu o desenvolvimento da resistência à insulina no coração, visto que foram observados nos animais submetidos à dieta ocidental alteração da via de sinalização de insulina, com menor conteúdo de IRS-1, PI3K, reduzida translocação do GLUT4 apesar do receptor de insulina não ter sofrido alteração do seu conteúdo (ERION & SCHULMAN, 2010).

A resistência à insulina é consequência da deposição ectópica de gordura crônica (SEPPALA-LINDROOS *et al.*, 2002), caracterizada pela redução da utilização de glicose com aumento da gliconeogênese hepática e hiperglicemia (BAYS *et al.*, 2004). De acordo com Lichtenstein & Schwab (2000) e Riccardi *et al.* (2004), independente da obesidade, uma alimentação rica em gordura contribui para intolerância à glicose e redução da sensibilidade à insulina, sendo o consumo de dietas ricas em ácidos graxos saturados o fator com maior relação com a resistência à insulina do que o consumo de dietas compostas com os demais tipos de ácidos graxos (CLARKE, 2000; LICHTENSTEIN & SCHWAB, 2000; STORLIEN *et al.*, 2000; RICCARDI *et al.*, 2004). Outros estudos com dietas ricas em gordura demonstraram que estas conduzem ao acúmulo intramuscular de lipídios, resultando em absorção reduzida de glicose e resistência à insulina (BONNARD *et al.*, 2008; HANCOCK *et al.*, 2008; HOLLOSZY, 2009; VAN DEN BROEK *et al.*, 2010). Sadler *et al.* (2012) evidenciou em ratos submetidos a uma dieta rica em gordura por 2 semanas, disfunção mitocondrial e resistência à insulina em músculo esquelético como reportado no presente estudo e por Sparks *et al.* (2005).

Evidências experimentais sugerem que as vias de transdução do sinal de insulina são também importantes para a função mitocondrial e que a resistência à insulina tem um impacto negativo sobre as mitocôndrias (YANG *et al.*, 2012).

Para avaliar a bioenergética cardíaca, o conteúdo de AMPK e pAMPK foi mensurado. A AMPK atua na regulação metabólica durante períodos de estresse, regulando o metabolismo energético e síntese protéica visando proteger a função cardiovascular. Uma vez ativada pela diminuição de ATP, a AMPK é capaz de fosforilar e desfosforilar enzimas-chave do metabolismo energético do coração. Sendo assim, a AMPK desempenha um papel fundamental na coordenação de vias anabólicas e catabólicas do coração (HEIDRICH *et al.*, 2010). O conteúdo de AMPK

apresentou-se sem diferença significativa entre os grupos estudados com aumento do conteúdo de pAMPK, sua forma ativada, somente com 10 semanas de ingestão da dieta ocidental. Ao avaliarmos a razão pAMPK/AMPK, observamos aumento significativo no GO com 10 semanas de dieta. Esse aumento de atividade da AMPK provavelmente está relacionado ao déficit energético gerado pela disfunção mitocondrial observada.

Alguns estudos descrevem que o metabolismo energético celular na obesidade está comprometido e a maioria dos distúrbios identificados na produção e utilização de energia convergem na mitocôndria (ROGGE, 2009). O estudo realizado por Sharov *et al.* (2000), demonstrou que a insuficiência cardíaca está associada com anormalidades morfológicas e funcionais das mitocôndrias, como hiperplasia, redução do tamanho das organelas e comprometimento da integridade estrutural. Embora a etiologia das doenças cardiovasculares seja multifatorial, muitas das alterações estão, direta ou indiretamente, associadas com a disfunção mitocondrial (menor atividade dos complexos, menor oxidação e alterações do metabolismo mitocondrial) nos cardiomiócitos (SHAROV *et al.*, 2000; BOUDINA *et al.*, 2009; CHEN & KNOWLTON, 2010). A oferta em excesso de nutrientes, particularmente de ácidos graxos, pode induzir alterações na atividade mitocondrial, desempenhando um papel importante na disfunção mitocondrial. Por exemplo, no estudo de Didier *et al.* (2007), animais alimentados com dieta rica em gordura por alguns dias foi suficiente para reduzir rapidamente a síntese de ATP mitocondrial.

Corroborando com os estudos supracitados, observamos nos animais submetidos à dieta ocidental redução da oxidação mitocondrial cardíaca, sugestivo de disfunção mitocondrial, quando alimentados por 1, 2, 10 e 16 semanas. Interessantemente, a disfunção mitocondrial relacionada à redução da oxidação de carboidratos surgiu inicialmente nos animais GO antes do estabelecimento da obesidade, em apenas 1 semana de consumo da dieta, sem alterar o conteúdo cardíaco de ATP, provavelmente por não apresentar modificação da oxidação de ácidos graxos, via preferencial de oxidação para produção de ATP no coração (RUSSELL *et al.*, 2005). Com 2 semanas de dieta os animais apresentaram redução da oxidação de ácidos graxos, sem diferença significativa na oxidação de carboidratos, quando comparados aos controles. A redução da oxidação de ácidos graxos foi acompanhada do menor acoplamento mitocondrial entre a fosforilação oxidativa e a produção de ATP, caracterizado pela dissipação de energia sob a

forma de calor através de proteínas desacopladoras (UCPs). Ou seja, o gradiente de prótons formado no espaço intermembranas não está sendo utilizado para produção de ATP. Fato este confirmado pelo menor conteúdo cardíaco de ATP observado no GO também neste período. A partir de 10 semanas de exposição à dieta os camundongos GO apresentaram disfunção mitocondrial relacionada à redução tanto da oxidação de carboidratos quanto da oxidação de ácidos graxos, assim como menor acoplamento mitocondrial e conteúdo de ATP cardíaco. Neves *et al.* (2014) também demonstrou redução da oxidação de ambos os substratos após 16 semanas de dieta ocidental.

As alterações na oxidação mitocondrial de ácidos graxos foram acompanhadas por modificações no que diz respeito ao conteúdo do transportador de ácido graxo FABPpm e CD36. O FABPpm foi aumentado no GO alimentado por 2 semanas, talvez numa tentativa de suprir o déficit inicial na oxidação de gorduras, e reduzido a partir de 10 semanas, onde houve o estabelecimento da disfunção mitocondrial para ácidos graxos. Já o transportador CD36 foi reduzido somente após 16 semanas de dieta ocidental, sugerindo contínua captação e deposição de ácidos graxos no miocárdio. Em modelos experimentais de obesidade e resistência à insulina, assim como em estudos em humanos, foi demonstrado a contínua translocação do CD36 para o sarcolema levando ao aumento na captação de ácidos graxos e conseqüentemente no maior acúmulo de gordura intramiocárdica (COORT *et al.*, 2004; CHABOWSKI *et al.*, 2006; CARLEY *et al.*, 2007; OUWENS *et al.*, 2007; AGUER *et al.*, 2010). Não sendo mais atribuída somente a redução na oxidação mitocondrial de ácidos graxos para a deposição ectópica de gordura no coração (SCHWENK *et al.*, 2008).

