



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


Amélia Faustino Bernardo

**Função mitocondrial cardíaca de camundongos filhotes e adultos  
submetidos à hiperalimentação durante a lactação**

Rio de Janeiro  
2015

Amélia Faustino Bernardo

**Função mitocondrial cardíaca de camundongos filhotes e adultos submetidos  
à hiperalimentação durante a lactação**



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.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Rio de Janeiro

2015

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

B523 Bernardo, Amélia Faustino.

Função mitocondrial cardíaca de camundongos filhotes e adultos submetidos à hiperalimentação durante a lactação / Amélia Faustino Bernardo. - 2015.

141f.

Orientadora: Érica Patrícia Garcia de Souza

Coorientador: Aníbal Sanchez Moura.

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

1. Obesidade - Teses. 2. Insulina - Sinalização - Teses. 3. Metabolismo energético - Teses. 4. Mitocôndria - Teses. 5. Mitocôndrias cardíacas. I. Souza, Érica Patrícia Garcia de. II. Moura, Aníbal Sanchez. III Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV.Título.

CDU 616-056.52

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

---

Assinatura

---

Data

Amélia Faustino Bernardo

**Função mitocondrial cardíaca de camundongos filhotes e adultos submetidos  
à hiperalimentação durante a lactação**

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 14 de setembro de 2015.

Coorientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza (Orientadora)  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vera Lucia Freire da Cunha Bastos  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana El-Bacha Porto  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Érika Afonso Costa Cortez Marques  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

## DEDICATÓRIA

Em MEMÓRIA à minha mãe, Joana Bernardo, seus ensinamentos formaram o alicerce da minha história. Aos meus filhos Jade Lyra B. da Costa, Jesualdo B. de S. Pontes e Joana da Rosa, sem o quais não teria tido forças para prosseguir no caminho em busca do conhecimento. Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que todos os dias de minha vida me deu saúde, força e sabedoria para superar todas as dificuldades e lutar pelos meus objetivos.

À minha família, em especial meus filhos Jade Lyra, Jesualdo Pontes e Joana da Rosa; meus netos, Lwena, Lukeny e Amélia; meus sobrinhos Djamila, Jessica, Nadinho e Tavinho; meus irmãos Tavares Bernardo, Maria Antónia, Elizabeth, Lauriana e meu companheiro Dionísio da Costa, por suportarem a minha ausência, pelo carinho, incentivo, AMOR e respeito. Vocês são a minha vida.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas em especial, ao Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento (LFND), e ao Programa de pós-graduação FISCLINEX por acreditar em mim e apoiar o meu ingresso no doutorado.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Érica Patrícia G. de Souza, por todo apoio e aprendizado, pelo enriquecimento profissional e pessoal, amizade e paciência ao longo desses anos.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Aníbal S. Moura, “mestre inspirador”, agradeço por sua paixão pela pesquisa científica, que sempre me contagiou.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Laís de Carvalho e as professoras do departamento de histologia, Prof.<sup>a</sup> Dra. Alessandra Alves Thole, Simone e Ana Carolina, pelo carinho e amizade.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Érika Cortez, pela sua dedicação, competência, atenção especial, sinceridade e pelo ombro amigo em todos os momentos deste percurso que colaboraram para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos Professores e colegas do Departamento de Farmacologia, Mariana Renovato, João Moraes, Cristiane Pereira e Simone pelo carinho, amizade, apoio incondicional, colaboração e torcida para a conclusão deste trabalho.

À minha inesquecível Dalvaci da Cunha Lira Neves, minha “MAMADI”. Muito obrigada por permitir fazer parte da tua família.

À minha “irmã Brasileira e comadre”, Fabiana Neves que sempre incentivou e participou na realização de muitos sonhos, a minha gratidão pela nossa amizade.

À minha “sobrinha” Vivian de Melo, pelos momentos incondicionais durante este tempo.

À minha “filha Brasileira”, “extraterrestre” Anatália Vieira, pelo carinho e amizade e por estar sempre pronta a ajudar a todos incondicionalmente.

À tia Dinda, Patrícia Pacheco, pelas noites no laboratório, pelo carinho, amizade e por estar sempre presente nos momentos difíceis.

Aos colegas de mestrado e iniciação científica do LFND, Roberta Guedes, Tayane, Camila, Bernardo e Gabriel.

Ao meu colega e pai, Maurílio Luíele, um presente. O teu exemplo me deu confiança para alcançar alturas maiores. Obrigada pelo carinho e atenção dispensada em toda esta caminhada.

Aos meus colegas do Departamento de Bioquímica da FM da UAN de Angola, pela amizade, companheirismo e colaboração.

Às minhas amigas, em especial, Maria da Conceição Miguel “Tchonca”, Maria Antónia Nelumba, Catarina Ruby, Zita Sebastião, Joaquina Lazary, pela amizade, carinho, e paciência, por sempre acreditarem em mim e proporcionarem tantos momentos felizes da minha vida.

À todos aqueles que não foram mencionados, mas que deram o seu apoio moral, pela confiança, incentivo e amor incomparável durante todos esses anos.

Aos órgãos de apoio financeiros CAPES, CNPQ, FAPERJ, INABE e a Faculdade de Medicina – UAN.

Chame o sucesso para fazer parte de sua vida.  
Acredite no seu potencial criador, seja inovador, treine sua mente para  
vencer, estipule metas e, principalmente, lute por seus ideais.

*Flavio Souza*

## RESUMO

BERNARDO, Amélia Faustino. *Função mitocondrial cardíaca de camundongos filhotes e adultos submetidos à hiperalimentação durante a lactação*. 2015. 141 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Estudos demonstram que a hiperalimentação no período pós-natal causa obesidade, alterações cardiometabólicas e resistência à insulina em longo prazo. O objetivo do estudo foi investigar as consequências da hiperalimentação na lactação nos corações de camundongos filhotes e adultos ao longo do desenvolvimento. Para induzir a hiperalimentação na lactação, o tamanho da ninhada foi reduzida a 3 filhotes machos no terceiro dia, grupo hiperalimentado (GH). O grupo controle (GC) permaneceu com 9 filhotes da lactação ao desmame. Avaliamos a massa corporal, gordura epididimária e retroperitoneal, morfologia hepática e cardíaca, ultraestrutura dos cardiomiócitos, peso do PVE/CT, glicemia de jejum, triglicerídeos, colesterol total, insulina plasmática e HOMA-IR. Analisamos o consumo de oxigênio das fibras cardíacas através da respirometria de alta resolução, atividade enzimática da PDH, CS e LDH no coração e glicogênio hepático. Biologia molecular, através das proteínas: IR $\beta$ , IRS1, pIRS1, PTP1B, PI3K, Akt, pAkt, GLUT1, GLUT4, AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ , HKII, CPT1, UCP2, FABPm, CD36, PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , 4HNE, complexos da CTE (I, II, III, IV e V),  $\alpha$ -tubulina, GP91 e VADC. Diferenças entre os grupos analisadas por *Two-Way* ANOVA, com significância  $p < 0,05$ . O GH apresentou aumento da massa corporal, gordura epididimária, retroperitoneal e colesterol total em todas as idades; glicemia de jejum, insulina, índice de HOMA-IR e triglicerídeos aos 21 e 90 dias. Aumento do índice de Lee aos 60 e 90 dias. GH apresentou diminuição: do IR $\beta$  e GLUT4 aos 21 e 60 dias; aumento do IR $\beta$  aos 90 dias; aumento do IRS1, PTP1B, aos 21 e 90 dias e da AKT, pAMPK/AMPK e GLUT1 aos 21 dias; diminuição da pIRS1/IRS1, PI3K, pAKT/AKT aos 21 e 90 dias; diminuição da HKII aos 21 dias e aumento aos 60 e 90 dias; aumento da PDH aos 90 dias; aumento da LDH aos 21 dias e redução aos 60 dias; aumento da CS aos 21 dias e diminuição aos 60 e 90 dias; aumento da oxidação de carboidratos aos 21 dias e redução aos 90 dias; diminuição na oxidação de ácidos graxos aos 60 e 90 dias. Adicionalmente, aumento do desacoplamento mitocondrial entre a fosforilação oxidativa e a síntese de ATP aos 60 e 90 dias. Diminuição da CPT1 e aumento da UCP2 aos 21 e 90 dias. Diminuição da PGC-1 $\alpha$  aos 60 e 90 dias; da FABPm e CD36 em todas idades. Aumento da 4HNE aos 21 e diminuição aos 90 dias. Diminuição na expressão do mRNA para CPT1 aos 21, 60 dias. Diminuição na expressão do mRNA para PPAR $\alpha$  e aumento na expressão do mRNA para UCP2 aos 21 dias; diminuição na expressão do mRNA para UCP2 ao 60 dias. Alterações morfológicas cardíacas e hepáticas, assim como na ultraestrutura dos cardiomiócitos, em todas as idades, maior conteúdo de glicogênio hepático aos 21 e 90 dias. Concluímos que a hiperalimentação na lactação levou à obesidade, com aumento da oxidação de glicose, alterações no metabolismo energético associadas à diminuição da sensibilidade à insulina, redução da capacidade oxidativa mitocondrial, levando ao desacoplamento e alteração da morfologia e ultraestrutura dos cardiomiócitos do desmame até a idade adulta.

Palavra chave: Obesidade. Sinalização de insulina. Disfunção mitocondrial.

## ABSTRACT

BERNARDO, Amélia Faustino. *Cardiac mitochondrial function in young and adults mice submitted to overnutrition during lactation*. 2015. 141 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

Recent studies have shown that overnutrition in the postnatal period lead obesity, cardiometabolic alterations, insulin resistance at long term. The objective of the study was to investigate the consequences of overnutrition lactation in the hearts of mice pups and adults throughout the development. To induce overnutrition during lactation, the litter size was reduced from three male pups at the third day, overnutrition group (OG). The control group (CG) remained with 9 pups per litter at lactation until weaning. We evaluated the body weight, epididymal and retroperitoneal fat, liver and cardiac morphology, ultrastructure of cardiomyocytes, left ventricle weight/ tibia length ratio, fasting glucose, triglycerides, total cholesterol, plasma insulin and HOMA-IR. The oxygen consumption of cardiac fibers was analyzed by high-resolution respirometry. We evaluated the enzymatic activity of PDH, CS and LDH and liver glycogen. Molecular biology, through: IR $\beta$ , IRS1, pIRS1, PTP1B, PI3K, Akt, pAkt, GLUT1, GLUT4, AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ , HKII, CPT1, UCP2, FABPm, CD36, PGC-1 $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , 4HNE, eletrons transport chain complex (I, II, III, IV and V),  $\alpha$ -tubulin, GP91 and VADC. Differences between groups analyzed by Two-way ANOVA, significance level  $p < 0.05$ . The OG had increased body weight, epididymal and retroperitoneal fat and total cholesterol in all ages. Fasting glucose, insulin, HOMA-IR and triglyceride levels at 21 and 90 days. Increased Lee index at 60 and 90 days. OG showed a decrease: the IR $\beta$  and GLUT4 at 21 and 60 days; IR $\beta$  increased to 90 days; increased IRS1, PTP1B, at 21 and 90 days and AKT, pAMPK/ AMPK and GLUT1 to 21 days; decrease of pIRS1/IRS1, PI3K, pAKT/ AKT at 21 and 90 days; HKII decreased at 21 days and increased at 60 and 90 days; PDH increased to 90 days; increased LDH at 21 days and reduced to 60 days; CS increased at 21 days and decreased at 60 and 90 days; increased oxidation of carbohydrates to 21 days and reduced to 90 days; decrease in fatty acid oxidation at 60 and 90 days. Additionally, increased mitochondrial uncoupling oxidative phosphorylation and ATP synthesis at 60 and 90 days. We observed decrease in CPT1 and increased UCP2 at 21 and 90 days. Decreased PGC-1 $\alpha$  at 60 and 90 days and FABPm and CD36 in all ages. increased 4HNE at 21 and decrease at 90 days. However, we observed a decrease in the expression of mRNA for CPT1 to 21 and 60 days. Decrease in mRNA expression of PPAR $\alpha$  and increased in mRNA expression of UCP2 at 21 days; decrease in mRNA expression of UCP2 at 60 days. Heart and liver morphological changes, as well as the ultrastructure of cardiomyocytes, in all ages, hepatic glycogen content at 21 and 90 days. We conclude that the overfeeding lactation led to obesity with increased glucose oxidation, changes in energy metabolism, associated with decreased insulin signaling, reduced mitochondrial oxidative capacity, leading to decoupling and changing the morphology and ultrastructure of cardiomyocytes from weaning to adulthood.

Keywords: Obesity. Insulin signaling. Mitochondrial dysfunction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Prevalência de obesidade na população mundial.....	23
Figura 2 –	Metabolismo da glicose e ácidos graxos em cardiomiócitos de diabéticos tipo 2.....	32
Figura 3 –	Via de sinalização de insulina.....	38
Figura 4 –	Produção de energia mitocondrial prejudicada.....	40
Figura 5 –	Estrutura da mitocôndria.....	42
Figura 6 –	Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTE).....	44
Figura 7 –	Geração de calor por desacoplamento mitocondrial.....	47
Figura 8–	Esquema do modelo experimental dos grupos Controle e Hiperalimentado até aos 90 dias.....	53
Figura 9 –	Separação de fases.....	62
Figura 10 –	Curva de ganho de peso corporal dos camundongos dos grupos controle e hiperalimentado ao longo do estudo.....	65
Figura 11 –	Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH, submetidas aos substratos relacionados aos protocolos de carboidratos.....	73
Figura 12 –	Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH, submetidas aos substratos relacionados aos protocolos de Ácidos graxos.....	74
Figura 13 –	Conteúdo total do receptor de insulina IR $\beta$ de cardiomiócitos de camundongos dos grupos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	75
Figura 14 –	Conteúdo total da proteína IRS-1 e da razão pIRS-1/IRS-1 de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	77
Figura 15 –	Conteúdo total da proteína PTP1B de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	78

Figura 16 –	Conteúdo total da proteína PI3K de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	79
Figura 17 –	Conteúdo total da proteína Akt e da razão pAkt/Akt de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	80
Figura 18 –	Conteúdo total da proteína GLUT4 de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	81
Figura 19 –	Conteúdo total da proteína GLUT4 nas frações citosólica e de membrana de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	82
Figura 20 –	Conteúdo da proteína GLUT1 de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	83
Figura 21 –	Conteúdo total da proteína AMPK $\alpha$ e da razão pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$ de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	84
Figura 22 –	Conteúdo total da proteína HK II de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	85
Figura 23 –	Atividade enzimática da Piruvato desidrogenase (PDH), Citrato sintase (CS) e Lactato desidrogenase (LDH) de cardiomiócitos dos camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias.....	87
Figura 24 –	Conteúdo total da proteína FABP e CD36 de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	89
Figura 25 –	Conteúdo da proteínas CPT1, UCP2 e PGC1- $\alpha$ , obtidos dos cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias.....	91
Figura 26 –	Conteúdo total dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons (I, II, II, IV e V) de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	93
Figura 27 –	Conteúdo da proteína 4HNE, obtidos do cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias.....	95
Figura 28 –	Expressão do mRNA para a proteína CPT1 e UCP2 obtidos dos cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias.....	97

Figura 29 –	Expressão do mRNA para a proteína PPAR $\alpha$ obtidos dos cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias.....	98
Figura 30 –	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo do glicogênio hepático de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias.....	99
Figura 31 –	Análise histológica do fígado de camundongos dos GC e GH aos 21 dias de vida.....	100
Figura 32 –	Análise histológica do fígado de camundongos dos GC e GH aos 60 dias de vida.....	101
Figura 33 –	Análise histológica do fígado de camundongos dos GC e GH aos 90 dias de vida.....	102
Figura 34 –	Análise histológica do coração de camundongos dos GC e GH aos 21 dias de vida.....	104
Figura 35 –	Análise histológica do coração de camundongos dos GC e GH aos 60 dias de vida.....	105
Figura 36 –	Análise histológica do coração de camundongos dos GC e GH aos 90 dias de vida.....	106
Figura 37 –	Microscopia Eletrônica de Transmissão de cardiomiócitos obtidos de camundongos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida.....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros bioquímicos dos grupos controle e hiperalimentado em diferentes idades.....	67
Tabela 2 –	Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos controle e hiperalimentado em diferentes idades.....	70
Tabela 3 –	Resumo dos principais achados obtidos nos cardiomiócitos de camundongos obesos submetidos à hiperalimentação durante a lactação.....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4HNE	4-hidroxinonenal
ADP	Adenosina difosfato
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AG	Ácidos graxos
AGL	Ácidos graxos livres
AGCLCoA	Ácido graxos de cadeia longa acil-coenzima A
AKT	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATP	Adenosina trifosfato
CoA	Coenzima A
CoQ	Coenzima Q
CPT	Carnitina palmitoil transferase
CS	Citrato sintase
CT	Comprimento da tíbia
CTE	Cadeia de transporte de elétrons
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DM2	Diabete mellitus tipo 2
ERO	Espécies reativas de oxigênio
F2,6BP	Frutose-2,6-bi-fosfato
F-6P	Frutose-6-fosfato
FADH2	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FABPm	Proteína de ligação de ácidos graxos de membrana plasmática
FAS	Ácido graxo síntase
FAT/CD36	Proteína transportadora de ácidos graxos integrada à membrana
FATP	Proteína transportadora de ácidos graxos
FMN	Flavinas nicotinamidas
FO	Fosforilação oxidativa
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase

GC	Grupo controle
GH	Grupo Hiperalimentado
GLUT	Transportador de glicose
GSK-3	Glicogênio sintase quinase
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HK	Hexoquinase
HOMA-IR	Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina
HVE	Hipertrofia ventricular esquerda
IC	Insuficiência cardíaca
IMC	Índice de massa corporal
IR $\beta$	Receptor de insulina $\beta$
IRS-1	Substrato do receptor de insulina-1
KAT	Cetoacil-CoA tiolase
KDa	Kilodalton
LDH	Lactato desidrogenase
LPL	Lipoproteína lipase
MC	Massa corporal
MCD	Malonil-CoA descarboxilase
MVE	Massa ventricular esquerda
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NADPH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfatase-oxidase
Omy	Oligomicina
PC	Palmitoil-L-carnitina
PDH	Piruvato desidrogenase
PDK	Piruvato desidrogenase kinase
PDP	Piruvato desidrogenase fosfatase
PFK	Fosfofrutoquinase
PGC1 $\alpha$	Coativador gama do receptor ativado do proliferador de peroxissoma 1alfa
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PKC	Proteína quinase C
PPAR $\alpha$	Receptor ativado do proliferador de peroxissoma alfa
PTP1B	Proteína tirosina-fosfatase 1B

PVE	Peso do ventrículo esquerdo
RI	Resistência à insulina
RNA	Ácido ribonucleico
TG	Triglicerídeos
TMB	Taxa metabólica basal
UCP	Proteína desacopladora
VE	Ventrículo esquerdo
VDAC	Canal iônico voltage-dependente
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1	<b>OBESIDADE</b> .....	21
1.1	<b>Obesidade e programação metabólica por hiperalimentação durante a lactação</b> .....	23
1.2	<b>Obesidade e doenças cardiovasculares</b> .....	25
1.3	<b>Metabolismo energético do coração</b> .....	28
1.3.1	<u>Metabolismo dos carboidratos</u> .....	29
1.3.2	<u>Metabolismo dos ácidos graxos</u> .....	33
1.3.3	<u>Via de sinalização de insulina</u> .....	35
1.3.4	<u>Metabolismo energético do coração na obesidade</u> .....	38
1.4	<b>Bioenergética mitocondrial</b> .....	41
1.4.1	<u>Mitocôndria</u> .....	41
1.4.2	<u>Função mitocondrial</u> .....	42
1.4.3	<u>Obesidade e doenças cardiovasculares na disfunção mitocondrial</u> .....	47
2	<b>OBJETIVOS</b> .....	51
2.1	<b>Objetivo geral</b> .....	51
2.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	51
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	52
3.1	<b>Animais e modelo experimental</b> .....	52
3.2	<b>Análise do ganho de peso corporal dos animais durante o crescimento</b> .....	54
3.3	<b>Análise dos parâmetros bioquímicos plasmáticos</b> .....	54
3.4	<b>Análise dos parâmetros biométricos</b> .....	55
3.5	<b>Respiração mitocondrial</b> .....	56
3.6	<b>Análise das proteínas através de Western Blotting</b> .....	57
3.7	<b>Fracionamento de membrana para a avaliação da translocação do GLUT4</b> .....	59
3.8	<b>Ensaio da atividade de enzimas chaves do metabolismo</b> .....	59
3.8.1	<u>Piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1)</u> .....	60

3.8.2	<u>Citrato sÍntase (E.C. 2.3.3.1)</u> .....	60
3.8.3	<u>Lactate desidrogenase (EC 1.1.1.27)</u> .....	61
3.9	<b>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)</b> .....	61
3.10	<b>Quantificao de glicogênio do fÍgado</b> .....	63
3.11	<b>Análise da morfologia do fÍgado e coração</b> .....	63
3.12	<b>Microscopia eletrônica de transmissão dos cardiomiócitos</b> .....	64
3.13	<b>Análise estatística</b> .....	64
4	<b>RESULTADOS</b> .....	65
4.1	<b>Efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre o ganho de peso corporal de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado</b> .....	65
4.2	<b>Efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida</b> .....	66
4.3	<b>Efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre os parâmetros biométricos e morfométricos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida</b> .....	68
4.4	<b>Respirao mitocondrial e consumo de oxigênio nas fibras cardÍacas de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida</b> .....	71
4.5	<b>Efeito da hiperalimentação na cascata de sinalizao de insulina</b> .....	75
4.5.1	<u>Análise do conteúdo de IR<math>\beta</math> nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida</u> .....	75
4.5.2	<u>Análise do conteúdo de IRS-1 da pIRS-1/IRS-1 dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida</u> .....	76
4.5.3	<u>Análise do conteúdo de PTP1B dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida</u> .....	77
4.5.4	<u>Análise do conteúdo de PI3K nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida</u> .....	78
4.5.5	<u>Análise do conteúdo de Akt e da razão pAkt/Akt nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida</u> .....	79

4.5.6	<u>Análise do conteúdo de GLUT4 dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	80
4.5.7	<u>Análise do conteúdo GLUT4 nas frações citosólica e de membrana dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	81
4.5.8	<u>Análise do conteúdo de GLUT1 nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	83
4.5.9	<u>Análise do conteúdo de AMPK<math>\alpha</math> e da razão pAMPK<math>\alpha</math>/AMPK<math>\alpha</math> nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	84
4.5.10	<u>Análise do conteúdo de HK II dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	85
4.6	<b>Atividade enzimática das enzimas chaves no metabolismo energético dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</b>	86
4.7	<b>Conteúdo das proteínas envolvidas no metabolismo energético mitocondrial.....</b>	88
4.7.1	<u>Análise do conteúdo de FABP e CD36 dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	88
4.7.2	<u>Análise do conteúdo de CPT1, UCP2 e PGC1-<math>\alpha</math> dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	89
4.7.3	<u>Análise do conteúdo dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	92
4.7.4	<u>Análise do conteúdo dos de 4HNE dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	94
4.8	<b>Expressão do mRNA de proteínas envolvidas no metabolismo energético mitocondrial.....</b>	96
4.8.1	<u>Expressão do mRNA para CPT1 e UCP2 dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	96

4.8.2	<u>Expressão do mRNA para PPAR<math>\alpha</math> dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</u>	97
4.9	<b>Alterações bioquímicas hepáticas de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</b>	98
4.10	<b>Histologia do fígado de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</b>	99
4.11	<b>Histologia do coração de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</b>	102
4.12	<b>Análise da ultraestrutura dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida.....</b>	107
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	110
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	124
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	125

## INTRODUÇÃO

O aumento da prevalência da obesidade nas últimas décadas tem se tornado um problema de saúde pública em todo mundo, independente do grau de desenvolvimento do país. Esta epidemia envolve componentes genéticos, comportamentais, sociais, metabólicos e endócrinos. Assim, a relação entre nutrientes e hormônios que contribuem para o ganho de peso, ainda é uma questão em discussão.

Um conjunto de alterações cardiovasculares é causado pela obesidade, mostrando uma associação entre o crescimento na incidência de doenças crônicas, como o diabetes mellitus tipo 2 (DM2), as doenças coronarianas e a hipertrofia ventricular esquerda, que levam à cardiomiopatia, assim como outras doenças. Sabe-se que a obesidade, quando não tratada, compromete a função cardíaca e o metabolismo energético, aumentando a morbidade e mortalidade. Em grande parte dos estudos relacionados à obesidade, o comprometimento do metabolismo energético celular está associado à disfunção mitocondrial.

A presente tese teve como foco principal investigar o metabolismo energético e a fisiologia mitocondrial no coração ao longo do desenvolvimento de camundongos *Swiss* obesos submetidos à hiperalimentação durante a lactação. Para tal, utilizamos o modelo de redução de ninhada, implementado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento.

## 1 OBESIDADE

A obesidade é considerada uma epidemia independente do nível de desenvolvimento do país (WHO, 2008; CHOUDHURY, FRIEDMAN, 2011; KRZYSZTOSZEK, WIERZEJSKA, ZIELINSKA, 2015). A sua prevalência tem aumentado dramaticamente em todo o mundo ao longo das últimas décadas e tem se revelado como um dos mais importantes fenômenos clínicos e epidemiológicos da atualidade (ÁGUILA et al., 1998; DONG et al., 2007; ROGGE, 2009) (Figura 1). A Organização Mundial da Saúde classifica a obesidade como “a epidemia do século” e os números publicados atualmente são alarmantes. Considerando a população com sobrepeso e obesidade, utilizando o índice de massa corporal (IMC – massa corporal (kg)/estatura (m)<sup>2</sup>), estimou-se que 1,6 bilhão de pessoas no mundo acima de 15 anos de idade apresentavam excesso de peso (IMC  $\geq$  25 kg/m<sup>2</sup>), dos quais 400 milhões eram obesos (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) (OMS, 2015; HILLS et al., 2014). A projeção divulgada para o ano de 2015 indica aumento de 75% nos casos de obesidade, onde 2,3 bilhões de pessoas terão excesso de peso e 700 milhões serão obesas (OMS, 2015). Igualmente, dados publicados em 2013, pela International Association for the Study of Obesity e International Obesity TaskForce (IASO/IOTF), apontaram o elevado número de crianças em idade pré-escolar e adolescentes acima do peso que tendem a se tornar adultos obesos e manifestar precocemente as doenças relacionadas com a obesidade. Nos Estados Unidos, sua prevalência continua superior a 30%, independente do sexo ou faixa etária (FLEGAL et al., 2010).

Atualmente, no Brasil o sobrepeso atinge mais de 30% das crianças, cerca de 20% da população adolescente, nada menos que 49,1% das mulheres e 56,5% dos homens acima de 20 anos. Nesse grupo, concentra-se o maior percentual de obesos, 17,9%, em todas as faixas etárias e em todas as faixas de renda, houve um aumento contínuo e substancial do percentual de pessoas com excesso de peso e obesidade. Segundo pesquisa divulgada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), Ministério da Saúde em todas as regiões do país, a VIGITEL Brasil 2014 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), respectivamente.

Estudos clínicos e experimentais descrevem a obesidade como uma doença endócrina metabólica crônica, de origem multifatorial, envolvendo fatores genéticos, ambientais, sócio-culturais e econômicos, resultante do armazenamento excessivo de gordura no organismo somado à inatividade física (LEVY-COSTA et al., 2005; BEILIN, HUANG, 2008; POPKIN, 2011).

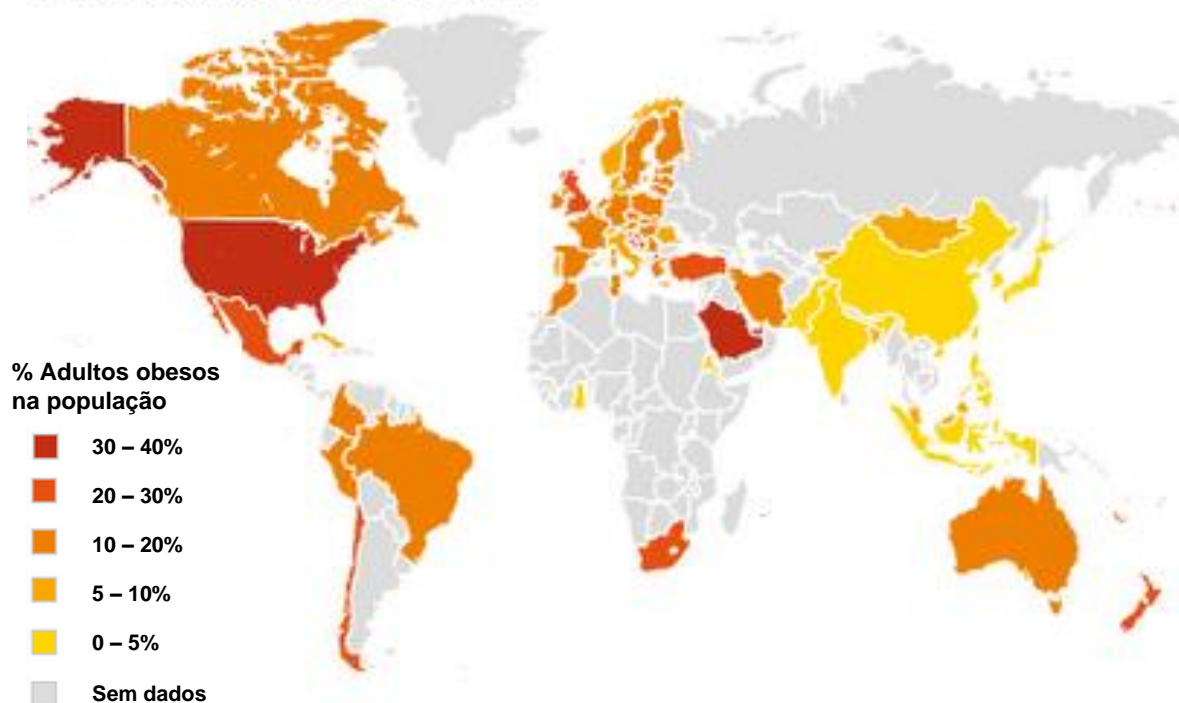
Em modelos animais, a obesidade pode ser avaliada por critérios baseados em: ganho de peso corporal ou índice de obesidade, conhecido como Índice de Lee, e/ou pelo aumento da massa de gordura corporal. Em seres humanos, pode ser diagnosticada através da medida da circunferência abdominal, que é um importante indicador de obesidade visceral, onde, a circunferência abdominal superior a 90cm em homens e 80cm em mulheres, de acordo com a etnia, representa um elevado risco cardiovascular (WHO, 2008; CAPINGANA et al., 2013).

Além das dificuldades naturais enfrentadas pelo excesso de peso, a obesidade pode, ao longo do tempo, acarretar problemas de saúde, levando a prejuízos ao indivíduo como redução da qualidade e da expectativa de vida. Além disso, a crescente prevalência da obesidade no Brasil e no mundo determina elevação da morbimortalidade nos pacientes e, conseqüentemente, maiores custos diretos e indiretos. A avaliação desses custos engloba setores tanto diretamente relacionados aos serviços de saúde, como outros setores da sociedade e aqueles indiretamente relacionados ao impacto sobre a qualidade de vida e a produtividade. Todos esses fatores têm conseqüências econômicas relevantes, daí a obesidade ser um problema de saúde pública com forte impacto na economia de um país (LAWLOR, CHATURVEDI, 2006; SICHIERI, DO NASCIMENTO, COUTINHO, 2007; KRZYSZTOSZEK, WIERZEJSKA, ZIELINSKA, 2015).

Desta forma, é essencial o combate à obesidade, e para tal, é necessária a investigação de sua etiopatogenia. Acredita-se que a obesidade estabelecida na idade adulta é um processo prospectivo com início na infância (OLIVEIRA, 2005). Estudos sugerem que alterações nutricionais no período fetal e pós-natal podem ser considerados vitais no desenvolvimento da obesidade, e também, no comprometimento de diferentes órgãos centrais e periféricos, levando a uma comorbidade associada ao ganho de peso e à síndrome metabólica (JAMES, RIGBY, LEACH, 2006).

Figura 1 - Prevalência de obesidade na população mundial

### O PROBLEMA DA OBESIDADE GLOBAL



O índice de massa corporal igual ou superior a 30 classifica um adulto como obeso

Fonte: Adaptação: Organização Mundial de Saúde, 2005.

<https://romarm.wordpress.com/2015/04/19/obesidade-o-mal-do-seculo/>. Acessado 16 ago. 2015

#### 1.1 Obesidade e programação metabólica por hiperalimentação durante a lactação

A programação metabólica define um processo no qual um estímulo durante períodos críticos da vida, tais como embrionário, fetal ou pós-natal, pode levar à consequências duradouras ou permanentes na idade adulta dos indivíduos (WATERLAND, GARZA, 1999; GUILLOTEAU et al., 2009). Além disso, estudos demonstram que alterações nutricionais no período gestacional, após o nascimento ou durante a lactação, causam alterações metabólicas importantes que levam ao surgimento da obesidade (SRINIVASAN, et al., 2003; ARMITAGE, TAYLOR, POSTON, 2005; TAYLOR, POSTON, 2007; FRIEDMAN, 2015).

A hiperalimentação é capaz de desencadear alterações fisiológicas prejudiciais a longo prazo. Fortes evidências obtidas em estudos com diversos modelos experimentais de hiperalimentação pós-natal mostraram que a lactação é um período crítico, uma vez que o organismo fica vulnerável a diversas modificações que podem se tornar definitivas na idade adulta da prole (PLAGEMANN et al., 1992; PLAGEMANN et al., 1999; MARTINS et al., 2008; PLAGEMANN et al., 2010; RODRIGUES et al., 2011; LACERDA-MIRANDA et al., 2012; SOARES et al., 2012; HABBOUT et al., 2013).

De acordo com a literatura, existem diversos modelos que estudam as alterações nutricionais no início da vida que levam à obesidade na idade adulta (PETEL, SRINIVASAN, 2002; 2010; NEVES et al., 2014). O modelo de hiperalimentação por redução de ninhada no terceiro dia da lactação, inicialmente descrito por Plagemann e colaboradores, gera um aumento na disponibilidade de leite para os filhotes hiperalimentados durante este período, devido à menor concorrência entre os filhotes pelo leite materno e aumenta o conteúdo de macronutrientes, como proteínas e triglicerídeos presentes no leite (PLAGEMANN et al., 1992; DÖRNER, PLAGEMANN, 1994; VOITS et al., 1996; CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2009).

O ganho excessivo de peso no início da vida pós-natal aumenta o risco para o aparecimento e manutenção da obesidade, assim como de doenças metabólicas associadas a ela, que resulta em hiperfagia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, hiperglicemia, resistência à insulina e maior adiposidade visceral já no desmame (STETTLER et al., 2005; MORRISON et al., 2008; MOREIRA et al., 2009; CONCEIÇÃO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; HABBOUT et al., 2013). Ao mesmo tempo, estudos sugerem que a persistência dos efeitos prospectivos de variações nutricionais na infância podem, também, ter como consequências modificações nos padrões de metilação do DNA em células específicas. Tais modificações, por sua vez, poderiam levar a alterações epigenéticas às células filhas através de replicações do DNA em tecidos específicos (PETEL, SRINIVASAN, 2002; LI et al., 2013).

Recentemente, trabalhos do nosso grupo demonstraram que alterações nutricionais na lactação induzem modificações permanentes na sinalização celular em cardiomiócitos e adipócitos através da modificação da ação dos hormônios insulina e leptina (PEREIRA et al., 2006; GARCIA-SOUZA et al., 2008; MARTINS et

al., 2008, LACERDA-MIRANDA et al., 2012; SOARES et al., 2012). Trabalhos epidemiológicos também mostraram que alterações na nutrição fetal e no estado endócrino podem provocar adaptações no desenvolvimento que predispõem a complicações cardiovasculares, metabólicas e doenças endócrinas na vida adulta (GODFREY, BARKER, 2000; ESTAMPADOR, FRANKS, 2014). Assim, a experiência nutricional no início da vida é cada vez mais reconhecida como um componente adicional para a causa do aparecimento de doenças crônicas na idade adulta (SMITH, RYCKMAN, 2015).

## **1.2 Obesidade e doenças cardiovasculares**

A obesidade tem sido considerada como um importante fator intimamente relacionado às doenças cardiovasculares (DCV) (WILSON et al., 2002). Os mecanismos fisiopatológicos que relacionam a obesidade com as DCV não estão bem esclarecidos. Entretanto, sabe-se que as DCV são a principal causa de morte na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento e, desta forma, é considerado um problema de saúde global (YUSUF et al., 2001). Vários estudos epidemiológicos mostram que os fatores de risco para DCV concentraram-se em crianças e jovens geralmente, são extrapolados para a idade adulta (YUSUF et al., 2001). Atualmente, as DCV são as responsáveis por aproximadamente 30% das mortes em todo o mundo, incluindo cerca de 40% em países de alta renda e cerca de 20% em países de média e baixa renda. A tendência global nas mortes por doenças DCV prevê uma taxa estimada de 32% para o ano de 2020, com uma maior contribuição dos países de média e baixa renda, em comparação com países de alta renda (YUSUF et al., 2001; CAPINGANA et al., 2013).

A obesidade também contribui de forma importante tanto para a hipertrofia, como para a disfunção cardíaca (CARROLL et al., 2005; GUZZARDI, 2011). Além disso, sabe-se que o aumento da massa ventricular esquerda (MVE) é um fator de risco importante para eventos de doença cardiovascular, e que a maior parte das doenças cardíacas acompanha-se de aumento da massa miocárdica (FRANCHINI, 2001). A hipertrofia ventricular esquerda (HVE) tem sido associada com diabetes melito e intolerância à glicose em várias investigações epidemiológicas, sendo o principal fator de risco independente para a morbidade e mortalidade cardiovascular

(DEVEREUX et al., 2000). Ela é definida como um processo celular marcado pelo aumento dos cardiomiócitos, acúmulo de proteínas sarcoméricas, reorganização da estrutura miofibrilar e alterações mitocondriais. Por consequência, o conjunto desses eventos leva ao comprometimento da função cardíaca e do metabolismo energético do coração (YANG et al., 2007, VENTURA-CLAPIER et al., 2011; LACERDA-MIRANDA et al., 2012; NEVES et al., 2014).

Além disso, a HVE é considerada como uma resposta adaptativa do coração às alterações hemodinâmicas, resultando em aumento da massa cardíaca, devido a estímulos fisiológicos (crescimento, exercício, gravidez, entre outros) ou a estados patológicos (hipertensão, insuficiência cardíaca, entre outros). Os mecanismos que levam à hipertrofia durante os estados fisiológicos e patológicos são bem diferentes, mas em geral, evidências indicam que a hipertrofia resulta da interação entre forças mecânicas e fatores neuro-hormonais. 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 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, PEREIRA et al., 2014).

Isto ocorre, pelo menos em parte, devido à diminuição na expressão de genes envolvidos na oxidação dos ácidos graxos, incluindo aqueles cuja expressão é regulada pelo receptor ativado do proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- $\alpha$ ) e seu coativador (PGC1- $\alpha$ ), que resulta no acúmulo ectópico de triglicerídeos nos cardiomiócitos (ARANY et al., 2006). Essa condição adaptativa é conhecida como esteatose cardíaca e gera um efeito tóxico nos cardiomiócitos, conhecido como cardiomiopatia lipotóxica (MAHMOD et al., 2013). A infiltração lipídica inicia o processo de apoptose das células cardíacas, levando a um remodelamento do ventrículo esquerdo, e, consequente desordem na interação entre o metabolismo e a contração, progredindo para uma disfunção e falência cardíaca, o que explica o aumento de morte por doenças cardiovasculares em indivíduos obesos (DROSATOS, SCHULZE, 2013).