A regulação da captação e utilização de ácidos graxos em cardiomiócitos é realizada pelo PPAR- α . O descompasso entre a captação e utilização de ácidos graxos resulta no acúmulo ectópico de triglicérides nos cardiomiócitos (esteatose cardíaca) (GLENN *et al.*, 2015; WEI *et al.*, 2016). No presente estudo, os camundongos alimentados com a dieta ocidental a partir de 10 semanas apresentaram tanto a redução na expressão gênica da proteína PPAR- α quanto o aumento sérico de triglicérides.

Crescenzo *et al.* (2015a), relatou em ratos Sprague-Dawley alimentados com uma dieta rica em gordura saturada por 2 semanas, aumento significativo do colesterol total e redução da oxidação tanto de carboidratos quanto de ácidos

graxos. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo, visto que observamos aumento do colesterol total com 2, 10 e 16 semanas de dieta ocidental, assim como redução na oxidação de ácidos graxos nos mesmos períodos.

Apesar da reduzida capacidade de oxidação de ácidos graxos observada na respirometria de alta resolução, encontramos conteúdo aumentado de CPT1 no GO submetido à dieta por 2 semanas. Entretanto, observamos aumento na expressão gênica da proteína CPT1 com 1 semana e redução com 16 semanas de dieta. No trabalho de Serviddio *et al.* (2011), os autores observaram aumento da expressão de CPT1 e sugeriram que isto poderia ocorrer no fígado durante o início da esteatose hepática para neutralizar o nível elevado de ácidos graxos como descrito anteriormente por Rizki *et al.* (2006), e que outras modificações pós-transcricionais poderiam reverter este efeito. A redução da sensibilidade da CPT1 em relação à malonil-CoA, juntamente com a inibição da atividade e expressão da ACC, suportam a ideia de que um mecanismo compensatório ocorre através da regulação do sistema ACC/malonil-CoA /CPT1, sugerido anteriormente por Merrill *et al.* (1998), acionado na primeira fase da esteatose hepática não-alcoólica, quando o fígado ainda apresenta esteatose, facilitando a oxidação de ácidos graxos (SERVIDDIO *et al.*, 2011).

A análise do conteúdo da proteína desacopladora UCP2 apresentou-se semelhante entre os grupos estudados. Já a expressão gênica da proteína UCP2 e UCP3 estavam reduzidas no GO alimentados por 2, 10 e 16 semanas. Yang *et al.* (2012) demonstrou que a estimulação crônica dos miócitos *in vitro* com insulina diminuiu a expressão de UCP2 e UCP3, sendo esta uma correlação negativa a resistência à insulina.

As UCPs são de grande importância para prevenir a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidas como subprodutos pela cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias. Assim, a diminuição na expressão das UCPs reflete no aumento da geração de EROs mitocondriais, característico do estresse oxidativo, como observado no estudo de Maclellan *et al.* (2005).

Outros estudos realizados em mitocôndrias isoladas de músculo esquelético tratadas com NEFA (ácidos graxos não esterificados) observaram que ácidos graxos de cadeia longa (>12 átomos de carbono) aumentam a produção de EROs (ASH & MERRY, 2011). Alguns estudos *in vivo* realizados em ratos e em humanos também

têm demonstrado maior produção de EROs no músculo esquelético após uma dieta rica em gordura (BONNARD *et al.*, 2008; LEFORT *et al.*, 2010).

Como já foi descrito, o coativador 1 do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1) é uma família de coativadores transcricionais que surgiram como reguladores centrais do metabolismo (AUSTIN & ST-PIERRE, 2012). Existem 3 isoformas da família PGC1: PGC-1 α , PGC-1 β e o PRC (PGC coativador relacionado), que interage com fatores de transcrição e os receptores nucleares para exercer as suas funções biológicas (HANDSCHIN & SPIEGELMAN, 2006). A isoforma mais conhecida e estudada é o PGC-1 α , que exerce uma regulação positiva da biogênese e a respiração mitocondrial, termogênese adaptativa, a gliconeogênese, bem como muitos outros processos metabólicos (HANDSCHIN & SPIEGELMAN, 2006). A expressão de PGC-1 α é altamente induzida por estímulos fisiológicos, incluindo o exercício, frio e jejum (HANDSCHIN & SPIEGELMAN, 2006). Resumindo, o PGC-1 α é um elo crítico no controle entre a oxidação de ácidos graxos via mitocôndria e todas as funções mitocondriais (LEHMAN & KELLY, 2002). No presente estudo, esta proteína foi significativamente reduzida nos camundongos do GO somente quando submetidos à dieta por 16 semanas, indicando menor expressão gênica de enzimas da oxidação de ácidos graxos e reduzida biogênese mitocondrial nos cardiomiócitos, com base em estudos anteriores (LEHMAN *et al.*, 2000, LEHMAN & KELLY, 2002; NEVES *et al.*, 2014). Esta redução é comum no coração hipertrofiado (BARGER *et al.*, 2000; LEHMAN & KELLY, 2002). À luz do exposto, sugerimos que, apesar da disfunção mitocondrial ter sido observada desde o início do estudo, a redução da biogênese mitocondrial se deu somente no período de 16 semanas de dieta, onde os animais GO apresentaram relação positiva de hipertrofia cardíaca e aumento da expressão gênica de MHC- β que está diretamente relacionado com a hipertrofia patológica.

Assim, a redução na expressão gênica de proteínas envolvidas na fosforilação oxidativa e biogênese mitocondrial se deve ao consumo da dieta ocidental, rica em gordura saturada, como observado por Sparks *et al.* (2005). Além disso, indivíduos resistentes à insulina apresentam reduzida expressão de genes mitocondriais e menor expressão de subunidades de proteínas da cadeia respiratória (MOOTHA *et al.*, 2003; PATTI *et al.*, 2003; MORINO *et al.*, 2005; HEILBRONN *et al.*, 2007; HWANG *et al.*, 2010), reduzido DNA mitocondrial, reduzida atividade oxidativa de enzimas mitocondriais (HEILBRONN *et al.*, 2007) e

diminuição no tamanho e densidade das mitocôndrias (KELLEY *et al.*, 2002; MORINO *et al.*, 2005; RITOV *et al.*, 2005; HEILBRONN *et al.*, 2007). Entretanto, não observamos alterações nos conteúdos proteicos dos cinco complexos multienzimáticos do sistema de transporte de elétrons mitocondrial. No estudo de Rosca *et al.* (2008), também não foi observado modificações no conteúdo proteico dos complexos respiratórios em modelo de insuficiência cardíaca.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, podemos inferir que a disfunção mitocondrial cardíaca é um processo anterior ao estabelecimento da obesidade durante o consumo da dieta ocidental. Os eventos relacionados aos processos de acúmulo ectópico de gordura e resistência à insulina são consolidados na medida em que se aumenta o período de consumo da dieta ocidental, favorecendo o estabelecimento da obesidade como tal. Concomitantemente, ocorrem modificações no que diz respeito ao remodelamento e hipertrofia cardíaca patológica. Em longo prazo, menor oxidação e alterações no metabolismo mitocondrial cardíaco, sugerindo disfunção mitocondrial, são estabelecidos comprometendo assim o metabolismo energético e a eficiência cardíaca global.