A insuficiência cardíaca (IC) está associada com a obesidade e a resistência à insulina. É uma síndrome crônica complexa e multicausal, caracterizada por uma

disfunção miocárdica profunda que resulta na incapacidade da bomba cardíaca em manter as necessidades periféricas do organismo. Ou seja, origina uma incompatibilidade entre a demanda do organismo e a capacidade do coração para exercer a sua função de bombeamento. Esta incompatibilidade pode resultar da diminuição da oferta de oxigênio e a disponibilidade de substrato causada pela hipóxia crônica, aterosclerose, doença arterial coronária ou defeitos mitocondriais induzidos por fatores genéticos ou tóxicos (BOUDINA, 2009; BLECKER, HERBERT, BRANCATI et al., 2012).

Também pode resultar do aumento da carga de trabalho do miocárdio, como uma hipertensão, por exemplo, a partir de alterações na estrutura cardíaca ou utilização ineficiente de ATP, levando a uma perda na utilização de energia. Como consequência da falha do bombeamento, o oxigênio e o substrato não são ofertados devidamente aos tecidos periféricos, criando um estado deficiente de energia para o organismo e o coração (METTAUER et al., 2006; VENTURA-CLAPIER et al., 2011).

Atualmente, a IC é considerada a via final comum da maioria das cardiomiopatias e outras doenças do aparelho circulatório, oriundas primariamente da disfunção ventricular e representa um importante problema de saúde pública no Brasil e no mundo devido à sua crescente prevalência e morbi-mortalidade associada. Um estudo publicado na revista Arquivos Brasileiros de Cardiologia demonstra que, 340 mil pessoas por ano morrem em todo o Brasil devido a doenças do aparelho circulatório, o que representa aproximadamente 40% dos óbitos ocorridos no País (ALBURQUEQUE et al., 2015).

A combinação dos fatores de risco cardiometabólicos, incluindo a obesidade visceral, intolerância à glicose ou DM2, 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 DM 2 (DI CHIARA et al., 2012; BURROWS et al., 2015).

Diferentes patologias estão associadas às alterações na utilização de substratos energéticos pelo coração e, conseqüentemente, com a redução da função cardíaca. Durante a última década, evidências clínicas e experimentais têm demonstrado que a seleção do combustível é consideravelmente alterada no coração hipertrófico (VAN DER VUSSE, BILSEN, GLATZ, 2000; KOLWICZ, TIAN, 2011).

Desta forma, considerando a obesidade como potencial mediador de morbidade e mortalidade cardiovascular, buscamos ampliar a compreensão o metabolismo energético na disfunção cardíaca. Contudo, é importante primeiro ter um conhecimento sólido sobre o metabolismo energético normal do coração.

### 1.3 Metabolismo energético do coração

Em condições fisiológicas, o metabolismo energético do coração desde o período pré-natal, é finamente controlado e dinâmico. Talvez seja a fase em que melhor se possa estudar a relação entre a disponibilidade, utilização de nutrientes e a dinâmica metabólica. Sabe-se que o coração está entre os órgãos que mais consomem energia e necessita de um fornecimento constante de combustível e oxigênio, a fim de manter o nível de ATP intracelular para o ciclo de contração/relaxamento do miocárdio sem interrupções (BERTRAND et al., 2008; VENTURA-CLAPIER et al., 2011). O miocárdio de animais neonatos, em condições fisiológicas, tem uma alta capacidade de utilização de glicose, enquanto que animais adultos utilizam primordialmente ácidos graxos (AG), lactato e corpos cetônicos como fonte primária de energia. Ou seja, as modificações da dinâmica de utilização energética ocorrem numa janela estreita de tempo (LOPASCHUK et al., 1991).

A geração de energia depende do ambiente cardíaco, incluindo o fluxo coronariano, o fornecimento de substrato, hormônios e estado nutricional. Os principais combustíveis envolvidos na manutenção da função cardíaca são o lactato (10%), a glicose (20%) e os ácidos graxos (60-70%) (RUSSELL, FINK, KELLY, 2005). Esta preferência de substrato deve-se ao fato de que a oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa inibe a captação e o catabolismo da glicose através do ciclo de Randle. Tendo em conta a importância destes substratos no metabolismo energético do coração, descreveremos resumidamente o metabolismo de carboidratos, lipídios e a via de sinalização de insulina nesse órgão nos tópicos a seguir.

### 1.3.1 Metabolismo dos carboidratos

Os carboidratos são as moléculas orgânicas mais abundantes na natureza e possuem grande variedade de funções, que incluem o fornecimento de fração significativa de energia na dieta da maioria dos organismos e atuam como forma de armazenamento de energia no corpo. 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. (STANLEY, RECCHIA, LOPASCHUK, 2005). Os substratos glicolíticos são derivados da glicose exógena e das reservas de glicogênio.

O metabolismo de carboidratos inicia-se com a oxidação da glicose, sendo o piruvato o produto final da glicólise nas células com mitocôndrias e com fornecimento adequado de oxigênio (Figura 2) (DYCK, LOPASCHUK, 2002). A glicólise aeróbia prepara as condições necessárias para a descarboxilação oxidativa do piruvato à Acetil-Coenzima A (Acetil-CoA), que é o principal combustível para o ciclo do ácido cítrico (DYCK, LOPASCHUK, 2002). Após a captação da glicose, a mesma é rapidamente fosforilada pela hexoquinase (HK) à glicose-6-fosfato, em tecidos periféricos, SNC e músculo esquelético.

A fosfofrutocinase-1 (PFK-1) é uma enzima chave reguladora que catalisa uma das reações irreversíveis da via glicolítica. A mesma utiliza ATP para produzir frutose-1,6-bifosfato, que é ativada pelo ADP, AMP e Pi e é inibida por ATP, acelerando, assim, o fluxo da via glicolítica. A PFK-1 também pode ser estimulada por frutose-2,6-bi-fosfato (F2,6BP) e inibida por frutose-1,6-bi-fosfato e pela diminuição do pH. O grau de inibição da PFK-1 pela concentração de hidrogênio depende dos níveis de ATP, quando estes se encontram elevados. O citrato é um regulador alostérico da PFK-1 ligado ao metabolismo oxidativo mitocondrial da glicólise. O acúmulo de citrato contribui para a diminuição da glicólise, que ocorre em vários tecidos quando há um aumento da oxidação de ácidos graxos (STANLEY, RECCHIA, LOPASCHUK, 2005; BERTRAND et al., 2008). Uma série de hormônios como insulina, epinefrina e outros, que ativam a glicólise exercem o controle de fosforilação pela PFK-2. Além disso, a ativação e fosforilação da PFK-2 pela AMPK é um mecanismo interessante para a compreensão da aceleração da glicólise induzida pelo AMP (MARSIN et al., 2000; BERTRAND et al., 2008). A conversão do gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bifosfoglicerato é catalizada pela enzima

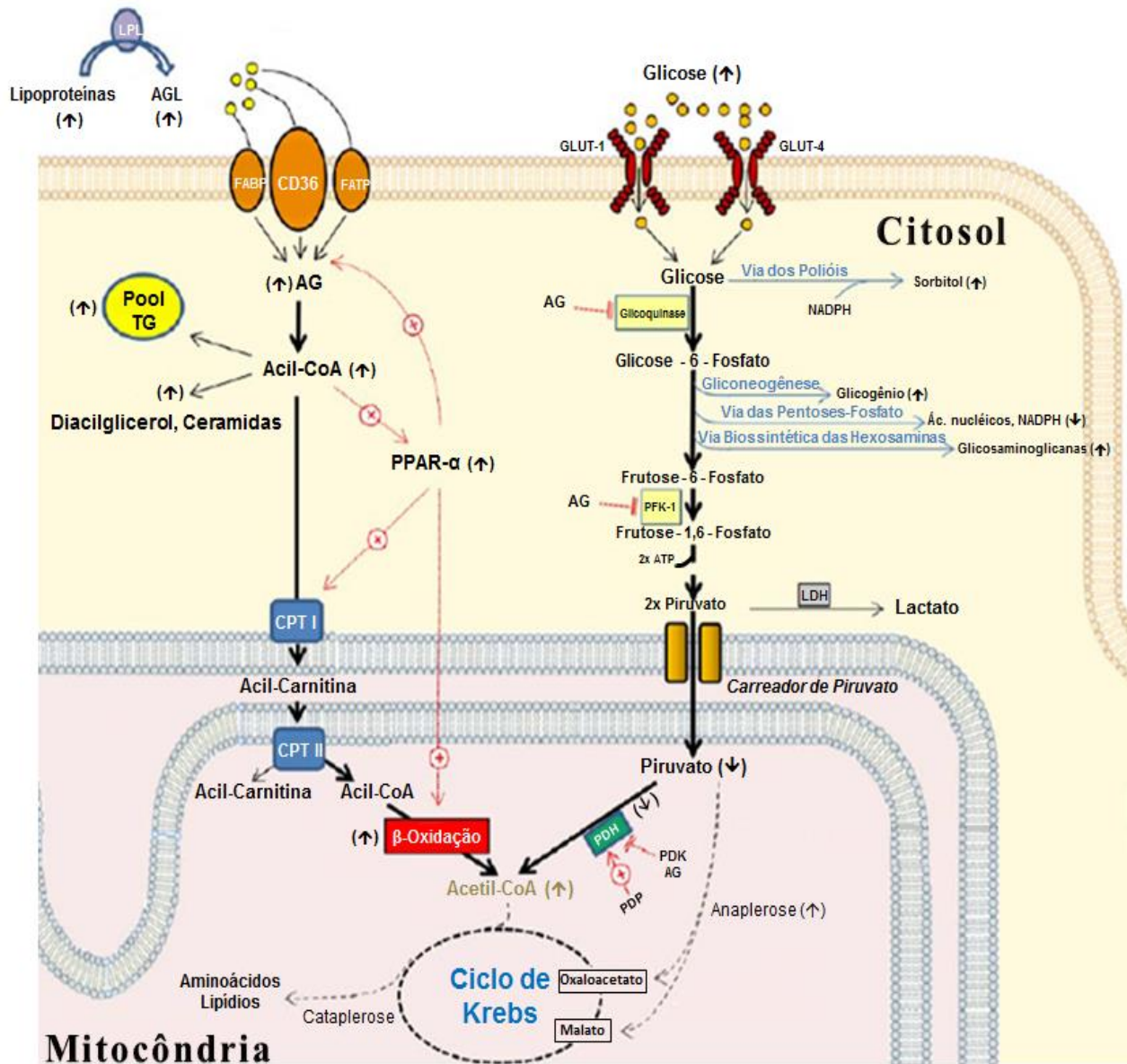
gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e produz duas moléculas de NADH originadas da glicólise. A GAPDH cataliza uma das principais reações da via glicolítica, porque o acúmulo de NADH + H<sup>+</sup> no citoplasma celular inibe a sua taxa de reação. Em contra partida, o aumento de NAD<sup>+</sup> ativa a GAPDH. O piruvato formado na via glicolítica pode converter-se em lactato, descarboxilar-se e formar Acetil-CoA, ou converter-se em malato.

A descarboxilação oxidativa do piruvato é o passo chave irreversível na oxidação dos carboidratos, catalizada pelo complexo multienzimático piruvato desidrogenase (PDH). A PDH é inativada quando fosforilada pela piruvato desidrogenase quinase (PDK) e é ativada pela desfosforilação através de PDH fosfatase. A PDK é inibida pelo piruvato e pela diminuição das razões Acetil-CoA/CoA livre e NADH + H<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup> (STANLEY, RECCHIA, LOPASCHUK, 2005). A atividade da PDH fosfatase é aumentada pelos níveis de Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>. A estimulação adrenérgica do coração aumenta o Ca<sup>+2</sup> citosólico transitório e a concentração mitocondrial de Ca<sup>+2</sup>, resultando na ativação da PDH, explicando, assim, a ativação da PDH e maior oxidação do piruvato em resposta ao aumento dos receptores adrenérgicos induzidos no coração (SHARMA et al., 2005).

A oxidação da glicose, piruvato e a atividade da PDH no coração são diminuídas por elevadas taxas de oxidação dos ácidos graxos. A taxa máxima de oxidação do piruvato em qualquer momento é definido pelo grau de fosforilação do complexo enzimático PDH. No entanto, o fluxo real é determinado pelas concentrações de substratos e produtos na matriz mitocondrial, já que estes controlam o fluxo da participação ativa do complexo desfosforilado (STANLEY, RECCHIA, LOPASCHUK, 2005). Assim, cada molécula de glicose e NAD<sup>+</sup> que entram na via glicolítica se converte em glicose-6-fosfato e gera duas moléculas de piruvato, NADH + H<sup>+</sup> e ATP. O NADH+H<sup>+</sup> e o piruvato formados nesta via entram na matriz mitocondrial para gerar CO<sub>2</sub> e NAD<sup>+</sup> e completar o processo de oxidação da glicose, ou são convertidos em lactato e NAD<sup>+</sup> no citoplasma por ação da lactato desidrogenase (LDH) (glicólise anaeróbia) (LOPASCHUK, FOLMES, STANLEY, 2007). A LDH é uma enzima amplamente expressa no coração, fígado e outros tecidos, e desempenha um papel importante na glicólise e gliconeogênese. Existem cinco isoformas de LDH, nomeadas de acordo com suas migrações eletroforéticas. Cada enzima é composta de quatro subunidades do tipo H ou M. A isoforma

cardíaca é constituída predominantemente de subunidade H, e é conhecida como LDH-1 (LOPASCHUK, FOLMES, STANLEY, 2007).

Figura 2 - Metabolismo da glicose e ácidos graxos em cardiomiócitos



Legenda: A captação de substratos ocorre através de transportadores específicos. Os ácidos graxos são submetidos a  $\beta$ -oxidação na mitocôndria, principalmente sob controle do receptor ativado do proliferador de peroxissoma alfa (PPAR- $\alpha$ ). Setas em negrito referem-se ao fluxo de moléculas de glicose através de diversas vias metabólicas e principalmente pela via da glicólise. Setas em parênteses indicam a direção das mudanças observadas nos cardiomiócitos de diabéticos tipo II em comparação a células normais. ATP: Trifosfato de adenosina; CPT: Carnitina palmitoil transferase; FABP: Proteína de ligação de ácidos graxos de membrana plasmática; FATP: Proteína transportadora de ácidos graxos; GLUT: Transportador de glicose; LDH: Lactato desidrogenase; LPL: Lipoproteína lipase; NADPH: Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina fosfatase-oxidase; PDH: Piruvato desidrogenase; PDK: Piruvato desidrogenase quinase; PDP: Piruvato desidrogenase fosfatase; PFK: Fosfofrutoquinase; TG: Triglicerídeos.

Fonte: Adaptação: AMARAL N., OKONKO D. O. 2015.

### 1.3.2 Metabolismo dos ácidos graxos

Em condições fisiológicas, cerca de 60 a 90% de Acetil-CoA utilizado no coração é proveniente da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, e cerca de 10 a 40% provêm da descarboxilação oxidativa do piruvato derivado da glicólise e da oxidação do lactato em iguais quantidades (STANLEY et al., 1997). Em condições fisiológicas normais, os ácidos graxos de cadeia longa são importantes substratos oxidáveis para o coração. Devido à sua baixa solubilidade em água, os ácidos graxos são fornecidos para o coração ligados à albumina plasmática ou ligados covalentemente ao núcleo de triacilgliceróis das lipoproteínas circulantes (MERKEL, ECKEL, GOLDBERG, 2002; AUGUSTUS et al., 2003) (Figura 2). Posteriormente, os ácidos graxos atravessam o sarcolema e o citoplasma para serem convertidos em acil-CoA na membrana externa mitocondrial e no retículo sarcoplasmático. Em um processo mediado pela carnitina, a maior parte destes derivados de ácidos graxos passam para o interior da mitocôndria e são degradados nas vias de  $\beta$ -oxidação e do ciclo do ácido cítrico.

Os ácidos graxos entram nos cardiomiócitos tanto por difusão passiva, como por transporte de proteínas através do sarcolema mediado por uma translocase (FAT/CD36) e uma proteína de ligação a ácidos graxos na membrana (FABPpm). Uma proteína específica de 88 KDa FAT, chamada CD36, é expressa abundantemente na musculatura esquelética e no músculo cardíaco, a qual parece regular parcialmente as taxas de captação de ácidos graxos no coração de humanos, visto que pessoas com mutações no gene CD36 têm menores taxas de captação do análogo de ácido graxos de cadeia longa em comparação a pessoas normais (MERKEL, ECKEL, GOLDBERG, 2002; SCHAFFER, 2002). 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 captação de ácidos graxos (LUIKEN et al., 2002; LUIKEN et al., 2003). Uma vez no citosol, os ácidos graxos de cadeia longa são esterificados a Acil CoA 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  $\beta$ -oxidação ou são esterificados no miocárdio.

A  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos ocorre em dois compartimentos celulares, primariamente na mitocôndria e, em menor proporção, nos peroxissomas (SCHULZ,

1994). Os primeiros produtos da oxidação dos ácidos graxos são  $\text{NADH} + \text{H}^+$ ,  $\text{FADH}_2$  e Acetil-CoA. Antes da  $\beta$ -oxidação na mitocôndria, o acil-CoA deve ser transportado primeiro para a matriz mitocondrial através de um sistema de transporte dependente de carnitina. A CPT1 catalisa primeiro a formação do acil-carnitina de cadeia longa a partir do acil-CoA de cadeia longa para o espaço intermembrana e, em seguida, a carnitina aciltranslocase transporta a acil-carnitina através da membrana mitocondrial interna em troca de carnitina. Das três enzimas transportadoras envolvidas no transporte mitocondrial, a CPT1 serve como enzima reguladora chave do controle das taxas de ácidos graxos pela mitocôndria (SCHULZ, 1994). Porém, a atividade da CPT1 é fortemente inibida por malonil-CoA (KERNER, HOPPEL, 2002). Malonil-CoA é um regulador chave fisiológico do metabolismo de ácidos graxos no coração. É formada pela carboxilação de Acetil-CoA catalizada pela Acetil-CoA carboxilase (ACC). A maior parte da Acetil-CoA nos cardiomiócitos se encontra na mitocôndria, entretanto, a ativação da CPT1 é regulada pela malonil-CoA, formada através da carboxilação do Acetil-CoA extra-mitocondrial (MCGARRY, BROWN, 1997; KERNER, HOPPEL, 2000).

A atividade da Acetil-CoA carboxilase (ACC) é inibida pela fosforilação da AMPK (KUDO et al., 1995; MUOIO et al., 1999). A ativação da ACC pode resultar na formação de malonil-CoA e diminuir a oxidação de ácidos graxos. Portanto, a ativação da AMPK pode exercer efeito tanto no metabolismo de carboidratos quanto no de ácidos graxos (DYCK et al., 1999). A degradação do malonil-CoA é regulada pela atividade da malonil-CoA descarboxilase (MCD), a qual converte malonil-CoA a Acetil-CoA e  $\text{CO}_2$  no citosol e na mitocôndria (DYCK, LOPASCHUK, 2000; HAMILTON, SAGGERSON, 2000). Quando há um aumento na atividade da MCD ocorre, conseqüentemente, uma queda da malonil-CoA no miocárdio e, por isso, haverá um aumento nas taxas de oxidação de ácidos graxos, ao passo que seu aumento suprime a oxidação dos ácidos graxos (SADDIK et al., 1993; STANLEY et al., 1996).

Após a captação dos ácidos graxos na mitocôndria, estes passam pelo processo de  $\beta$ -oxidação, gerando  $\text{NADH} + \text{H}^+$  e  $\text{FADH}_2$ . 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; HASSELBANK et al., 2003; STANLEY et al., 2003).

Estudos recentes demonstram que os ácidos graxos são capazes de estimular seu próprio catabolismo através de um conjunto de receptores nucleares chamados de receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo (PPARs), que controlam a expressão de uma variedade de genes envolvidos no metabolismo lipídico e homeostase de energia (MOTOJIMA et al., 1998; BERGER, MOLLER, 2002; ATHERTON et al., 2009; BARANOWSKI, BLACHNIO-ZABIELSKA, GORSKI, 2009). Das Três isoformas de PPAR (PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\beta$  e PPAR- $\gamma$ ), o PPAR- $\alpha$  é a isoforma com maior afinidade de ligação aos ácidos graxos (DESVERGNE, WHALI, 1999; ATHERTON et al., 2009). O PPAR- $\alpha$  é altamente expresso em tecidos com alta taxa catabólica, tais como fígado, rins, músculo esquelético e coração (BRAISSANT et al., 1996). Sua ativação resulta na transcrição de genes que controlam o transporte de ácidos graxos, a absorção intracelular e o catabolismo (ATHERTON et al., 2009).

### 1.3.3 Via de sinalização de insulina

O transporte de glicose nos cardiomiócitos é regulado pelo gradiente transmembranar e pelo conteúdo de transportadores de glicose no sarcolema (GLUT) (Figura 3). Estes transportadores são expressos no miocárdio, nomeadamente GLUT4 e GLUT1. O GLUT4 (70%) é sensível à ação da insulina e encontra-se amplamente distribuído em vesículas intracelulares em condições de aporte adequado de oxigênio. O GLUT1 (30%) é independente da ação da insulina, sendo responsável pela captação basal de glicose em condições de jejum, quando as concentrações séricas são mais baixas (YOUNG et al., 1997; RAMASAMY et al., 2001). Estes GLUTs são transportadores críticos para a manutenção da morfologia e das funções normais do coração (BECKER et al., 2001). Assim, esta etapa de transporte de glicose através da membrana plasmática é o passo inicial e limitante para a utilização do substrato pelos cardiomiócitos. Ambos os GLUTs não se localizam apenas no sarcolema, mas também em compartimentos de armazenamento intracelular. Além disso, são bem regulados, principalmente durante o período pós-natal, quando ocorre a substituição do GLUT1 por GLUT4 (FRIEHS et

al., 2003). Os hormônios, como por exemplo tireoidianos e insulina, são reguladores deste processo, promovendo a indução de GLUT4 e repressão de GLUT1 (CASTELLÓ et al., 1994).

Em resposta ao estímulo de insulina (Figura 3), o aumento da demanda de trabalho ou isquemia, há a translocação dos transportadores de glicose GLUT1 e GLUT4 das vesículas intracelulares para a membrana do sarcolema, o que leva a um aumento na taxa de captação de glicose, mediado pela PI3K (Fosfatidilinositol-3-quinase) (SLOT et al., 1991; SUN et al., 1994; YOUNG et al., 1997; FRIEHS et al., 2003). O lactato é outro estímulo para o incremento na capacidade de captação de glicose, independente da PI3K (MEDINA et al., 2002). A translocação do GLUT4 para a membrana plasmática também é estimulada pela ativação da proteína ativada por AMP (AMPK), que ocorre no coração durante o exercício (STANLEY, RECCHIA, LOPASCHUK, 2005) e parece ter um papel importante na captação de glicose induzida pela isquemia (RUSSET et al., 2004).

A insulina, além de estimular os transportadores de glicose, atua no metabolismo como: na oxidação de glicose, síntese de glicogênio e síntese protéica (SALTIEL, KAHN, 2001; BELKE, et al., 2002; SHIOJIMA et al., 2002). É um hormônio protéico secretado pelas ilhotas pancreáticas, essencial para a manutenção da homeostase glicêmica, do crescimento e diferenciação celular (WICKSTEED et al., 2003). Além disso, é também um hormônio com secreção diretamente determinada por nutrientes, em resposta a um aumento da glicemia e dos níveis de aminoácidos circulantes após a refeição. Para regular a homeostase glicêmica, a insulina reduz a produção hepática de glicose, com a diminuição da gliconeogênese e da glicogenólise, aumentando a sua captação periférica, principalmente nos tecidos muscular e adiposo. Também estimula a lipogênese no fígado e no tecido adiposo. Além disso, é capaz de aumentar a síntese e inibir a degradação de proteínas.

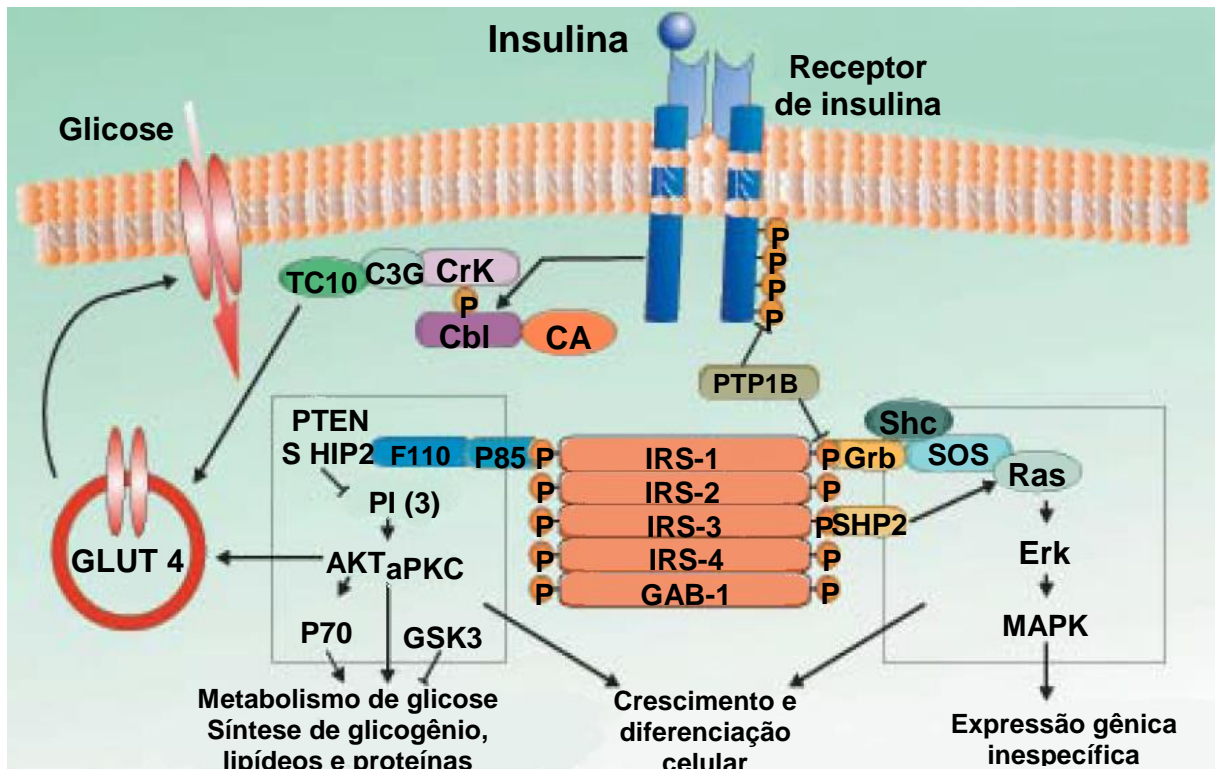
A captação de glicose pelos cardiomiócitos é mediada por um processo de difusão facilitada, na qual a glicose se move a favor do seu gradiente de concentração nas células (SUN et al., 1994) (Figura 3). Quando os níveis de glicose no sangue se encontram elevados, inicia o processo de secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas. Uma vez liberada na corrente sanguínea, a insulina se liga ao seu receptor (IR), que é constituído por duas subunidades extracelulares  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , ligadas por pontes dissulfetos numa estrutura tetramérica  $\alpha_2\beta_2$

(TCHECA, CORVERA, 1999). A subunidade  $\alpha$  contém o sítio de ligação à insulina e a subunidade  $\beta$  é a responsável pela transmissão do sinal, além de possuir atividade tirosina quinase. A ligação da insulina ao seu receptor gera uma mudança conformacional, que ativa o domínio tirosina quinase da subunidade intracelular e desencadeia uma cascata de fosforilação de proteínas que consistem na ativação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1) e cria sítios de reconhecimento para a subunidade regulatória P<sup>85</sup> da PI3K. Uma vez ativada, a PI3K promove a fosforilação e ativação da proteína quinase B (AKT) e proteína quinase C (PKC) (TCHECA, CORVERA, 1999). Outra proteína envolvida na translocação de GLUTs é a proteína tirosina-fosfatase 1B (PTP1B), que é a responsável pela desfosforilação do receptor de insulina e seus substratos.

Finalmente, o sinal é transmitido para as vesículas de armazenamento do GLUT4, que estimula sua translocação para a membrana plasmática e, posteriormente, a glicose é incorporada pelas células. Este sistema é importante para manter a homeostase da glicose. Portanto, quando este sistema de transporte se encontra deficiente no músculo esquelético ou cardíaco leva à hiperglicemia e subsequente resistência à insulina (NISHIUMI et al., 2010).

A resistência à insulina (RI) resulta em uma série de alterações na cascata de sinalização da insulina, tais como a inibição da fosforilação do substrato do receptor de insulina-1 (IRS-1), da proteína quinase B (Akt) e da proteína glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) (CHANG, CHIANG, SALTIEL, 2004). Através da Akt, a insulina controla a síntese de glicogênio no fígado e no músculo esquelético, inativando a GSK-3 e ativando a glicogênio sintetase. Além disso, em períodos de excesso de carboidratos, a insulina estimula a síntese de ácidos graxos no fígado, e na situação de excesso de adiposidade e resistência à insulina, interfere na quantidade de ácidos graxos livres (AGL) circulantes, promovendo a gliconeogênese no fígado.

Figura 3 - Via de sinalização de insulina



Fonte: Adaptação SALTIEL A. R., KAHN C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. V. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec. 2001.

#### 1.3.4 Metabolismo energético do coração na obesidade

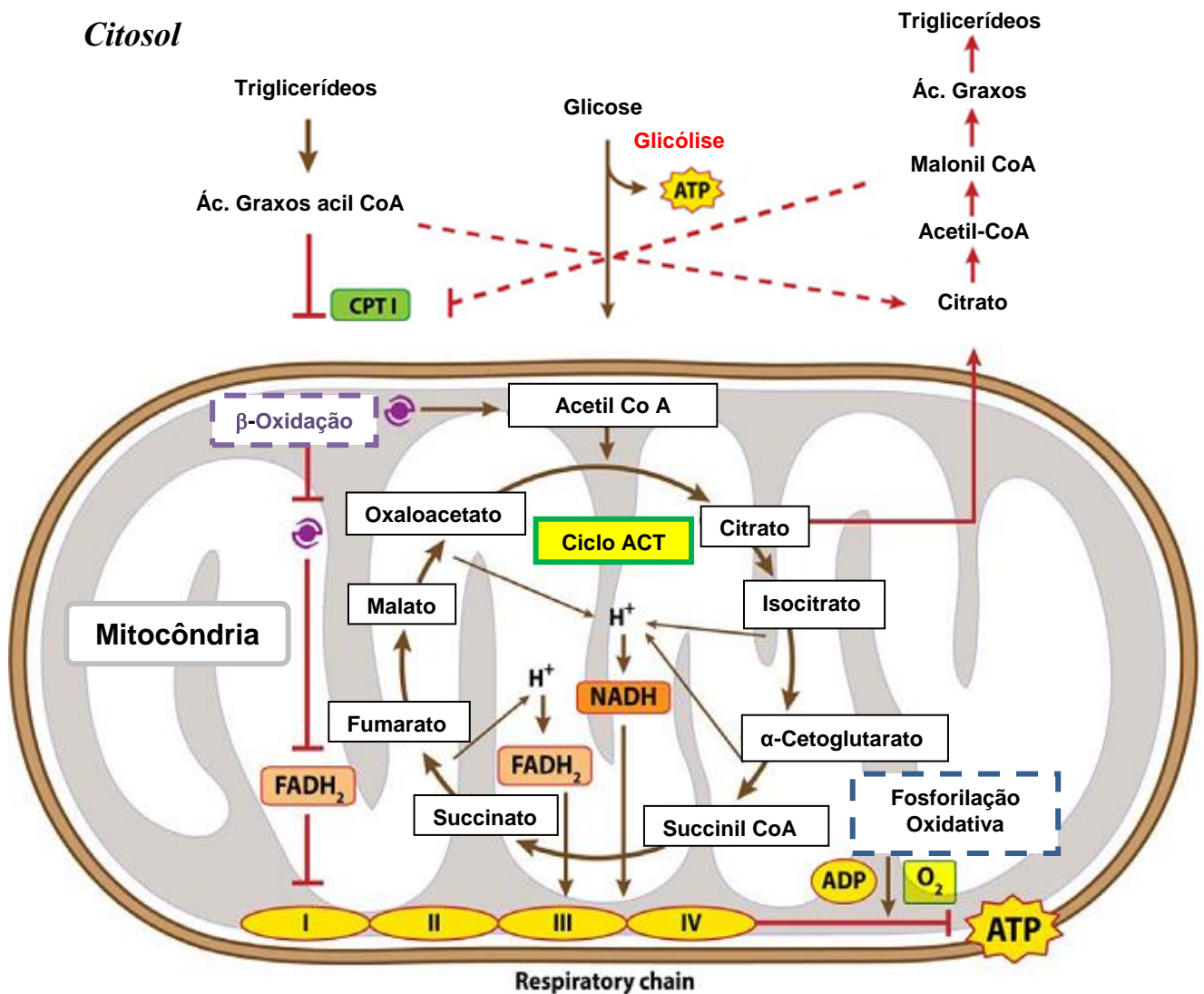
Está bem definido na literatura que a obesidade aumenta o risco para desenvolvimento de doença coronária e insuficiência cardíaca. A epidemia da obesidade é, provavelmente, uma importante força motriz para a perpetuação das doenças isquêmicas do coração nos países desenvolvidos e para o aumento de mortes relacionadas à doença cardiovascular nos países em desenvolvimento (KENCHIAH et al., 2002; WILSON et al., 2002; LAWLOR, CHATURVEDI, 2006).

Estudos recentes sugerem que alterações ocorridas no metabolismo dos ácidos graxos no coração em indivíduos obesos (Figura 4) podem ter um papel causal no desenvolvimento das cardiomiopatias relacionadas com a obesidade, uma vez que tanto um fenótipo metabólico alterado, como o aumento nos níveis de ácido graxo e de triglicerídeos, pode levar ao acúmulo de lipídeos no coração e à

utilização excessiva de ácidos graxos (LOPASCHUK, FOLMES, STANLEY, 2007). Ao analisar a relação entre a obesidade e o metabolismo energético cardíaco, é importante reconhecer que as mudanças na função cardíaca e no metabolismo da obesidade não ocorrem isoladamente de outras desordens metabólicas (RUDERMAN et al., 1998). As alterações na obesidade contribuem para a hipertensão, desenvolvimento de hipertrofia cardíaca, cardiomiopatias e disfunção diastólica (AVELAR et al., 2007).

O acúmulo de lipídeos no miocárdio é atribuído a um desequilíbrio entre a captação e a utilização de ácidos graxos pelos cardiomiócitos (BOUDINA et al., 2005). Embora os altos níveis de ácidos graxos circulantes pareçam contribuir de forma importante para o acúmulo de lipídeos no miocárdio, ainda não está bem claro de que forma as alterações nas taxas de oxidação dos ácidos graxos contribuem para este fato.

Figura 4 - Produção de energia mitocondrial prejudicada



Legenda: Na obesidade ocorre a intolerância à glicose, diabetes tipo 2 e a  $\beta$ -oxidação é reduzida nas células do 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), Acil-CoA são convertidos em malonil-CoA que os resintetizam em ácidos graxos, que podem se acumular dentro da célula ou ser transportado para outros tecidos como triglicerídeos. A redução da capacidade de utilizar os ácidos graxos para produção de ATP aumenta em indivíduos obesos a dependência sobre a glicólise. NOTA: 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.

Fonte: Adaptação: ROGGE, M. M. 2009.

## 1.4 Bioenergética mitocondrial

### 1.4.1 Mitocôndria

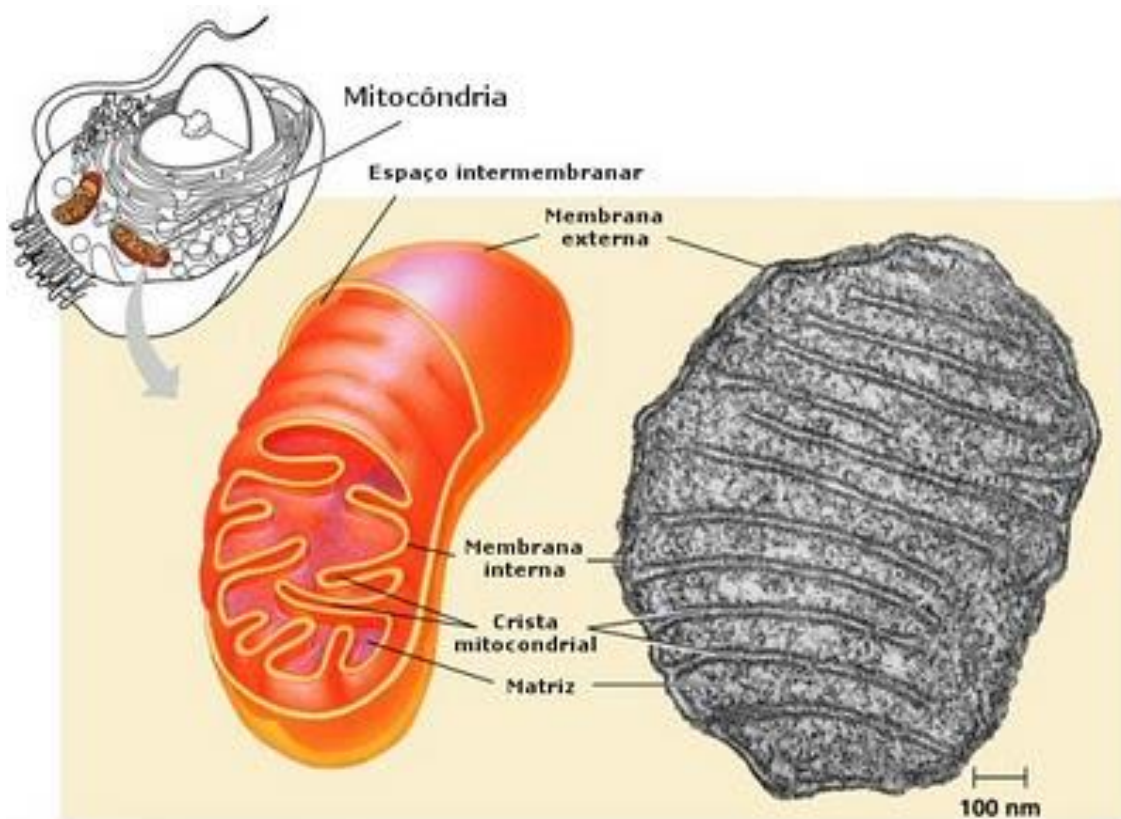
A mitocôndria, antes considerada uma organela estática, hoje é reconhecida por sua dinâmica, caracterizada pela movimentação intracelular e regulação de sua arquitetura, localiza-se em locais intracelulares onde há maior necessidade de energia. (FREDERICK, SHAW, 2007) (Figura 5).

Está presente em grande quantidade nas células do sistema nervoso, do coração e do músculo esquelético (BHOPAL, RAFNSSON, 2009; GERSHONI, TEMPLETON, MISHMAR, 2009). Estruturalmente, é formada por uma membrana externa e outra interna, separadas por um espaço intermembranar que contém várias enzimas e onde se acumulam prótons transportados da matriz. 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. A região limitada pela membrana interna é conhecida como matriz mitocondrial, onde existem proteínas, ribossomos e DNA mitocondrial (que contém genes codificadores de proteínas, de RNA ribossomal e de RNA de transferência), necessários e/ou responsáveis por várias funções mitocondriais (KOWALTOWSKI et al., 2009).

As mitocôndrias desempenham um papel crítico na manutenção da função celular. Elas também são uma poderosa fonte de radicais livres e fatores pró-apoptóticos (ROSCA, HOPPEL, 2010). Dessa forma, a manutenção da homeostase mitocondrial é essencial para a viabilidade celular. Responsável pela fonte primária de energia na forma de ATP, as mitocôndrias fornecem o combustível necessário para o aparelho contrátil e, portanto, são primordiais para o bombeamento cardíaco. Com o intuito de manter a atividade elétrica e mecânica (contratilidade e relaxamento diastólica), o coração precisa de um fornecimento contínuo de energia, sendo essa exigência alcançada pela síntese diária de aproximadamente 30 kg de energia em forma de ATP, produzidos principalmente por fosforilação oxidativa

mitocondrial (ASHRAFIAN, FRENNEAUX, 2007). Para o fornecimento adequado de ATP ao cardiomiócito, a função mitocondrial é regulada de maneira transiente, de acordo com a necessidade energética celular, por meio de vias de sinalização que envolvem mensageiros intermediários, como o  $\text{Ca}^{2+}$  e as espécies reativas de oxigênio.

Figura 5 - Estrutura da mitocôndria



---

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

#### 1.4.2 Função mitocondrial

A mitocôndria é a organela central do metabolismo energético, sendo a principal fonte de produção de energia (bioenergética mitocondrial) para a célula. Desempenham um papel importante na vida e na morte celular, na diferenciação da maioria dos tecidos e no desenvolvimento de todo o organismo. Dentre as funções

metabólicas que ocorrem na matriz mitocondrial, se destaca a síntese de ATP por meio do acoplamento da fosforilação oxidativa com a cadeia de transporte de elétrons (CTE) (Figura 6), sendo auxiliado pelo ciclo do ácido cítrico (ou ciclo de krebs) e pelo processo de  $\beta$ -oxidação. Elas são coordenadoras centrais e locais das transformações bioquímicas essenciais do metabolismo energético. Estas organelas têm sido focadas no estudo das doenças metabólicas, como ligações das alterações nas funções mitocondriais com transtornos associados à síndrome metabólica (NISOLI et al. 2007; CARDOSO, QUELICONI, KOWALTOWSKI, 2010).

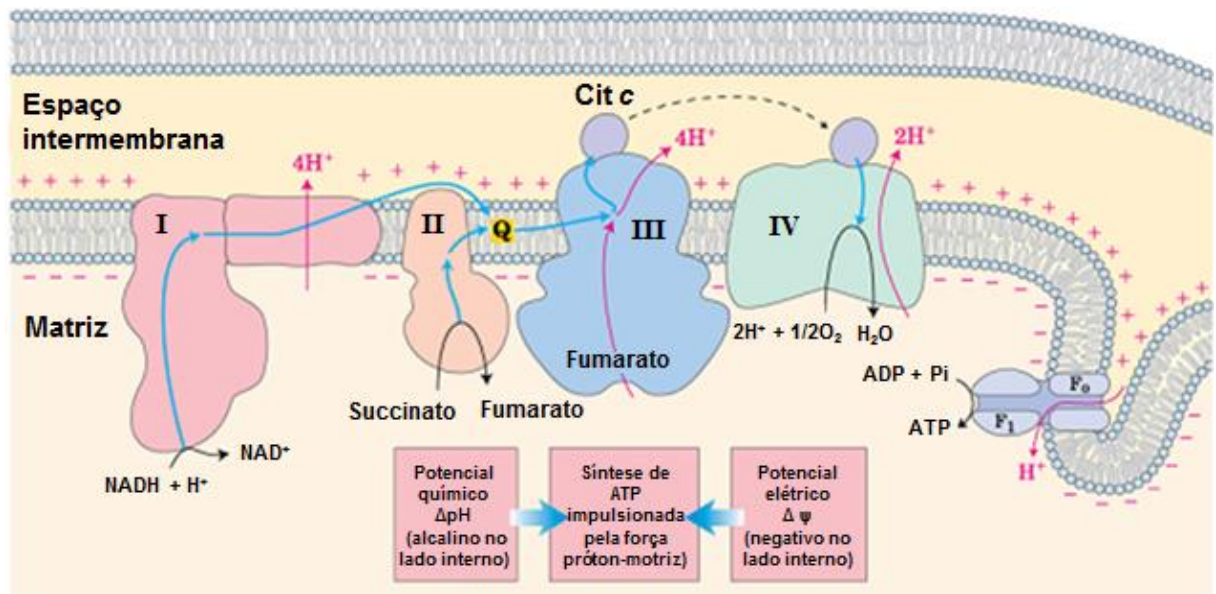
O piruvato e os ácidos graxos são convertidos em Acetil-CoA, que são oxidados em  $\text{CO}_2$ , através do ciclo do ácido cítrico. Grandes quantidades de NADH e  $\text{FADH}_2$  são produzidas por essas reações de oxidação. A energia disponível pela combinação do oxigênio com os elétrons reativos levados pelo NADH e pelo  $\text{FADH}_2$ , é regulada por uma cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial (WALLACE, 2005).

Praticamente toda a energia disponível a partir da oxidação de carboidratos, gorduras e outros substratos, é inicialmente armazenada na forma de elétrons de alta energia (WALLACE, 2005), provenientes da dissociação dos átomos de hidrogênio em prótons e elétrons, que são transferidos para o  $\text{O}_2$  através de uma série de complexos protéicos (complexos I, II, III, IV – citocromo c oxidase e V – ATP sintase) localizados na membrana interna mitocondrial (MCFARLAND, TURNBULL, 2009), contendo centros redox consecutivos que possuem afinidade progressiva por elétrons. O gradiente eletroquímico de prótons gerado durante o transporte de elétrons é utilizado para impulsionar a conversão de ADP (adenosina difosfato) + Pi (fosfato inorgânico) em ATP, por meio do complexo ATP sintase (WALLACE, 2005; MCFARLAND, TURNBULL, 2009).

A fosforilação oxidativa (FO) é um elemento fundamental da bioenergética, extensivamente estudada para resolver os mecanismos de transdução de energia do sistema de transporte de elétrons e analisar os diferentes modos de controle da respiração mitocondrial (GNAIGER, 2009). A combinação dessas reações é responsável por uma eficiente troca ATP-ADP entre a mitocôndria e o citosol de tal forma que o ATP pode ser usado para prover muitas das reações celulares dependentes de energia. A FO é a via final e comum, pela qual os elétrons provenientes de diversos combustíveis do organismo se convergem até ao oxigênio molecular. A eficiência pela qual os equivalentes redutores (a partir da oxidação de

acetil-CoA) são convertidos em ATP pela FO é chamada de acoplamento mitocondrial (JOHANNSEN, RAVUSSIN, 2009).

Figura 6 - Cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (CTE)



Legenda: A energia obtida através da transferência de elétrons (setas azuis) até a CTE é utilizada para bombear prótons (setas rosas) da matriz para o espaço intermembranas, 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 à 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](http://www.obesityonline.org)

Em contrapartida, 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 7) e as mitocôndrias são chamadas “desacopladas”. Estes processos podem ser

desacoplados por proteínas desacopladoras (UCPs), encontradas na membrana mitocondrial interna, e por alguns compostos, como a 2,4-dinitrofenol, que aumentam a permeabilidade de prótons na membrana mitocondrial interna (BHOPAL, RAFNSSON, 2009). As UCPs são conhecidas por participarem da regulação da termogênese basal, embora seu papel fisiológico e bioquímico não tenha sido bem confirmado. A proteína desacopladora 1 (UCP1) é 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 UCPs (UCP2 e UCP3) foram descobertas, sendo ambas homólogas à UCP1 e expressas em adultos. Especificamente, a UCP2 é expressa em vários tecidos (incluindo o tecido adiposo, músculo, coração, rins, sistema digestório e cérebro), enquanto que a expressão da UCP3 é expressa no músculo esquelético, fígado e coração (ROUSSET et al., 2004; CARDOSO, QUELICONI, KOWALTOWSKI, 2010). A UCP2 e UCP3 têm sido relacionadas à determinação da taxa metabólica basal (TMB). Em um estudo com índios Pima, os autores avaliaram o conteúdo da UCP2 e UCP3 e comprovaram a associação de ambas as proteínas com a taxa metabólica durante o sono e com o gasto energético de 24h. Tal fato implica que a variação genética da UCP2 e UCP3 pode estar relacionada às diferenças no desacoplamento mitocondrial e na eficiência da utilização de energia. Existem diferenças substanciais na TMB a medida que a massa gorda e magra diferem (WALDER et al. 1998).

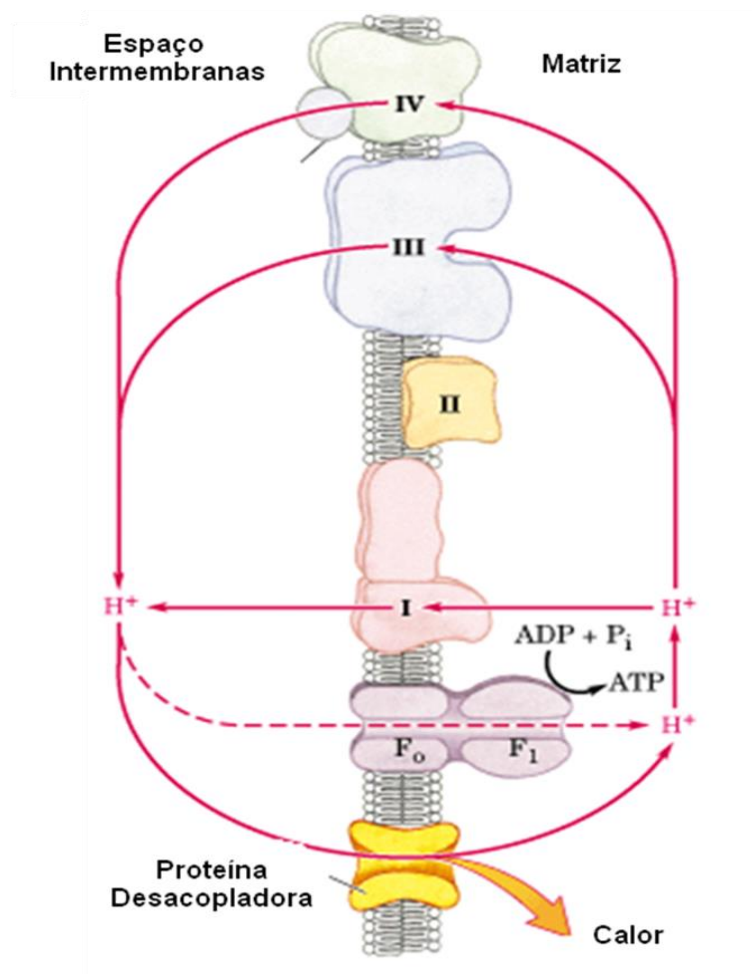
A isoforma UCP4 é encontrada somente no cérebro e a sua expressão em células de mamíferos reduz o potencial de membrana mitocondrial. YU et al. (2000) observou em seu estudo abundante expressão de UCP5 no cérebro humano, testículos, rins, útero, coração, pulmão, estômago, fígado e músculo esquelético, 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).

Estudos revelam que alterações no conteúdo mitocondrial, mutações ou alterações da capacidade respiratória, são determinantes no controle do metabolismo (FURUKAWA et al., 2004). Assim, as alterações no metabolismo de substratos no miocárdio, que ocorrem na insuficiência cardíaca, as causas e consequências destas anomalias, são mal compreendidas.

Há evidências que sugerem que o metabolismo prejudicado de substratos contribui para a disfunção contrátil e o progressivo remodelamento, que são estados característicos da insuficiência cardíaca. A seleção de substrato no miocárdio é relativamente normal durante o estágio inicial da insuficiência cardíaca, porém, em estágios avançados, há uma baixa regulação da oxidação de ácidos graxos, do aumento glicolítico e oxidação da glicose, redução da atividade da cadeia respiratória e uma reserva deficiente do fluxo oxidativo mitocondrial (STANLEY, RECCHIA, LOPASCHUK, 2005).

Dessa forma, o melhor entendimento da biologia mitocondrial na progressão de doenças degenerativas pode trazer novas possibilidades terapêuticas no tratamento dessas doenças.

Figura 7 - Geração de calor por desacoplamento mitocondrial



Legenda: Processo de desacoplamento mitocondrial em tecido adiposo marrom, onde a força próton-motriz é dissipada sob a forma de calor, via proteína desacopladora, ao invés de ser utilizada para impulsionar a ATP-sintase para a produção de ATP.

Fonte: Adaptação: NELSON, D. L. & COX, M. M. 2006.

#### 1.4.3 Obesidade e doenças cardiovasculares na disfunção mitocondrial

A estreita associação entre obesidade, resistência à insulina e diabetes tipo 2 dificulta a distinção entre as modificações verdadeiramente atribuíveis à obesidade em relação às alterações metabólicas secundárias causadas pela resistência à insulina.

A disfunção mitocondrial ocorre através de processos diretamente relacionados com o desacoplamento mitocondrial, por alterações da expressão de proteínas desacopladoras (UCPs), aumento de espécies reativas de oxigênio

(EROs) via aumento de produtos da peroxidação lipídica, como o aldeído 4-hidroxinonenal (4-HNE), e por alterações das atividades enzimáticas, como as da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (NAKAMURA et al., 2005). Estudos clínicos e experimentais descrevem que o aumento de espécies reativas de oxigênio está diretamente relacionado com a insuficiência cardíaca, que por sua vez, apresentava aumento da peroxidação lipídica, tido como um marcador de estresse oxidativo (NAKAMURA et al., 2005).

O 4-HNE é um dos produtos da peroxidação lipídica mais estudados, não só em relação à sua função fisiológica e proteção como molécula de sinalização e estimular a expressão de genes, mas também pela sua função citotóxica na inibição da expressão gênica e promover o desenvolvimento e a progressão de diversos estados patológicos (AYALA, MUÑOZ M, ARGÜELLES, 2014). A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e induzindo a destruição de estruturas celulares, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condição extrema, à morte celular programada (apoptose) (RAY, HUANG, TSUJI, 2012). Estudos com animais demonstram que a peroxidação lipídica altera a morfologia mitocondrial em virtude do excesso de formação de EROs e radicais superóxido, além de reduzir a produção de ATP e transcrição gênica de genes associados à insuficiência cardíaca (LASKOWSKI, RUSSELL, 2008).

A produção mitocondrial prejudicada de ATP apresenta também uma importante relação entre fatores genéticos e ambientais que podem levar ao desenvolvimento da obesidade (ROGGE, 2009). De fato, estudos clínicos e experimentais mostram que existe uma mudança no padrão de utilização de substratos pelo coração em falência, havendo favorecimento da oxidação de glicose no lugar de ácidos graxos, o que acaba por levar o coração a um déficit energético (SHAROV et al., 2000; ROSCA et al., 2008).

Os estudos com 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; 2010).

Um estudo onde se avaliavam os cardiomiócitos de indivíduos não diabéticos e com função do VE preservada, mostraram que os indivíduos jovens com obesidade exibiram disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, dano oxidativo mitocondrial e ativação dos mecanismos de apoptose, em níveis semelhantes aos observados em idosos, com ou sem obesidade. Também avaliaram 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 (NIEMANN et al., 2011). 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. Estudo recente do nosso grupo reforça a associação entre a obesidade e disfunção mitocondrial, onde os autores mostraram que camundongos *Swiss* adultos com obesidade induzida por dieta ocidental, rica em gordura saturada e açúcar simples, apresentaram desacoplamento e disfunção mitocondrial cardíaca (NEVES et al., 2014).

Assim sendo, o estudo detalhado do desenvolvimento da disfunção mitocondrial cardíaca em modelo de obesidade em diferentes fases da vida pode auxiliar na melhor compreensão dos fatores envolvidos no desenvolvimento desta doença. Além disso, podemos afirmar que um melhor entendimento da disfunção mitocondrial na obesidade é crucial e constitui a base para o desenvolvimento de uma estratégia terapêutica para manter a integridade mitocondrial, otimizar o metabolismo energético, reduzir o estresse oxidativo e melhorar a função contrátil do miocárdio (SHAROV et al., 2000; REN et al., 2010).

Dados obtidos no mestrado, reforçam a associação entre a obesidade e a disfunção mitocondrial, demonstrando que em camundongos *Swiss* adultos jovens (90 dias) hiperalimentados na lactação, apresentaram alterações específicas no metabolismo energético de cardiomiócitos, na capacidade oxidativa mitocondrial e no acoplamento do consumo de oxigênio à produção de ATP, com diminuição da oxidação de ácidos graxos, reduzindo a eficiência cardíaca e alterando a morfologia ultraestrutural dos cardiomiócitos.

Na tentativa de elucidar este fenômeno e considerando o aumento da obesidade no mundo, o surgimento de doenças cardiovasculares e desordens metabólicas, nos propusemos a realização de estudos mais detalhados para

acompanhar as modificações do metabolismo energético mitocondrial no coração ao longo do desenvolvimento, assim como as alterações nas vias metabólicas envolvidas.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre o metabolismo energético e o desenvolvimento da disfunção mitocondrial cardíaca em camundongos obesos filhotes e adultos jovens.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar o metabolismo energético e mitocondrial cardíaco ao longo do desenvolvimento em camundongos controle e hiperalimentado em diferentes idades: aos 21, 60 e 90 dias de vida através da:

- a) Análise dos parâmetros bioquímicos plasmáticos;
- b) Análise dos parâmetros biométricos;
- c) Análise da atividade mitocondrial das fibras cardíacas isoladas, através do consumo de oxigênio por respirometria de alta resolução;
- d) Análise do conteúdo de proteínas do metabolismo energético mitocondrial cardíaco e da sinalização de insulina (IR $\beta$ , IRS-1, pIRS1, PTP1B, PI3K, Akt, pAkt, GLUT1, GLUT4, AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ , HKII, CPT1, UCP2, FABPm, CD36, PGC1 $\alpha$ , 4HNE e os complexos da cadeia de transporte de elétrons: I, II, III, IV e V);
- e) Análise da atividade das enzimas que intervêm no metabolismo energético: Complexo multienzimático Piruvato desidrogenase (PDH), Citrato sintase (CS), Lactato desidrogenase (LDH);
- f) Análise da expressão gênica das proteínas envolvidas no metabolismo dos carboidratos e lipídeos (CPT1, UCP2, PPAR $\alpha$ );
- g) Determinação do glicogênio hepático;
- h) Análise histológica do fígado e do coração;
- i) Ultra-estrutura mitocondrial dos cardiomiócitos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e modelo experimental

Utilizamos o método de Plagemann (PLAGEMANN et al.,1992) já implementado em nosso laboratório, para a produção de animais obesos. Fêmeas da raça *Swiss* com 3 meses de idade, fornecidas pelo Instituto Vital Brasil ao biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento, foram mantidas sob condições padrão de temperatura ( $21\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) e umidade controladas ( $60\pm 10\%$ ). O ambiente foi submetido a ciclos de 12 horas de claro e escuro (07:00h às 19:00h) e ciclo de exaustão de ar (15 min/hora) em caixas de polipropileno, recebendo dieta padrão Nuvilab<sup>®</sup> e água *ad libitum*. Após o acasalamento, as fêmeas prenhas foram separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais durante todo período de gestação. Após o nascimento, os filhotes machos foram distribuídos na proporção de 9 recém nascidos por fêmea lactante e divididos em dois grupos:

**Grupo controle (GC):** ninhadas de lactantes que amamentaram 9 filhotes machos com dieta normal (25% de proteína) até o 21º dia (final da lactação ou desmame) (Figura 8); **Grupo hiperalimentado (GH):** ninhadas de lactantes que amamentaram 9 filhotes machos com dieta normal (25% de proteína) até o 3º dia, sendo reduzido somente a 3 filhotes por gaiola até o 21º dia (final da lactação ou desmame) (Figura 8).

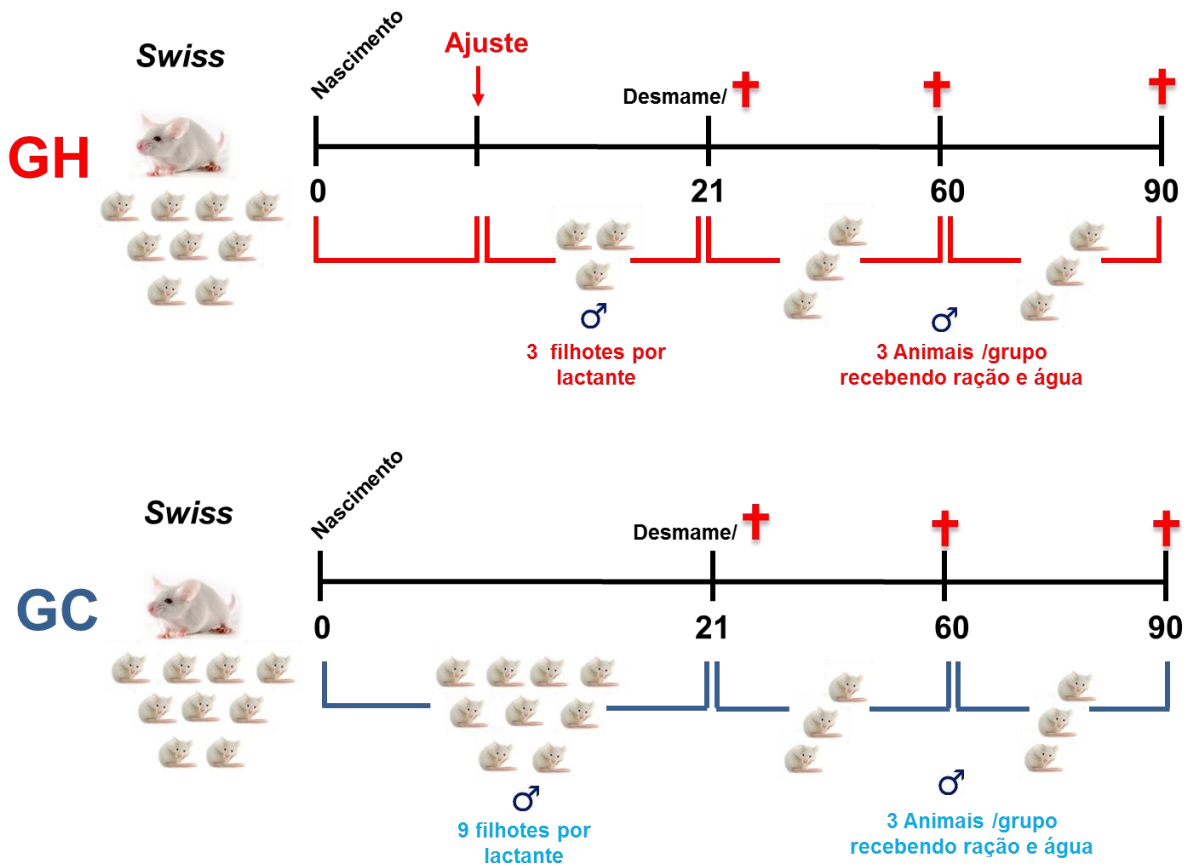
Para estudo dos animais filhotes, tanto o grupo controle, quanto o grupo hiperalimentado, foram analisados no dia do desmame, aos 21 dias de vida.

Para estudo dos animais adultos jovens, após o desmame, os filhotes foram separados das lactantes e colocados em gaiolas com 3 filhotes machos por grupo, receberam água e ração comercial padrão Nuvilab<sup>®</sup> *ad Libitum* e foram mantidos sob as condições padrão descritas anteriormente até a data da eutanásia (60 e 90 dias de vida).

Para a realização de todos os experimentos, foram utilizados um macho de cada ninhada, totalizando 11 animais por grupo. Os animais foram tratados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, usados pelo colégio Brasileiro de experimentação animal (COBEA) e os protocolos experimentais aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da

Universidade Estadual do Rio de Janeiro (CEUA|053|2011), estando de acordo com a lei nº 11.794 sancionada em Novembro de 2008 (MARQUES, MORALES, PETROIANU, 2009).

Figura 8 - Esquema do modelo experimental dos grupos controle e hiperalimentado até aos 90 dias



Fonte: A autora, 2015

### 3.2 Análise do ganho de peso corporal dos animais durante o crescimento

Para verificar o efeito da hipernutrição no início da vida sobre o ganho de peso após o nascimento, foi avaliado o peso corporal (MC) das ninhadas do grupo controle e grupo hiperalimentado. Os animais foram pesados aos 3, 10, 21, 30, 60, e 90 dias de vida em balança analítica de precisão (Marte A-1500).

#### Eutanásia

Após 12 horas de jejum, a glicose plasmática dos animais dos grupos controle e hiperalimentado foi determinada através do sangue da veia caudal com o auxílio de glicosímetro e fitas teste (Accu-Chek Active<sup>®</sup>). Os resultados foram expressos em mg/dl.

Em seguida, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Avertin<sup>®</sup> (2,2,2-tribromoethanol, 2-metil-2-butanol) - 0,02 ml/g de massa corporal.

Com os animais sob efeito da anestesia, o tórax foi aberto, o coração retirado e rapidamente imerso em solução de relaxamento e preservação BIOPS (em mM: CaK<sub>2</sub>EGTA 2.77, K<sub>2</sub>EGTA 7.23, MgCl<sub>2</sub> 6.56, ditiotretitol 0.5, K-MES 50, imidazol 20, taurina 20, Na<sub>2</sub>ATP 5.77, fosfocreatina 15, pH 7.1 ajustado a 25°C) contida em uma placa de petri, sobre gelo químico. O ventrículo esquerdo e os demais tecido foram retirados e pesado em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N<sup>®</sup>), em seguida, foram divididos em diferentes partes para sua utilização nas técnicas descritas a seguir.

### 3.3 Análise dos parâmetros bioquímicos plasmáticos

As amostras de sangue dos animais dos grupos controle e hiperalimentado foram coletadas e, posteriormente, vertidas em tubo de ensaio contendo EDTA K<sub>3</sub> (concentração final de 1,735 mg/mL). Imediatamente, foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos a 4°C para a separação do plasma. Em seguida, o plasma foi alíquotado e mantido a -70°C, para posterior quantificação da insulina plasmática por método radioimunoensaio (RIA) (MP Biomedicals, São Francisco, CA, USA). O

índice de resistência à insulina (HOMA-IR) foi calculado usando a seguinte fórmula: [insulina de jejum ( $\mu\text{UI/ml}$ ) x glicemia de jejum ( $\text{mmol/L}$ )] / 22,5 (MATTHEWS et al., 1985). O plasma também foi utilizado para a determinação dos níveis de triglicerídeos (TG) e colesterol total, utilizando ensaios enzimáticos colorimétricos (BIOCLIN, Brasil).

### **3.4 Análise dos parâmetros biométricos**

#### **Peso do fígado e da gordura visceral**

O fígado e as gorduras epididimal (GE) e retroperitoneal (GR) dos animais dos grupos controle e hiperalimentado, foram retirados e pesados em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N<sup>®</sup>). Biópsias do fígado foram armazenadas para análise do glicogênio hepático e morfológica. Corrigimos o peso do fígado (g) pela massa corporal (g) para avaliarmos possível esteatose hepática, visto que esta razão tem sido associada ao comprometimento hepático (SERVIDDIO et al., 2011).

#### **Comprimento Naso-anal e comprimento da tíbia**

Mensurou-se o comprimento naso-anal dos animais dos grupos controle e hiperalimentado, com o auxílio de um paquímetro para análise do índice de Lee (raiz cúbica da massa corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) x 1000). A tíbia esquerda também foi dissecada e o seu comprimento (CT) foi aferido com auxílio de um paquímetro.

#### **Peso do ventrículo esquerdo e estimativa da hipertrofia cardíaca**

Para investigar a presença da hipertrofia cardíaca nos grupos controle e hiperalimentado, o coração foi retirado, o átrio foi removido, isolando o ventrículo esquerdo (VE), que foi pesado em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N) (PVE) e feita a razão entre o PVE e o CT (YIN, 1982).

### 3.5 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 (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, MgCl<sub>2</sub> 3.0, K-MES 60, taurina 20, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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<sup>®</sup> Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) contendo 2ml de MIRO5 a 37°C. Todas as análises foram realizadas em concentrações de oxigênio superiores a 400 nmol O<sub>2</sub>.ml<sup>-1</sup>. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de O<sub>2</sub>.s<sup>-1</sup>.mg de peso úmido<sup>-1</sup>. O estudo foi realizado com dois grupos de substratos independentes em cada câmara: (câmara A, em mM) glutamato 10, malato 2 e 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 e 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 mitocondrial através de todas as preparações, a respiração foi mensurada em presença de 10 $\mu$ M de citocromo c.

### 3.6 Análise das proteínas através de Western Blotting

Parte do ventrículo esquerdo retirado dos animais foi congelada imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise através da técnica de Western Blotting. O material foi picotado e, em seguida, homogeneizado em solução de lise gelada contendo 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% NP-40, 0,1% SDS, e coquetel de inibidor de protease (Complete EDTA-free em comprimido Roche Diagnostics, Califórnia, EUA), por trituração manual com o homogenizador potter-Elvehjem<sup>®</sup> 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 R430R) 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<sup>®</sup> BCA Protein Assay (Thermo Scientific USA, Rockford, IL). Em seguida, as amostras foram fervidas com 20% de solução tampão de Laemmli contendo glicerol 10%, 2- $\beta$ -mercaptoetanol 5%, SDS 10% NaOH 10N e azul de bromofenol 0,0001% (LAEMMLI, 1970), durante 3 minutos a 100°C, para desnaturação das proteínas.

O conteúdo do receptor de insulina na subunidade  $\beta$  (IR $\beta$ ), do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1), substrato do receptor de insulina 1 fosforilada (pIRS1), proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B), do fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), da proteína quinase B (Akt), da proteína quinase B fosforilada (pAkt), do transportador de glicose tipo 1 (GLUT1), do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4), da AMP-proteína quinase (AMPK $\alpha$ ), da AMP-proteína quinase fosforilada (pAMPK $\alpha$ ), da Hexocinase II (HKII), da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1), da proteína desacopladora 2 (UCP2), Proteína de ligação de ácidos graxos de membrana (FABPm), CD36, coativador do receptor ativado do proliferador de peroxissoma alfa (PGC-1 $\alpha$ ), coquetel para os complexos (I, II, III, IV e V) da cadeia de transportes de elétrons (OXPHOS), 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE),  $\alpha$ -tubulina, GP91 e do canal iônico dependente de voltage mitocondrial (VADC), foram detectados por Imunoblotting.

As proteínas totais (15µg de proteína) foram aplicadas no gel de poliacrilamida de 10% e 12% (acrilamida 30%, bis-acrilamida 1,6%, APS 10%, TEMED, SDS 0,4 %, Tris 1,5 M), respectivamente com um padrão de peso molecular para proteínas de 12/250 KDA (GE-Healthcare Life Sciences<sup>®</sup>) e submetidas à eletroforese SDS-PAGE em cuba de eletroforese (Hoefer MiGOty Small<sup>®</sup>). Após a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular, estas foram transferidas para uma membrana PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech<sup>®</sup>), utilizando o sistema semi-dry (Bio-RAD<sup>®</sup>, EUA). 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, as membranas foram incubadas (overnight) com anticorpos primários específicos para detecção de proteínas chave do metabolismo mitocondrial e citoplasmático: anti-IRβ (Sc 711, 1:1000), anti-PI3K (Sc 423, 1:1000), anti-Akt 1/2 (Sc-8312, 1:1000), anti-pAkt 1/2/3 (Sc-7985-R, 1:1000), anti-GLUT1 (Sc-7903, 1:1000), anti-GLUT4 (Sc-7938, 1:1000), anti-HKII (C-64-G5, 1:1000), anti-CPT1 (Sc-98834, 1:1000), anti-FABPm (Sc-15974-R, 1:1000), anti-CD36 (Sc-9154, 1:1000), anti-GP91 (Sc-20782, 1:1000) e anti-VDAC (Sc-98708, 1:1000) obtidos em coelho e anti-UCP2 (Sc-6525, 1:1000), anti-IRS-1 (Sc-559, 1:1000) e anti-pIRS1(Sc,17200-T 1:1000 ), anti-PTP1B (Sc1718, 1:1000) e anti-PGC-1α (Sc 5815, 1:1000) , obtido em cabra (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), anti-AMPK (#2532S, 1:1000), anti-pAMPKα (#4188X, 1:1000) obtidos em coelho, (Cell Signaling Technology), anti-α Tubulina (C-5286, 1:1000) e anti-OXPHOS (ab110413, 1:1000), anti-4HNE (ab46545, 1:1000) obtido em camundongo (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) na diluição 1:1000 e 1:2000 respectivamente. Posteriormente, para a imunomarcação, as membranas PVDF foram incubadas com anticorpos secundários específicos biotinizado apropriado anti-coelho, anti-cabra ou anti-camundongo (Zymed) (SC-2040, SC-2042, SC-2039 - 1:1000, 1:2000 e 1:3000, Santa Cruz Biotechnology). A seguir as membranas foram incubadas por 1h com estreptavidina peroxidase conjugada com a mesma diluição do secundário (Invitrogen Life Technologies<sup>®</sup>). Entre a incubação dos anticorpos primários, secundários e a streptavidina, realizou-se 3 lavagens/5 minutos cada com Tween-TBS. A imunorreatividade foi visualizada por quimioluminescência aumentada (ECL-Plus, GE Healthcare-Life Sciences), e

subsequentemente quantificados por densitometria utilizando o software Image J<sup>®</sup> (NIH, Bethesda, MD, EUA).

### **3.7 Fracionamento de membrana para a avaliação da translocação do GLUT4**

Para determinar a translocação do GLUT4, o ventrículo esquerdo do coração dos animais estudados foi lisado e fracionado em fração citosólica e de membrana plasmática, utilizando uma metodologia adaptada (BILAN et al. 1992; HUNDAL et al. 1992; NEVES et al. 2014). Foi utilizado para a lise dos tecidos o tampão HES contendo 10 mmol/L HEPES, 5 mmol/L EDTA, 250 mmol/L sacarose e coquetel de inibidores de protease (Complete EDTA-Free em comprimidos Roche Diagnostics, Pleasanton, CA, USA). O homogenato foi sonicado e colocado em repouso no gelo por 30 minutos. Após este período, o homogenato foi centrifugado à 750×g/3 min à 4°C. O sobrenadante (SN1) foi coletado e deixado sob gelo. O pellet (P1) foi ressuspenso em 1 ml do tampão HES e re-homogeneizado e centrifugado por 750×g/3 min à 4°C. O pellet (P2) obtido foi descartado e o sobrenadante (SN2) foi adicionado ao SN1, formando a fração citosólica. Uma parte da fração citosólica foi ultracentrifugada à 31000×g /60 min à 4°C. O pellet obtido foi ressuspenso em 400 µl do tampão HES e sonicado para homogeneização da fração de membrana plasmática. A concentração de proteínas nas frações foi determinada pelo método BCA (Protein Assay Kit, Bicinchoninic Acid; Thermo scientific, Rockford, IL, USA). O conteúdo de GLUT4 das frações citosólica e de membrana foi determinado por Western blotting usando anticorpos adequados (transportador de glicose dependente de insulina SLC2A4 - GLUT4 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA; anti-actin 1:1000, Sigma-Aldrich).

### **3.8 Ensaio da atividade de enzimas chaves do metabolismo**

As atividades enzimáticas máximas da piruvato desidrogenase (PDH), lactato desidrogenase (LDH) e citrato sintase (CS), foi determinada em homogeneizados de tecido ventricular esquerdo. Curvas da cinética da atividade enzimática foram calculadas como percentagem da resposta máxima de controle.

### 3.8.1 Piruvato desidrogenase (EC 1.2.4.1)

A atividade da PDH foi mensurada em metodologia previamente descrita por Hinmam e Blass (HINMAN, BLASS, 1981). Resumidamente, o ventrículo esquerdo foi homogeneizado em tampão de fosfato contendo em (mM): 50 fosfato de potássio, 2-Betamercaptoetanol, 1 EDTA, e 0,1% v/v Tritón X-100, pH 7,8. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi, então, retirado e congelado em freezer -70°C para posterior dosagem. A atividade da PDH foi baseada na redução de NAD<sup>+</sup> pela oxidação do corante violeta de P-Iodonitrotetrazolium (INT). A quantidade da oxidação NAD<sup>+</sup> era proporcional à atividade da PDH quando medido a 500 nm. A composição da mistura de reação foi em (mM): 0,6 INT, 2,5 NAD<sup>+</sup>, 0,2 Tiamina Pirofosfato, 0,1 coenzima A, 0,3 ditioneitol, 1 MgCl<sub>2</sub>, e 0,0065 PMS, 1 mg/ml de BSA e 40 µg de proteína. A absorbância foi monitorada após a adição de 5 mM de piruvato durante 25 min a 25°C a 500 nm, em espectrofotômetro (Victor3 1420, Multilabel Counter, PerkinElmer).

### 3.8.2 Citrato sintase (E.C. 2.3.3.1)

A enzima citrato sintase é utilizada como um marcador da capacidade aeróbica do tecido avaliado. A atividade foi determinada utilizando a metodologia descrita por (ALP, NEWSHOLME, ZAMMIT, 1976). O tecido do ventrículo esquerdo foi homogeneizado em tampão de extração 1:09 (w/v), contendo em (mM): 50 Tris/HCl; 1 EDTA e inibidor de protease a pH 7,4. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi, então, retirado e congelado em freezer -70°C para posterior dosagem. A cinética da reação foi iniciada por adição de oxalacetato baseado na quantificação do complexo formado entre a Acetil-CoA e oxaloacetato (OAA) liberada com o DTNB no meio. O tampão de ensaio utilizado contém em (mM): 100 tris/HCl, 1 EDTA, 0,2 DTNB, 0,5 oxalacetato; 30 Acetil-CoA e 0,1% (V/V) triton x 100. Em seguida, foi adicionado 15 µg de proteína num volume final de 221 µl (0,2 ml) e pH 8,1. A atividade da CS foi normalizada pelo teor de proteína total e foi relatado como nanomoles por minuto por miligrama de proteína. A elevação da absorbância a 412nm foi monitorizada por

um intervalo de 7 min a 25°C, em espectrofotômetro (Victor3 1420, Multilabel Counter, PerElmer).

### 3.8.3 Lactato desidrogenase (EC 1.1.1.27)

Atividade da LDH foi determinada utilizando a metodologia descrita por (BEUTLER, 1984). Tecidos do ventrículo esquerdo foram homogeneizados em tampão Tris-HCl contendo, 1000 mM de Tris-HCl, 5 mM EDTA a pH 8,0. Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado por 15 minutos a 3000 rpm a 4°C. O sobrenadante foi, então, retirado e congelado em freezer -70°C para posterior dosagem. O ensaio foi baseado na monitorização da oxidação do NADH na presença de piruvato. Por outro lado, a oxidação de NADH, foi proporcional à atividade da LDH, quando medido a 340 nm. A solução de trabalho usada contém: 75 mM Tris-HCl, 1000mm de EDTA, 2 mM de NADH e 30 ug de proteína. O piruvato (10 mM) foi adicionado após um período de incubação de 10 min a 37°C e a reação foi monitorada durante 5 min a 340nm em espectrofotômetro (Victor3 1420, Multilabel Counter, PerElmer).

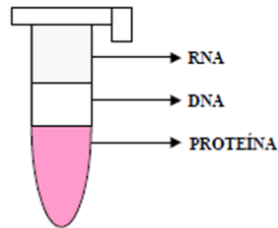
## 3.9 **Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)**

### **Extração do RNA total**

Para análise da expressão gênica das enzimas CPT1, UCP2 e PPAR $\alpha$ , fragmentos de tecido cardíaco foram homogeneizados com 1ml de Trizol™ (Life Technologies), conforme protocolo do fabricante. O homogenato foi transferido para um microtubo e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 200  $\mu$ l 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 12.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos, para separação de fases (Figura 9).

Figura 9 - Separação de fases



Fonte: A autora, 2015.

A fase aquosa sobrenadante foi cuidadosamente transferida para outro microtubo. Em seguida, foram acrescentados e misturados 500  $\mu$ l de isopropanol, deixando-se em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente. Nova precipitação foi, então, realizada a 12.000 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 9.500 rpm, a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente no interior do fluxo laminar. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 50  $\mu$ l de água dietilpircarbonato (DEPC) e incubado a 60°C, por 10 minutos, para melhor dissolução do RNA.