REFERÊNCIAS

- ABEL, E. D. Obesity Stresses Cardiac Mitochondria Even When You Are Young. *J Am Coll Cardiol*. v. 57, n. 5, p. 586-589, Feb. 2011.
- ABU-ELHEIGA, L. *et al.* Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science*. v. 291, n. 5513 p. 2613-2616, 2001.
- AGUER, C. *et al.* Intramyocellular lipid accumulation is associated with permanent relocation ex vivo and in vitro of fatty acid translocase (FAT)/CD36 in obese patients. *Diabetologia*. v. 53, n. 6, p. 1151-1163, Jun. 2010.
- AHIMA, R. S.; OSEI, S. Y. Molecular regulation of eating behavior: new insights and prospects for therapeutic strategies. *Trends Mol Med*. v. 7, n.5, p. 205-213, 2001.
- ALLARD, M. F. Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr Hypertens Rep*. v. 6, n. 6, p. 430-435, Dec. 2004.
- ALTMAN, J. Weight in the balance. *Neuroendocrinology*. v. 76, n. 3, p.131-136, 2002.
- ASH, C. E.; MERRY, B. The molecular basis by which dietary restricted feeding reduces mitochondrial reactive oxygen species generation. *Mech Ageing Dev*. v. 132, p. 43-54, 2011.
- ASSAAD, H. *et al.* Analysis of energy expenditure in diet-induced obese rats. *Front Biosci (Landmark Ed)*. v. 1, n. 19, p. 967-985. Jun. 2014.
- ATELLA, V. *et al.* Excess body weight increases the burden of age-associated chronic diseases and their associated health care expenditures. *Aging*. v. 7, n. 10, p. 882-892, 2015.
- AUGUSTUS, A.S. *et al.* Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 284, p. E331-E339, 2003.
- AUSTIN, S.; ST-PIERRE, J. PGC1 α and mitochondrial metabolism—emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci*. v. 125, n. 21, p. 4963-4971, 2012.
- BAGNOL, D. *et al.* Diet-induced models of obesity (DIO) in rodents. *Curr Protoc Neurosci*. v. 9, n. 9.38, p. 1-13, Apr. 2012.
- BARGER, P. M. *et al.* Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor- α during cardiac hypertrophic growth. *J Clin Invest*. v. 105, p. 1723-1730, 2000.
- BAYNE, K. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. American Physiological Society. *Physiologist*. v. 39, n. 4, p. 208-211, Aug. 1996.

- BAYS, H.; Mandarino, L.; DEFRONZO, R. A. Role of the adipocyte, free fatty acids, and ectopic fat in pathogenesis of type 2 diabetes mellitus: Peroxisome proliferator-activated receptor agonists provide a rational therapeutic approach. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 89, p. 463-478, 2004.
- BERARDO, A. *et al.* Cardiological manifestations of mitochondrial respiratory chain disorders. *Acta Myol.* v. 30, n. 1, p. 9-15, Jun. 2011.
- BEZERRA, I.N. *et al.* Away-from-home eating: nutritional status and dietary intake among Brazilian adults. *Public Health Nutr.* v. 18, n. 6, p. 1011-1017, Apr. 2015.
- BIJUR, G.; JOPE, R. Rapid accumulation of Akt in mitochondria following phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Neurochem.* v. 87, p. 1427-1435, 2003.
- BILAN P. J. *et al.* Acute and long-term effects of insulin-like growth factor I on glucose transporters in muscle cells. Translocation and biosynthesis. *FEBS Lett.* v. 298, p. 285-290, Fev. 1992.
- BONNARD, C. *et al.* Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J Clin Invest.* v. 118, p. 789-800, 2008.
- BOUDINA, S. *et al.* Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the heart. *Circulation.* v. 119, n. 9, p. 1272-1283, Mar. 2009.
- BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation.* v. 115, p. 3213-3223, 2007.
- BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord.* v. 11, p. 31-39. 2010.
- BOWKER-KINLEY, M. M. *et al.* Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochem J.* v. 1, n. 329, p. 191-196, Jan. 1998.
- BRADLEY, H. *et al.* Visualization and quantitation of GLUT4 translocation in human skeletal muscle following glucose ingestion and exercise. *Physiol Rep.* v. 3, n. 5, p. 1-11, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2012: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.
- BRUCE, A. *et al.* Conversão de energia: Mitocondrial. In: BRUCE, A. *et al.* Biologia molecular da célula. 5ªed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 14, p. 653-684.

BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. Highfat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*. v. 15, p. 798-808, 2007.

BUGGER, H.; ABEL, E. D. Molecular mechanisms for myocardial mitochondrial dysfunction in the metabolic syndrome. *Clin Sci (Lond)*. v. 114, p. 195-210, 2008.

CARDOSO, A. R.; QUELICONI, B. B.; KOWALTOWSKI, A. J. Mitochondrial ion transport pathways: role in metabolic diseases. *Biochim Biophys Acta*. v.1797, n. 6-7, p. 832-838, Jun-Jul. 2010.

CARLEY, A. N. *et al.* Mechanisms responsible for enhanced fatty acid utilization by perfused hearts from type 2 diabetic db/db mice. *Arch Physiol Biochem*. v. 113, n. 2, p. 65-75, Apr. 2007.

CARUSO, M. *et al.* Activation and mitochondrial translocation of protein kinase Cdelta are necessary for insulin stimulation of pyruvate dehydrogenase complex activity in muscle and liver cells. *J Biol Chem*. v. 276, p. 45088-45097, 2001.

CASAS-AGUSTENCH, P. *et al.* Acute effects of three high-fat meals with different fat saturations on energy expenditure, substrate oxidation and satiety. *Clin Nutr*. v. 28, p. 39-45, 2009.

CHABOWSKI, A. *et al.* Fatty acid transport and FAT/CD36 are increased in red but not in white skeletal muscle of ZDF rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 291, n. 3, p. E675-E682, Sep. 2006.

CHEN, L.; KNOWLTON, A. A. Mitochondria and heart failure: new insights into an energetic problem. *Minerva Cardioangiol*. v. 58, n. 2, p. 213-229, Apr. 2010.

CHESS, D. J. *et al.* Deleterious effects of sugar and protective effects of starch on cardiac remodeling, contractile dysfunction, and mortality in response to pressure overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v. 293, n. 3, p. H1853-H1860, Sep. 2007.

CLARK, J. M.; DIEHL, A. M. Hepatic steatosis and Type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab. Rep*. v. 2, p. 210-215, 2002.

CLARKE, B.; WYATT, K. M.; MCCORMACK, J. G. Ranolazine increases active pyruvate dehydrogenase in perfused normoxic rat hearts: evidence for an indirect mechanism. *J Mol Cell Cardiol*. v. 28, p. 341-350, 1996.

CLARKE, S. D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br J Nutr*. v. 83, p. S59-S66, 2000.