A concentração do RNA total foi determinada 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 260 nm para ácido nucléico e 280 nm para contaminantes proteicos. A relação entre essas leituras demonstrou uma razão maior que 1,8, garantindo a qualidade do RNA obtido, segundo as exigências vigentes para a biologia molecular.

O RNA total extraído (2,0  $\mu$ g) foi reversamente transcrito em cDNA a 42°C, na presença da enzima transcriptase reversa e de Random primers. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando Taq-Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) com volume de reação de 25  $\mu$ l. 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, PPAR $\alpha$  e actina foram obtidos a partir do catálogo de expressão gênica ABI TaqMan (Foster City, CA, EUA).

### 3.10 Quantificação de glicogênio do fígado

A glicose produzida pela hidrólise do glicogênio hepático foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando kit comercial (Glucox 500, Doles, Goiânia, GO, Brazil) em método previamente descrito por Carroll e colaboradores (CARROLL et al., 1956). As amostras do fígado foram pesadas e homogeneizadas com 1 ml de TCA (5 %) e centrifugadas a 3000 rpm, 4°C, por 15 min. O sobrenadante (com glicogênio em suspensão) foi decantado para um tubo de ensaio em separado e o *pellet* foi ressuscitado novamente em 1ml de TCA (segunda extração) e homogeneizado novamente por 1 min. Mais duas extrações foram feitas da mesma maneira, para extração de maior percentagem (aprox. 97%) do glicogênio presente. Juntaram-se todos os sobrenadantes de cada amostra para análise da concentração de glicogênio. Após a centrifugação, foram adicionados 8 ml de etanol absoluto (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) em 5 ml do sobrenadante. Após 12 h de incubação a -20°C, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm, 4°C, por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O glicogênio foi hidrolisado pela incubação do *pellet* dissolvido em 2 ml de água destilada e HCl 1M (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR), a 60°C por 5 min. Adicionou-se 50  $\mu$ l de NaOH 1 M (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) para neutralizar a mistura. A glicose foi quantificada em 200  $\mu$ l do sobrenadante a 510 nm em espectrofotômetro Biochrom Assys UVM 340 Scanning Microplate.

### 3.11 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  $\mu$ m, coletados em lâminas e posteriormente corados com Hematoxilina-Eosina (H & E). 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, mensurada através de gotículas de gordura presentes nos hepatócitos.

### 3.12 Microscopia eletrônica de transmissão dos cardiomiócitos

A morfologia dos cardiomiócitos foi analisada ultra-estruturalmente por microscopia eletrônica de transmissão de rotina. Fragmentos do ventrículo esquerdo coletados foram fixados em solução de Karnovsky (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 4%, 5mM de  $\text{CaCl}_2$  em Tampão Cacodilato 0,1M pH 7.2), overnight, em temperatura ambiente e pós-fixados com Tetróxido de Ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) 1% por 1h. Em seguida, as amostras foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M, desidratadas em série crescente de acetona e incluídas em resina Epon. Os cortes ultrafinos foram obtidos, coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Os cortes foram analisados e observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 906 UERJ ou no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM 1011 da FIOCRUZ. As imagens digitais foram adquiridas aleatoriamente por grade, em triplicata.

### 3.13 Análise estatística

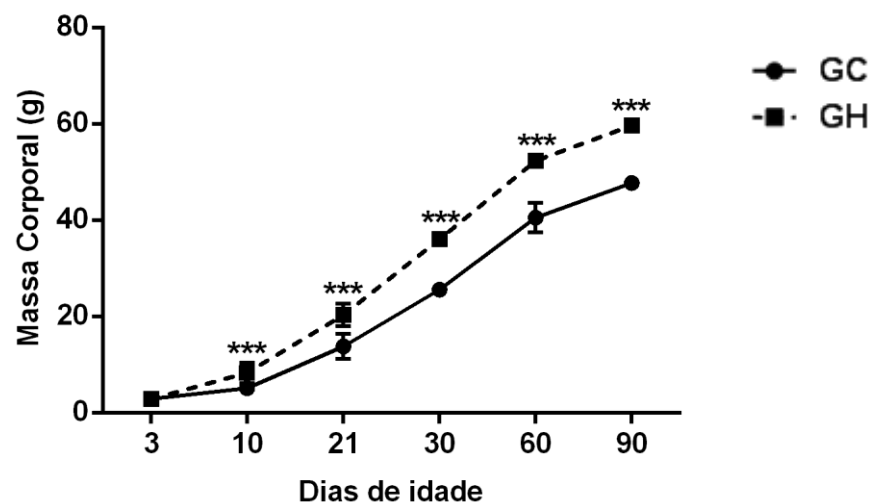
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 6 a 11 animais por grupo. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado e confirmou a normalidade e homogeneidade de variância dos dados. Foi utilizado para análise estatística do peso corporal o *Two-way* ANOVA de medidas repetidas (RM) seguido do pós-teste de Bonferroni. O efeito da hiperalimentação e a idade nas variáveis estudadas foi analisada por *Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism v.6.05 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e o nível de significância foi estabelecido como  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre o ganho de peso corporal de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado

Com relação ao ganho de peso corporal, observamos que os animais do grupo hiperalimentado (GH) apresentaram sobrepeso em relação aos animais do grupo controle (GC), que pode ser observado a partir do 10º dia de vida ( $P < 0,001$ ) persistindo até a idade adulta (90 dias) ( $P < 0,0001$ ). Esta diferença representou um aumento de 61% (10 dias), 47% (21 dias), 41% (30 dias), 29% (60 dias) e 25% (90 dias) no GH em relação ao GC (Figura 10). Este aumento progressivo é corroborado pela interação entre o fator hiperalimentação e idade, uma vez que a massa corporal aumenta de acordo com a idade e a manipulação na lactação (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ).

Figura 10 - Curva de ganho de peso corporal dos camundongos dos grupos controle e hiperalimentado ao longo do estudo



Legenda: Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA de medidas repetidas (RM) seguidas de pós-teste de Bonferroni. \*\*\* $P < 0,001$ .  $n = 11$ /grupo.

#### 4.2 Efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre os parâmetros bioquímicos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Foram avaliados a glicemia de jejum, os níveis plasmáticos de insulina, colesterol total e triglicerídeos dos camundongos GC e GH. Em nossos resultados, identificamos que os camundongos GH, aos 21 e 90 dias, mostraram um aumento significativo da glicemia (+31%,  $P < 0,01$ ; +19%,  $P < 0,05$ , respectivamente), insulina (+53%; +41%,  $P < 0,001$ , respectivamente) e HOMA-IR (+94%,  $P < 0,01$ ; +56%  $P < 0,001$ , respectivamente). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas nos animais GH de 60 dias, comparados aos seus respectivos controles. Em relação a estes resultados, foi observado que o efeito hiperalimentação teve maior influência, visto que não houve aumento nestes parâmetros com a evolução da idade (Two-Way ANOVA,  $P < 0,0001$ ). Adicionalmente, observamos um aumento significativo do colesterol total nos animais GH de 21, 60 e 90 dias (+183%,  $P < 0,05$ ; +101%,  $P < 0,01$ ; +209%,  $P < 0,001$  respectivamente) quando comparado aos animais GC. Complementando este resultado, o Two-way ANOVA evidenciou influência dos fatores hiperalimentação e idade de forma isolada para o aumento dos níveis de colesterol total no grupo GH ( $P < 0,001$ ) e uma interação entre os dois fatores uma vez que os níveis de colesterol total no GH aumentam com a evolução da idade ( $P < 0,05$ ).

Em relação aos níveis de triglicerídeos, foi observada diferença significativa nos animais GH aos 21 e 90 dias (+29%,  $P < 0,01$ ; +25%,  $P < 0,05$ ). Entretanto, não houve diferença nos animais de 60 dias quando comparado ao GC. Verificou-se que a hiperalimentação influenciou independentemente nestes resultados (Two-Way ANOVA,  $P < 0,01$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 - Parâmetros bioquímicos dos grupos controle e hiperalimentado em diferentes idades

	21d		60d		90d	
	GC	GH	GC	GH	GC	GH
	n=11	n=11	n=11	n=11	n=11	n=11
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	74,00 ± 2,82	97,14 ± 15,10 <sup>a</sup>	90,83 ± 13,71	90,63 ± 8,89	97,42 ± 7,93	116,25 ± 9,72 <sup>c</sup>
<b>Insulina (mUI/ml)</b>	9,46 ± 1,59	14,44 ± 2,39 <sup>a</sup>	9,47 ± 1,59	10,76 ± 2,29 <sup>o</sup>	12,66 ± 1,75 <sup>Ω</sup>	16,50 ± 1,16 <sup>c,Δδ</sup>
<b>Índice HOMA-IR</b>	15,47 ± 5,87	29,96 ± 3,88 <sup>a</sup>	26,28 ± 7,14 <sup>#</sup>	27,90 ± 5,35	28,80 ± 1,95 <sup>ψ</sup>	44,85 ± 6,18 <sup>c,Δ,δ</sup>
<b>Colesterol total (mmol/l)</b>	0,75 ± 0,22	2,11 ± 0,83 <sup>a</sup>	1,67 ± 0,44	3,37 ± 1,20 <sup>b</sup>	1,45 ± 0,37	4,48 ± 1,23 <sup>c,Δ</sup>
<b>Triglicerídeos (mmol/l)</b>	0,80 ± 0,10	1,03 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,93 ± 0,04	1,07 ± 0,10	0,86 ± 0,06	1,08 ± 0,17 <sup>b</sup>

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 diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [#] GC 60 vs GC 21 dias, [ψ] GC 90 vs GC 21 dias, [Ω] GC 90 vs GC 60 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [Δ] GH 90 vs GH 21 dias, [δ] GH 90 vs GH 60 dias.

#### 4.3 Efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre os parâmetros biométricos e morfométricos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

De acordo com os nossos resultados, observamos que houve aumento significativo no índice de Lee nos animais GH nas idades de 60 e 90 dias (+3%; +2%,  $P < 0,05$ , respectivamente) quando comparados aos seus controles, entretanto, sem alteração no grupo GH aos 21 dias. Além disso, os animais GH com 21, 60 e 90 dias demonstraram elevação da massa corporal (+80%; +16%, +22%,  $P < 0,001$ , respectivamente) em comparação aos grupos GC das mesmas idades. O teste Two-way ANOVA evidenciou influência dos fatores hiperalimentação e idade de forma isolada para o aumento destes resultados ( $P < 0,0001$ ). Além disso, este resultado é corroborado pela interação entre os fatores hiperalimentação e a idade, uma vez que a massa corporal aumenta com a idade e com a manipulação na lactação (Two-Way ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Quanto aos depósitos de gordura e massa hepática, verificou-se aumento destes parâmetros com a evolução da idade das proles. Com isso, os animais GH nas idades de 21, 60 e 90 dias apresentaram incremento na massa da gordura epididimal (+800%,  $P < 0,05$ ; +36%,  $P < 0,001$ ; +59%,  $P < 0,001$ , respectivamente), na gordura retroperitoneal (+343%,  $P < 0,01$ ; +43%,  $P < 0,001$ ; +62%,  $P < 0,001$ , respectivamente), no PVE (+72%,  $P < 0,001$ ; 12%,  $P < 0,05$ ; +20%,  $P < 0,001$ , respectivamente) e na massa do fígado (+97,4%,  $P < 0,001$ ; +15,9%,  $P < 0,01$ ; +24,9%,  $P < 0,001$ , respectivamente) quando comparados aos seus homólogos. A interação dos fatores hiperalimentação e idade contribuiu para tais achados, pois os animais GH apresentaram incremento dos parâmetros analisados com a evolução temporal (Two-Way ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Observamos também um aumento significativo na razão PVE/CT nos animais GH de 21, 60 e 90 dias (+52,8%,  $P < 0,001$ ; +12%,  $P < 0,01$ ; +14%,  $P < 0,01$ , respectivamente) em relação aos seus respectivos controles. Adicionalmente, houve diferença estatística por efeito da hiperalimentação e da idade (Two-Way ANOVA,  $P < 0,0001$ ) e uma interação entre os fatores hiperalimentação e idade uma vez que a razão PVE/CT nestes animais mostrou aumento com a evolução temporal (Two-Way ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Para a razão do peso do fígado/massa corporal, verificamos um aumento significativo nos animais GH de 21, 60 e 90 dias (+18%,  $P < 0,001$ ; +15%,  $P < 0,05$ ; +23%,  $P < 0,01$ , respectivamente). O teste Two-way ANOVA evidenciou que os fatores hiperalimentação e idade influenciaram de forma isolada para o aumento destes resultados ( $P < 0,0001$ ).

Quanto à avaliação do conteúdo de glicogênio hepático, observamos influência dos fatores hiperalimentação e idade em tal variável. Sendo assim, os animais GH aos 21 e 90 dias apresentaram maior conteúdo de glicogênio hepático (+139%,  $P < 0,001$ ; +107%,  $P < 0,01$ , respectivamente) em comparação com os seus respectivos controles, todavia, aos 60 dias não houve alteração nessa variável (Tabela 2). Para este resultado, o fator hiperalimentação influenciou mais negativamente do que a idade, uma vez que não houve incremento no conteúdo de glicogênio hepático com a evolução da idade (Two-way ANOVA,  $P < 0,0001$ ).

Tabela 2 - Parâmetros biométricos e morfométricos dos grupos controle e hiperalimentado em diferentes idades

	21d		60d		90d	
	GC	GH	GC	GH	GC	GH
	n=11 Média ± DP	n=11 Média ± DP	n=11 Média ± DP	n=11 Média ± DP	n=11 Média ± DP	n=11 Média ± DP
<b>Massa corporal (g)</b>	11,40 ± 0,44	20,50 ± 1,13 <sup>a</sup>	37,68 ± 2,71 <sup>#</sup>	43,63 ± 1,47 <sup>b,o</sup>	44,14 ± 1,01 <sup>ψ,Ω</sup>	53,77 ± 2,35 <sup>c,Δ,δ</sup>
<b>Gordura epididimal (g)</b>	0,02 ± 0,009	0,21 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,11 <sup>#</sup>	0,86 ± 0,010 <sup>b,o</sup>	0,78 ± 0,09 <sup>ψ</sup>	1,29 ± 0,20 <sup>c,Δ,δ</sup>
<b>Gordura retroperitoneal (g)</b>	0,006 ± 0,005	0,038 ± 0,015 <sup>a</sup>	0,28 ± 0,03 <sup>#</sup>	0,38 ± 0,08 <sup>b,o</sup>	0,42 ± 0,09 <sup>ψ,Ω</sup>	0,76 ± 0,07 <sup>c,Δ,δ</sup>
<b>Índice Lee</b>	330,12 ± 5,75	331,61 ± 8,37	328,50 ± 8,00	336,55 ± 4,58 <sup>b</sup>	336,70 ± 4,24	343,24 ± 5,63 <sup>c,Δ</sup>
<b>Comprimento naso-anal (cm)</b>	6,81 ± 0,25	8,31 ± 0,15 <sup>a</sup>	10,27 ± 0,22 <sup>#</sup>	10,47 ± 0,13 <sup>b</sup>	10,50 ± 0,16 <sup>ψ</sup>	11,07 ± 0,12 <sup>c,Δ,δ</sup>
<b>Peso do VE (VE) (g)</b>	0,05 ± 0,004	0,09 ± 0,007 <sup>a</sup>	0,14 ± 0,004 <sup>#</sup>	0,15 ± 0,011 <sup>b,o</sup>	0,14 ± 0,005 <sup>ψ</sup>	0,17 ± 0,014 <sup>c,Δ,δ</sup>
<b>Razão VE/CT (g/cm)</b>	0,036 ± 0,005	0,05 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,067 ± 0,002 <sup>b,#</sup>	0,076 ± 0,006 <sup>o</sup>	0,071 ± 0,002 <sup>ψ</sup>	0,081 ± 0,007 <sup>c,Δ</sup>
<b>Peso do fígado (g)</b>	0,47 ± 0,03	0,92 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,57 ± 0,08 <sup>#</sup>	1,82 ± 0,015 <sup>b,o</sup>	1,45 ± 0,196 <sup>ψ</sup>	1,82 ± 0,123 <sup>c,Δ</sup>
<b>Razão peso do fígado(g)/Massa corporal (g)</b>	0,039 ± 0,002	0,046 ± 0,003 <sup>a</sup>	0,039 ± 0,001	0,045 ± 0,003 <sup>b</sup>	0,029 ± 0,003 <sup>ψ,Ω</sup>	0,036 ± 0,003 <sup>c,Δ,δ</sup>
<b>Glicogênio hepático (g/g de tecido)</b>	0,50 ± 0,10	1,21 ± 0,26 <sup>a</sup>	0,60 ± 0,26	0,33 ± 0,15 <sup>o</sup>	0,45 ± 0,18	1,24 ± 0,19 <sup>c,δ</sup>

Legenda: VE: Ventrículo esquerdo; CT: Comprimento da tibia. 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 diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [#] GC 60 s GC 21 dias, [ψ] GC 90 vs GC 21 dias, [Ω] GC 90 vs GC 60 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [Δ] GH 90 vs GH 21 dias, [δ] GH 90 vs GH 60 dias.

#### 4.4 Respiração mitocondrial e consumo de oxigênio nas fibras cardíacas de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Nossos resultados mostram um aumento na taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3) nos animais GH aos 21 dias de vida (+33%,  $P<0,01$ ) quando glutamato, malato e succinato foram utilizados como substrato, indicando aumento na oxidação de carboidratos como substrato preferencial nesta idade em relação ao seu controle. Enquanto aos 60 dias não observamos diferença estatística comparado ao respectivo grupo GC. Porém, observamos uma diminuição na taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3) nos animais GH aos 90 dias (-15%,  $P<0,05$ ), mostrando uma diminuição na oxidação de carboidratos, quando comparado ao seu grupo controle (Figura 11A). Tais achados são corroborados pela interação entre os fatores hiperalimentação e idade, visto que houve um aumento da oxidação de carboidratos com a hiperalimentação na lactação, tende a desaparecer com a evolução da idade (Two-way ANOVA,  $P<0,0001$ ).

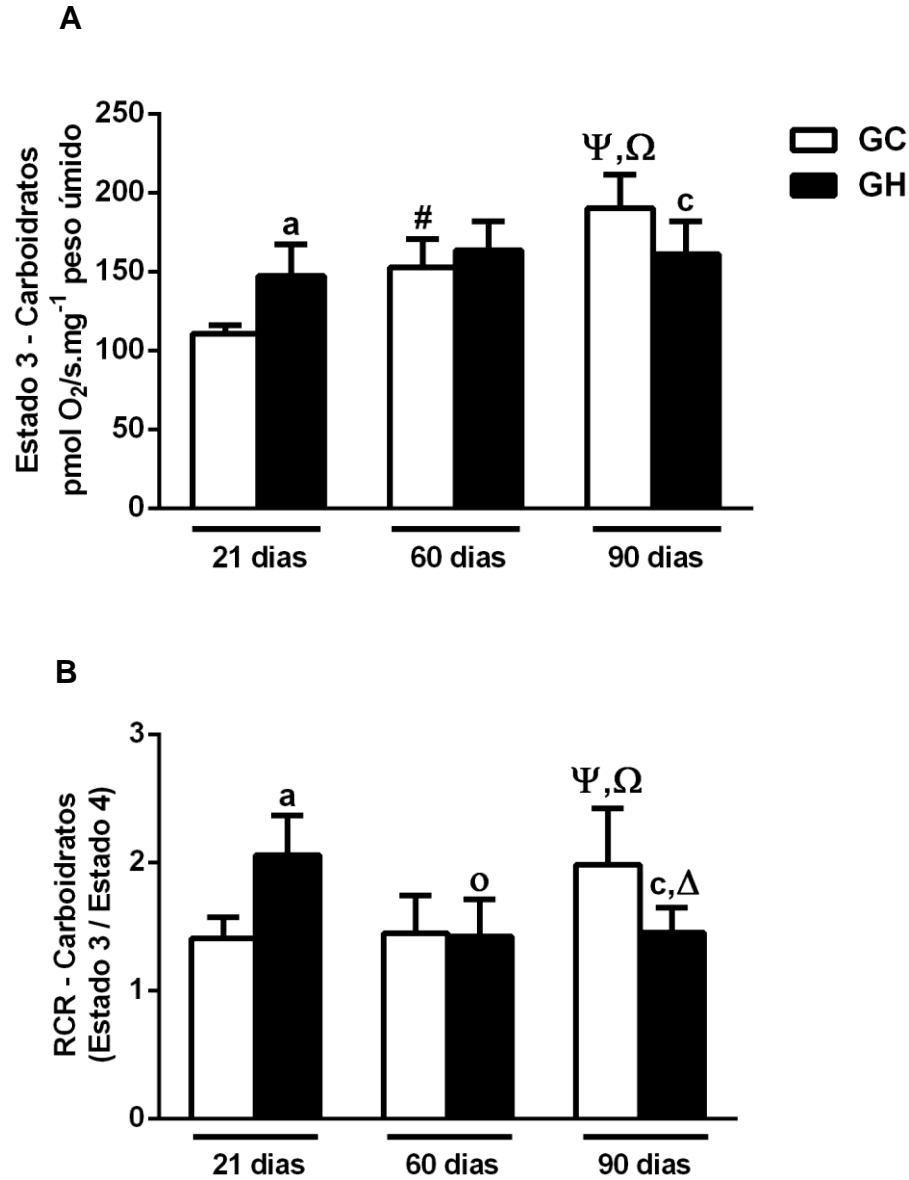
Avaliamos o desacoplamento mitocondrial através da razão do controle respiratório (RCR) para a oxidação dos complexos II e III. Aos 21 dias observamos um aumento do RCR no GH em relação ao seu controle (+46%,  $P<0,05$ ), evidenciando o acoplamento mitocondrial nesta idade, porém, aos 90 dias observamos uma redução do RCR no GH quando comparado a seu homólogo (-27%,  $P<0,01$ ), mostrando desacoplamento mitocondrial, (Figura 11B). Entretanto, aos 60 dias não observamos diferença estatísticas quando comparado ao GC. A idade influenciou significativamente neste resultado (Two-way ANOVA,  $P<0,05$ ), havendo também interação entre a hiperalimentação e a idade, que colaborou para a diminuição do RCR desses animais (Two-way ANOVA,  $P<0,0001$ ).

Quando adicionamos como substrato o ácido graxo palmitoil-L-carnitina, a taxa respiratória máxima (estado 3) do grupo hiperalimentado aos 21 dias não foi alterada, enquanto que aos 60 e 90 dias, observamos diminuição na oxidação dos ácidos graxos (-32%; -28%,  $P<0,01$  respectivamente) comparado aos seus respectivo controle (Figura 12A). Uma interação entre a hiperalimentação e a idade foi observada nestes resultados, onde os animais GH apresentaram diminuição da oxidação dos ácidos graxos (Two-way ANOVA,  $P<0,05$ ).

O RCR para oxidação de ácidos graxos do grupo GH aos 21 dias não mostrou-se diferente do seu respectivo controle, porém, observamos diminuição aos 60 e 90 dias (-26%,  $P < 0,05$ ; -23%,  $P < 0,01$ , respectivamente), quando comparado aos seus respectivos GC (Figura 12B). Este resultado, é ratificado pelo teste Two-way ANOVA, que mostrou que a hialimentação e a idade influenciaram independentemente na redução desta variável (Two-Way ANOVA,  $P < 0,001$ ).

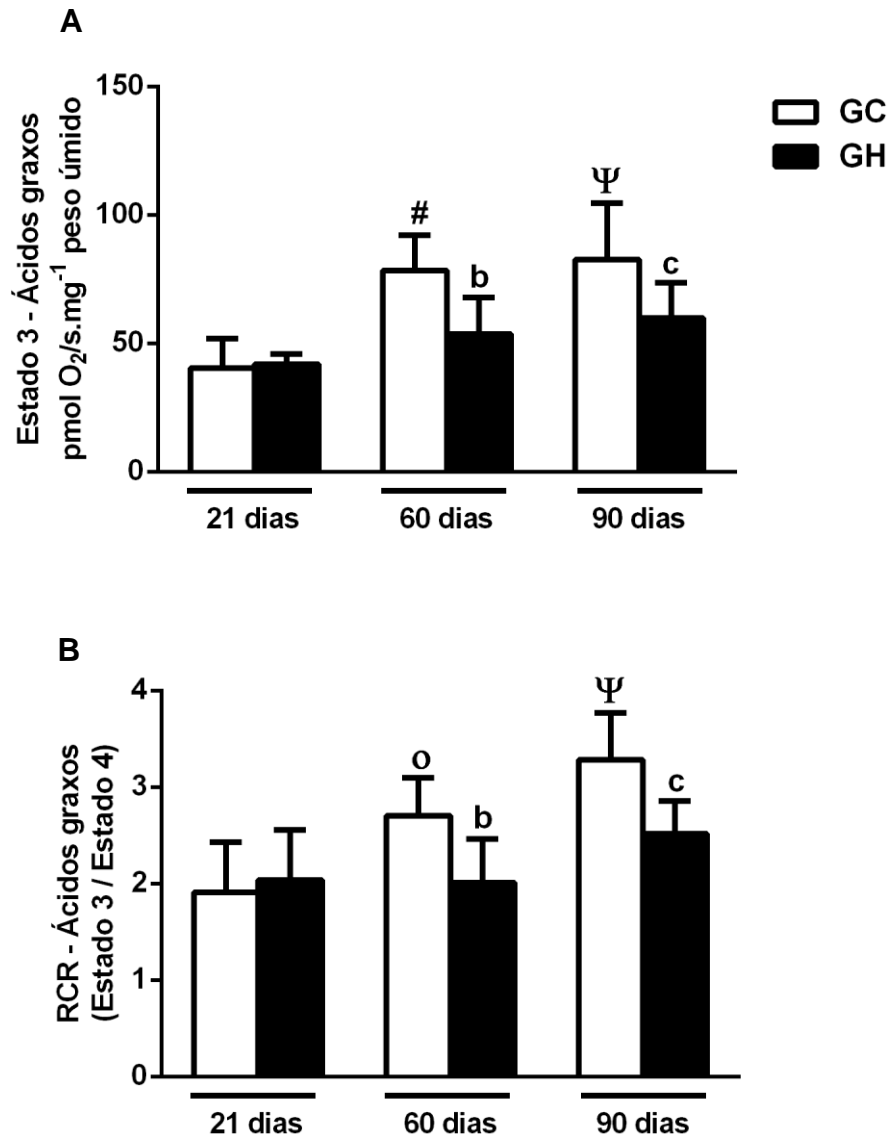
Também avaliamos a integridade da membrana mitocondrial utilizando citocromo c e observamos que não houve aumento do fluxo respiratório entre os grupos em nenhuma das idades, indicando ausência de danos na membrana mitocondrial.

Figura 11 - Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH, submetidas aos substratos relacionados aos protocolos de carboidratos



Legenda: (A) Estado 3 – Respiração máxima. (B) Razão do controle respiratório (RCR), calculado como a razão Estado 3/Estado 4. 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 diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [#] GC 60 vs GC 21 dias, [Ψ] GC 90 vs GC 21 dias, [Ω] GC 90 vs GC 60 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [Δ] GH 90 vs GH 21 dias.  $n=10$ /grupo.

Figura 12 - Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH, submetidas aos substratos relacionados aos protocolos de Ácidos graxos



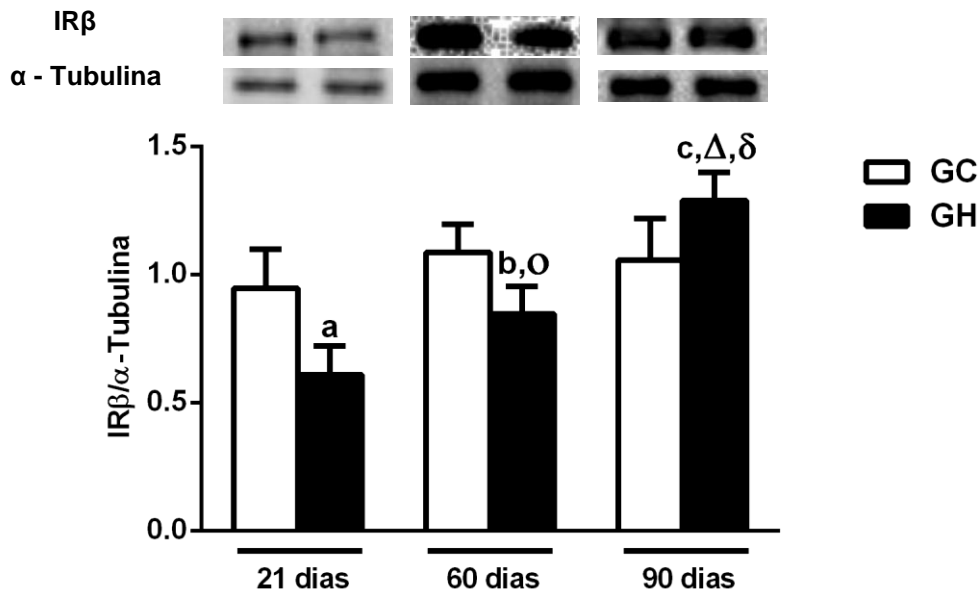
Legenda: (A) Estado 3 – Respiração máxima. (B) Razão do controle respiratório (RCR), calculado como a razão Estado 3/Estado 4. Os valores foram representados como média ± desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [#] GC 60 vs GC 21 dias, [ψ] GC 90 vs GC 21 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias. n=10/grupo.

## 4.5 Efeito da hiperalimentação na cascata de sinalização de insulina

### 4.5.1 Análise do conteúdo de IR $\beta$ nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

O conteúdo total do receptor de insulina (IR $\beta$ ) no coração dos camundongos do GH foi menor aos 21 e 60 dias (-30%; -22%,  $P < 0,05$ , respectivamente), comparados aos respectivos do grupo GC. Entretanto, aos 90 dias o conteúdo de IR $\beta$  foi maior (+22%,  $P < 0,05$ ), quando comparado ao seu homólogo (Figura 13). Tais achados foram suportados por uma interação entre os fatores hiperalimentação e a idade, sendo modificado com a evolução da idade (Two-Way ANOVA,  $P < 0,0001$ ).

Figura 13. Conteúdo total do receptor de insulina IR $\beta$  de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida



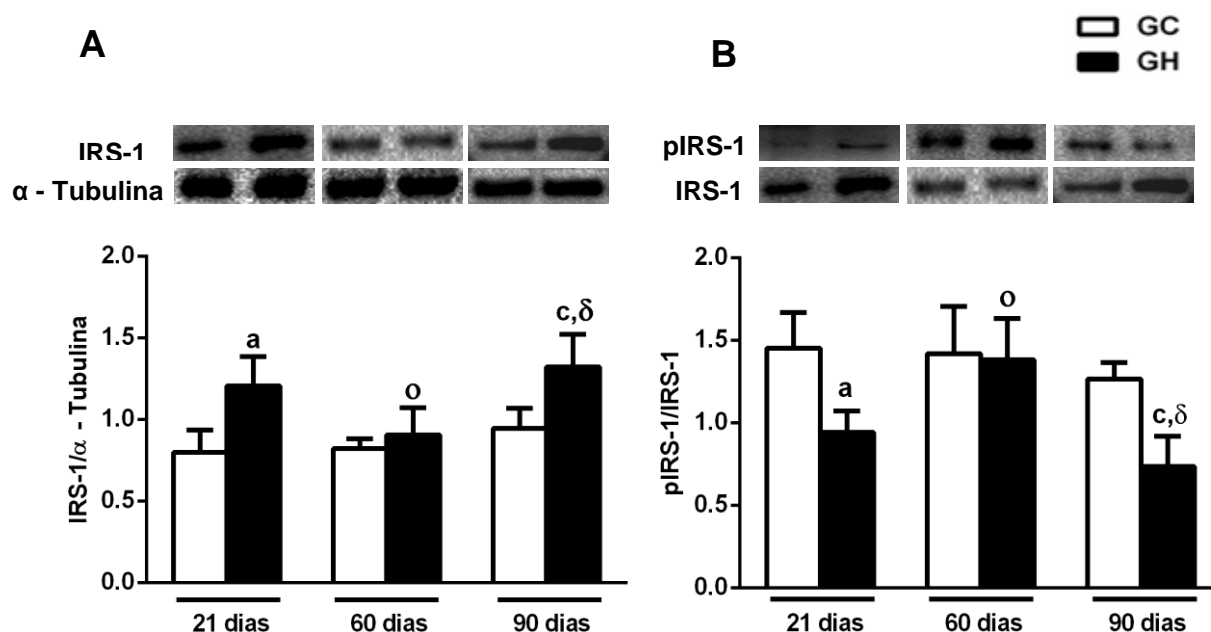
Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias. n=7/grupo.

#### 4.5.2 Análise do conteúdo de IRS-1 da pIRS-1/IRS-1 dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Em nossos resultados, observamos aumento do conteúdo de IRS-1 no GH aos 21 e 90 dias (+50%,  $P<0,001$ ; +40%,  $P<0,01$ ) (Figura 14A). Entretanto, não foram observadas diferença estatísticas no GH aos 60 dias quando comparado ao GC. Para este resultado, o fator hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente (Two-way ANOVA,  $P<0,05$ ), havendo também interação entre a hiperalimentação e a idade (Two-way ANOVA,  $P<0,05$ ).

Entretanto, aos 21 e 90 dias os animais do GH apresentaram diminuição na razão pIRS-1/IRS-1 (-35%; -42%,  $P<0,05$  respectivamente) em relação aos seus contrapares. Aos 60 dias a razão pIRS-1/IRS-1 foi semelhante entre os grupos estudado (Figura 14B). A hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente na diminuição deste resultado (Two-way ANOVA,  $P<0,0001$ ), houve interação entre os dois fatores estudados (Two-way ANOVA,  $P<0,05$ ).

Figura 14 - Conteúdo total da proteína IRS-1 e da razão pIRS-1/IRS-1 de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida

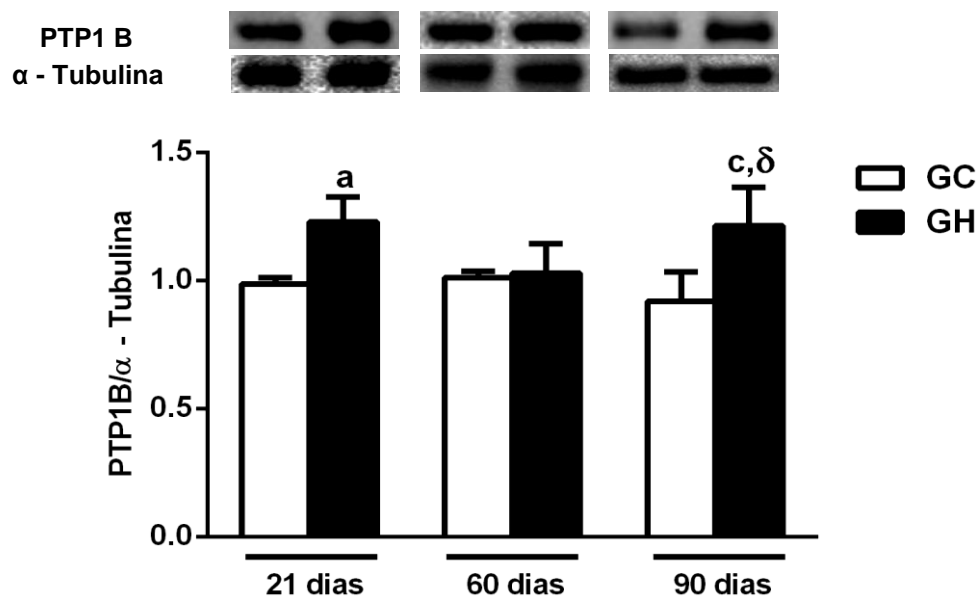


Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [δ] GH 90 vs GH 60 dias  $n=7$ /grupo.

#### 4.5.3 Análise do conteúdo de PTP1B dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Os animais GH apresentaram aumento de PTP1B no coração aos 21 e 90 dias (+24%,  $P < 0,05$ , +32%,  $P < 0,001$ ), quando comparado aos seus respectivos controles. Entretanto, não observamos diferença estatísticas do conteúdo de PTP1B nos cardiomiócitos de camundongos GH aos 60 dias de vida. Tais achados referentes ao aumento de PTP1B foram justificados pelo teste *Two Way* ANOVA, onde a hiperalimentação influenciou neste resultado (Two-way ANOVA,  $P < 0,0001$ ) (Figura 15).

Figura 15 - Conteúdo total dos proteína PTP1B de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida

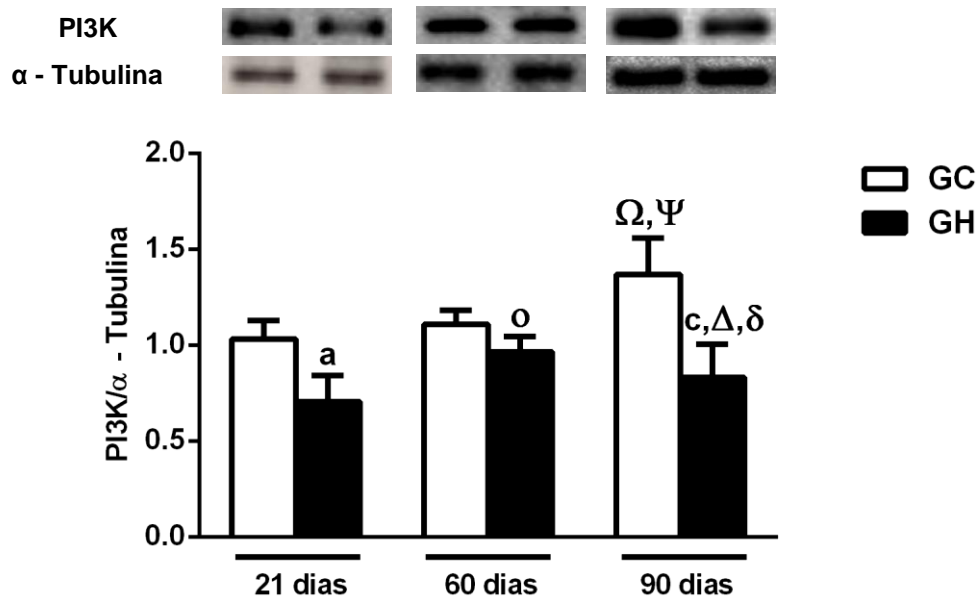


Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [δ] GH 90 vs GH 60 dias.  $n=7$ /grupo.

#### 4.5.4 Análise do conteúdo de PI3K nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Os cardiomiócitos dos camundongos do GH aos 21 e 90 dias apresentaram diminuição do conteúdo da PI3K (-32%,  $P < 0,05$ ; -39%,  $P < 0,001$ ) em relação aos seus correspondentes do grupo GC, resultando no prejuízo na via de sinalização da insulina no coração dos camundongos GH. Entretanto, não observamos diferença significativa nos animais GH aos 60 dias quando comparado aos seus controles (Figura 16). O teste Two-way ANOVA mostrou que a interação entre os fatores hiperalimentação e a idade colaboraram especialmente para a diminuição da PI3K ( $P < 0,0001$ ).

Figura 16 - Conteúdo total da proteína PI3K de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida



Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. 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 diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [ $\Omega$ ] GC 90 vs GC 60 dias, [ $\circ$ ] GH 60 vs GH 21 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias.  $n=7$ /grupo.