COORT, S. L. *et al.* Cardiac substrate uptake and metabolism in obesity and type-2 diabetes: Role of sarcolemmal substrate transporters. *Mol and Cell Biochem*. v. 299, p. 5-18, 2007.

- COORT, S.L. *et al.* Enhanced sarcolemmal FAT/CD36 content and triacylglycerol storage in cardiac myocytes from obese Zucker rats. *Diabetes*. v. 53, n. 7, p. 1655-1663, Jul. 2004.
- COVEN, D. L. *et al.* Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 285, p. E629-E636, 2003.
- CRESCENZO, R. *et al.* A possible link between hepatic mitochondrial dysfunction and diet-induced insulin resistance. *Eur J Nutr*. 2015. [Epub ahead of print]
- CRESCENZO, R. *et al.* Fat Quality Influences the Obesogenic Effect of High Fat Diets. *Nutrients*. v. 7, n. 11, p. 9475-9491, Nov. 2015a.
- DALY, D. M. *et al.* Impaired intestinal afferent nerve satiety signalling and vagal afferent excitability in diet induced obesity in the mouse. *J Physiol*. v. 1, n. 589, p. 2857-2870, Jun. 2011.
- DELANY, J. P. *et al.* Differential oxidation of individual dietary fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr*. v. 72, p. 905–911, 2000.
- DI CHIARA, T. *et al.* Hypoadiponectinemia: A Link between Visceral Obesity and Metabolic Syndrome. *J Nutr Metab*. v. 2012, p. 1-8, 2012.
- DIDIER, L. *et al.* Diet-induced modulation of mitochondrial activity in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 293, p. E1169-E1177, 2007.
- DINICOLANTONIO J. J. *et al.* The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Prog Cardiovasc Dis*. Nov. 2015. [Epub ahead of print]
- DOMINGUEZ, L. J.; BARBAGALLO, M. The biology of the metabolic syndrome and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. v. 19, n. 1, p. 5-11, Jan. 2016.
- DYCK, J. R. *et al.* Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5_AMP activated protein kinase. *Eur J Biochem*. v. 262, p. 184-190, 1999.
- DYCK, J. R.; LOPASCHUK, G. D. Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol*. v. 34, p. 1099-1109, 2002.
- ENGLISH, P. J. *et al.* Food fails to suppress Ghrelin levels in obese humans. *J Clin Endocrinol Metab*. v. 87, p. 2984-2987, 2002.
- ERION, D.; SCHULMAN, G. Diacylglycerol-mediated insulin resistance. *Nat Med*. v. 16, p. 400-402, 2010.
- EWIJK PA, V. *et al.* Effects of high-fat feeding on ectopic fat storage and postprandial lipid metabolism in mouse offspring. *Obesity*. v. 23, n. 11, p. 2242-2250, Nov. 2015.

FANG, C. X. *et al.* Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 295, p. H1206-H1215, 2008.

FISCHER, Y. *et al.* Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT1 and GLUT4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. *Endocrinology.* v. 136, p. 412-420, 1995.

FISCHER, Y. *et al.* Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes: Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem.* v. 272, p. 7085–7092, 1997.

GALE, S. M. *et al.* Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr.* v. 134, n.2, p. 295-298, 2004.

GALLOU-KABANI, C. *et al.* Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 292, p. E1095–E1100, 2007.

GHIBAUDI, L. *et al.* Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague–Dawley rats. *Obes Res.* v. 10, p. 956–963, 2002.

GLATZ, J. F. *et al.* Involvement of membrane associated proteins in the acute regulation of cellular fatty acid uptake. *J Mol Neurosci.* v. 16, p. 123-132, 2001.

GLENN, D.J. *et al.* Cardiac steatosis potentiates angiotensin II effects in the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* v. 308, n. 4, p. H339-H350, Feb. 2015.

GNAIGER, E. Normalization of flux - past the RCR: on efficiency, coupling and substrate control factors. In: _____. *Mitochondrial Pathways and respiratory control: An introduction to OXPHOS analysis.* 4th ed. Innsbruck: OROBOROS MiPNet Publications, 2014. p.59-62.

Disponível em: <http://www.bioblast.at/index.php/Gnaiger_2014_MitoPathways

GOODWIN, G. W.; TAEGTMEYER, H. Regulation of fatty acid oxidation of the heart by MCD and ACC during contractile stimulation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 277, p. E772-E777, 1999.

GUASCH-FERRÉ, M. *et al.* Dietary fat intake and risk of cardiovascular disease and all-cause mortality in a population at high risk of cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* v. 102, n. 6, p. 1563-1573, Dec. 2015.

GUSTAFSSON, A. B.; GOTTLIEB, R. A. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol.* v. 23, n. 6, p. 447-459, Nov. 2003.

HALL, J. L. *et al.* Increased cardiac fatty acid uptake with dobutamine infusion in swine is accompanied by a decrease in malonyl CoA levels. *Cardiovasc Res.* v. 32, p. 879-885, 1996.

HANCOCK, C. R. *et al.* High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 105, p. 7815-7820, 2008.

HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev*. v. 27, p. 728-735, 2006.

HARIRI, N. *et al.* A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res*. n. 9, p. 632-643, Sep. 2010a.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. v. 23, p. 270-299, 2010.

HARMANCEY, R. *et al.* Western diet changes cardiac acyl-CoA composition in obese rats: a potential role for hepatic lipogenesis. *J Lipid Res*. v. 51, p. 1380-1393, 2010.

HARROLD, J. A. *et al.* Early leptin response to a palatable diet predicts dietary obesity in rats: key role of melanocortin-4 receptors in the ventromedial hypothalamic nucleus. *J Neurochem*. v. 74, p. 1224-1228, 2000.

HASSELBANK, D. M. *et al.* Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem J*. v. 371, p. 753-760, 2003.

HAUTON, D. *et al.* Utilization of triacylglycerol and non-esterified fatty acid by the working rat heart: myocardial lipid substrate preference. *Biochim Biophys Acta*. v. 1533, p. 99-109, 2001.

HAVEL, P. J. Peripheral signals conveying metabolic information to the brain: short-term and long-term regulation of food intake and energy homeostasis. *Exp Biol Med (Maywood)*. v. 226, n. 11, p. 963-977. 2001.

HEATHER, L. C.; CLARKE, K. Metabolism, hypoxia and the diabetic heart. *J Mol Cell Cardiol*. v. 50, n. 4, p. 598-605, Apr. 2011.

HEIDRICH, F. *et al.* AMPK - Activated Protein Kinase and its Role in Energy Metabolism of the Heart. *Curr Cardiol Rev*. v. 6, p. 337-342, 2010.

HEILBRONN, L. K. *et al.* Markers of mitochondrial biogenesis and metabolism are lower in overweight and obese insulin-resistant subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. v. 92, p.1467-1473, 2007.

HEMAGUCHI, M. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease is a novel predictor of cardiovascular disease. *World J Gastroenterol*. v. 13, p. 1579-1584, 2007.

HOLLOSZY, J. O. Skeletal muscle "mitochondrial deficiency" does not mediate insulin resistance. *Am J Clin Nutr*. v. 89, p. 463S-466S, 2009.

HUANG, S.; CZECH, M. P. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab.* v. 5, p. 237-252, 2007.

HUANG, X. F. *et al.* Role of fat amount and type in ameliorating diet-induced obesity: insights at the level of hypothalamic arcuate nucleus leptina receptor, neuropeptide Y and pro-opiomelanocortin mRNA expression. *Diabetes Obes Metab.* v. 6, p. 35-44, 2004.

HUE, L. *et al.* Regulation of glucose metabolism in cardiac muscle. *Biochem Soc Trans.* v. 23, p. 311-314, 1995.

HUE, L.; TAEGTMEYER, H. The randle cycle revisited: a new head for an old hat. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 297, n. 3, p. E578-E591, 2009.

HUNDAL HS, RAMLAL T, REYES R, LEITER LA, KLIP A. Cellular mechanism of metformin action involves glucose transporter translocation from an intracellular pool to the plasma membrane in L6 muscle cells. *Endocrinology.* v. 131, n. 3, p. 1165-1173, Sep. 1992.

HWANG, B.; JEOUNG, N. H.; HARRIS, R. A. Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDH4) deficiency attenuates the long-term negative effects of a high-saturated fat diet. *Biochem J.* v. 423, n. 2, p. 243-252, Sep. 2009.

HWANG, H. *et al.* Proteomics analysis of human skeletal muscle reveals novel abnormalities in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* v. 59, p. 33-42, 2010.

HWANG, J. S. *et al.* Glucosamine enhances body weight gain and reduces insulin response in mice fed chow diet but mitigates obesity, insulin resistance and impaired glucose tolerance in mice high-fat diet. *Metabolism.* v. 64, n. 3, p. 368-379, Mar. 2015.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa de Orçamentos Familiares 1974-1975 (POF). Rio de Janeiro: IBGE, 1976.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF). Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

IKEMOTO, S. *et al.* High-fat diet-induced hyperglycemia and obesity in mice: differential effects of dietary oils. *Metab Clin Exp.* v. 45, p. 1539-1546, 1996.

INGWALL, J. S. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res.* v. 81, p. 412-419, 2009.

JANSSENS, S. *et al.* Effects of low-stearate palm oil and high-stearate lard high-fat diets on rat liver lipid metabolism and glucose tolerance. *Nutr Metab (Lond).* v. 12, n. 57, p. 1-11, Dec. 2015.

- JECKEL, K. M. *et al.* The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. *Lipids Health and Dis.* v. 10, n. 92, p. 1-11, 2011.
- JOHANNSEN, D. L.; RAVUSSIN, E. The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol.* v. 9, p. 780-786, 2009.
- KANTOR, P. F. L. G. D. O. L. H. Myocardial energy metabolism. In: *Heart Physiology and Pathophysiology*, edited by Opie LH. Orlando, FL: Academic, p. 543-569, 2004.
- KARL, D.M. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rev.* 44, 739–96, 1980.
- KELLEY, D. E. *et al.* Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes.* v. 51, p. 2944-2950, 2002.
- KERNER, J. *et al.* Fatty acid chain elongation in palmitate-perfused working rat heart: mitochondrial acetyl-CoA is the source of two-carbon units for chain elongation. *J Biol Chem.* v. 289, n. 14, p. 10223-10234, Apr. 2014.
- KERNER, J.; HOPPEL, C. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* v. 1486, p. 1-17, 2000.
- KO, H. J. *et al.* Nutrient Stress Activates Inflammation and Reduces Glucose Metabolism by Suppressing AMP-Activated Protein Kinase in the Heart. *Diabetes.* v. 58, p. 2536-2546, 2009.
- KOJIMA, M. *et al.* Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature.* V. 402, n. 6762, p. 656-660, 1999.
- KOWALTOWSKI, A. J. *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.* v. 47, n. 4, p. 333–343, Aug. 2009.
- KUDO, N. *et al.* High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5_AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* v. 270, p. 17513-17520, 1995.
- LANDINI, L. *et al.* Adipose Tissue Oxygenation in Obesity: A Matter of Cardiovascular Risk? *Curr Pharm Des.* v. 22, n. 1, p. 68-76, 2015.
- LE ROUX, C. W. *et al.* Postprandial plasma ghrelin is suppressed proportional to meal calorie content in normal-weight but not obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 90, p. 1068-1071, 2005.
- LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. *Am J Physiol.* v. 89, p. 24-33, 1929.
- LEE, S. H. *et al.* Korean Red Ginseng (*Panax ginseng*) Improves Insulin Sensitivity in High Fat Fed Sprague-Dawley Rats. *Phytother Res.* v. 26, n. 1, p. 142-147, Jan. 2012.

- LEFORT, N. *et al.* Increased reactive oxygen species production and lower abundance of complex I subunits and carnitine palmitoyltransferase 1b protein despite normal mitochondrial respiration in insulin-resistant human skeletal muscle. *Diabetes*. v. 59, p. 2444-2452, 2010.
- LEHMAN, J. J. *et al.* PPAR γ coactivator-1 (PGC-1) promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest*. v. 106, p.847-856, 2000.
- LEHMAN, J. J.; KELLY, D. P. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. v. 29, p. 339-345, 2002.
- 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. Oct. 2010.
- LEVIN, B. E.; DUNN-MEYNELL, A. A. Defense of body weight depends on dietary composition and palatability in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. v. 282, p. R46-R54, 2002.
- LI, R. *et al.* Glucocorticoid Receptor Mediates the Effect of High-Fat Diet on Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Mouse Liver. *DNA Cell Biol*. Oct. 2015. [Epub ahead of print]
- LICHTENSTEIN, A. H.; SCHWAB, U. S. Relationship of dietary fat to glucose metabolism. *Atherosclerosis*. v. 150, p. 227-243, 2000.
- LIN, S.; STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Leptin receptor, NPY, POMC mRNA expression in the diet-induced obese mouse brain. *Brain Res*. v. 875, p. 89-95, 2000.
- LOPASCHUK, G. D. *et al.* Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. v. 1213, p. 263-276, 1994.
- LUIKEN, J. J. *et al.* Cardiac contraction-induced GLUT4 translocation requires dual signaling input. *Trends Endocrinol Metab*. v. 26, n. 8, p. 404-410. Aug. 2015.
- LUIKEN, J. J. *et al.* Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes*. v. 52, p. 1627-1634, 2003.
- LUIKEN, J. J. *et al.* Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes*. v. 51, p. 3113–3119, 2002.
- LUO, X. *et al.* Roles of Pyruvate, NADH, and Mitochondrial Complex I in Redox Balance and Imbalance in β Cell Function and Dysfunction. *J Diabetes Res*. v. 2015, n. 512618, p. 1-12, 2015.