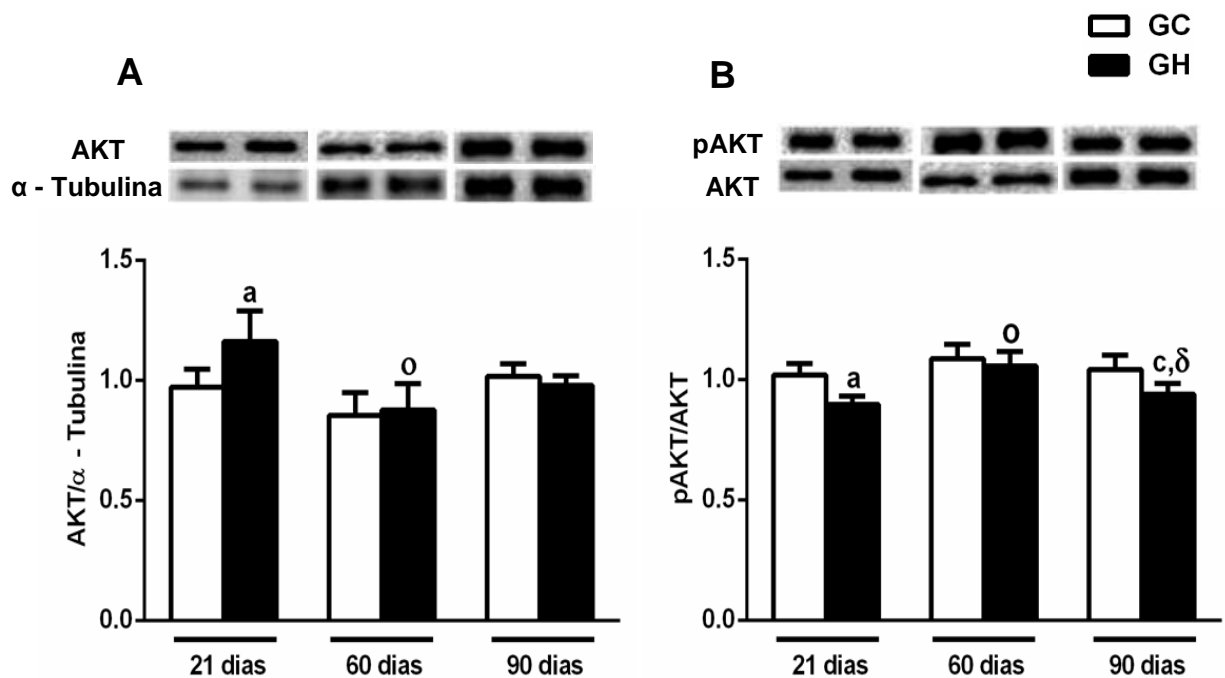
#### 4.5.5 Análise do conteúdo de Akt e da razão pAkt/Akt nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Aos 21 dias observamos aumento do conteúdo da proteína Akt (+20%,  $P < 0,05$ ) no coração dos camundongos do GH em comparação ao seu controle. Entretanto, não houve diferença significativa no conteúdo desta proteína aos 60 e 90 dias comparado aos seus respectivos controles. Verificou-se que a interação entre os fatores hiperalimentação e a idade interferiram neste parâmetro, denotando um efeito maximizado da hiperalimentação apenas no período precoce de vida das proles GH (Two-way ANOVA,  $P < 0,05$ ).

Além disso, aos 21 e 90 dias os animais do GH apresentaram diminuição na razão pAkt/Akt (-12%; -10%,  $P < 0,01$  respectivamente) em relação aos seus

contrapares, mostrando prejuízo na via de sinalização de insulina nestas idades. Aos 60 dias a razão pAkt/Akt foi semelhante entre os grupos estudado (Figura 17A, B). A hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente na diminuição deste resultado (Two-way ANOVA,  $P < 0,0001$ ).

Figura 17 - Conteúdo total da proteína Akt e da razão pAkt/Akt de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida



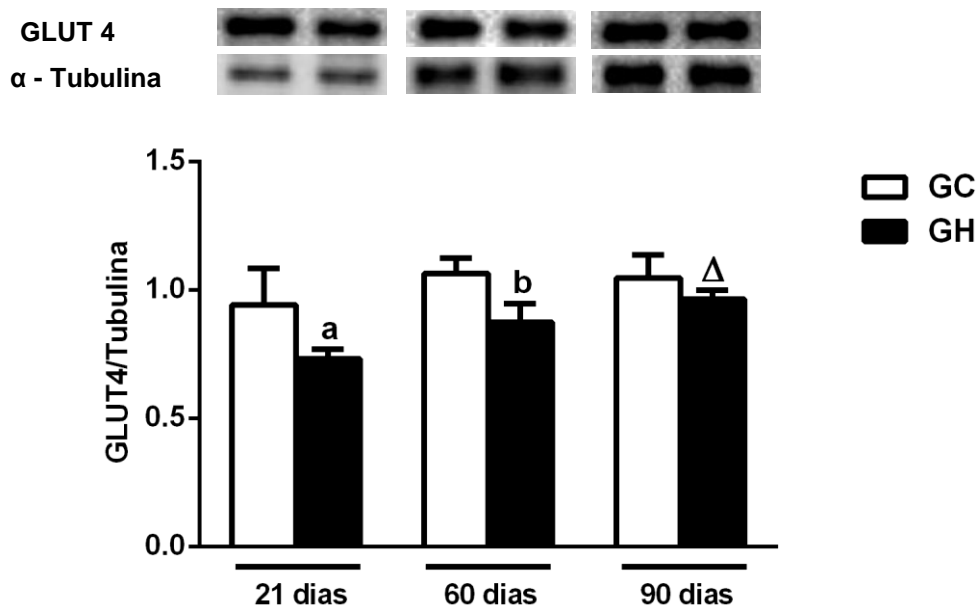
Legenda: Os gráficos representam a densidade relativa das proteínas normalizadas pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias.  $n=7$ /grupo

#### 4.5.6 Análise do conteúdo de GLUT4 dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Os cardiomiócitos de camundongos do GH aos 21 e 60 dias, apresentaram diminuição no conteúdo de GLUT4 (-22%,  $P < 0,001$ ; -8%,  $P < 0,01$ ). Entretanto, aos 90 dias não foi observado diferença significativa entre os grupos. O teste Two-way ANOVA, mostrou que os fatores hiperalimentação e idade influenciaram

independentemente nestes achados ( $P<0,0001$ ). Porém, não houve interação entre os dois fatores (Two-way ANOVA,  $P>0,05$ ), (Figura 18).

Figura 18 - Conteúdo total da proteína GLUT4 de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida



Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. 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 diferentes indicam diferença significativa para  $P<0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias.  $n=7$ /grupo.

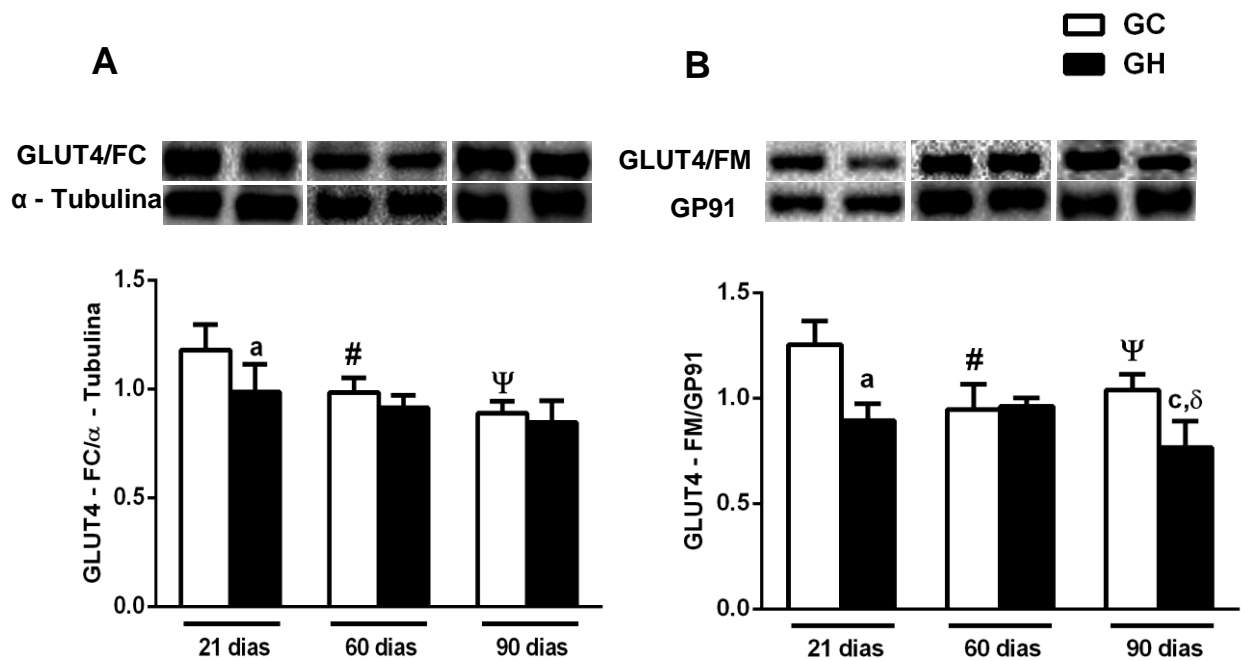
#### 4.5.7 Análise do conteúdo GLUT4 nas frações citosólica e de membrana dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Os animais GH aos 21 dias apresentaram uma diminuição do conteúdo de GLUT4 na fração citosólica (-16%,  $P<0,05$ ), enquanto que aos 60 e 90 dias não foram observadas diferenças significativas quando comparados aos GC (Figura 19A). Adicionalmente, observamos que o teste Two-way ANOVA evidenciou que a

hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente neste resultado, sobretudo em um momento precoce na vida das proles ( $P < 0,05$ ).

Ao analisarmos o conteúdo da fração de membrana, observamos que os animais GH aos 21 e 90 dias, apresentaram uma redução (-29%,  $P < 0,0001$ ; -26%,  $P < 0,01$ ) e aos 60 dias não foram observadas diferença entre os grupos nesta idade. (Figura 19B). Adicionalmente, o teste Two-way ANOVA verificou que a hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente neste resultado ( $P < 0,0001$ ). Havendo interação entre os dois fatores estudados ( $P < 0,0001$ ).

Figura 19. Conteúdo total da proteína GLUT4 nas frações citosólica e de membrana de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida

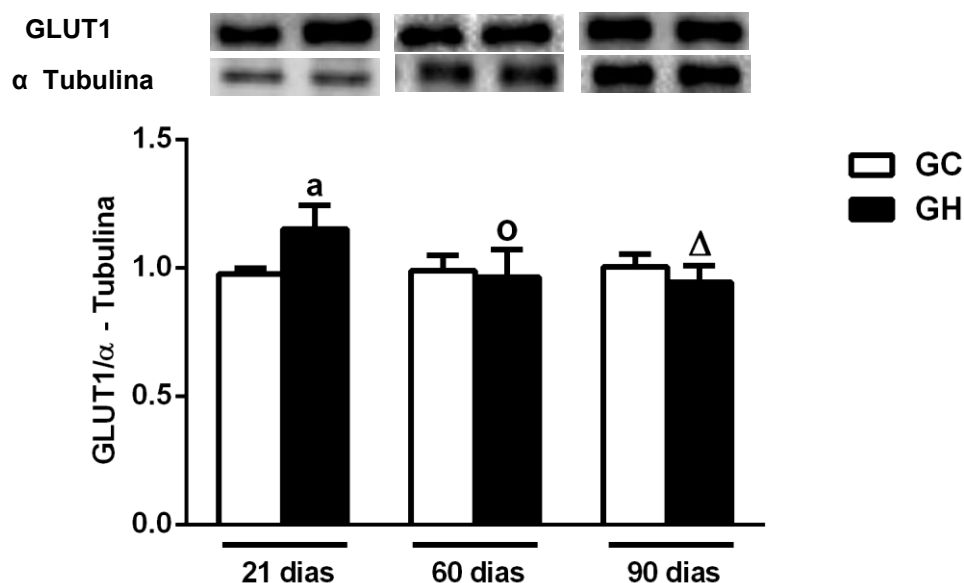


Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina e GP91. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [#] GC 60 s GC 21 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias n=7/grupo.

#### 4.5.8 Análise do conteúdo de GLUT1 nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Realizamos a análise do conteúdo da proteína GLUT1 no coração de camundongos controle e hiperalimentados aos 21, 60 e 90 dias de vida. Nossos resultados demonstram que existe um aumento significativo no conteúdo da proteína GLUT1 no grupo GH aos 21 dias (+18%,  $P < 0,01$ ) em comparação ao seu controle, enquanto que aos 60 e 90 dias não há diferença significativa entre os grupos (Figura 20). A interação entre os fatores hiperalimentação e idade contribuiu para esse resultado, sobretudo no grupo GH aos 21 dias, demonstrando um efeito precoce da hiperalimentação na variável descrita acima (Two-Way ANOVA,  $P < 0,001$ ).

Figura 20 - Conteúdo da proteína GLUT1 de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida

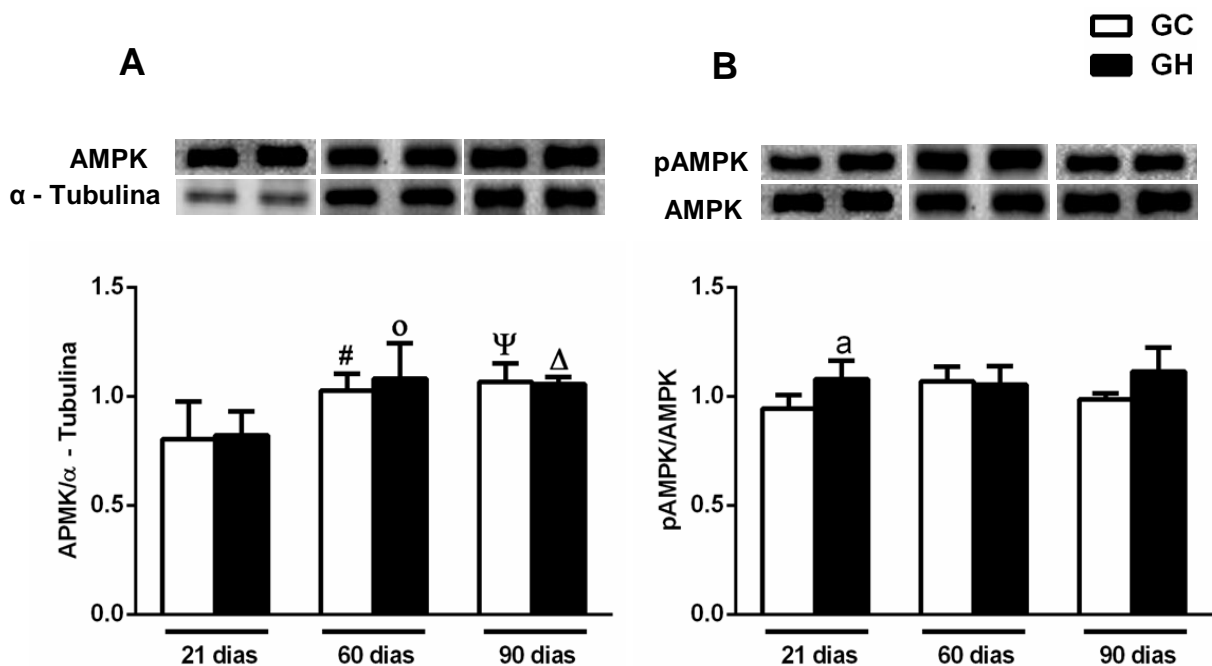


Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [Δ] GH 90 vs GH 21 dias.  $n=7$ /grupo

4.5.9 Análise do conteúdo de AMPK $\alpha$  e da razão pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Com relação ao conteúdo total de AMPK $\alpha$  não observamos diferença significativa entre os grupos aos 21, 60 e 90 dias. Adicionalmente, nossos resultados demonstraram um aumento na razão pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  nos animais GH aos 21 dias (+14%,  $P < 0,05$ ) em relação ao seu respectivo GC. Aos 60 e 90 dias, a razão pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  foi semelhante aos seus respectivos do grupo GC (Figura 21A, B). A hiperalimentação influenciou independentemente nestes resultados, influenciando somente em um período precoce, aos 21 dias (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ).

Figura 21. Conteúdo total da proteína AMPK $\alpha$  e da razão pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida

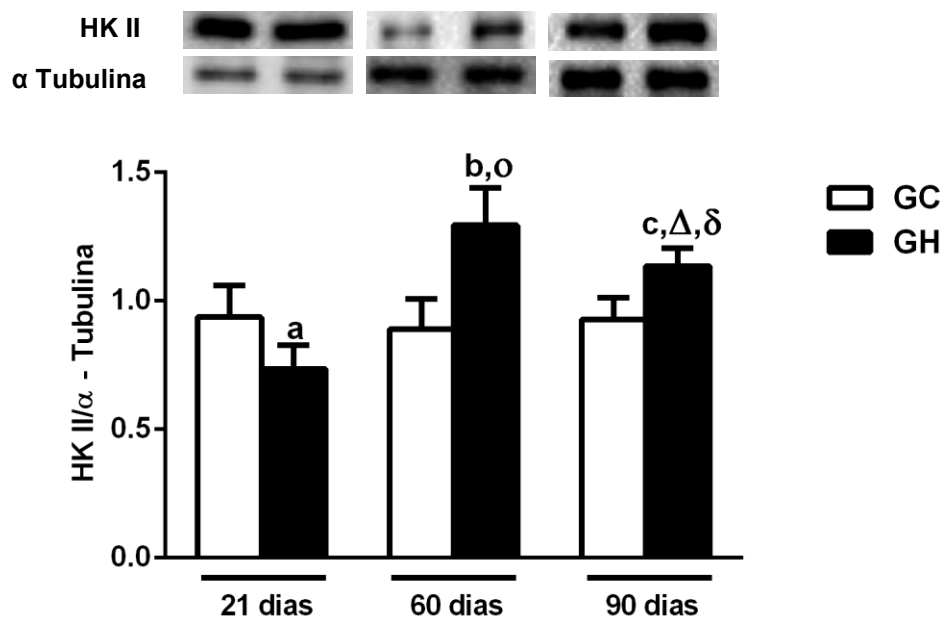


Legenda: Os gráficos representam a densidade relativa das proteínas normalizadas pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [#] GC 60 vs GC 21 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias. n=7/grupo.

#### 4.5.10 Análise do conteúdo de HK II dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Quanto ao conteúdo de HK II, uma enzima glicolítica chave, observamos diferença significativa entre os grupos nos cardiomiócitos de camundongos GH aos 21, 60 e 90 dias de vida. Houve diminuição do conteúdo de HKII aos 21 dias (-22%,  $P < 0,05$ ) em relação ao seu contrapartido e aos 60 e 90 dias um aumento desta variável (+45%,  $P < 0,001$ ; +22%,  $P < 0,05$ ), comparado com os seus respectivos controles. O teste Two-way ANOVA evidenciou uma interação entre os fatores hiperalimentação e a idade sobre o conteúdo da HKII, o qual variou com o tempo de vida das proles ( $P < 0,0001$ ), (Figura 22).

Figura 22 - Conteúdo total da proteína HK II de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida



Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. 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 diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias.  $n=7$ /grupo.

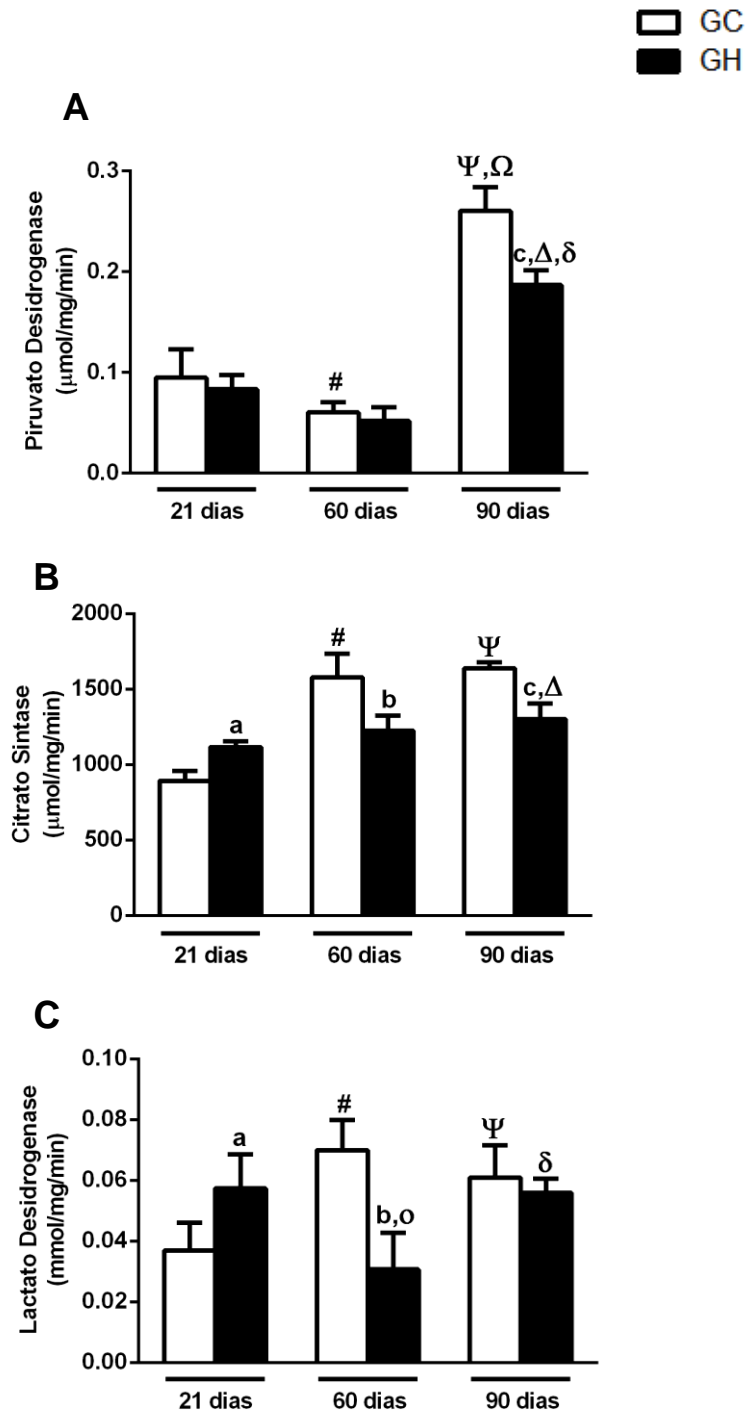
#### **4.6 Atividade enzimática das enzimas chaves no metabolismo energético dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida**

A atividade das enzimas PDH, CS e LDH foi medida bioquimicamente nos coração de camundongos dos grupos GC e GH. Observamos que os animais do grupo GH não demonstraram diferença significativa na atividade da enzima PDH aos 21 e 60 dias. Entretanto, observamos menor atividade da enzima aos 90 dias (-28%,  $P < 0,001$ ) quando comparado ao seu controle (Figura 23A). Para este resultado, a interação entre o fator hiperalimentação e a idade foi notória, uma vez que a atividade enzimática decresceu com a evolução temporal (Two-way ANOVA,  $P < 0,01$ ).

Ao analisarmos a atividade da CS, observamos que o GH aos 21 dias apresentou aumento significativo na atividade enzimática (+25%,  $P < 0,01$ ) em relação ao seu contrapartido, porém aos 60 e 90 dias tais grupos apresentaram menor atividade (-22%; -21%,  $P < 0,001$ ) quando comparado ao grupo GC (Figura 23B). O teste Two-way ANOVA mostrou uma interação entre os fatores hiperalimentação e idade nesse parâmetro, ratificado pela diminuição da atividade enzimática de CS com o decorrer do tempo ( $P < 0,0001$ ).

Adicionalmente, observamos que o GH aos 21 dias demonstrou um aumento na atividade da LDH (+54%,  $P < 0,01$ ), entretanto com diminuição aos 60 dias (-49%,  $P < 0,0001$ ) e sem diferença significativa aos 90 dias, quando comparados com os seus correspondentes GC (Figura 23C). Para este resultado houve interação entre a hiperalimentação e a idade na atividade desta enzima (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ).

Figura 23 - Atividade enzimática da Piruvato desidrogenase (PDH), Citrato sintase (CS) e Lactato desidrogenase (LDH) de cardiomiócitos dos camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias



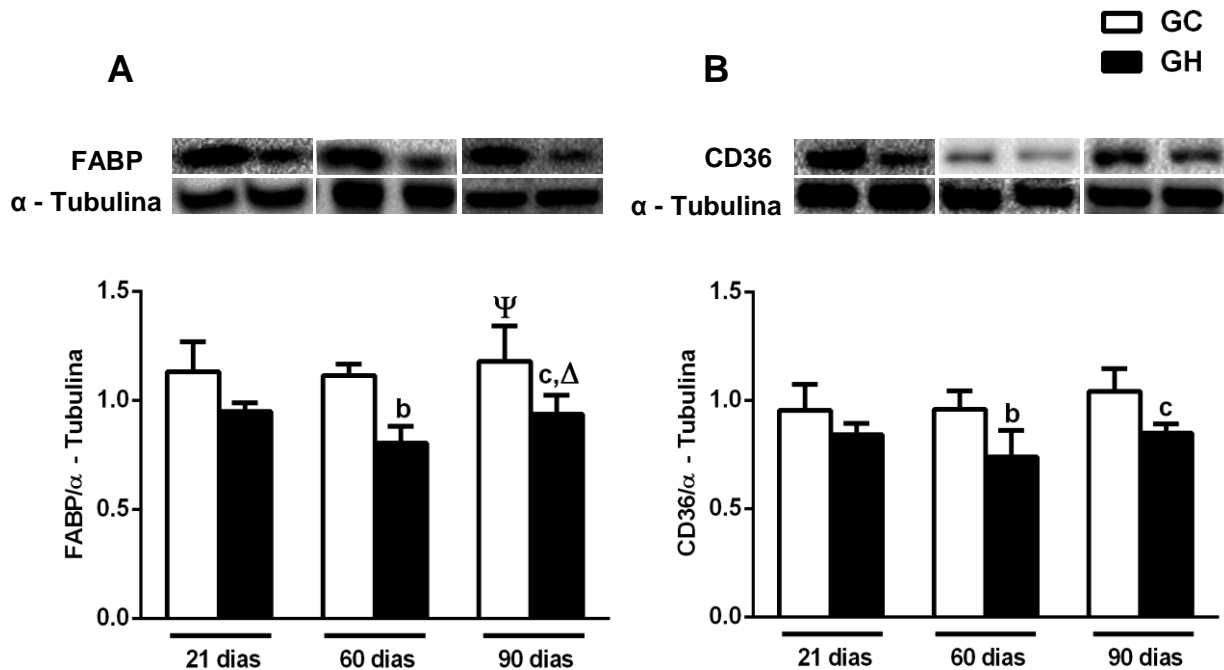
Legenda: Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [#] GC 60 vs GC 21 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [ $\Omega$ ] GC 90 vs GC 60 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias.  $n=8$ /grupo.

#### 4.7 Conteúdo das proteínas envolvidas no metabolismo energético mitocondrial

##### 4.7.1 Análise do conteúdo de FABP e CD36 dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Nossos resultados demonstraram que não houve diferença estatísticas do conteúdo de FABP e CD36 nos cardiomiócitos de camundongos GH aos 21 dias de vida. Enquanto que aos 60 e 90 dias, o GH apresentou diminuição do conteúdo de FABP (-21%; -28%,  $P<0,05$ ) e CD36 (-23%,  $P<0,001$ ; -19%,  $P<0,05$ ), em comparação com os seus respectivos controles. Este resultado, indica prejuízo na captação dos ácidos graxos para que ocorra a beta oxidação na mitocôndria. Tais achados referentes à diminuição de FABP e CD36, foram justificados pelo teste *Two Way ANOVA*, onde a hiperalimentação influenciou negativamente neste resultado (*Two-way ANOVA*,  $P<0,05$ ), (Figura 24A, B).

Figura 24 - Conteúdo total da proteína FABP e CD36 de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida



Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. 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 diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias.  $n=7$ /grupo.

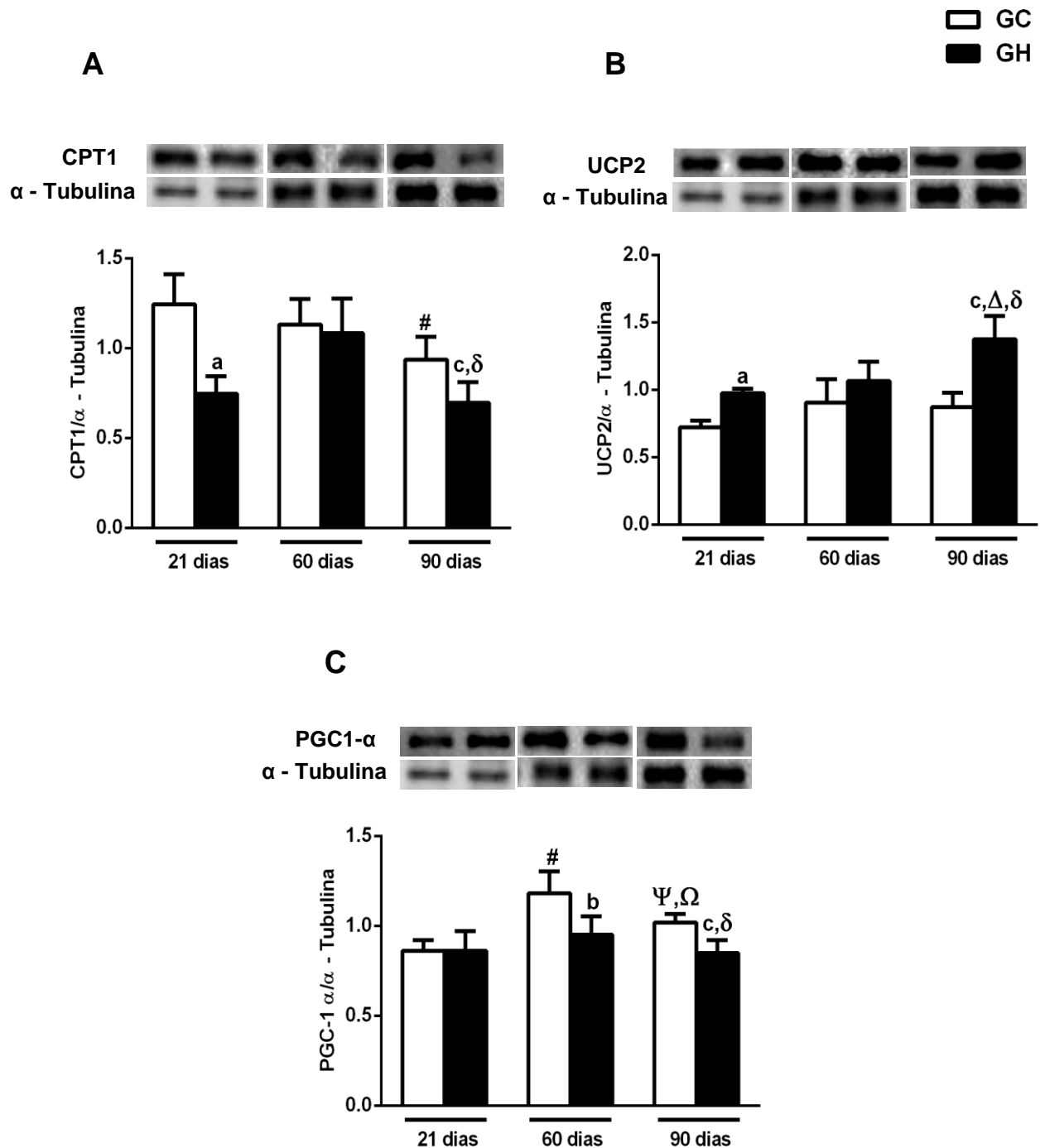
#### 4.7.2 Análise do conteúdo de CPT1, UCP2 e PGC1- $\alpha$ dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Observamos em nosso resultado que os animais do GH apresentaram diminuição do conteúdo da proteína CPT1 aos 21 e 90 dias (-22%,  $P < 0,001$ ; -26%,  $P < 0,05$ ) e aumento no conteúdo da proteína UCP2 (+36%,  $P < 0,05$ ; + 57%,  $P < 0,001$ , respectivamente) no coração quando comparado aos seus controles. Entretanto aos 60 dias, não se observou diferença significativa destas proteínas entre os grupos. A hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente este parâmetro (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ), havendo também interação entre os dois fatores estudados,

indicando que o parâmetro observado sofre influência deletéria da hiperalimentação, maximizada com a idade das proles (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ), (Figura 25A,B).

Quanto ao conteúdo de PGC1- $\alpha$ , não observamos diferença estatística no GH aos 21 dias. Entretanto, os cardiomiócitos dos animais GH apresentaram redução de PGC1- $\alpha$  aos 60 e 90 dias (-20%,  $P < 0,001$ ; -17%,  $P < 0,05$ , respectivamente), quando comparado aos seus grupos controles. Além disso, tais achados foram justificados pelo teste *Two Way* ANOVA, onde a hiperalimentação e a idade influenciaram negativamente neste resultado (Two-way ANOVA,  $P < 0,0001$ ). Verificou-se uma interação entre os fatores hiperalimentação e a idade neste resultado (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ), (Figura 25C).

Figura 25 - Conteúdo da proteínas CPT1, UCP2 e PGC1- $\alpha$ , obtidos do cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias

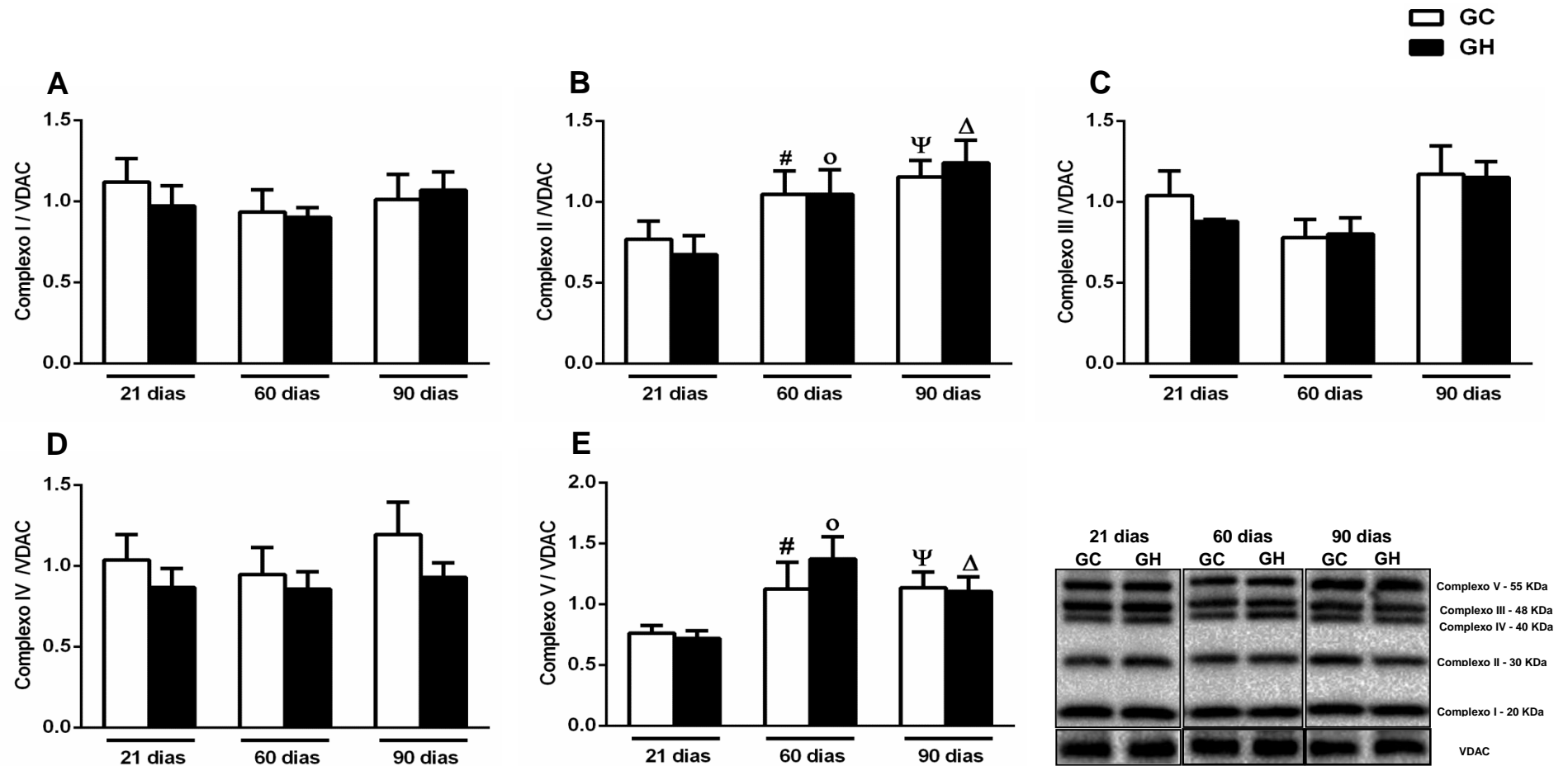


Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [#] GC 60 vs GC 21 dias, [Ψ, Ω] GC 90 vs GC 21 dias, [Δ] GH 90 vs GH 21 dias, [δ] GH 90 vs GH 60 dias. n=8/grupo.

#### 4.7.3 Análise do conteúdo dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Avavaliámos o conteúdo dos complexos I, II, III, IV e V da cadeia de transporte de elétrons pela técnica de Western Blotting, conforme demonstrado na Figura (26A, B, C, D, E). Como podemos observar, os animais do GH não apresentaram diferença estatísticas do conteúdo dos complexos respiratórios quando comparados aos seus respectivos grupos controles em todas as idades.

Figura 26 - Conteúdo total dos complexos respiratórios da cadeia transportadora de elétrons (I, II, III, IV e V) de cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida

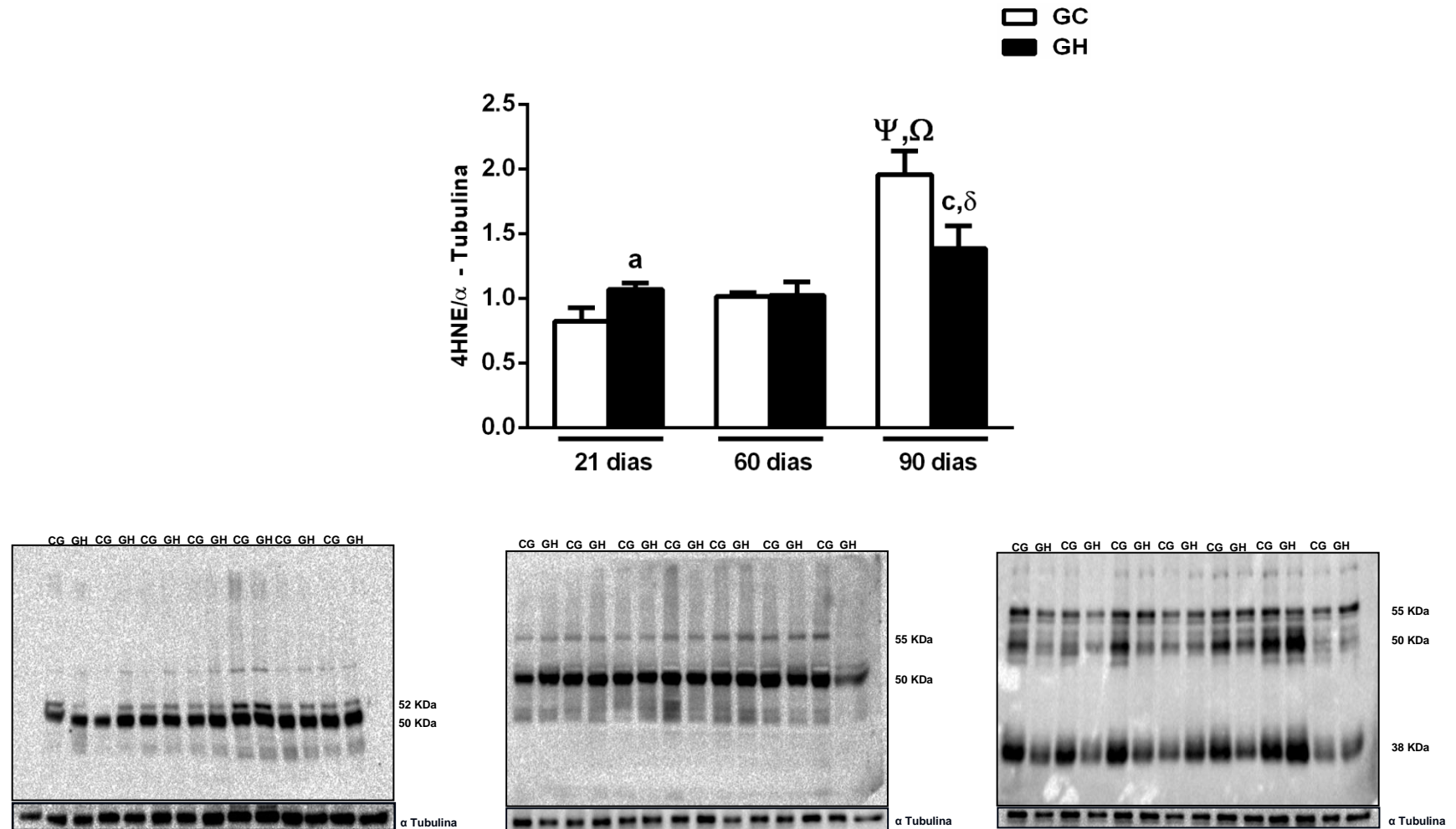


Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno VDAC. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [#] GC 60 vs GC 21 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias.  $n=7$ /grupo.