- MACKENZIE, R.W.; ELLIOTT, B.T. Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes.* v. 7, p. 55-64, Feb. 2014.
- MACLELLAN, J. *et al.* Physiological increases in uncoupling protein 3 augment fatty acid oxidation and decrease reactive oxygen species production without uncoupling respiration in muscle cells. *Diabetes.* v. 54, p. 2343-2350, 2005.
- MALIK, V.S.; HU, F.B. Fructose and Cardiometabolic Health: What the Evidence From Sugar-Sweetened Beverages Tells Us. *J Am Coll Cardiol.* v. 66, n. 14, p. 1615-1624, Oct. 2015.
- MARSIN, A. S. *et al.* Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol.* v.10, n.20, p.1247-1255, Sep. 2000.
- MARTINEZ-USEROS, J.; GARCIA-FONCILLAS, J. Obesity and colorectal cancer: molecular features of adipose tissue. *J Transl Med.* v. 14, n. 21, p. 1-12, Jan. 2016.
- MARZULLO, P. *et al.* The relationship between active ghrelin levels and human obesity involves alterations in resting energy expenditure. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 89, p. 936-939, 2004.
- MATTHEWS, DR. *et al.* Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* v. 28, n. 7, p. 412-419, Jul. 1985.
- MCFARLAND, R.; TURNBULL, D. M. Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *J Intern Med.* v. 265, n. 2, p. 210-228, Feb. 2009.
- MCGARRY, J. D.; BROWN, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase System. From concept to molecular analysis. *Eur J Biochem.* v. 244, p. 1-14, 1997.
- MENDONÇA, C. P.; ANJOS, L. A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cad. Saúde Pública.* v. 20, n. 3, p. 698-709, 2004.
- MERKEL, M.; ECKEL, R. H.; GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res.* v. 43, p. 1997-2006, 2002.
- MERRILL, G. F. *et al.* Influence of malonyl-CoA and palmitate concentration on rate of palmitate oxidation in rat muscle. *J Appl Physiol.* v. 85, p. 1909-1914, 1998.
- METTAUER, B. *et al.* Heart failure: a model of cardiac and skeletal muscle energetic failure. *Pflugers Arch.* v. 452, p. 653-666, 2006.
- MILLER, D. S. Non-genetic models of obesity. *In: Festing, M. F. W. Animal models of obesity.* London: Oxford University Press. p. 131-140, 1979.

MITTWEDE, P.N. *et al.* Obesity and Critical Illness: Insights from Animal Models. *Shock*. Oct. 2015. [Epub ahead of print]

MOOTHA, V. K. *et al.* PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet*. v. 34, p. 267-273, 2003.

MORINO, K. *et al.* Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Invest*. v. 115, p. 3587-3593, 2005.

MORIO, B. *et al.* Involvement of dietary saturated fats, from all sources or of dairy origin only, in insulin resistance and type 2 diabetes. *Nutr Rev*. v. 74, n. 1, p. 33-47, Jan. 2016.

MOUSSAVI, N.; GAVINO, V.; RECEVEUR, O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity*. v. 16, p. 7-15, 2008.

MUECKLER, M. Facilitative glucose transporters. *Eur J Biochem*. v. 219, p. 713-725, 1994.

MUOIO, D. M. *et al.* AMP activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. *Biochem J*. v. 338, p. 783-791, 1999.

MUSTAJOKI, P. Obesogenic food environment explains most of the obesity epidemic. *Duodecim*. v. 131, n. 15, p. 1345-1352. 2015.

NEARY, N. M.; GOLDSTONE, A. P.; BLOOM, S. R. Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus. *Clin Endocrinol (Oxf)*. v. 60, n. 2, p. 153-160. 2004.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehninger Principles of Biochemistry: Oxidative Phosphorylation and Photophosphorylation. 4thed. New York: Freeman, 2006. cap. 19, p. 691-717.

NEUBAUER, S. The failing heart - an engine out of fuel. *N Engl J Med*. v. 356, p. 1140-1151, 2007.

NEVES, F. A. *et al.* Heart energy metabolism impairment in Western-diet induced obese mice. *J Nutr Biochem*. v. 25, n. 1, p. 50-57, 2014.

NIEMANN, B. *et al.* Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria. *J Am Coll Cardiol*. v. 57, p. 577- 585, 2011.

NISHIUMI, S. *et al.* Green and Black Tea Suppress Hyperglycemia and Insulin Resistance by Retaining the Expression of Glucose Transporter 4 in Muscle of High-Fat Diet-Fed C57BL/6J Mice. *J. Agric. Food Chem*. v. 58, p. 12916-12923, 2010.

NIU, Y.G.; HAUTON, D.; EVANS, R. D. Utilization of triacylglycerol-rich lipoproteins by the working rat heart: routes of uptake and metabolic fates. *J Physiol.* v. 558, p. 225-237, Jul. 2004.

OKRĘGLICKA, K. Health effects of changes in the structure of dietary macronutrients intake in western societies. *Rocz Panstw Zakl Hig.* v. 66, n. 2, p. 97-105, 2015.

OLIVEIRA JUNIOR, A. S. *et al.* Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. *Cardiovasc Diabetol.* v. 12, n. 65, p. 1-10, Apr. 2013.

OLIVEIRA, G.B. *et al.* Cardiovascular Disease Burden: Evolving Knowledge of Risk Factors in Myocardial Infarction and Stroke through Population-Based Research and Perspectives in Global Prevention. *Front Cardiovasc Med.* v. 2, n. 32, p. 1-4, Aug. 2015.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Obesidade: Prevenção e gestão da epidemia global. Relatório de uma Consulta da OMS sobre Obesidade. Geneva: OMS, 1998.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Obesidade: Prevenção e gestão da epidemia global. Relatório de uma Consulta da OMS sobre Obesidade. Geneva: OMS, 2008.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Observatório Global de Saúde. Obesidade: Situação e tendências. Geneva: OMS, 2013.

Opie, L. H. Heart physiology: from cell to circulation. 4th ed. Lippincott, Williams and Wilkins; p. 543-569, 2004.

ORNELLAS, F. *et al.* Programming of obesity and comorbidities in the progeny: lessons from a model of diet-induced obese parents. *PLoS One.* v. 10, n. 4, p. 1-20, 2015.

Ouwens, D. M. *et al.* Cardiac contractile dysfunction in insulin-resistant rats fed a high-fat diet is associated with elevated CD36-mediated fatty acid uptake and esterification. *Diabetologia.* v. 50, n. 9, p. 1938-1948, Sep. 2007.

PATEL, T. P. *et al.* Insulin resistance: an additional risk factor in the pathogenesis of cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Heart Fail Rev.* v. 21, n. 1, p. 11-23, Jan. 2016.

PATRIZIO, M. *et al.* Hormonal regulation of b-myosin heavy chain expression in the mouse left ventricle. *J Endocrinol.* v. 216, p. 287-296, 2013.

PATTI, M. E. *et al.* Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 100, p. 8466-8471, 2003.

PELLETIER, A.; CODERRE, L. Ketone bodies alter dinitrophenol-induced glucose uptake through AMPK inhibition and oxidative stress generation in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 292, p. E1325-E1332, 2007.

- PIERS, L. S. *et al.* The influence of the type of dietary fat on postprandial fat oxidation rates: monounsaturated (olive oil) vs saturated fat (cream). *Int J Obes.* v. 26, p. 814-821, 2002.
- POPKIN, B. M. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. *Proc Nutr Soc.* v. 70, p. 82-91, 2011.
- RANDLE, P. J.; DENTON, R. M.; ENGLAND, P. J. Citrate as a metabolic regulator in muscle and adipose tissue. *Biochem Soc Symp.* v. 27, p. 87-103, 1968.
- RANDLE, P. J.; ENGLAND, P. J.; DENTON, R. M. Control of the tricarboxylate cycle and its interactions with glycolysis during acetate utilization in rat heart. *Biochem J.* v. 117, p. 677-695, 1970.
- REINEHR, T. *et al.* Ghrelin levels before and after reduction of overweight due to a low-fat high-carbohydrate diet in obese children and adolescents. *Int J Obes.* v. 29, p. 362-368, 2005.
- RESZKO, A. E. *et al.* Assay of the concentration and ¹³C-isotopic enrichment of malonylcoenzyme A by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* v. 298, p. 69-75, 2001.
- RESZKO, A. E. *et al.* Regulation of malonyl-CoA concentration and turnover in the normal heart. *J Biol Chem.* v. 279, p. 34298-34301, 2004.
- RICCARDI, G.; GIACCO, R.; RIVELLESE, A. A. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr.* v. 23, p. 447-456, 2004.
- RIDER, M. H. *et al.* Evidence for new phosphorylation sites for protein kinase C and cyclic AMP-dependent protein kinase in bovine heart 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.* v. 310, p. 139-142, 1992.
- RITOV, V. *et al.* Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes.* v. 54, p. 8-14, 2005.
- RIZKI, G. *et al.* Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res.* v. 47, p. 2280-2290, 2006.
- ROGGE, M. M. The Role of Impaired Mitochondrial Lipid Oxidation in Obesity. *Biol Res Nurs.* v. 10, n. 4, p. 356-373, Apr. 2009.
- ROLFE, D. F.; BRAND, M. D. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep.* v. 17, p. 9-16, 1997.
- ROSCA, M. G. *et al.* Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res.* v. 80, n. 1, p. 30-39, Oct. 2008.
- ROSINI TC, *et al.* Diet-induced obesity: rodent model for the study of obesity-related disorders. *Rev Assoc Med Bras.* v. 58, n. 3, p. 383-387, May-Jun. 2012.

ROUSSET, S. *et al.* The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes*. v. 53, n. suppl 1, p. S130–S135, Feb. 2004.

RUDERMAN, N. B. *et al.* Malonyl-CoA, fuel sensing, and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 276, p. E1-E18, 1999.

RUPPRECHT, A. *et al.* Uncoupling protein 2 and 4 expression pattern during stem cell differentiation provides new insight into their putative function. *PLoS One*. v. 9, n. 2, p. 1-10, 2014.

RUSSELL, L. K.; FINCK, B. N.; KELLY, D. P. Mouse models of mitochondrial dysfunction and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. v. 38, n. 1, p. 81-91, 2005.

RUSSELL, R. R. *et al.* Translocation of myocardial GLUT-4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v. 277, p. H643-H649, 1999.

SADDIK, M. *et al.* Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J Biol Chem*. v. 268, p. 25836-25845, 1993.

SADLER, N. C. *et al.* Activity-Based Protein Profiling Reveals Mitochondrial Oxidative Enzyme Impairment and Restoration in Diet-Induced Obese Mice. *PLoS One*. v. 7, n. 10, p. 1-10, 2012.

SAHA, A. K. *et al.* Activation of malonyl-CoA decarboxylase in rat skeletal muscle by contraction and the AMP-activated protein kinase activator 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside. *J Biol Chem*. v. 275, p. 24279-24283, 2000.

SAINSBURY, A.; COONEY, G. J.; HERZOG, H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. v. 16, n. 4, p. 623-637, 2002.

SAN-CRISTOBAL, R. *et al.* Analysis of Dietary Pattern Impact on Weight Status for Personalised Nutrition through On-Line Advice: The Food4Me Spanish Cohort. *Nutrients*. v. 7, n. 11, p. 9523-9537, Nov. 2015.

SANDERS, T. A. How important is the relative balance of fat and carbohydrate as sources of energy in relation to health? *Proc. Nutr. Soc.* 2015. [Epub ahead of print]

SCHAFFER, J. E. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 282, p. E239-E246, 2002.

SCHWARTZ, G. G. *et al.* Inhibition of fatty acid metabolism alters myocardial high-energy phosphates in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. v. 267, p. H224-H231, 1994.

SCHWENK, R. W. *et al.* Regulation of sarcolemmal glucose and fatty acid transporters in cardiac disease. *Cardiovasc Res*. v. 79, n. 2, p. 249-258, Jul. 2008.

SEPPALA-LINDROOS, A. *et al.* Fat accumulation in the liver is associated with defects in insulin suppression of glucose production and serum free fatty acids

independent of obesity in normal men. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 87, p. 3023-3028, 2002.

SERVIDDIO, G. *et al.* Oxidation of Hepatic Carnitine Palmitoyl Transferase-I (CPT-I) Impairs Fatty Acid Beta- Oxidation in Rats Fed a Methionine-Choline Deficient Diet. *PLoS ONE.* v. 6, n. 9, p. e24084 1-9, 2011.

SHAROV, V. G., *et al.* Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* v. 32, n. 12, p. 2361-2367, Dec. 2000.

SMILOWITZ, J. T. *et al.* Food Intake and Obesity: The Case of Fat. In: Montmayeur JP, le Coutre J, editors. *Fat Detection: Taste, Texture, and Post Ingestive Effects.* Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2010. Chapter 22. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53555/>

SPARKS, L.M. *et al.* A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes.* v. 54, p. 1926-1933, 2005.

STANLEY, P.E. Extraction of adenosine triphosphate from microbial and somatic cells. *Methods Enzymol.* v. 133, p. 14-22, 1986.

STANLEY, W. C. *et al.* Beta-Hydroxybutyrate inhibits myocardial fatty acid oxidation in vivo independent of changes in malonyl-CoA content. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 285, p. H1626–H1631, 2003.

STANLEY, W. C. *et al.* Pyruvate dehydrogenase activity and malonyl CoA levels in normal and ischemic swine myocardium: effects of dichloroacetate. *J Mol Cell Cardiol.* v. 28, p. 905-914, 1996.

STANLEY, W. C. *et al.* Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res.* v. 33, p. 243-257, 1997.

STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev.* v. 85, p. 1093-1129, 2005.

STEINBUSCH, L. K. *et al.* Absence of fatty acid transporter CD36 protects against Western-type diet-related cardiac dysfunction following pressure overload in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 301, n. 4, p. E618-E627, 2011.

STORLIEN, L. H. *et al.* Diet composition and insulin action in animal models. *Br J Nutr.* v. 83, p. S85-S90, 2000.

STORLIEN, L. H. *et al.* Dietary fat subtypes and obesity. *World Rev Nutr Diet.* v. 88, p. 148-154, 2001.

TAEGMTMEYER, H. Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation.* v. 110, p. 894-896, 2004.