#### 4.7.4 Análise do conteúdo dos de 4HNE dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Os corações dos animais do GH apresentaram aumento de conteúdo da proteína 4-HNE aos 21 dias (+29%,  $P<0,01$ ) e redução aos 90 dias (-29%,  $P<0,001$ ), quando comparado ao GC. Entretanto, não foi observada diferença significativa quando comparados ao GC (Figura 27). O teste *Two Way ANOVA* verificou que a hiperalimentação e a idade influenciaram neste resultado (Two-way ANOVA,  $P<0,0001$ ). Além disso, verificou-se uma interação entre os fatores hiperalimentação e a idade neste resultado (Two-way ANOVA,  $P<0,05$ ).

Figura 27 - Conteúdo da proteína 4HNE, obtidos do cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias



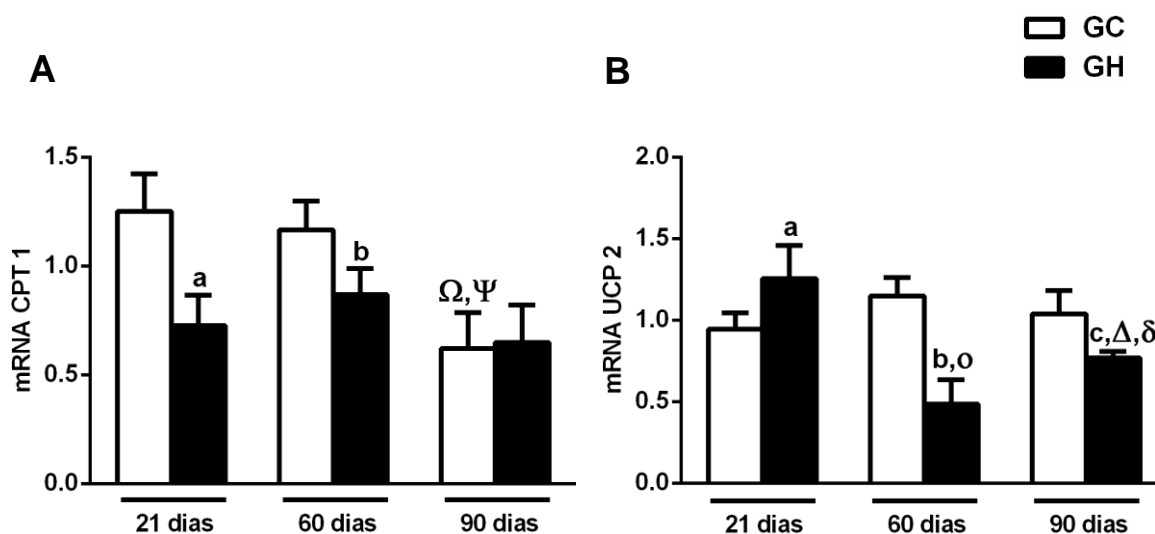
Legenda: O gráfico representa a densidade relativa da proteína normalizada pelo controle endógeno  $\alpha$ -Tubulina. Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [ $\Omega$ ] GC 90 vs GC 60 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias. n=8/grupo.

## 4.8 Expressão do mRNA de proteínas envolvidas no metabolismo energético mitocondrial

### 4.8.1 Expressão do mRNA para CPT1 e UCP2 dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Quanto a avaliação da expressão cardíaca do mRNA para CPT1, observamos uma diminuição no GH aos 21 dias e 60 dias (-42%,  $P < 0,001$ ; -26%,  $P < 0,05$ ), enquanto que aos 90 dias não observamos diferença em relação aos seus homólogos (Figura 28A). A expressão cardíaca do mRNA para UCP2 no GH aos 21 dias aumentou (+34%,  $P < 0,01$ ) e aos 60 e 90 dias diminuiu (-57%,  $P < 0,001$ ; -26%,  $P < 0,05$ ), quando comparado aos seus contrapares (Figura 28B). A hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente este parâmetro (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ), havendo também interação entre os dois fatores estudados, comprovando que com a evolução da idade, ocorre a diminuição da expressão de UCP2 nos animais GH (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ).

Figura 28 - Expressão do mRNA para a proteína CPT1 e UCP2 obtidos dos cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias

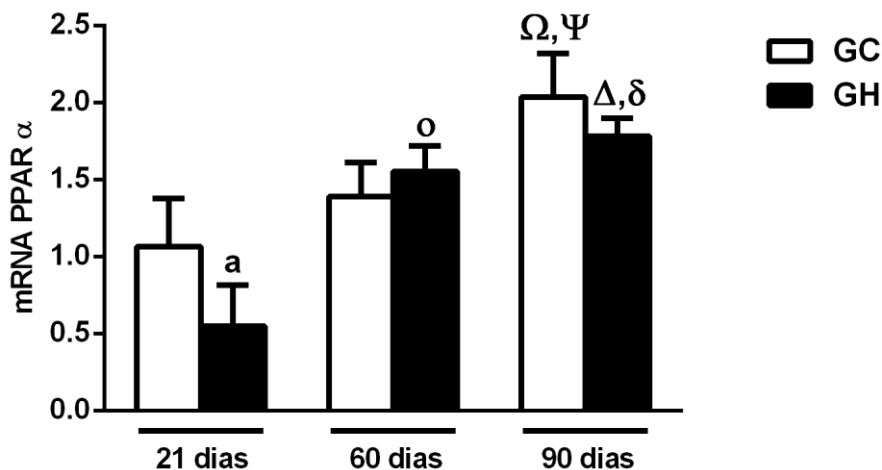


Legenda: Os gráficos apresentam a expressão de mRNA como a razão da quantificação relativa das proteínas normalizadas pelo controle endógeno (mRNA da Actina). Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [ $\Omega$ ] GC 90 vs GC 60 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias. n=8/grupo.

#### 4.8.2 Expressão do mRNA para PPAR $\alpha$ dos cardiomiócitos de camundongos dos rupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Avaliamos a expressão gênica cardíaca do PPAR $\alpha$  no coração e observamos uma diminuição nos animais GH aos 21 dias (-48%,  $P < 0,0001$ ) quando comparados aos seus contrapares. No entanto, aos 60 e 90 dias a expressão deste manteve-se inalterada, quando comparada aos respectivos grupos GC (Figura 29). A hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente este parâmetro (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ), havendo também interação entre os dois fatores estudados sobretudo em idade precoce das proles (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ).

Figura 29 - Expressão do mRNA para a proteína PPAR $\alpha$  obtidos dos cardiomiócitos de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias

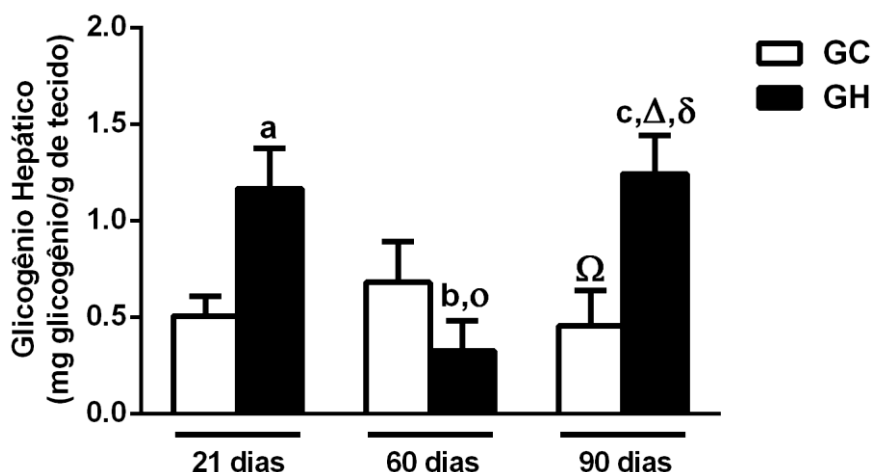


Legenda: Os gráficos apresentam a expressão de mRNA como a razão da quantificação relativa das proteínas normalizadas pelo controle endógeno (mRNA da Actina). Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [ $\psi$ ] GC 90 vs GC 21 dias, [ $\Omega$ ] GC 90 vs GC 60 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [ $\Delta$ ] GH 90 vs GH 21 dias, [ $\delta$ ] GH 90 vs GH 60 dias.  $n=8$ /grupo.

#### 4.9 Alterações bioquímicas hepáticas de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

Aos 21, 60 e 90 dias os camundongos hiperalimentados apresentaram maior peso tecidual (+97%,  $P < 0,0001$ ; +16%,  $P < 0,01$ ; +25%,  $P < 0,001$ ) quando comparados com os seus respectivos controles. Entretanto, maior conteúdo de glicogênio hepático foi notório apenas aos 21 e 90 dias nos animais GH (+ 139%,  $P < 0,001$ ; +107%,  $P < 0,01$ , respectivamente), quando comparados com os seus homólogos, (Figura 30). A hiperalimentação e a idade influenciaram independentemente este parâmetro (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ), havendo também interação entre os dois fatores estudados, demonstrando uma influência da hiperalimentação somente nos períodos precoce e tardio das proles (Two-way ANOVA,  $P < 0,001$ ).

Figura 30 - Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo do glicogênio hepático de camundongos dos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias

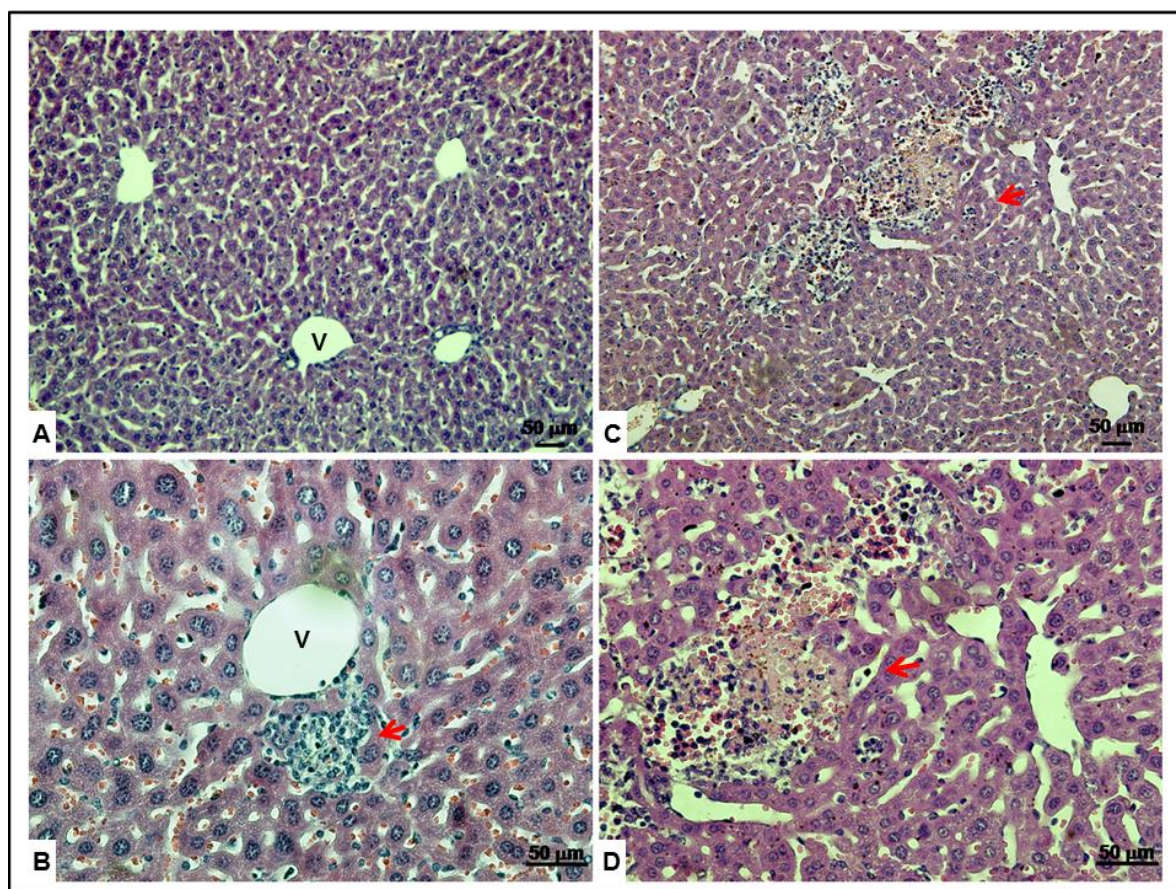


Legenda: Os valores foram representados como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As diferenças foram testadas com Two-way ANOVA seguidas de pós-teste de Bonferroni com múltiplas comparações. Letras e símbolos diferentes indicam diferença significativa para  $P < 0,05$ , comparando com: [a] GC vs GH 21 dias, [b] GC vs GH 60 dias, [c] GC vs GH 90 dia, [Ω] GC 90 vs GC 60 dias, [o] GH 60 vs GH 21 dias, [Δ] GH 90 vs GH 21 dias, [δ] GH 90 vs GH 60 dias. n=10/grupo.

#### 4.10 Histologia do fígado de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

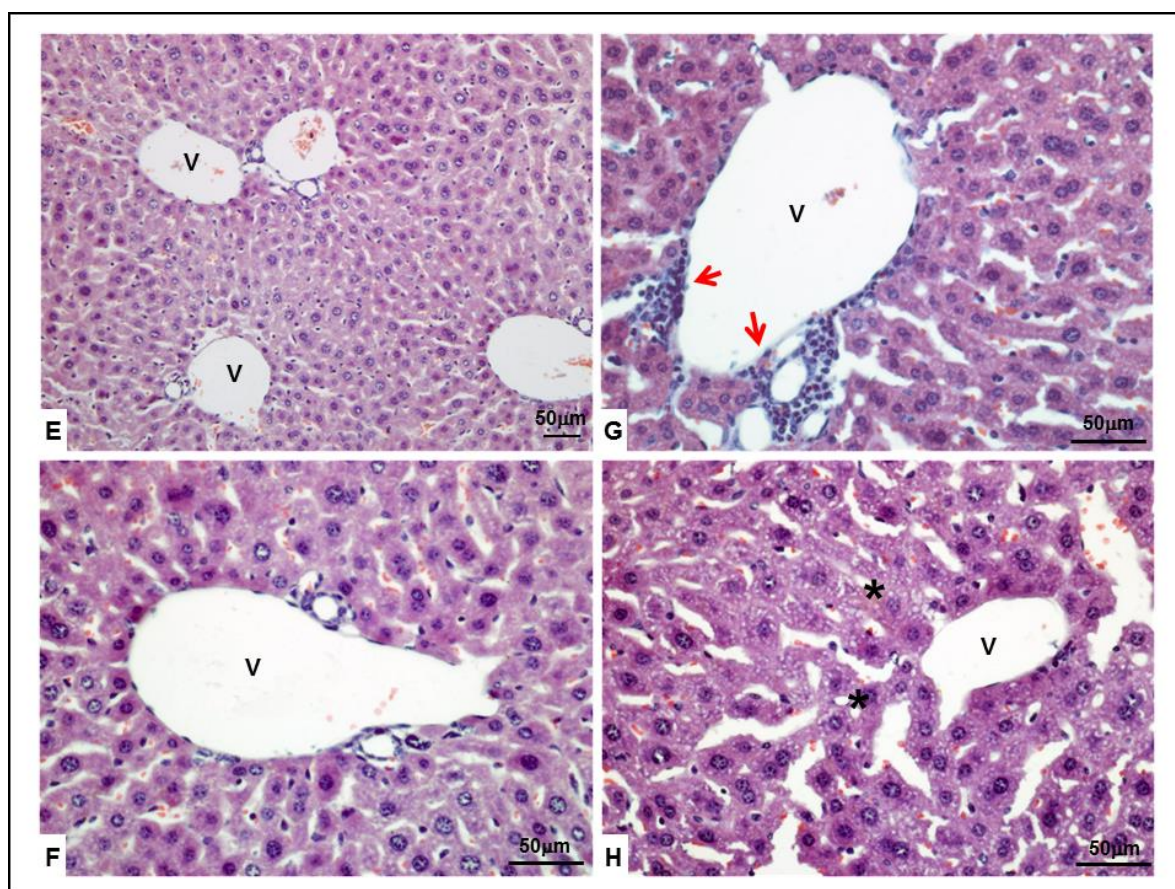
A análise histológica de seções do fígado coradas por hematoxilina e eosina, demonstrou que o fígado do camundongos do GC, aos 21 dias evidenciou estrutura normal (Figura 31A) e pequenos focos inflamatórios no GH (Figura 31B, C, D), quando comparado com o GC. Além disso, o GC aos 60 dias evidenciou morfologia preservada com cordões de hepatócitos íntegros e veia centro-lobular (V) (Figura 32E, F), enquanto que no GH observou-se presença de infiltrado de células (seta) e hepatócitos com microesteatose (\*) (Figura 32G, H). Adicionalmente, o GC aos 90 dias apresentou morfologia preservada com cordões de hepatócitos íntegros e veia centro-lobular (V) (Figura 33I, J) e o GH apresentou presença microesteatose nos cordões de hepatócitos (Figura 33K, L).

Figura 31 - Análise histológica do fígado de camundongos dos GC e GH aos 21 dias de vida, corados com hematoxilina e eosina (H&E)



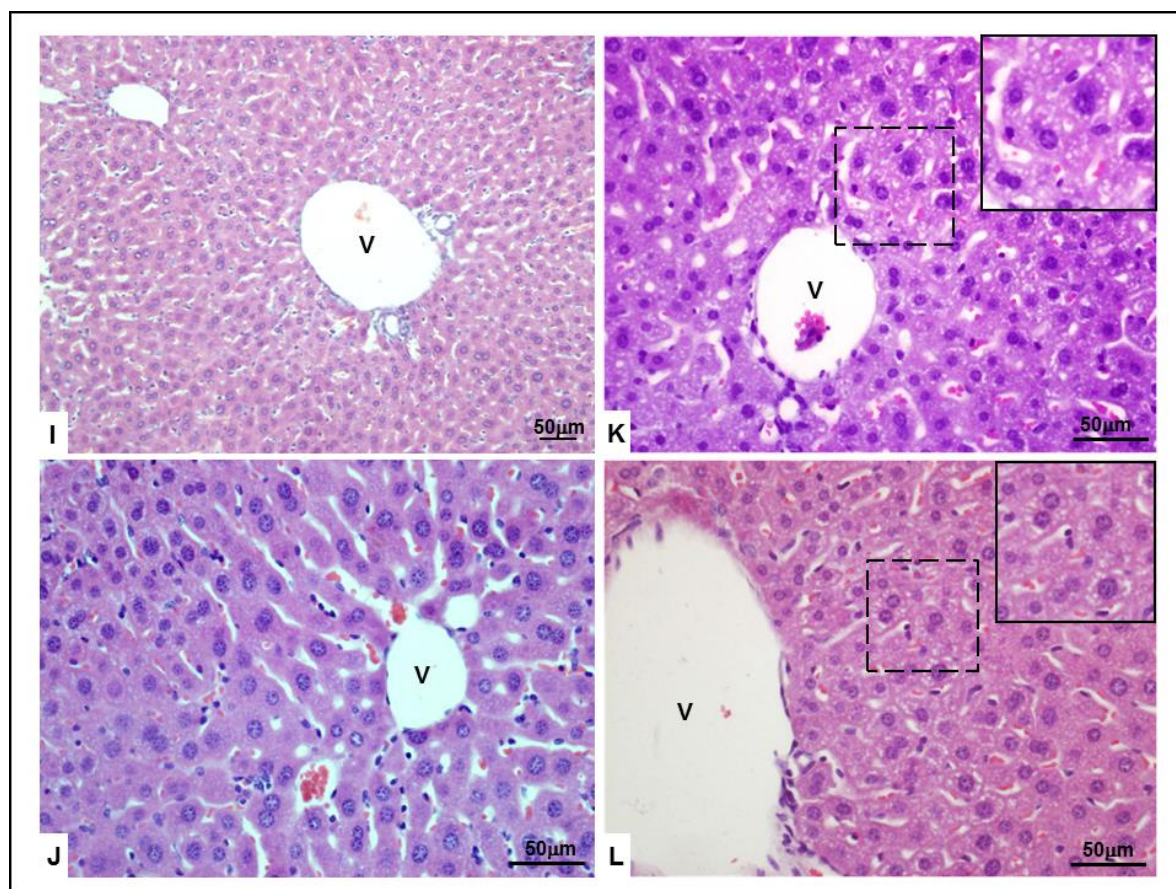
Legenda: (A) GC demonstra arquitetura típica com estruturas do cordão hepático e veias centrais (V), (B, C, D) GH apresenta infiltrado celular inflamatório (seta). n=6/grupo.

Figura 32 - Análise histológica do fígado de camundongos dos GC e GH aos 60 dias de vida, corados com hematoxilina e eosina (H&E)



Legenda: (E, F) GC com morfologia preservada com cordões de hepatócitos íntegros e veia centrolobular (V), (G,H) GH presença de infiltrado de células (seta) e hepatócitos com microesteatose (\*). n=6/grupo.

Figura 33 - Análise histológica do fígado de camundongos dos GC e GH aos 90 dias de vida, corados com hematoxilina e eosina (H&E)



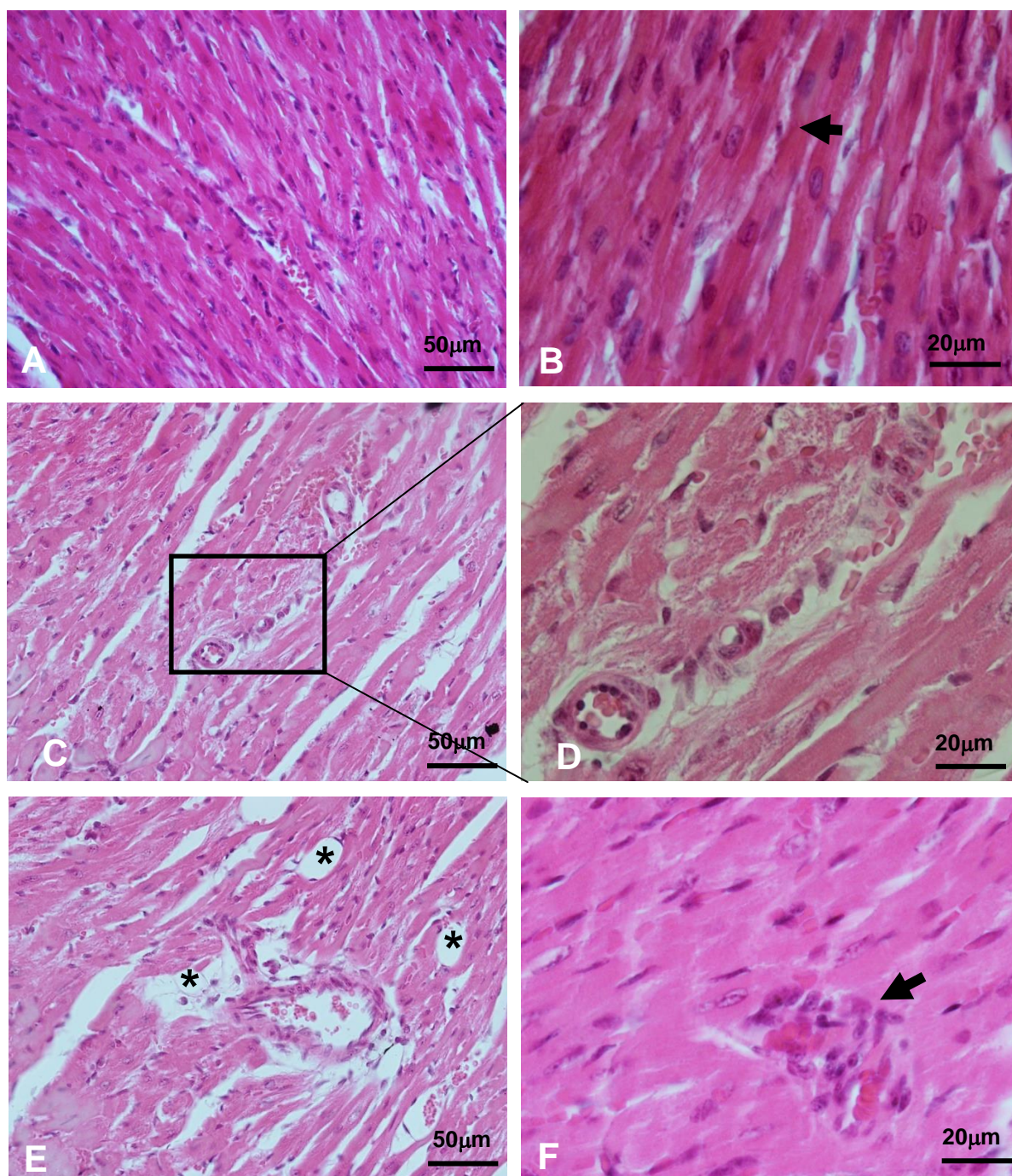
Legenda: (I, J) GC com morfologia preservada com cordões de hepatócitos íntegros e veia centrolobular (V), (K, L) GH presença microesteatose nos cordões de hepatócitos. Os inserts representam a área pontilhada ampliada para observação da microesteatose. n=6/grupo.

#### 4.11 Histologia do coração de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida

A análise histológica do coração dos camundongos do GC, aos 21 dias evidenciou cardiomiócitos bifurcados típicos, com núcleo central e discos intercalares (Figura 34A, B) e no GH apresentou fibrose, desorganização dos cardiomiócitos, presença de adipócitos e infiltrado inflamatório (Figura 34C, D). Além disso, o GC aos 60 dias evidenciou cardiomiócitos típicos bifurcados, com núcleo central e discos intercalares (Figura 35A, B), enquanto que o GH observou-se fibrose, desorganização dos cardiomiócitos, infiltrado inflamatório e adipócitos (Figura 35C, D, E). Adicionalmente, nos animais controles aos 90 dias observamos

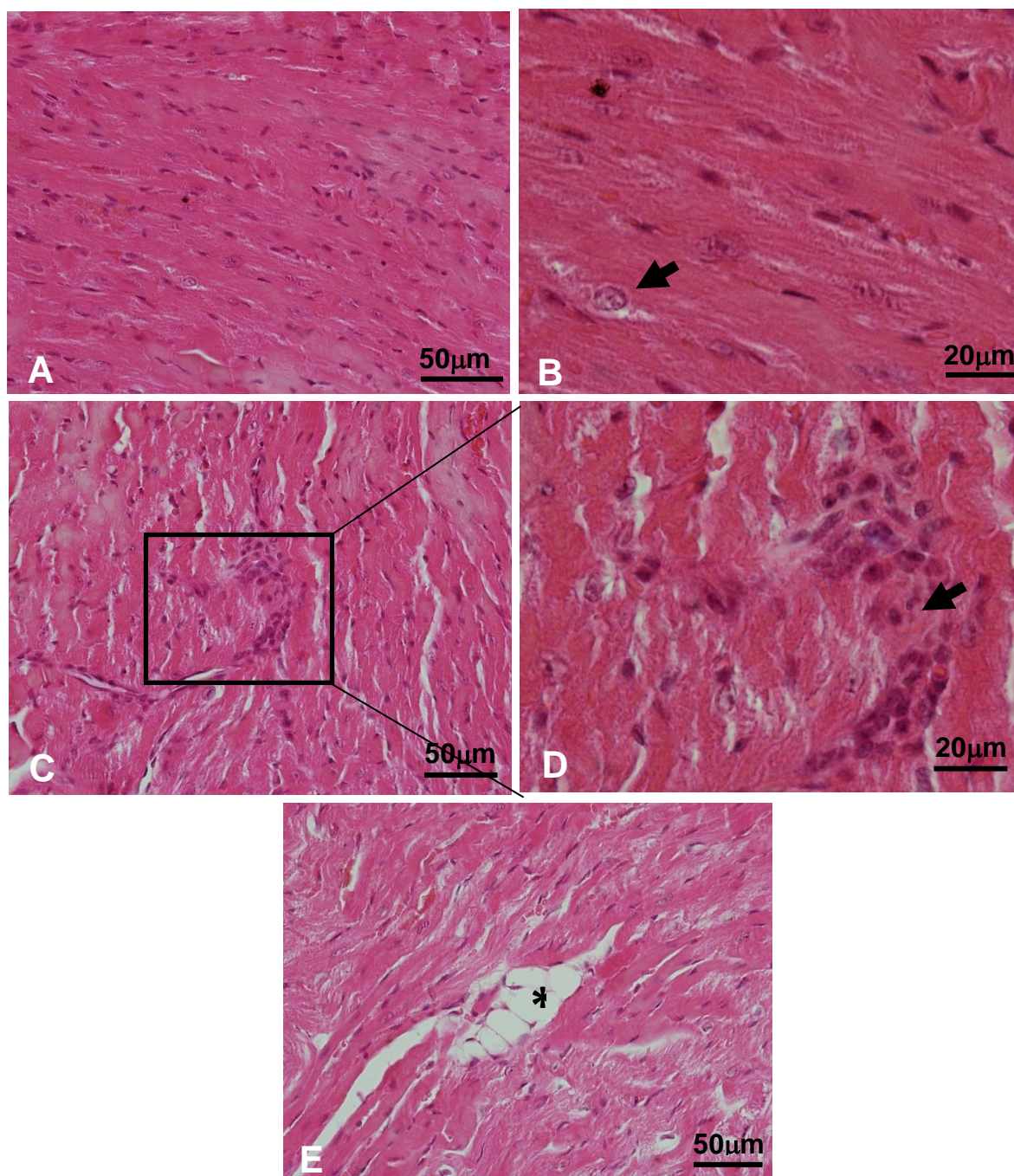
cardiomiócitos típicos com estriações transversais e discos intercalares (Figura 36A) e o GH apresentou miocárdio com acúmulo de tecido adiposo, cardiomiócito desestruturados e esteatose (Figura 36B, C).

Figura 34 - Análise histológica do coração de camundongos dos GC e GH aos 21 dias de vida, corados com hematoxilina e eosina (H&E)



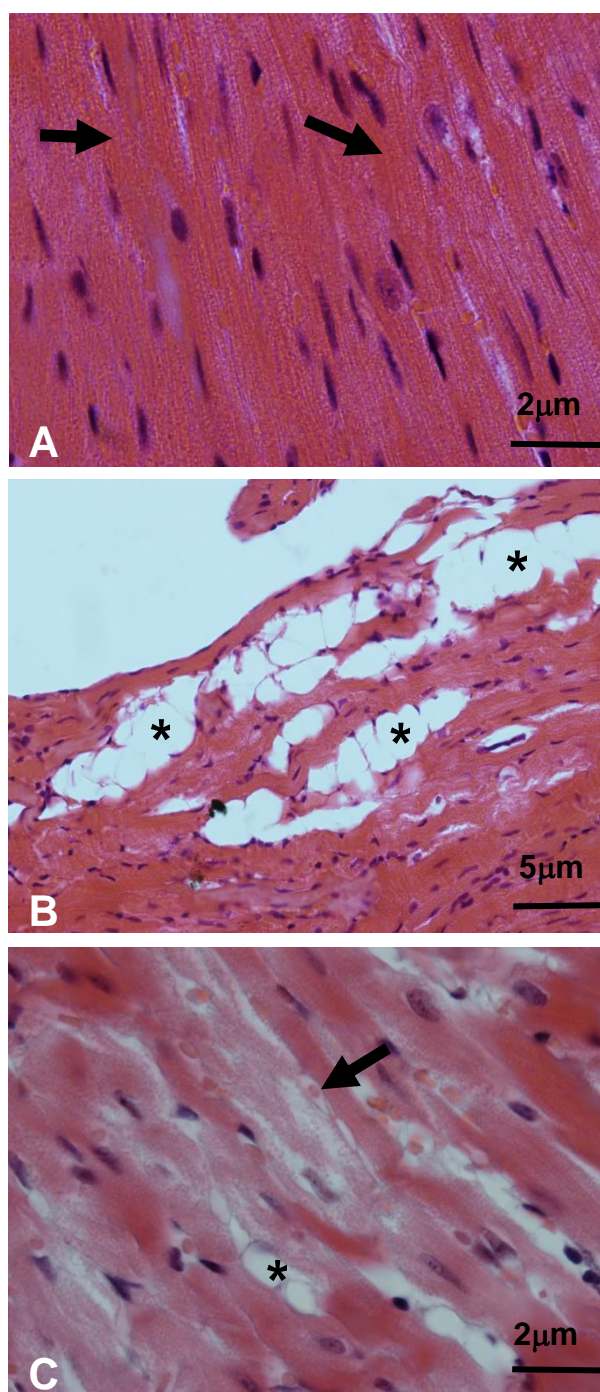
Legenda: (A, B) GC demonstra cardiomiócitos típicos bifurcados, com núcleo central e discos intercalares (seta) objetiva de 40x e 100x. (C) GH apresenta fibrose/desorganização dos cardiomiócitos. A área demarcada pelo retângulo em (C) é evidenciada com melhor detalhe em (D); Adipócitos (\*) e Infiltrado inflamatório (seta) (E, F), objetiva de 40x e 100x. n=6/grupo.

Figura 35 - Análise histológica do coração de camundongos dos GC e GH aos 60 dias de vida, corados com hematoxilina e eosina (H&E)



Legenda: (A, B) GC demonstra cardiomiócitos típicos bifurcados, com núcleo central e discos intercalares (seta); objetiva 40x e 100x. (C) GH apresenta fibrose/desorganização dos cardiomiócitos e infiltrado inflamatório. A área demarcada pelo retângulo em (C) é evidenciada com melhor detalhe em (D). (E) Adipócitos (\*); objetiva 40x. n=6/grupo.

Figura 36 - Análise histológica do coração de camundongos dos GC e GH aos 90 dias de vida, corados com hematoxilina e eosina (H&E)

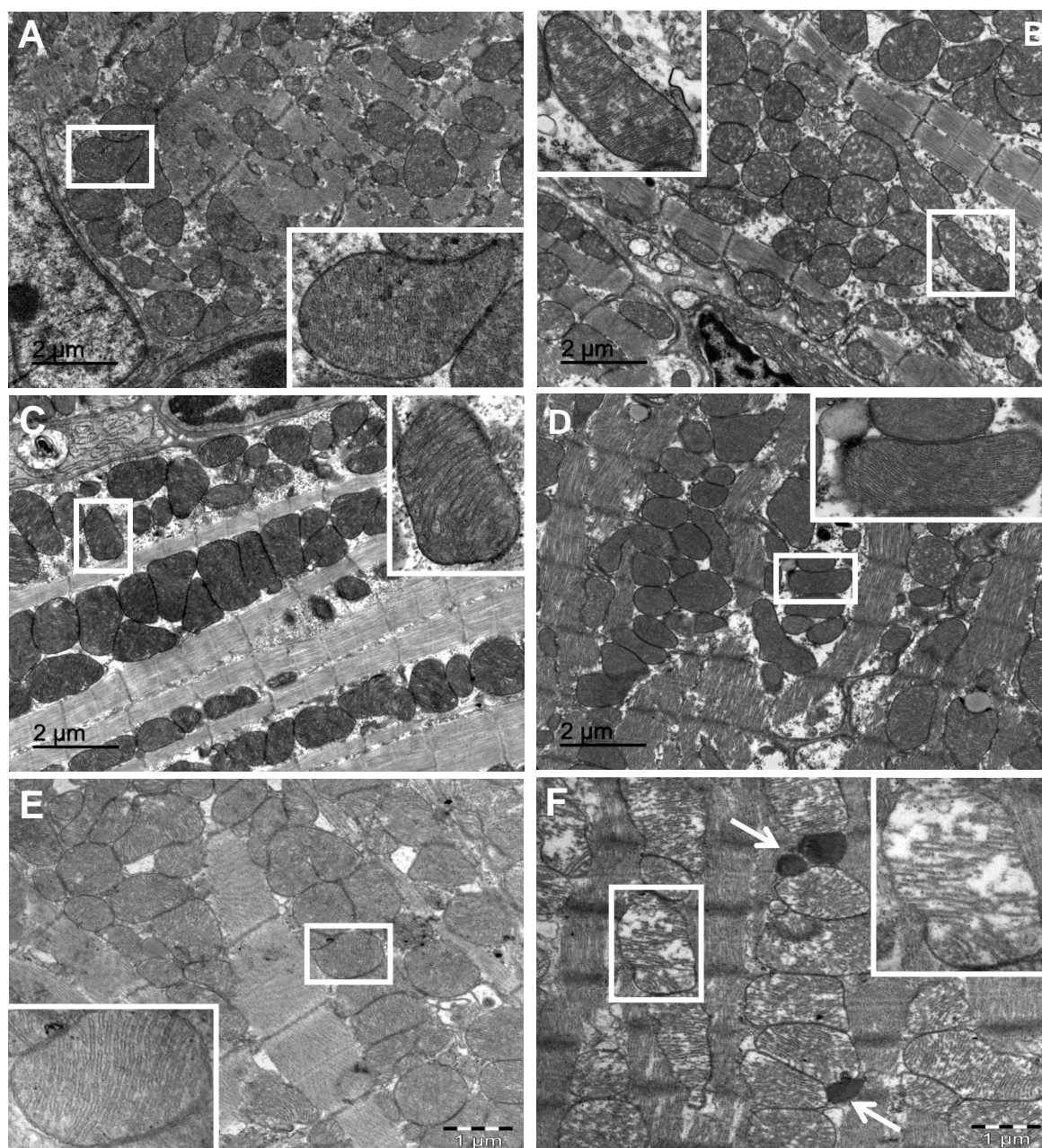


Legenda: (A) GC demonstra cardiomiócitos típicos com estriações transversais e discos intercalares (seta); objetiva de 100x. (B) GH apresenta miocárdio com acúmulo de tecido adiposo (\*); objetiva de 40x e (C) cardiomiócito desestruturados (seta) e esteatose (\*); objetiva de 100x. n=6/grupo.

#### **4.12 Análise da ultraestrutura dos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 21, 60 e 90 dias de vida**

A análise ultraestrutural das mitocôndrias de cardiomiócitos do GC aos 21, 60 e 90 dias, demonstrou mitocôndrias com as duas membranas, interna e externa, preservadas, cristas organizadas e matriz mitocondrial eletrondensa, indicativos de integridade mitocondrial (Figuras 37A, C e E). Já a análise das mitocôndrias de cardiomiócitos do GH, evidenciou um aumento progressivo no dano mitocondrial e no depósito de gotículas lipídicas (Figuras 37B, D e F). Aos 21 dias (Figura 37B), o GH apresentou algumas poucas mitocôndrias com um início de desorganização da matriz mitocondrial, porém com cristas mitocondrias e estrutura de membrana intactas. Aos 60 dias (Figura 37D), o GH já apresentou moderado dano na matriz mitocondrial, observando-se uma desorganização das cristas mitocondriais, e algumas mitocôndrias com a membrana danificada. Além disso, pudemos observar a presença de gotículas lipídicas. Interessantemente, aos 90 dias (Figura 37F), o dano mitocondrial já se apresentava estabelecido no GH, atingindo a grande maioria das mitocôndrias, além da presença de muitas gotículas lipídicas, caracterizando uma deposição ectópica de lipídeos.