- TAEGTMEYER, H. *et al.* Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart. *Ann NY Acad Sci.* v. 1015, p. 202-213, 2004.
- TARDIF, A. *et al.* Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 281, p. E1205-E1212, 2001.
- TARGOER, G. *et al.* Nonalcoholic fatty liver disease and risk of future cardiovascular events among type 2 diabetic patients. *Diabetes.* v. 54, p. 3541-3546, 2005.
- TAUBES, G. Nutrition: The soft science of dietary fat. *Science.* v. 291, n. 5513, p. 2536-2545, Mar. 2001.
- TE MORENGA LA, *et al.* Dietary sugars and cardiometabolic risk: systematic review and meta-analyses of randomized controlled trials of the effects on blood pressure and lipids. *Am J Clin Nutr.* v. 100, n. 1, p. 65-79, Jul. 2014.
- TENTOLOURIS, N. *et al.* Differential effects of high-fat and high-carbohydrate content isoenergetic meals on plasma active Ghrelin concentrations in lean and obese women. *Horm Metab Res.* v. 36, p. 559-563, 2004.
- THAKKER, G. D. *et al.* Increased Myocardial Susceptibility to Repetitive Ischemia With High-fat diet–induced Obesity. *Obesity.* v. 16, p. 2593-2600, 2008.
- TIKELLIS, C. *et al.* Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 295, n. 2, p. E323-E330, Aug. 2008.
- TREMBLAY, F. *et al.* Over-activation of S6 kinase 1 as a cause of human insulin resistance during increased amino acid availability. *Diabetes.* v. 54, n. 9, p. 2674-2684, 2005.
- TURKER, Y. *et al.* Investigation of relationship of visceral body fat and inflammatory markers with metabolic syndrome and its components among apparently healthy individuals. *Int J Clin Exp Med.* v. 8, n. 8, p. 13067-13077, 2015.
- TURNER, N. *et al.* Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J Endocrinol.* v. 220, n. 2, p. T61-T79, Jan. 2014.
- VAN DEN BROEK, N. M. *et al.* Increased mitochondrial content rescues in vivo muscle oxidative capacity in long-term high-fat-diet-fed rats. *FASEB J.* v. 24, p. 1354-1364, 2010.
- VAN DER VUSSE, G. J. *et al.* Fatty acid homeostasis in the normoxic and ischemic heart. *Physiol Rev.* v. 72, p. 881-940, 1992.
- VAN DER VUSSE, G.J.; VAN BILSEN, M.; GLATZ, J.F. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovasc Res.* v. 45, p. 279-293, 2000.

VANOVERSCHELDE, J. L. *et al.* Competition between palmitate and ketone bodies as fuels for the heart: study with positron emission tomography. *Am J Physiol.* v. 264, p. H701-H707, 1993.

VENTURA-CLAPIER, R. *et al.* Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta.* v. 1813, n. 7, p. 1360-1372, Jul. 2011.

WALDER, K. *et al.* Association between uncoupling protein polymorphisms (UCP2-UCP3) and energy metabolism/obesity in Pima indians. *Hum Mol Genet.* v. 7, n. 9, p. 1431-1435, Sep. 1998.

WANG, H.; STORLIEN, L. H.; HUANG, X. F. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and Arc leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 282, p. E1352-E1359, 2002.

WEI, J. *et al.* Myocardial Steatosis as a Possible Mechanistic Link between Diastolic Dysfunction and Coronary Microvascular Dysfunction in Women. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 310, n. 1, p. H14-H16, Jan. 2016.

WEIS, B. C. *et al.* Use of a selective inhibitor of liver carnitine palmitoyltransferase I (CPT I) allows quantification of its contribution to total CPT I activity in rat heart. Evidence that the dominant cardiac CPT I isoform is identical to the skeletal muscle enzyme. *J Biol Chem.* v. 269, p. 26443-26448, 1994.

WHITAKER, R. M. *et al.* Mitochondrial Biogenesis as a Pharmacological Target: A New Approach to Acute and Chronic Diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* v. 6, n. 56, p. 229-249, Jan. 2016.

WILLETT, W. C.; LEIBEL, R. L. Dietary fat is not a major determinant of body fat. *Am J Med.* v. 113, n. 9B, p. 47S-59S, Dec. 2002.

WOODS, S. C. *et al.* A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr.* v. 133, p. 1081-1087, 2003.

XING, Y. *et al.* Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha2 subunit of AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* v. 278, p. 28372-28377, 2003.

XU, H. *et al.* Uncoupling lipid metabolism from inflammation through fatty acid binding protein-dependent expression of UCP2. *Mol Cell Biol.* v. 35, n. 6, p. 1055-1065, 2015.

YAGYU, H. *et al.* Lipoprotein lipase (LpL) on the surface of cardiomyocytes increases lipid uptake and produces a cardiomyopathy. *J Clin Invest.* v. 111, p. 419-426, 2003.

YANG, C. *et al.* Mitochondrial dysfunction in insulin resistance: differential contributions of chronic insulin and saturated fatty acid exposure in muscle cells. *Biosci Rep.* v. 32, n. 5, p. 465-478, 2012.

YANG, J. Y. *et al.* Insulin stimulates Akt translocation to mitochondria: implications on dysregulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in diabetic myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* v. 46, p. 919-926, 2009.

YANG, L. *et al.* Sodium tanshinone IIA sulfonate depresses angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy through MEK/ERK pathway. *Exp Mol Med.* v. 39, n. 1, p. 65-73, Feb. 2007.

YANG, L. G. *et al.* Low n-6/n-3 PUFA Ratio Improves Lipid Metabolism, Inflammation, Oxidative Stress and Endothelial Function in Rats Using Plant Oils as n-3 Fatty Acid Source. *Lipids.* v. 51, n. 1, p. 49-59, Jan. 2016.

YIN, F. C. *et al.* Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. *Am J Physiol.* v. 243, n. 6, p. H9141-H9147, Dec. 1982.

YOKOYAMA, M. *et al.* Apolipoprotein B production reduces lipotoxic cardiomyopathy: studies in heart specific lipoprotein lipase transgenic mouse. *J Biol Chem.* v. 279, p. 4204-4211, 2004.

YU, X. X. *et al.* Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature Manipulation. *FASEB J.* v. 14, n. 11, p. 1611-1618, 2000.

ZALESIN, K. C. *et al.* Impact of obesity on cardiovascular disease. *Med Clin North Am.* v. 95, n. 5, p. 919-937, Sep. 2011.

ZAMBON, L. *et al.* Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Rev Nutr.* v. 22, n. 5, p. 707-715, 2009.

ZAMMIT, V. A.; FRASER, F.; ORSTORPHINE, C. G. Regulation of mitochondrial outer-membrane carnitine palmitoyltransferase (CPT I): role of membrane-topology. *Adv Enzyme Regul.* v. 37, p. 295-317, 1997.

ZHOU, X. *et al.* Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat. *Hypertension.* v. 55, n. 4, p. 880-888, 2010.

ZHOU, Y. T. *et al.* Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 97, p. 1784-1789, 2000.

ZORZANO, A. *et al.* Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. *Am J Cardiol.* v. 80, p. 65A-76A, 1997.