Figura 37 - Microscopia Eletrônica de Transmissão de cardiomiócitos obtidos de camundongos GC e GH aos 21, 60 e 90 dias de vida



Legenda: (A, C, E) GC apresenta mitocôndrias íntegras, com membranas e matriz intactas, em todas as idades; aumento de 15000x. (B) GH aos 21 dias, apresenta a maioria das mitocôndrias íntegras. Em algumas, observa-se pequenos pontos de perda de eletrondensidade da matriz mitocondrial, porém com cristas e membranas intactas; (D) GH aos 60 dias, observa-se moderado dano na matriz mitocondrial, com desorganização das cristas mitocondriais, e algumas mitocôndrias com a membrana danificada. Além disso, podemos observar a presença de gotículas lipídicas (seta); aumento de 15000x. (F) GH aos 90 dias, observa-se intenso dano mitocondrial, com destruição da matriz e cristas mitocondriais. A imagem mostra também a presença de gotículas de lipídeos (seta); aumento de 15000x. Em todas as imagens, os inserts representam, em detalhes, as respectivas áreas demarcadas, evidenciando a ultraestrutura mitocondrial; aumento de 60000x. n=6/grupo.

Tabela 3 - Resumo dos principais achados obtidos nos cardiomiócitos de camundongos obesos submetidos a hiperalimentação durante a lactação

Análises	GH 21	GH 60	GH 90
Massa corporal	↑ (80%)	↑ (16%)	↑ (22%)
Gordura Epididimal	↑ (800%)	↑ ( 36% )	↑ (59%)
Gordura Retrop.	↑ (34%)	↑ (43%)	↑ (62%)
Índice de Lee	=	↑ (3%)	↑ (2%)
Comp. naso-anal	↑ (22%)	↑ (2%)	↑ (5%)
Glicemia	↑ (31%)	=	↑ (19%)
Insulina	↑ (53%)	=	↑ (41%)
Índice HOMA-IR	↑ ( 94% )	=	↑ (50%)
Triglicerídeos	↑ (29%)	=	↑ (25%)
Colesterol total	↑ (183%)	↑ (101%)	↑ (209%)
V Eesquerdo	↑ (72%)	↑ (12%)	↑ (20%)
VE/CT	↑ (52%)	↑ (12%)	↑ (14%)
Fígado	↑ (97%)	↑ (15%)	↑ (24%)
Fígado/M Corporal	↑ (18%)	↑ (15%)	↑ (23%)
Estado 3-CHO	↑ (33%)	=	↓ (15%)
RCR-CHO	↑ (46%)	=	↓ (27%)
Estado 3-AG	=	↓ (32%)	↓ (28%)
RCR-AG	=	↓ (26%)	↓ (23%)
IRβ	↓ (38,3%)	↓ (22%)	↑ (22%)
IRS-1	↑ (50%)	=	↑ (40%)
PTP1B	↑ (24%)	=	↑ (32%)
PI3K	↓ (32%)	=	↓ (39%)
AKT	↑ (20%)	=	=
pAKT/AKT	↓ (12%)	=	↓ (10%)
AMPKα	=	=	=
pAMPKα/AMPKα	↑ (14%)	=	=
GLUT4	↓ (22%)	↓ (8%)	=
GLUT4-Citosolico	↓ (16%)	=	=
GLUT4-Membrana			
GLUT1	↑ (18%)	=	=
HK II	↓ (22%)	↑ (45%)	↑ (22%)
PDH	=	=	↑ (28%)
CS	↑ (25%)	↓ (22%)	↓ (21%)
LDH	↑ (54%)	↓ (49%)	=
FABPm	=	↓ (21%)	↓ (28%)
CD36	=	↓ (23%)	↓ (19%)
CPT1	↓ (22%)	=	↓ (26%)
UCP2	↑ (36%)	=	↑ (57%)
PGC1-α	=	↓ (20%)	↓ (17%)
Complexos (I, II, III, IV, V)	=	=	=
mRNA CPT1	↓ (42%)	↓ (26%)	=
mRNA UCP2	↑ (34%)	↓ (57%)	=
mRNA PPARα	↓ (48%)	=	=
Glicogênio hepático	↑ (139%)	=	↑ (107%)

## 5 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos o efeito da hiperalimentação durante a lactação sobre os parâmetros metabólicos e desenvolvimento da disfunção mitocondrial cardíaca em camundongos do desmame até a idade adulta.

Nossos resultados mostraram que a hiperalimentação no período da lactação induz obesidade precoce e sobrepeso na idade adulta, alterações no metabolismo energético e na via de sinalização da insulina, alterações estruturais, assim como uma proeminente disfunção mitocondrial cardíaca. Os animais do grupo hiperalimentado (GH) apresentaram aumento significativo do peso corporal, gordura epididimal e retroperitoneal, desde os 10 dias de vida, que persistiu até a idade adulta. Acredita-se que a diferença do peso corporal deve-se ao efeito da hiperalimentação durante a lactação, salientando que, em todos os animais do estudo, foi oferecida uma dieta com qualidade idêntica, levando a uma “impressão” e modificação do metabolismo dos mesmos, resultando em um processo diferenciado de obtenção, armazenamento e uso de energia. Além disso, nossos resultados são compatíveis com dados obtidos em diversos estudos com modelos que sugerem uma relação direta entre o acúmulo de gordura, hiperinsulinemia e intolerância à glicose. Este aumento de adiposidade observado nos animais do grupo GH, pode constituir um fator de risco para a diminuição da sensibilidade à insulina, em quadros de sobrepeso e obesidade (MOREIRA et al., 2009; CONCEIÇÃO et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; HABBOUT et al., 2013).

Adicionalmente, nossos dados mostram que o aumento da disponibilidade de nutrientes gera nos animais do grupo GH alterações metabólicas, como aumento dos níveis plasmáticos de glicose e insulina aos 21 e 90 dias, sugerindo o comprometimento da sinalização da insulina e na homeostase de glicose já no desmame (21 dias), que persiste até os 90 dias de vida (idade adulta). Estes resultados contribuem no entendimento de que, no período pós-natal, ocorrem modificações que resultam em alterações metabólicas adaptativas, efeitos deletérios a longo prazo que perduram na idade adulta (GNAIGER, 2009; MOREIRA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2011; LACERDA-MIRANDA et al. 2012). Entretanto, nosso estudo não observou diferença significativa entre os grupos aos 60 dias de vida, isto deve-se provavelmente a que o insulto direto ocorrido no início da vida tenha

normalizado durante esta fase de crescimento do animal, daí uma compensação nos níveis de insulina circulantes no sangue.

Com relação ao efeito do aumento da insulina, é sabido que a hiperinsulinemia é capaz de estimular a síntese, o estoque de ácidos graxos e, conseqüentemente, o acúmulo de triglicérides em diferentes tecidos (MORISCO et al., 2006). Paralelamente, no período de 21, 60 e 90 dias, também observamos a ocorrência de modificações no metabolismo lipídico nos animais do grupo GH, que se reflete no aumento dos níveis plasmáticos de triglicérides aos 21 e 90 dias e colesterol total em todas as idades comparadas ao grupo GC. Este aumento corrobora com o acúmulo de adiposidade encontrada nestes animais.

Além disso, Cunha e colaboradores (2009) verificaram que o grupo de ninhada reduzida teve um maior consumo de leite materno aos 10 e 21 dias, e a análise do leite das mães apresentou alto teor de triglicérides, o que pode ser considerado essencial para o estabelecimento dos potenciais efeitos no metabolismo deficiente na idade adulta. De maneira surpreendente, não encontramos diferença estatística nos níveis plasmáticos de triglicérides entre os grupos nos animais de 60 dias quando comparado aos seus respectivos controles. Estes resultados demonstram que a programação metabólica, ou seja, a hiperalimentação ocorrida no estudo, pode interferir diretamente nos achados obtidos em um momento precoce (aos 21 dias de vida) e ser mais explícitos em um momento mais tardio (aos 90 dias).

Estes dados corroboram com os trabalhos anteriores do nosso grupo, que observaram alteração da sinalização de leptina no coração (PEREIRA et al., 2006), e que animais com ninhada reduzida tiveram prejuízo na via de sinalização da insulina no coração (MARTINS et al., 2008) e hipertrofia do músculo cardíaco (MOREIRA et al., 2009), demonstrados também por outros pesquisadores que usaram o mesmo modelo, considerando os efeitos causados por alterações da nutrição no início da vida (BOULLU-CIOCCA et al., 2005; PARK et al., 2005; RODRIGUES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2011; HABBOUT et al., 2013). A associação entre a sinalização da insulina e leptina tem sido demonstrada em diferentes tipos de células, em que níveis aumentados destes hormônios estão associados com a hipertensão, aterosclerose, hipertrofia do ventrículo esquerdo e resposta adaptativa cardíaca para melhorar a absorção de glicose e/ou de ácidos graxos, talvez para melhorar o fornecimento de energia para o coração.

A obesidade e a hiperinsulinemia também são consideradas como principais fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A hipertrofia cardíaca é uma adaptação do coração a uma nova condição de trabalho que, a princípio, pode ser considerada um mecanismo adaptativo. Entretanto, tal evento, a longo prazo, altera o metabolismo cardíaco, havendo uma redução na utilização de ácidos graxos e aumento na utilização de glicose (HUSS, KELLY, 2004; PROUD, 2004; DEBOSCK et al, 2006). Diversos estudos realizados em diferentes tecidos como coração, tecido adiposo, ilhotas pancreáticas e fígado, sugerem que as consequências da obesidade geradas pelo método de redução de ninhada têm características diferentes e riscos potenciais (MARTINS et al., 2008; LACERDA-MIRANDA et al., 2012; HAUBOT et al., 2013). Especificamente no coração, fortes associações têm sido relacionadas entre a obesidade, a hipertrofia e disfunção cardíaca. Assim, uma atenção especial em nosso estudo foi dedicada a avaliar as alterações encontradas nos camundongos hiperalimentados quanto a: respiração mitocondrial cardíaca, sinalização de insulina e a biologia molecular de algumas proteínas chave envolvidas na regulação do metabolismo energético de carboidratos e ácidos graxos, a morfologia e a ultraestrutura.

Sendo assim, começamos por estudar as implicações da hiperalimentação na lactação sobre as possíveis alterações cardíacas em camundongos do grupo GH, através da relação entre o peso do coração com o comprimento da tibia (YIN, 1982). Consistente com a literatura, observamos que os animais do grupo GH tiveram uma relação maior da massa cardíaca em todas as idades, sugerindo o aparecimento de uma leve hipertrofia cardíaca nestes animais. Além disso, os animais do grupo GH também apresentaram alterações morfológicas importantes como aumento do peso do fígado e da relação entre o peso do fígado e massa corporal em todas as idades, sugerindo possível desenvolvimento do quadro de esteatose hepática não-alcoólica na idade adulta. No que concerne às alterações cardíacas e hepáticas, nossos resultados demonstraram que a hiperalimentação e a idade tiveram um efeito pronunciado na programação, com elevação precoce nestes parâmetros.

Está descrito na literatura que, tanto a obesidade como as doenças cardiovasculares, estão relacionadas à disfunção mitocondrial (SHAROV et al., 2000). No coração, a grande quantidade de adenosina trifosfato (ATP) necessária para sustentar a função contrátil e o metabolismo basal é gerada principalmente pelo metabolismo oxidativo mitocondrial, com uma pequena quantidade derivada da

glicólise. A oxidação de ácidos graxos é a principal fonte de produção de ATP no coração adulto (TAEGTMEYER, 1994). Em condições aeróbicas, o custo de oxigênio para produzir um mol de ATP é maior para oxidação dos ácidos graxos livres do que para a glicose, devido à menor concentração molecular de oxigênio no metabolismo dos lipídeos. Quando a disponibilidade de oxigênio no miocárdio não é limitante, este prefere o substrato com a maior produção de energia (QUIÑONES-GALVAN, FERRANNINI, 2001).

Em concordância com os resultados que demonstram alterações do metabolismo energético, nossos dados obtidos através da análise de respirometria de alta resolução demonstraram que os animais do GH apresentaram maior capacidade de oxidação de carboidratos aos 21 dias quando os substratos que fornecem elétrons ao complexo I e II da CTE foram utilizados. Além disso, observamos um aumento do conteúdo de GLUT1 nos cardiomiócitos destes animais, sugerindo ser o substrato preferencial nesta idade. Este resultado corrobora com o estudo descrito por (HUSS, KELLY, 2004), onde observou que o coração fetal é favorecido pela oxidação da glicose para manter a produção de ATP em diversas condições. Adicionalmente, observamos redução na oxidação de carboidratos aos 90 dias e nenhuma diferença entre os grupos foi observada aos 60 dias, quando comparado ao grupo GC. Verificou-se neste experimento que, o fator idade teve maior efeito na oxidação de carboidratos no grupo de animais GH.

A  $\beta$ -oxidação dos ácidos graxos é responsável por 60-80% da produção de ATP no coração adulto normal. Diferentes patologias cardíacas podem causar perturbações nas vias finamente reguladas do metabolismo energético do miocárdio, e essas perturbações podem contribuir para a progressão dos danos ao coração. A eficiência na utilização de ácido graxo como substrato energético é uma proposta para relacionar alterações cardíacas e o metabolismo energético de camundongos hiperalimentados. Portanto, é importante o estudo de proteínas envolvidas na sinalização de ácidos graxos.

A FABPm, é um transportador de ácido graxo facilitador de entrada entre o meio extra e intracelular e a CD36, é uma proteína integral de membrana com a função de translocar ácidos graxos e FABPm para o sarcolema (MAKOWSKI, HOTAMISLIGIL, 2004). Paralelamente, nossos resultados não demonstraram diferença estatística no conteúdo da FABPm e CD36 nos animais GH aos 21 dias, enquanto que, aos 60 e 90 dias observamos uma redução comparado aos seus

controles. Estes resultados sugerem que existe uma menor capacidade dos cardiomiócitos dos animais adultos na translocação de ácidos graxos nos grupos hiperalimentados, uma vez que estas proteínas estão diretamente ligadas ao transporte de ácidos graxos para a mitocôndria (TURNER et al., 2014).

À luz do exposto, o presente estudo não observou diferença significativa do consumo de  $O_2$  no grupo GH aos 21 dias quando o ácido graxo foi utilizado como substrato, entretanto, observamos uma diminuição significativa aos 60 e 90 dias comparado aos seus controles. Apesar da reduzida capacidade de oxidação de ácidos graxos observada na respirometria, este estudo demonstrou diminuição no conteúdo de CPT1 nos cardiomiócitos do GH aos 21 e 90 dias e não foram observadas diferença aos 60 dias. Adicionalmente, observamos redução na expressão de mRNA da proteína CPT1 aos 21 e 60 dias e aos 90 dias esta proteína se manteve inalterada.

Sabe-se que, o receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo ( $PPAR\alpha$ ) é um fator de transcrição expresso no músculo cardíaco e esquelético ativado por ácidos graxos e induz a expressão de genes que codificam as enzimas de oxidação de lipídeos. Neste conjunto de experimentos e análises, nós encontramos diminuição na expressão de mRNA da proteína  $PPAR\alpha$  nos cardiomiócitos aos 21 dias. Portanto, nossos achados sugerem que a interação entre os dois fatores hiperalimentação e idade exerce um efeito negativo sobre a oxidação de ácidos graxos nos cardiomiócitos do grupo GH, diminuindo o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a matriz mitocondrial e inibindo a expressão gênica de genes relacionados à oxidação de gorduras, resultando em deficiência no metabolismo energético e disfunção mitocondrial cardíaca nestes animais logo ao desmame, e que perdura até a idade adulta (SERVIDDIO et al., 2008). Estudos relatam que tal deficiência energética pode contribuir para o desenvolvimento de disfunção contrátil e remodelamento cardíaco (JASWAL et al., 2011; VENTURA-CLAPIER et al., 2011).

A razão do controle respiratório (RCR) é altamente correlacionada com o desacoplamento mitocondrial e a via de sinalização de proteínas desacopladoras (UCPs), proteínas estas consideradas importantes por alguns autores pelo fato de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas como subprodutos pela cadeia transportadora de elétrons nas mitocôndrias. Assim, a diminuição na expressão e aumento no conteúdo das UCPs reflete um aumento na geração de

EROs mitocondriais, característico do estresse oxidativo, como observado no estudo de MACLELLAN et al., (2005).

As proteínas desacopladoras são uma família de proteínas mitocondriais que fornecem uma rota alternativa para o movimento de prótons do espaço intermembranar para a matriz mitocondrial, que está desacoplada da síntese de ATP. Surpreendentemente, dados recentes demonstram uma correlação positiva entre ácidos graxos livres e a expressão de UCP2 e UCP3 nos cardiomiócitos em situação de falência cardíaca, o que gera desacoplamento da fosforilação oxidativa, e, por conseguinte, diminui a síntese de ATP e a eficiência cardíaca (MURRAY et al., 2008). Em nosso estudo, observamos aumento no conteúdo da proteína UCP2 nos cardiomiócitos do GH aos 21 e 90 dias e manutenção deste parâmetro aos 60 dias. Quanto à expressão do mRNA da proteína UCP2, observamos aumento aos 21 dias e uma diminuição aos 60 e 90 dias quando comparado ao grupo GC.

Além disso, através da RCR, observou-se maior desacoplamento entre a fosforilação oxidativa e a produção de ATP nos cardiomiócitos dos animais do grupo GH aos 60 e 90 dias, caracterizado pela dissipação de energia sob a forma de calor através de UCPs. Ou seja, o gradiente de prótons formado no espaço intermembranas não está sendo utilizado para produção de ATP.

Assim, o aumento da expressão de UCP2 nos animais de 21 dias sugere aumento do desacoplamento, no sentido de ampliação da capacidade de balancear o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, inerentes do processo de produção de ATP e, ao mesmo tempo, prejudiciais para a estrutura mitocondrial. Portanto, sugerimos que estes animais apresentam diminuição na cardioproteção (LASKOWSKI, RUUSSELL, 2008).

Sabendo que os animais hiperalimentados aos 90 dias apresentaram hiperinsulinemia, a redução da expressão da UCP2 pode estar relacionada com o aumento da insulina plasmática. YANG et al. (2012) demonstrou que a estimulação crônica dos miócitos, *in vitro*, com insulina diminui a expressão de UCP2 e UCP3. Logo, a hiperinsulinemia dos animais GH pode estar relacionada com a disfunção mitocondrial via desacoplamento.

De acordo com os nossos dados, a obesidade induzida pela hiperalimentação levou a um aumento da expressão logo ao desmame e uma diminuição na idade adulta, fato que é maximizado pela interação entre os dois fatores estudados, isto é hiperlimentação e idade.

O estresse oxidativo é outra causa das alterações cardíacas que refere-se ao desequilíbrio devido ao excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou oxidantes, sobre a capacidade da célula para montar uma resposta eficaz antioxidante. As EROs, são formados durante o metabolismo oxidativo mitocondrial. Evidências indicam que as EROs também podem servir como moléculas de sinalização importantes na proliferação celular e sobrevivência (RAY, HUANG, TSUJI, 2012). Para avaliar este processo, analisamos o aldeído 4-hidroxinonenal (4HNE).

O 4HNE, é um produto abundante da peroxidação lipídica, derivado a partir da oxidação de fosfolipídios presentes na membrana interna da mitocôndria e apresenta grande poder nocivo ao coração. A literatura descreve que se encontra elevada em diferentes situações patológicas, como a obesidade, e incluindo o tecido cardíaco nas doenças cardiovasculares (ANDERSON, KATUNGA, WILLIS, 2012). Em nossos estudo, observamos aumento do conteúdo de 4HNE no GH aos 21 dias, sugerindo que estes animais, na lactação, desenvolvem um quadro de estresse oxidativo cardíaco via peroxidação lipídica, que pode promover a formação de adutos e morte por apoptose ou necrose de células, respectivamente. Entretanto, os animais do GH aos 90 dias apresentaram uma redução desta proteína. Estudos descrevem que o 4HNE é metabolizado enzimaticamente em condições fisiológicas e, em níveis muito baixos, desempenham um importante papel como molécula de sinalização para estimular a expressão gênica e aumentar a capacidade antioxidante celular, sugerindo que o 4-HNE pode promover resposta adaptativa ao estresse oxidativo. Baixas concentrações de 4-HNE podem induzir a liberação de proteína-1 quimiotáctica de monócitos por macrófagos, através da ativação de PKC $\beta$ , enquanto que a activação de PKC $\delta$  e Jun N-terminal quinase é bastante associada à apoptose através de uma regulação positiva do ativador de ligação proteína-1 de ADN factor de transcrição (NITTI et al., 2002; AYAALA, MUÑOZ, ARGUELLES, 2014 ). Vale destacar que os animais de 60 dias não sofreram alterações na carbonilação destas proteínas e que o fator hiperalimentação e idade tiveram maior efeito neste resultando, havendo também interação entre os fatores estudados.

O coativador 1 do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1- $\alpha$ ) é uma família de coativadores transcricionais, que surgiram como reguladores centrais do metabolismo (AUSTIN, ST-PIERRE, 2012). A expressão de PGC1- $\alpha$  é

altamente induzida por estímulos fisiológicos. Além disso, é o elo de ligação crítico no controle entre a oxidação de ácidos graxos via mitocôndria e todas as funções mitocondriais (LEHMAN, KELLY, 2002; HANDSCHIN, SPIEGELMAN, 2006).

Nosso estudo não observou diferença significativa no conteúdo da PGC1- $\alpha$  nos animais GH aos 21 dias. Entretanto, encontramos uma redução aos 60 e 90 dias, indicando menor expressão gênica de enzimas que participam na oxidação de ácidos graxos e reduzida biogênese mitocondrial nos cardiomiócitos destes animais.

Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que a diminuição da eficiência respiratória mitocondrial cardíaca indica redução na atividade dos complexos da cadeia de transporte de elétrons (CTE), como fator determinante do prejuízo na transferência de energia para a contração cardíaca e progressão da disfunção cardíaca (NOJIRI et al., 2006; ROSCA, HOPPEL, 2009). A eficiência da fosforilação oxidativa na mitocôndria não depende exclusivamente da atividade de cada complexo respiratório, mas sim, também, do arranjo entre os componentes da CTE e as unidades funcionais (supercomplexos).

Alterações na biogênese, morfologia mitocondrial e o remodelamento metabólico podem desempenhar um papel crucial no desenvolvimento da fisiopatologia da disfunção cardíaca (ROSCA et al., 2008; HAUSENLOY, RUIZ-MEANA, 2010). Conforme descrito, nossos resultados apontam para um defeito na fosforilação oxidativa da CTE, no entanto, nenhuma modificação foi detectada no conteúdo proteico individual dos complexos respiratórios mitocondriais. Estes resultados vão de encontro com o descrito por (ROSCA et al., 2008), num estudo com modelo de insuficiência cardíaca, onde os autores não encontraram alterações na expressão proteica e/ou da atividade dos complexos respiratórios da CTE.

Estudos anteriores mostraram que a seleção do substrato energético do miocárdio é relativamente normal durante as fases iniciais de insuficiência cardíaca, para manter o equilíbrio dinâmico influenciado pelo desenvolvimento fisiológico, que ocorre em resposta às mudanças hormonais (insulina e leptina) (STANLEY et al., 2005, p. 1093; RODRIGUES et al., 2011).

A função cardíaca depende da produção de ATP intracelular que deriva do metabolismo da glicose. Este metabolismo inicia com o transporte de glicose para a célula através de transportadores: GLUT1, que mantém a captação de glicose basal, e o GLUT4, que pode ser mobilizado a partir de compartimentos intracelulares para o sarcolema em resposta à insulina e/ou à estimulação contrátil, aumentando, assim,

a captação de glicose. Estes dois transportadores apresentam diferentes afinidades por glicose e capacidade de transporte (FRIEHS et al., 2003; DYCK, LOPASCHUK, 2006).

Após entrar na célula, a glicose tem diversos destinos, podendo ser estocada como glicogênio ou entrar no metabolismo glicolítico para produção de energia. Alguns estudos demonstraram que a absorção de glicose no coração é regulada pela insulina via ativação do GLUT4 e pelo aumento da incorporação do transportador de glicose no sarcolema (SLOT et al., 1991; SUN et al., 1994; YOUNG et al., 1997).

Ao analisarmos as proteínas da cascata de sinalização de insulina, observamos que os camundongos do grupo GH aos 21 dias, apresentaram diminuição no conteúdo de IR $\beta$ , na razão pIRS1/IRS1, PI3K, pAkt/Akt e GLUT4 e aumento no IRS-1 e PTP1B, indicando prejuízo na via de sinalização de insulina. Porém, embora tenhamos encontrado deficiência na sinalização de insulina, foi observado um aumento do GLUT1 nos cardiomiócitos destes animais, mostrando que a captação de glicose esta sendo realizada pela via independente de insulina. Os camundongos GH, aos 60 dias, apresentaram redução IR $\beta$ , GLUT4 e o conteúdo das proteínas IRS-1, PTP1B, PI3K, pAkt/Akt foram semelhantes. Porém, sugerimos que esta semelhança encontrada nestas proteínas, provavelmente, esteja ocorrendo um mecanismo compensatório na tentativa de prevenir a resistência à insulina nesta idade.

Além disso, apesar do conteúdo total dos transportadores de glicose nos cardiomiócitos dos animais do GH aos 90 dias não terem sofrido alteração, observamos um menor conteúdo de GLUT4 de fração de membrana (GLUT4-FM). Este resultado confirma o comprometimento na via de sinalização de insulina, assim como o menor conteúdo na razão pIRS1/IRS1, PI3K, pAkt/Akt e aumento no IR $\beta$ , IRS-1 e PTP1B observado nestes animais. A PI3K é ativada pela ligação da sua subunidade regulatória ao IRS-1 fosforilado em tirosina (KRUSZYNSKA et al., 2002). Portanto, uma diminuição na fosforilação de IRS-1 em resíduos de tirosina poderia explicar a ativação diminuída de PI3K nos cardiomiócitos dos animais do grupo GH. A PI3K ativa proteínas quinases dependentes de fosfoinosítídeos (PDK) que por sua vez fosforilam a Akt (WATSON e PESSIN, 2001). O aumento de IRS-1 e PTP1B sugere um processo compensatório dos cardiomiócitos destes animais, aumentando o substrato do receptor de insulina, porém há aumento da PTP1B. A PTP1B tem

sido descrita como uma das enzimas chave na regulação negativa das vias de transdução do sinal de insulina por desfosforilar os resíduos de IR $\beta$  e IRS-1, diminuindo a transmissão do sinal para a translocação do GLUT4, resultando, como consequência, em menor absorção de glicose, hiperglicemia, hiperinsulinemia e aumento do índice HOMA-IR, observados nestes animais. Estes resultados corroboram com o estudo do nosso grupo, que demonstrou a resistência a insulina via PTP1B no coração de animais hiperalimentados (MARTINS, et al., 2008). Com este resultado, se pode aferir que a programação metabólica por redução de ninhada resultou na resistência à insulina no coração dos camundongos GH.

A Proteína kinase ativada por AMP (AMPK) surgiu como um importante regulador chave envolvido no status de energia celular, inclusive no metabolismo energético cardíaco (ROUSSET et al., 2004; STANLEY et al., 2005). A AMPK é ativada durante o estresse metabólico, e não só ativa numerosas vias de produção energética, como também inibe o consumo destas vias. No coração, a AMPK é como um sensor metabólico que é ativado sob condições de estresse metabólico, como hipóxia, ou em condições onde o ATP está esgotado. É um importante modulador do metabolismo de ácidos graxos no miocárdio, acelerando a oxidação quando o ATP é baixo, e diminuindo a oxidação quando o ATP é alto. Assim sendo, a AMPK é considerada um sensor energético, um sinalizador para baixos níveis de energia celular e troca de substratos energéticos (HEIDRICH et al., 2010).

O coração tem alta demanda energética, uma vez que está entre os órgãos que consomem e produzem mais energia. Existem poucos reservatórios energéticos cardíacos e, caso cesse a produção de ATP, o suprimento de ATP cardíaco seria exaurido em segundos (DYCK, LOPASCHUK., 2006). Assim, se explica a importância da AMPK como um regulador energético para o coração. A ativação da AMPK resulta na estimulação da absorção de glicose, glicólise e oxidação de ácidos graxos quando há uma demanda metabólica aumentada. Tal ativação cardíaca também estimula a translocação e a absorção no transporte de glicose. Além de ter ações sobre o metabolismo energético, ela também tem ações importantes sobre o processo de hipertrofia cardíaca (DYCK, LOPASCHUK, 2006).

Considerando que, neste estudo, observamos aumento da pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  nos cardiomiócitos dos animais do grupo GH aos 21 dias, podemos sugerir que o aumento da taxa metabólica cardíaca pela ativação AMPK leva a um aumento na produção de acetil-CoA a partir de carboidratos, garantindo fornecimento adequado

de substrato para a mitocôndria nesta idade (KUDO et al., 1995; MUOIO et al., 1999; COVEN et al., 2003). Entretanto, a razão pAMPK $\alpha$ /AMPK $\alpha$  permaneceu inalterada aos 60 e 90 dias, quando comparado com o grupo GC.

A mudança mais notável no perfil metabólico dos corações hipertrofiados é uma dependência crescente de glicose com uma redução global no metabolismo oxidativo. Em modelos animais, esta mudança é atribuída à baixa regulação da promoção da expressão gênica para a oxidação de ácidos graxos e fosforilação do miocárdio, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK) também promove hipertrofia cardíaca, levando ao aumento da captação de glicose (KOLWICZ, TIAN, 2011). Além disso, o aumento na dependência da glicose como fonte de energia, alterações no metabolismo de outras vias da glicose, por exemplo, via das pentoses fosfato e outras vias biossintéticas, também são mencionadas no coração hipertrofiado. Como podemos observar, tanto os nossos resultados como os já descritos na literatura, mostram que a hiperalimentação no início da vida, é um importante fator responsável pelo desenvolvimento da doença cardiovascular, induzindo alterações metabólicas e levando ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (DYCK, LOPASCHUK, 2006; LACERDA-MIRANDA et al. 2012).

Estudos têm mostrado que o metabolismo deficiente de substrato contribui para a disfunção do miocárdio e para o remodelamento ventricular esquerdo progressivo. As vias metabólicas podem ser reguladas através da ativação enzimática via fosforilação ou através da inibição metabólica, contribuindo para as diferenças nos marcadores enzimáticos do metabolismo energético (STANLEY et al., 2005).

O metabolismo energético cardíaco também foi estudado ao avaliarmos o fluxo da via glicolítica através do conteúdo protéico da hexoquinase (HKII), uma enzima reguladora chave da via e do fluxo da respiração mitocondrial pelo ciclo de Krebs (CK), da atividade da primeira enzima que participa na descarboxilação do piruvato na mitocôndria PDH, (que converte o piruvato em Acetil-CoA), a primeira enzima do ciclo de Krebs, CS (que condensa o Acetil-CoA com o oxalacetato) e a LDH (marcador da via glicolítica) (CALMETTES et al., 2013).

Nossos resultados mostram uma diminuição da HKII aos 21 dias e um aumento aos 60 e 90 dias. Concomitantemente, este estudo observou que a atividade das enzimas PDH, CS e LDH, variam com o grau da disfunção cardíaca associada à idade. A maior atividade da CS e LDH nos cardiomiócitos dos animais

do grupo GH aos 21 dias sugere existir aumento da captação e oxidação de glicose e lactato nestes animais, permitindo um aumento da concentração de glicose a ser oxidada, elevando ainda mais, a produção de Acetil-CoA para ser oxidado no CK. Além disso, a elevação dos níveis de insulina observada neste grupo também pode levar à síntese de glicogênio e ao armazenamento de glicose no fígado. A CS é uma das enzimas chave na regulação da via metabólica de geração de energia, que catalisa a condensação de oxaloacetato e acetil-CoA de modo a formar citrato no Ciclo de Krebs, e tem sido amplamente utilizado como marcador metabólico para avaliar a capacidade oxidativa e respiratória mitocondrial. Observamos aos 60 e 90 dias, uma acentuada diminuição da CS, mostrando provavelmente que o metabolismo cardíaco esteja deficiente, resultando numa menor capacidade de oxidação de carboidratos à medida em que aumenta o dano mitocondrial e de gordura. Este efeito pode estar associado com a reduzida atividade da LDH aos 60 dias e da PDH aos 90 dias, observada em nossos resultados. Assim, quando a demanda de ATP é reduzida, a energia contida a partir de acetil-CoA mitocondrial pode ser transportada para o citosol sob a forma de citrato e ser armazenada como gordura para a síntese dos triglicerídeos e acetil-CoA.

O modelo de hiperalimentação apresenta importantes alterações hormonais (insulina, leptina) que favorecem o acúmulo de glicogênio no fígado (PEREIRA et al., 2006; TREVENZOLI et al., 2010). Considerando a importância do fígado para a modulação de substratos energéticos, evidenciamos que os animais do grupo GH apresentaram maior conteúdo hepático de glicogênio aos 21 e 90 dias. Entretanto, uma redução foi observada nos animais do GH aos 60 dias, comparando ao seus respectivos controles. Como consequência da obesidade, também observamos, através da análise morfológica, infiltrado inflamatório celular no fígado dos camundongos do GH já a partir dos 21 dias, progredindo acentuadamente até os 90 dias de vida, caracterizando um processo inflamatório que favorece a esteatose na idade adulta e compromete o metabolismo lipídico no fígado. Tais alterações são frequentemente observadas em casos de obesidade e diabetes do tipo 2, caracterizada por infiltração de gordura hepática, que é considerada como um marcador de diminuição da oxidação nestes tecidos, bem como nos músculos esqueléticos de animais obesos (BROWNING, HORTON, 2004; CONCEIÇÃO et al., 2013).

Interessantemente, a morfologia do coração mostrou que os animais GC aos 21, 60 e 90 dias apresentaram cardiomiócitos típicos, com estriações transversais e discos intercalares, enquanto que os do GH apresentaram fibrose e desorganização dos cardiomiócitos, esteatose, infiltrado inflamatório e acúmulo de tecido adiposo (deposição ectópica de gordura), esteatose cardíaca. Resultados semelhantes foram observados recentemente pelo nosso grupo em modelo de obesidade induzida por dieta ocidental (NEVES et al, 2014).

Estudos realizados por SHAROV e colaboradores (2000), demonstraram 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 alterações estão direta ou indiretamente associadas com a disfunção mitocondrial nos cardiomiócitos (CHEN, KNOWLTON, 2010). Está descrito na literatura que, tanto a obesidade como as doenças cardiovasculares, estão relacionadas à disfunção mitocondrial (SHAROV et al., 2000).

Em nosso estudo, além de avaliarmos a respiração mitocondrial e a sinalização de insulina, estudamos adicionalmente, a morfologia ultraestrutural dos cardiomiócitos por Microscopia Eletrônica de Transmissão aos 21, 60 e 90 dias. A análise dos cardiomiócitos de ambos os grupos, mostrou um aumento de mitocôndrias danificadas nos animais hiperalimentados aos 60 e 90 dias. Interessantemente, estes dados, reforçam o que foi observado na respirometria, ou seja, mostram que a hipertrofia cardíaca, está associada com vários tipos de alterações na mitocôndria, uma organela vital na estrutura dos miócitos e que, vários factores podem contribuir para o aumento da susceptibilidade do miocárdio hipertrófico, como anormalidades estruturais, que se reflete, na redução da oxidação de substratos, diminuição da eficiência cardíaca, aumento do acúmulo de lipídios no miocárdio, que podem ser resultantes da disfunção mitocondrial (fosforilação oxidativa reduzida e desacoplamento mitocondrial) observados no GH, aos 60 e 90 dias.

Além disso, esses resultados estão de acordo com a literatura, que demonstra a grande ocorrência de mitocôndrias com membranas danificadas e depleção de matriz nas doenças cardiovasculares (STANLEY et al., 2005). O grupo hiperalimentado também apresentou aumento na deposição ectópica de lipídeos no

coração, pois uma vez que a oxidação de ácidos graxos está diminuída nos cardiomiócitos desse grupo, o ácido graxo é armazenado no citoplasma como gotículas lipídicas. Nossos resultados estão de acordo com o trabalho descrito por BIOSOI e colaboradores (2010).

Em resumo, nossos resultados indicam que o estado nutricional durante a lactação é de grande importância para o desenvolvimento adequado de sistemas metabólicos responsáveis pela manutenção de estoques energéticos. Além disso, contribuem para melhor compreensão a respeito de como alterações no metabolismo energético estabelecidas por padrão nutricional podem contribuir para o prejuízo na via de sinalização de insulina do miocárdio e predisõem as mitocôndrias cardíacas ao estresse oxidativo, que também reduz a capacidade de oxidação dos ácidos graxos, e ativa o desacoplamento mitocondrial através das proteínas UCP2, alterações na biogênese mitocondrial, disfunção cardíaca, esteatose cardíaca e outras doenças crônicas relacionadas à obesidade.

## CONCLUSÕES

Baseado nos nossos resultados podemos concluir que a hiperalimentação no início da vida induz a obesidade em camundongos filhotes, aos 21 dias, com aumento do depósito de gordura e diminuição da sensibilidade à insulina, sem disfunção mitocondrial estabelecida. Ao longo do desenvolvimento, a obesidade e a resistência à insulina prevalecem com alterações no metabolismo energético cardíaco caracterizado pela modificação da morfologia das mitocôndrias, redução da capacidade oxidativa e do acoplamento mitocondrial quanto a oxidação dos substratos energéticos, levando a redução da eficiência cardíaca na idade adulta.

## REFERÊNCIAS

- ÁGUILA M. B., APFEL-RODRIGUES M. I., MANDARIM-DE-LACERDA C. A. Stereology of the myocardium and blood biochemistry in aged rats fed with a cholesterol-rich and canola oil diet (n-3 fatty acid rich). *Basic Res Cardiol.* v. 93, n. 3, p. 182-191, Jun. 1998.
- ALBURQUEQUE D. C., SOUZA NETO J. D., BACAL F., ROHDE L. E., BERNARDEZ-PEREIRA S., BERWANGER O., ALMEIDA D. R., INVESTIGADORES ESTUDO BREATHE. I Brazilian Registry of Heart Failure- Clinical Aspects, Care Quality and Hospitalization Outcomes. *Arg Bras Cardiol.* v. 104, n. 6, p. 433-442, Jun. 2015.
- ALLARD M. F. Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr Hypertens Rep.* v. 6, n. 6, p. 430-435, Dec. 2004.
- ALP P. R., NEWSHOLME E. A., ZAMMIT V. A. Activities of citrate synthase and NAD<sup>+</sup>-linked and NADP<sup>+</sup>-linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochem J.* v. 154, n. 3, p. 689-700, Mar 15. 1976.
- ANDERSON E. J., KATUNGA L. A., WILLIS M. S. Mitochondria as a source and target of lipid peroxidation products in healthy and diseased heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* v. 39, n. 2, p. 179-193, Feb. 2012.
- ARANY Z., NOVIKOV M., CHIN S., MA Y., ROSENZWEIG A., SPIEGELMAN B. M. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 103, n. 26, p. 10086-10091. Jun 27. 2006.
- ARMITAGE J. A., TAYLOR, P. D., POSTON L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol.* v. 565, n. Pt 1, p. 3–8, May. 2005.
- ASHRAFIAN H., FRENNEAUX M. P. Metabolic modulation in heart failure: the coming of age. *Cardiovasc Drugs Ther.* v. 21, n. 1, p. 5-7, Feb. 2007.
- ATHERTON H. J., GULSTON M. K., BAILEY N. J., CHENG K. K., ZHANG W., CLARKE K., GRIFFIN J. L. Metabolomics of the interaction between PPAR-alpha and age in the PPAR-alpha-null mouse. *Mol Syst. Biol.* v.5, n. 259, p. 1-10, Apr 7. 2009.
- AUGUSTUS A. S., KAKO Y., YAGYU H., GOLDBERG I. J. Routes of FA delivery to cardiac muscle: modulation of lipoprotein lipolysis alters uptake of TG-derived FA. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 284, n. 2, p. 331-339, Feb. 2003.
- AUSTIN, S., ST-PIERRE, J. PGC1 $\alpha$  and mitochondrial metabolism—emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci.* v. 125, n. 21, p. 4963-4971, Nov. 2012.

AVELAR E., CLOWARD T. V., WALKER J. M., FARNEY R. J., STRONG M., PENDLETON R. C., SEGERSON N., ADAMS T. D., GRESS R. E., HUNT S. C., LITWIN S. E. Left ventricular hypertrophy in severe obesity: interactions among blood pressure, nocturnal hypoxemia, and body mass. *Hypertension*. n. 49, n. 1, p. 34-39, Jan. 2007.

AYAALA A., MUÑOZ M. F., ARGUELLES S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxid Med Cell Longev*. v. 2014, n. 360438, May. 2014.

BARANOWSKI M., BLACHNIO-ZABIELSKA A., GORSKI J. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation induces unfavourable changes in fatty acid composition of myocardial phospholipids. *J Physiol Pharmacol*. v. 60, n. 2, p. 13-20, Jun. 2009.

BECKER C., SEVILLA L., TOMÀS E., PALACIN M., ZORZANO A., FISCHER Y. The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporters in cardiac myocytes. *Endocrinology*. v. 142, n. 12, p. 5267-5276, Dec. 2001.

BEILIN L., HUANG R. C. Childhood obesity, hypertension, the metabolic syndrome and adult cardiovascular disease. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. v. 35, n. 4, p. 409-411, Apr. 2008.

BELKE D. D., BETUING S., TUTTLE M. J., GRAVELEAU C., YOUNG M. E., PHAM M., ZHANG D., COOKSEY R. C., MCCLAIN D. A., LITWIN S. E., TAEGTMEYER H., SEVERSON D., KAHN C. R., ABEL E. D. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile protein isoform expression. *J Clin Invest*. v. 109, n. 5, p. 629-639, Mar. 2002.

BERGER J., MOLLER D. E. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. v. 53, p. 409-435, Feb. 2002.

BERTRAND L., HORMAN S., BEAULOYE C., VANOVERSCHELDE J. L. Insulin signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. v. 79, n. 2, p. 238-248, Jul 15. 2008.

BEUTLER, E. Lactate dehydrogenase analysis. In Red cell metabolism: A manual of biochemical methods. 3th edition, *Grune & Stratton, Inc.* Orlando, FL, USA. pp. 65-66, 1984.

BHOPAL R. S., RAFNSSON S. B. Could mitochondrial efficiency explain the susceptibility to adiposity, metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases in South Asian populations? *Int J Epidemiol*. v. 38, n. 4, p. 1072-1081, Aug. 2009.

BILAN P. J., MITSUMOTO Y., RAMLAL T., KLIP A. 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, Feb. 1992.

BLECKER S., HERBERT R., BRANCATI F. L. Comorbid diabetes and end-of-life expenditures among Medicare beneficiaries with heart failure. *J Card Fail.* v. 18, n. 1, p. 41-46, Jan. 2012.

BOUDINA S., ABEL E. D. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation.* v. 115, n. 25, p. 3213-3223, Jun. 2007.

BOUDINA S., ABEL E. D. Diabetic cardiomyopathy, causes and effects. *Rev Endocr Metab Disord.* v. 11, n. 1, p. 31-39, Mar. 2010.

BOUDINA S., SENA S., O'Neill B. T., TATHIREDDY P., YOUNG M. E., ABEL E. D. Reduced Mitochondrial Oxidative Capacity and Increased Mitochondrial Uncoupling Impair Myocardial Energetics in Obesity. *Circulation.* v. 112, n. 17, p. 2686-2695, Oct. 2005.

BOUDINA S., BUGGER H., SENA S., O'NEILL B. T., ZAHA V. G., LLKUN O., WRIGHT J. J., MAZUMDER P. K., PALFREYMAN E., TIDWELL T. J., THEOBALD H., KHALIMONCHUK O., WAYMENT B., SHENG X., RODNICK K. J., CENTINI R., CHEN D., LITWIN S. E., WEIMER B. E., ABEL E. D. Contribution of impaired myocardial insulin signaling to mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart. *Circulation.* v. 119, n. 9, p. 1272-1283, Mar. 2009.

BOULLU-CIOCCA S., DUTOUR A., GUILLAUME V., ACHARD V., OLIVER C., GRINO M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome. *Diabetes.* v. 54, n. 1, p. 197-203, Jan. 2005.

BRAISSANT O., FOUFELLE F., SCOTTO C., DAUCA M., WAHLI W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology.* v. 137, n. 1, p. 354-366, Jan. 1996.

BROWNING J. D., HORTON J. D. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest.* v. 114, n. 2, p. 147-152, Jul. 2004.

BURROWS R., CORREA-BURROUS P., REYES M., BLANCO E., ALBALA C., GAHANGAN S. Healthy Chilean Adolescents with HOMA-IR  $\geq$  2.6 Have Increased Cardiometabolic Risk: Association with Genetic, Biological, and Environmental Factors. *J Diabetes Res.* doi: 10.1155/2015/783296

CALMETTES G., JOHN S. A., WEISS J. N., RIBALET B. Hexokinase-mitochondrial interactions regulate glucose metabolism differentially in adult and neonatal cardiomyocytes. *J Gen Physiol.* v. 142, n. 4, p. 425-436, Oct. 2013.

CAPINGANA D. P., MAGALHÃES P., SILVA A. B., GONÇALVES M. A., BALDO M. P., RODRIGUES S. L., SIMÕES C. C., FERREIRA A. V., MILL J. G. Prevalence of cardiovascular risk factors and socioeconomic level among public-sector workers in Angola. *BMC Public Health.* v. 7, n. 13, p. 732-780, Aug. 2013.

- 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. 2010.
- CARROLL A. R., CARLEY N. A., DYCK J. R., SEVERSON D. L. Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic db/db mouse hearts. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 288, n. 5, p. E900-E906, May. 2005.
- CARROLL N. V., LONGLEY R. W., ROE J. H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J Biol Chem*. v. 220, n. 2, p. 583-593, Jun. 1956.
- CASTELLÓ A., RODRÍGUEZ-MANZANEQUE J. C., CAMPS M., PÉREZ-CASTILLO A., TESTAR X., PALACÍN M., SANTOS A., ZORZANO A. Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. *J Biol Chem*. v. 269, n. 8, p. 5905-5912, Feb. 1994.
- CHANG L., CHIANG S. H., SALTIEL A. R. Insulin signaling and the regulation of glucose transport. *Mol Med*. v. 10, n. 7-12, p. 65-71, Dec. 2004.
- 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.
- CHOUDHURY M., FRIEDMAN J. E. Obesidade: A obesidade infantil - metilato de agora, pague depois? *Nat Ver Endocrinol*. v. 7, n. 8, p. 439-440, Jun. 2011.
- CONCEIÇÃO E. P., TREVENZOLI I. H., OLIVEIRA E., FRANCO J. G., CARLOS A. S., NASCIMENTO-SABA C. C., MOURA E. G., LISBOA P. C. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Horm Metab Res*. v. 43, n. 7, p. 513-516, Jun. 2011.
- COVEN D. L., HU X., CONG L., BERGERON R., SHULMAN G. I., HARDIE D. G., YOUNG L. H. Physiological role of AMP-activated protein kinase in the heart: graded activation during exercise. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 285, n. 3, p. E629-E636, Sep. 2003.
- CUNHA A. C., PEREIRA R. O., PEREIRA M. J., SOARES V. DE M., MARTINS M. R., TEIXEIRA M. T., SOUZA E. P., MOURA A. S. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem*. v. 20, n. 6, p. 435-442, Jun. 2009.
- DESVERGNE B., WAHLI W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev*. v. 20, n. 5, p. 649-688, Oct. 1999.
- DEVEREUX R. B., ROMAN M. J., PARANICAS M., O`GRADY M. J., LEE E. T., WELTY T. K., FABSITZ R. R., ROBBINS E. R., HOWARD B. V. Impact of diabetes on cardiac structure and function: the Strong Heart Study. *Circulation*. v. 101, n. 19, p. 2271-2276, May 16. 2000.

DI CHIARA T., ARGANO C., CORRAO S., SCAGLIONE R., LICATA G.  
Hypoadiponectinemia: A Link between Visceral Obesity and Metabolic Syndrome. *J Nutr Metab.* v. 2012, n. 175245, p. 1-7. 2012.

DONG F., LI Q., SREEJAYAN N., NUNN J. M., REN J. Metallothionein prevents high-fat diet induced cardiac contractile dysfunction: role of peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1alpha and mitochondrial biogenesis. *Diabetes.* v. 56, n. 9, p. 2201-2212, Sep. 2007.

DÖRNER G., PLAGEMANN A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res.* v. 26, n. 5, p. 213-221.1994.

DROSATOS K., SCHULZE P. C. Cardiac lipotoxicity: molecular pathways and therapeutic implications. *Curr Heart Fail Rep.* v. 10, n. 2, p. 109-121, Jun. 2013.

DYCK J. R., KUDO N., BARR A. J., DAVIES S. P., HARDIE D. G., LOPASCHUK G. D. Phosphorylation control of cardiac acetyl-CoA carboxylase by cAMP-dependent protein kinase and 5-AMP activated protein kinase. *Eur J Biochem.* v. 262, n.1, p. 184-190, May. 1999.

DYCK J. R., LOPASCHUK G. D. AMPK alterations in cardiac physiology and pathology: enemy or ally? *J Physiol.* v. 574, n. (Pt 1), p. 95-112, Jul. 2006.

\_\_\_\_\_ Malonyl CoA control of fatty acid oxidation in the ischemic heart. *J Mol Cell Cardiol.* v. 34, n. 9, p. 1099-1109, Sep. 2002.

ESTAMPADOR A. C., FRANKS P. W. Genetic and epigenetic catalysts in early-life programming of adult cardiometabolic disorders. *Diabetes Metab Syndr Obes.* v. 1, n. 7, p. 575-586, Dec. 2014.

FLEGAL K. M., CARROLL M. D., OGDEN C. L., CURTIN L. R. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2008. *JAMA.* v. 303, n. 3, p. 235-241, Jan. 2010.

FRANCHINI K.G. Hipertrofia cardíaca: mecanismos moleculares. *Rev Bras Hipertens.* v. 8, n. 1, p. 125-142, jan. 2001.

FREDERICK R. L., SHAW J. M. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic.* v. 8, n. 12, p. 1668-1675, Dec. 2007.

FRIEHS I., CAO-DANH H., STAMM C., COWAN D. B., MCGOWAN F. X., DEL NIDO P. J. Postnatal increase in insulin-sensitive glucose transporter expression is associated with improved recovery of postischemic myocardial function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* v. 126, n. 1, p. 263-271, Jul. 2003.

FRIEDMAN J. E. Obesity and Gestational Diabetes Mellitus Pathways for Programming in Mouse, Monkey, and Man-Where Do We Go Next? The 2014 Norbert Freinkel Award Lecture. *Diabetes Care.* v. 38, n. 8, p. 1402-1411, Aug. 2015.

FURUKAWA S., FUJITA T., SHIMABUKURO M., IWAKI M., YAMADA Y., NAKAJIMA Y., NAKAYAMA O., MAKISHIMA M., MATSUDA M., SHIMOMURA I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* v. 114, n. 12, p. 1752-1761, Dec. 2004.

GARCIA-SOUZA E. P., SILVA S. V., FELIX G. B., RODRIGUES A. L., MOURA A. S., FREITAS M. S., BARJA-FIDALGO T. C. Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and MTOR/AKT activation in adipocytes of adult rats. *American Journal of Physiology. Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 295, n. 3, p. E626-E636, Sep. 2008.

GERSHONI M., TEMPLETON A. R., MISHMAR D. Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *Bioessays.* v. 31, n. 6, p. 642-650, Jun. 2009.

GNAIGER E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol.* v. 41, n. 10, p. 1837-1845, Oct. 2009.

GODFREY K. M., BARKER D. J. P. Fetal nutrition and adult diseases. *Am J Clin Nutr.* v. 71, (Suppl. 5), p. 1344S-1352S, May. 2000.

GUILLOTEAU P., ZABIELSKI R., HAMMON H. M., METGES C. C. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and **potential** prevention and treatments. *J Physiol Pharmacol.* Suppl 3, p. 17-35, Oct. 2009.

GUZZARDI M. A., IOZZO P. Fatty heart, cardiac damage, and inflammation. *Rev Diabet Stud.* v. 8, n.3, p. 403-417, 2011.

HABBOU A., LI N., ROCHETTE L., VERGELY C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *J Nutr.* v.143, n. 5, p. 553-562, May. 2013.

HAMILTON C., SAGGERSON E. D. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes. *Biochem J.* v. 350, n. 1, p. 61-67, Aug. 2000.

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

HAUSENLOY D. J., RUIZ-MEANA, M. Not just the powerhouse of the cell: emerging roles for mitochondria in the heart. *Cardiovascular Research.* v. 88, n. 1, p. 5-6, Ouct. 2010.

HASSELBANK D. M., GLATZ J. F., LUIKEN J. J., ROEMEN T. H., VAN DER VUSSE G. J. Ketone bodies disturb fatty acid handling in isolated cardiomyocytes derived from control and diabetic rats. *Biochem J.* v. 371, n. Pt 3, p. 753-760, May. 2003.

HEIDRICH F., SCHOTOLA H., POPOV A. F., SOHNS C., SCHUENMANN J., FRIEDRICH M., COSKUN K. O., VON LEWINSKI D., HINZ J., BAUER M., MOKASHI S. A., SOSSALLA S., SCHMITTO J. D. AMPK - Activated Protein Kinase and its Role in Energy Metabolism of the Heart. *Curr Cardiol Rev.* v. 6, p. 337-342, Nov. 2010.

HILLS A. P., MOKHTAR N., BROWINIE S., BYRNE N. M. Childhood obesity in Asia: the value of accurate body composition methodology. *Asia pac J Clin Nutr.* V.23, n. 3, p. 339-343, 2014.

HINMAN L. M., BLASS J. P. An NADH-linked spectrophotometric assay for pyruvate dehydrogenase complex in crudetissue homogenates. *J Biol Chem.* v. 256, n. 13, p. 6583-6586, Jul. 1981.

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.

HUSS J. M., KELLY D. P. Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circ Res.* v. 95, n. 6, p. 568-578, Sep 17. 2004.

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.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF OBESITY & INTERNATIONAL OBESITY TASKFORCE (2013). Obesity The Global Epidemic. <http://www.iaso.org/iotf/obesitytheglobalepidemic/>. acesso em: 15/08/2015.

JAMES W. P., RIGBY N., LEACH R. Obesity and the metatabolic syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences.* v. 1083, p. 1-10, Nov. 2006.

JASWAL J. S., KEUNG W., WANG W., USSHER J. R., LOPASCHUK G. D. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation - A novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta.* v. 1813, n. 7, p. 1333-1350, Jul. 2011.

JOHANNSEN D. L., RAVUSSIN, E. The role of mitochondria in health and disease. *Current Opinion in Pharmacology.* v. 9, n. 6, p. 780-786, Dec. 2009.

KENCHAIH S., EVANS J. C., LEVY D., WILSON P. W., BENJAMIN E. J., LARSON M. G., KANNEL W. B., VASAN R. S. Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med.* v. 347, 5, p. 305-313, Aug. 2002.

KERNER J., HOPPEL C. L. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* v. 1486, n. 1, p. 1-17, Jun 26. 2000.

\_\_\_\_\_. Radiochemical malonyl-CoA decarboxylase assay: activity and subcellular distribution in heart and skeletal muscle. *Anal Biochem.* v. 306, n. 2, p. 283-289, Jul 15. 2002.

KOLWICZ S. C. N. Jr., TIAN R. Glucose metabolism and acardiac Hypertrophy. *Cardiovasc Res.* V. 90, n. 2, p. 194-201, May 1. 2011.

KOWALTOWSKI A. J., DE SOUZA-PINTO N. C., CASTILHO R. F. & VERCESI A. E. Mitochondria and reactive oxygen species, *Free Radic. Biol. Med.* v. 47, n. 4, Aug 15, p. 333-343. 2009.

KRUSZYNSKA Y. T., WORRALL D. S., OFRECIO J., FRIAS J. P., MACARAEG G., OLEFSKY J. M. Fatty acid-induced insulin resistance: decreased muscle PI3K activation but unchanged Akt phosphorylation. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 87, n. 1, p. 226-234, Jan. 2002.

KRZYSZTOSZEK J., WIERZEJSKA E., ZIELINSKA A. Obesity. An analysis of epidemiological and prognostic research. *Arch Med Sci.* v. 11, n. 1, p. 24-33, Mar 2015.

KUDO N., BARR A. J., BARR R. L., DESAI S., LOPASCHUK G. D. 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, n. 29, p. 17513-17520, July. 1995.

LACERDA-MIRANDA G., SOARES V. M., VIEIRA A. K., LESSA J. G., RODRIGUES-CUNHA A. C., CORTEZ E., GARCIA-SOUZA E. P., MOURA A.S. Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice. *Peptides.* v. 35, n. 1, p. 65-73, May. 2012.

LAEMMLI U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug 15. 1970.

LASKOWSKI K. R., RUSSELL R. R. Uncoupling proteins in heart failure. *Curr Heart Fail Rep.* v. 5, n. 2, p. 75-79. 2008.

LAWLOR D. A., CHATURVEDI N. Treatment and prevention of obesity--are there critical periods for intervention? *Int J Epidemiol.* v. 35, n. 1, p. 3-9, Feb. 2006.

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.

LEVY-COSTA R. B., SICHIERI R., PONTES NDOS S., MONTEIRO C. A. Household food availability in Brazil: distribution and trends (1974-2003). *Rev Saude Publica.* v. 39, n. 4, p. 530-540, Aug. 2005.

LI C. C., YOUNG P. E., MALONEY C. A., EATON S. A., COWLEY M. J., BUCKLAND M. E., PREISS T., HENSTRIDGE D. C., COONEYG. J., FEBBRAIO M. A., MARTIN D. I., CROPLEY J. E., SUTER C. M. Maternal obesity and diabetes induces latent metabolic defects and widespread epigenetic changes in isogenic mice. *Epigenetics.* v. 8, n. 6, p. 602-611, Jun. 2013.

LOPASCHUK G. D., FOLMES C. D. L., STANLEY W. C. Cardiac Energy Metabolism in Obesity. *Circ. Res.*, v. 101, n. 4, p. 335-347, Aug 17. 2007.

LOPASCHUK G. D., SPAFFORD M. A., MARSH D. R. Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth. *Am J Physiol.* v. 261, n. 6Pt 2, p. H1698-H1705, Dec. 1991.

LUIKEN J. J., COORT S. L., WILLEMS J., COUMANS W. A., BONEN A., VAN DER VUSSE G. J., GLATZ J. F. Contraction-induced fatty acid translocase/CD36 translocation in rat cardiac myocytes is mediated through AMP-activated protein kinase signaling. *Diabetes.* v. 52, n. 7, p. 1627-1634, Jul. 2003.

LUIKEN J. J., KOONEN D. P., WILLEMS J., ZORZANO A., BECKER C., FISCHER Y., TANDON N. N., VAN DER VUSSE G. J., BONEN A., GLATZ J. F. Insulin stimulates long-chain fatty acid utilization by rat cardiac myocytes through cellular redistribution of FAT/CD36. *Diabetes.* v. 51, n. 10, p. 3113–3119, Oct . 2002.

MACLELLAN J.D., GERRITS M. F., GOWING A., SMITTH P. J., WHEELER M. B., HARPER M. E. 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, Aug. 2005.

MAHMUD M., BULL S., SUTTIE J. J., PAL N., HOLLOWAY C., DASS S., MYERSON S. G., SCHNEIDER J. E., DE SILVA R., PETROU M., SAYEED R., WESTABY S., CLELLAND C., FRANCIS J. M., ASHRAFIAN H., KARAMITSOS T. D., NEUBAUES S. Myocardial steatosis and left ventricular contractile dysfunction in patients with severe aortic stenosis. *Circ Cardiovasc Imaging.* v. 6, n. 5, p. 808-816, Sep. 2013.

MAKOWSKI L., HOTAMISLIGIL G. S. Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr.* v. 134, n. 9, p. 2464S-2468S. 2004.

MARQUES R. G., MORALES M. M., PETROIANU A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras.* v. 24, n. 1, p. 69-74. 2009.

MARSIN A. S., BERTRAND L., RIDER M. H., DEPREZ J., BEAULOYE C., VINCENT M. F., VAN DEN B. G., CARLING D., HUE L. 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 28. 2000.

MARTINS M. R., VIEIRA A. K., DE SOUZA E. P., MOURA A. S. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *J Endocrinol.* v. 198, n. 3, p. 591-598, Sep. 2008.

MATTHEWS DR, HOSKER JP, RUDENSKI AS, NAYLOR BA, TREACHER DF, TURNER RC. 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, n. 1, p. 1-14, Feb. 1997.

MEDINA R. A., SOUTHWORTH R., FULLER W., GARLICK P. B. Lactate-induced translocation of GLUT1 and GLUT4 is not mediated by the phosphatidylinositol-3-kinase pathway in the rat heart. *Basic Res Cardiol.* v. 97, n. 2, p. 168-176, Mar. 2002.

MERKEL M., ECKEL R. H., GOLDBERG I. J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res.* v. 43, n. 12, p. 1997-2006, Dec. 2002.

METTAUER B., ZOLL J., GARNIER A., VENTURA-CLAPIER R. Heart failure: a model of cardiac and skeletal muscle energetic failure. *Pflugers Arch.* v. 452, p. 653-666, Sep. 2006.

MOREIRA A. S. B., TEIXEIRA M. T., OSSO F., PEREIRA R. O., GARCIA-SOUZA E. P., MANDARIM DE LACERDA C. A., MOURA A. S. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* v. 19, n. 11, p. 805-810, Dec. 2009.

MORISCO C., LEMBO G., TRIMARCO B. Insulin resistance and cardiovascular risk: New insights from molecular and cellular biology. *Trends Cardiovasc Med.* v. 16, n. 6, 183-188, Aug. 2006.

MORRISON J. A., FRIEDMAN L. A., WANG P., GLUECK C. J. Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. *J Pediatr.* v. 152, p. 201-206. Feb. 2008.

MOTOJIMA K., PASSILLY P., PETERS J. M., GONZALEZ F. J., LATRUFFE N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem.* v. 273, n. 27, p. 16710-16714, Jul. 1998.

MUOIO D. M., SEEFELD K., WITTERS L. A., COLEMAN R. A. 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, n. 3, p. 783-791, Mar. 1999.

MURRAY J., OQUENDO C. E., WILLIS J. H., MARUSICH M. F., CAPALDI R. A. Monitoring oxidative and nitrative modification of cellular proteins; a paradigm for identifying key disease related markers of oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev.* v. 60, n. (13-14), p. 1497-1503, Oct-Nov. 2008.

NAKAMURA K., KUSANO K. F., MATSUBARA H., NAKAMURA Y., MIURA A., NISHII N., BANBA K., NAGASE S., MIYAJI K., MORITA H., SAITO H., EMORI

T., OHE T. Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Card Fail* v.11, p.117–123, 2005.

NEVES F. A., BERNARDO A. F., MATTOS A. B., VIEIRA A. K., MALAFAIA T. DE O., THOLE A. A., RODRIGUES-CUNHA A. C., GARCIA-SOUZA E. P., SICHIERI R., MOURA A. S. Heart energy metabolism impairment in Western-diet induced obese mice. *J Nutr Biochem*. v. 25, n. 1, p. 50-57, Jan. 2014.

NIEMANN B., CHEN Y., TESCHNER M., LI L., SILBER R. E., ROHRBACH S. Obesity induces signs of premature cardiac aging in younger patients: the role of mitochondria. *J Am Coll Cardiol*. v. 57, p. 577- 585, Fev. 2011.

NISOLI E., CLEMENTI E., CARRUBA M., MONCADA S. Defective mitochondrial biogenesis: a hallmark of the high cardiovascular risk in the metabolic syndrome? *Circ. Res*. v. 100, n. 6, p. 795-806, Mar. 2007.

NITTI M., DOMENICOTTI C., D'ABRAMO C., ASSERETO S., COTTALASSO D., MELLONI E., POLIG., BIASI F., MARINARI U. M., PRONZATO M. A. Activation of PKC-beta isoforms mediates HNE-induced MCP-1 release by macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. v. 294, n. 3, p. 547-552, Jun. 2002.

NISHIUMI S., BESSYO H., KUBO M., AOKI Y., TANAKA A, YOSHIDA K, ASHIDA H. 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, n. 24, p. 12916-12923, Dec. 2010.

NOJIRI H., SHIMIZU T., FUNAKOSHI M., YAMAGUCHI O., ZHOU H., KAWAKAMI S., OHTA Y., SAMI M., TACHIBANA T., ISHIKAWA H., KUROSAWA H., KAHAN R. C., OTSU K., SHIRASAWA T. Oxidative stress causes heart failure with impaired mitochondrial respiration. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 44, p. 33789-33801, Nov. 2006.

OLIVEIRA L. P. M. Alimentação complementar nos primeiros dois anos de vida. *Revista de Nutrição*. v. 18, n. 4, p. 459-469. 2005.

OMS. Helth Topics: Obesity. Disponível em: <http://who.int/topics/obesity/en/>. Acesso em: 17/08/15 às 19:00.

OMS. Obesity. Disponível em: [http://who.int/gho/ncd/risk\\_factors/obesity\\_text/en/](http://who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/). Acesso em: 17/08/15 às 21:30.

PARK S. Y., CHO Y. R., KIM H. J., HIGASHIMORI T., DANTON C., LEE M. K., DEY A., ROTHERMEL B., KIM Y. B., KALINOWSKI A., RUSSELL K. S., KIM J. K. PELLETIER A., CODERRE L. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. *Diabetes*. v. 54, n. 12, p. 3530-3540, Dec. 2005.

PEREIRA R. O., MOREIRA A. S., DE CARVALHO L., MOURA A. S. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. *Regul Pept*. v. 136, n. 1-3, p. 117-121, Sep. 2006.

PEREIRA R. O., WENDE A. R., CRUM A., HUNTER D., OLSEN C. D., RAWLINGS T., RIEHLE C., WARD W. F., ABEL E. D. Maintaining PGC-1 $\alpha$  expression following pressure overload-induced cardiac hypertrophy preserves angiogenesis but not contractile or mitochondrial function. *FASEB J.* v. 28, n. 8, p. 3691-3702, Aug. 2014.

PETEL M. S., SRINIVASAN M. Metabolic programming: causes and consequences. *J Biol Chem.* v. 277, n. 3, p. 1629-1632, Jan. 2002.

\_\_\_\_\_. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. *J Nutr.* v. 140, n. 3, p. 658-661, Mar. 2010.

PLAGEMANN A., HARDER T., RAKE A., VOITS M., FINK H., ROHDE W., DÖRNER G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.* v. 836, n. (1-2), p. 146-155, Jul. 1999.

PLAGEMANN A., HEIDRICH I., GÖTZ F., ROHDE W., DÖRNER G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol.* v. 99, n. 3, p. 154-158. 1992.

PLAGEMANN A., ROEPKE K., HARDER T., BRUNN M., HARDER A., WITTRÖCK-STAAR M., ZISKA T., SCHELLONG K., RODEKAMP E., MELCHIOR K., DUDENHAUSEN J. W. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med.* v. 38, n. 4, p. 393-400, Jul. 2010.

POPKIN B. M. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. *Proc Nutr Soc.* v. 70, n. 1, p. 82-91, Feb. 2011.

PROUD C. G. Ras, PI3-kinase & mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* v. 63, n. 3, p. 403-413, Aug. 2004.

QUIÑONES-GALVAN A., FERRANNINI E. Metabolic effects of glucose-insulin infusions: myocardium and whole body. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* v. 4, n. 2, p. 157-163, Mar. 2001.

RAMASAMY R., HWANG Y. C., WHANG J., BERGMANN S. R. Protection of ischemic hearts by high glucose is mediated, in part, by GLUT-4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 281, n. 1, p. H290-H297. Jul. 2001.

RAY P. D., HUANG B. W., TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.* v. 24, n. 5, p. 981-990, May. 2012.

REN J., PULAKAT L., WHALEY-CONNELL A., SOWERS J. R. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J Mol Med.* v. 88, n. 10, p. 993-1001, Oct. 2010.

RODRIGUES A. L., DE SOUZA E. P., DA SILVA S. V., RODRIGUES D. S., NASCIMENTO A. B., BARJA-FIDALGO C., DE FREITAS M. S. RODRIGUES A. L., DE MOURA E. G., PASSOS M. C., TREVENZOLI I. H., DA CONCEIÇÃO E. P.,

BONONO I. T., NETO J. F., LISBOA P. C. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem.* v. 22, n. 2, p. 109-117, Feb. 2011.

RODRIGUES A. L., DE SOUZA E. P., DA SILVA S. V., RODRIGUES D. S., NASCIMENTO A. B., BARJA-FIDALGO C., DE FREITAS M. S. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after earlyovernutrition. *J Endocrinol.* v. 195, n. 3, p. 485-494, Dec. 2007.

ROGGE M. M. The Role of Impaired Mitochondrial Lipid Oxidation in Obesity. *Biol Res Nurs.* v. 10, n. 4, p. 356-373, Apr. 2009.

ROSCA, M. G.; HOPPEL, C. L. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* v. 41, n. 2, p. 107-112, 2009.

\_\_\_\_\_. Mitochondria in heart failure. *Cardiovasc Res.* v. 88, n. 1, p. 40-50. 2010.

ROSCA M. G., VAZQUEZ E. J., KERNER J., PARLAND W., CHANDLER M. P., STANLEY W., SABBAH H. N., HOPPEL C. L. Cardiac mitochondria in heart failure: decrease in respirasomes and oxidative phosphorylation. *Cardiovasc Res.* v. 80, n. 1, p. 30-39, Oct. 2008.

ROUSSET S., ALVES-GUERRA M. C., MOZO J., MIROUX B., CASSARD-DOULCIER A. M., BOUILLAUD F., RICQUIER D. The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* v. 53, n. suppl 1, p. S130-S135, Feb. 2004.

RUDERMAN N., CHISHOLM D., PI-SUNYER X., SCHNEIDER S. The metabolically obese, normal-weight individual revisited. *Diabetes.* v. 47, n. 5, p. 699-713, May. 1998.

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

SADDIK M., GAMBLE J., WITTERS L. A., LOPASCHUK G. D. Acetyl-CoA carboxylase regulation of fatty acid oxidation in the heart. *J Biol Chem.* v. 268, n. 34, p. 25836-25845, Dec 5. 1993.

SALTIEL A. R., KAHN C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec. 2001.

SCHAFFER J. E. Fatty acid transport: the roads taken. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 282, n. 2, p. E239-E246, Feb. 2002.

SCHULZ H. Regulation of fatty acid oxidation in heart. *J Nutr.* v. 124, n. 2, p. 165-171, Feb. 1994.

SERVIDDIO G., SASTRE J., BELLANTI F., VINA J., VENDEMIALE G., ALTOMARE E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med.* v. 29, n. 2/1, p.22-35. 2008.

SERVIDDIO G., GIUDETTI A. M., BELLANTI F., PRIORE P., ROLLO T., TAMBORRA R., SICULELLA L., VENDEMIALE G., ALTOMARE E., GNONI G. V. 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- e24094. 2011.

SHARMA N., OKERE I. C., MCELFRESH T. A., KING K. L., STERK J. P., HUANG H., BRUNENGRABER D. Z. CHANDLER M. P., STANLEY W. C. Regulation of glucose oxidation and pyruvate dehydrogenase activity during high cardiac energy expenditure: critical role for fatty acid oxidation. *J Physiol*. v. 562, n. (pt 2), p. 593-603, Jan. 2005.

SHAROV V. G., TODOR A. V., SILVERMAN N., GOLDSTEIN S., SABBAH H. N. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. v. 32, n. 12, p. 2361-2367, Dec. 2000.

SHIOJIMA I., YEFREMASHVILI M., LUO Z., KUREISHI Y., TAKAHASHI A., TAO J., ROSENZWEIG A., KAHN CR., ABEL E. D., WALSH K. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem*. v. 277, n. 40, p. 37670-37677, Oct. 2002.

SICHERI R., DO NASCIMENTO S., COUTINHO W. The burden of hospitalization due to overweight and obesity in Brazil. *Cad Saude Publica*. v. 23, n. 7, p. 1721-1727, Jul. 2007.

SLOT J. W., GEUZE H. J., GIGENGACK S., JAMES D. E., LIENHARD G. E. Translocation of the glucose transporter Glut4 in cardiac myocytes of the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 88, n. 17, p. 7815-7819, Sep. 1991.

SMITH C. J., RYCKMAN K. K. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. *Diabetes Metab Syndr Obes*. v. 29, n. 8, p. 295-302, Jun. 2015.

SOARES V. M., GARCIA-SOUZA E. P., LACERDA-MIRANDA G., MOURA A. S. Early life overfeeding decreases acylated ghrelin circulating levels and upregulates GHSR1 signaling pathway in white adipose tissue of obese young mice. *Regul Pept*. v. 174, n. 1-3, p. 6-11, Feb10. 2012.

SRINIVASAN M., AALINKEEL R., SONG F., PATEL M. S. Programming of islet functions in the progeny of hyperinsulinemic/obese rats. *Diabetes*. v. 52, n. 4, p. 984-990, Apr. 2003.

STANLEY W. C., LOPASCHUK G. D., HALL J. L., MCCORMACK J. G. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischaemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res*. v. 33, n. 2, p. 243-257, Feb.1997.

STANLEY W. C., RECCHIA F. A., LOPASCHUK G. D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart. *Physiol Rev*. v. 85, n. 3, p. 1093-1129, Jul. 2005.

STANLEY W. C., HERNANDEZ L. A., SPIRES D., BRINGAS J., WALLACE S., MCCORMACK J. G. Pyruvate dehydrogenase activity and malonyl CoA levels in normal and ischemic swine myocardium: effects of dichloroacetate. *J Mol Cell Cardiol.* v. 28, n. 5, p. 905-14, May. 1996.

STANLEY W. C., MEADOWS S. R., KIVILO K. M., ROTH B. A., LOPASCHUK G. D. beta-Hydroxybutyrate inhibits myocardial fatty acid oxidation in vivo independent of changes in malonyl-CoA content. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* v. 285, n. 4, p. H1626-H1631, Oct. 2003.

STETTLER N., STALLINGS V. A., TROXEL A. B., ZHAO J., SCHINNAR R. NELSON S. E., ZIEGLER E. E., STROM B. L. Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation.* v. 111, n. 15, p. 1897-1903, Apr. 2005.

SUN D., NGUYEN N., DeGRADO T. R., SCHWAIGER M., BROSIUS F. C. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation.* v. 89, n.2, p. 793-798, Feb. 1994.

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

TREVENZOLI I. H., RODRIGUES A. L., OLIVEIRA E., THOLE A. A., CARVALHO L., FIGUEIREDO M. S., TOSTE F.P., NETO J.F., PASSOS M.C., LISBOA P.C., MOURA E. G. Leptin treatment during lactation programs leptin synthesis, intermediate metabolism, and liver microsteatosis in adult rats. *Horm Metab Res.* v. 42, n. 7, p. 483-490, Jun. 2010.

TAEGTMEYER H. Energy metabolism of the heart: from basic concepts to clinical applications. *Curr Probl Cardiol.* v. 19, n. 2, p. 59-113, Feb. 1994.

TURNER N., COONEY G. J., KRAEGEN E.W., BRUCE C. R. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J Endocrinol.* v. 220, n. 2, T61-79, Jan. 2014.

TARDIF A., JULIEN N., PELLETIER A., THIBAUT G., SRIVASTAVA A. K., CHIASSEON J. L., CODERRE L. Chronic exposure to beta-hydroxybutyrate impairs insulin action in primary cultures of adult cardiomyocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 281, n. 6, p. E1205-E1212, Dec. 2001.

TAYLOR P. D., POSTON L. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol.* v. 92, n. 2, p. 287-298, Mar. 2007.

VAN DER VUSSE G.J., BILSEN V. M., GLATZ J. F. C. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. *Cardiovascular Research.* v. 45, n. 2, p. 279-293, Jan 14. 2000.

VANOVERSCHELDE J. L., WIJNS W., KOLANOWSKI J., BOL A., DECOSTER P. M., MICHEL C., COGNEAU M., HEYNDRIKX G. R., ESSAMRI B., MELIN J. A. Competition between palmitate and ketone bodies as fuels for the heart: study with positron emission tomography. *Am J Physiol.* v. 264, n. 3 Pt 2, p. H701-H707, Mar. 1993.

VENTURA-CLAPIER R., GARNIER A., VEKSLER V., JOUBERT F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta.* v. 1813, n. 7, p. 1360-1372, Jul. 2011.

VOITS M., FÖRSTER S., RÖDEL S., VOIGT J. P., PLAGEMANN A., FINK H. Obesity induced by unspecific early postnatal overfeeding in male and female rats: hypophagic effect of CCK-8S. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* v. 354, n. 3, p.374-378, Aug-Sep. 1996.

WALDER K., NORMAN R. A., HANSON R. L., SCHRAUWEN P., NEVEROVA M., JENKINSON C. P., EASLICK J., WARDEN C. H., PECQUEUR C., RAIMBAULT S., RICQUIER D., SILVER M. H., SHULDINER A. R., SOLANES G., LOWELL B. B., CHUNG W. K., LEIBEL R. L., PRATLEY R., RAVUSSIN E. 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.

WALLACE D. C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, again, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* v. 39, p. 359-407, Feb. 2005.

WATERLAND R. A., GARZA C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr.* v. 69, n. 2, p. 179-197, Feb. 1999

WATSON R. T., PESSIN J. E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. *Recent Prog Horm Res.* v. 56, p. 175-193. 2001

WHO. Obesity Circunference and Waist-Hip Ratio Report of a WHO Expert Consultation GENEVA. 2008. Disponível em <[http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501491-\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501491-_eng.pdf)>. acesso em 13/10/2013

WICKSTEED B, ALARCON C, BRIAUD I, LINGOHR MK, RHODES CJ. Glucose-induced translational control of proinsulin biosynthesis is proportional to preproinsulin mRNA levels in islet beta-cells but not regulated via a positive feedback of secreted insulin. *J Biol Chem.* v. 278, n. 43, p. 42080-42090, Oct. 2003.

WILSON P. W. F., D'AGOSTINO R. B., SULLIVAN L., PARISE H., KANNEL W. B. Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med.* v. 162, n. 16, p. 1867-1872, Sep. 2002.

YANG, C., AYE C. C., LI X., DIAZ RAMOS A., ZORZANO A., MORA S. 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, Oct. 2012.

YANG L., ZOU X.; LIANG Q., CHEN H., FENG J., YAN L., WANG Z., ZHOU D., LI S., YAO S., ZHENG Z. 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.

YIN F. C., SPURGEON H. A., RAKUSAN K., WEISFELDT M. L., LAKATTA E. G. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rat. . *Am J Physiol.* v. 243, n. 6, p. H941-H9147, Dec. 1982.

YOUNG L. H., RENFU Y., RUSSELL R., HU X., CAPLAN M., REN J., SHULMAN G. I., SINUSAS A. J. Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation.* v. 95, n. 2, p. 415-422, Jan. 1997.

YU, X. X., MAO W., ZHONG U., SCHOW P., ESCOVAJ., SHERWOOD S. W., ADAMS S. H., PAN G. 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, Aug. 2000.

YUSUF S. SRINATH R., OUNPUU S., ANAND S. Global burden of cardiovascular diseases Part II. Variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation.* v. 104, n. 23, p. 2855–2864, Dec. 2001.