



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira

**Hemodinâmica e metabolismo energético mitocondrial no
coração de camundongos adultos obesos programados por
hipernutrição na lactação**

Rio de Janeiro
2016

Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira

Hemodinâmica e metabolismo energético mitocondrial no coração de camundongos adultos obesos programados por hipernutrição na lactação

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

Orientador: Prof. Dr. Anibal Sanchez Moura

Rio de Janeiro

2016

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

V665 Vieira, Anatalia Kutianski Gonzalez.
Hemodinâmica e metabolismo energético mitocondrial no coração de camundongos adultos obesos programados por hipernutrição na lactação / Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira – 2016.
89 f.

Orientador: Anibal Sanchez Moura.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Coração – Metabolismo - Teses. 2. Hemodinâmica - Teses. 3. Obesidade - Teses. 4. Metabolismo energético - Teses. 5. Isquemia - Teses. I. Moura, Anibal Sanchez. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. 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

Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira

Hemodinâmica e metabolismo energético mitocondrial no coração de camundongos adultos obesos programados por hipernutrição na lactação

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

Aprovada em 21 de janeiro de 2016.

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Anibal Sanchez Moura (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Cristina Paes

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Karen de Jesus Oliveira

Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Eduardo Vera Tibiriçá

Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à Deus, à minha mãe e meu irmão os quais sempre me deram forças para vencer os obstáculos e alcançar os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à minha mãe, Deborah Gonzalez, ao meu irmão Gabriel Kutianski, ao meu pai Raimundo Emiliano, ao meu lindo primo e afilhado João Victor Kutianski, à minha Avó (*in memoriam*), Maria Kutianski e ao meu avô, Celestino Alonso (*in memoriam*) pelos ensinamentos das mais diferentes formas, pelas risadas e pela força inclusive nos momentos mais cansativos para alcançar mais uma vitória.

À minha segunda família, família Bravo, pelos momentos de alegria e distração no Paraíso Jaguanum, pela credibilidade por me terem como membro da família e, com certeza pelo apoio de sempre na vida pessoal e profissional.

Às minhas amigas e amigos que de maneiras diferente e particular me ajudaram a ter força e alcançar mais um sonho: Jéssica, Ana Beatriz, Kahena, Thiago Pereira, Jéssica Barberena, Ana Paula Edelman, Marcella Deleuse.

Às minhas amigas do LFND Roberta Guedes, Fabiana Neves, Vivian Soares, Patrícia Pacheco, Tayanne Malafaia e Ana Mattos por tudo que fizeram na minha caminha científica, pela paciência, risadas, ajudas e conselhos.

À minha irmã Natalie Bravo pelas conversas, conselhos, risadas, choros e amizade maravilhosa e eterna.

À minha mãe angolana, Amélia Faustino Bernardo, que muito me ajudou, ensinou e aconselhou na vida científica e pessoal. Obrigada por todas as ajudas nas manhãs, tardes, e principalmente, nas madrugadas com palavras de força. Sentirei saudades.

Aos amigos da minha turma 2007/1: Flávia Gombar, Genilza Oliveira, Juliana Oliveira, Thiago José e Thiago Martino.

Ao meu orientador da vida científica, e neste momento de doutorado, Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura que sempre acreditou e acredita no meu potencial e responsabilidade. Dedico a minha vitória profissional também a você.

À minha aluna de iniciação científica Marcella Kalil, que desde o início do seu contato com o laboratório e estudos científicos muito ajudou para a finalização deste presente projeto de doutorado com dedicação e entusiasmo.

Aos colegas do laboratório LFND (UERJ – IBRAG – DCF) onde desde o início da graduação pude sempre aprender e mergulhar do mundo científico.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

RESUMO

VIEIRA, Anatalia Kutianski Gonzalez. *Hemodinâmica e metabolismo energético mitocondrial no coração de camundongos adultos obesos programados por hipernutrição na lactação*. 2016. 89f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

O desequilíbrio nutricional no início da vida no período conhecido como janela crítica, leva ao desenvolvimento da obesidade, dislipidemia, diabetes e doenças cardiovasculares na idade adulta. Este estudo teve como objetivo analisar em camundongos machos Swiss adultos aos 120 dias de vida os efeitos e associações da hiperalimentação na lactação por redução de ninhada nos parâmetros hemodinâmicos, no metabolismo energético mitocondrial (razão do controle respiratório e oxidação de carboidratos e ácidos graxos), na produção de ATP, no estresse oxidativo cardíaco, hepático e plasmático, na biologia molecular através de proteínas-chave e na deposição de colágeno cardíaco. Os camundongos foram divididos em dois grupos (controle e hiperalimentado) submetidos a duas condições (linha de base e isquemia/reperfusão) formando quatro grupos no total: grupo controle linha de base (GCLB), grupo controle isquemia/reperfusão (GCIR), grupo hiperalimentado linha de base (GHLB) e o grupo hiperalimentado isquemia/reperfusão (GHIR). O GH desenvolveu maior peso do ventrículo esquerdo, gordura central e glicemia de jejum. Os níveis plasmáticos de insulina e leptina encontram-se aumentados no GH comparado ao GC. Os parâmetros EDP, Max dP/dt e Min dP/dt apresentaram diferenças significativas nas condições basais e pós-isquêmicas apresentando o GHIR aumento da EDP e Min dP/dt e redução da Max dP/dt comparado ao GHLB e aumento da EDP comparado ao GCIR. Os desequilíbrios na função cardíaca foram associados a disfunção mitocondrial, uma vez que se observou redução na oxidação de ácido graxo e carboidrato e, na RCR para carboidrato no GH e a redução na produção de ATP no GHIR comparado ao GCIR e GHLB. Além disso, aumento nos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP no GHIR e do BNP no GHLB, aumento na deposição de colágeno no GHIR comparado ao GHLB e GCIR bem como no GCIR comparado com o GCLB, aumento da sensibilidade pós isquemia na via de sinalização da insulina com aumento da PTP1B, IRS1 e pAKT2 bem com redução da pAKT1, AKT2, AMPK, pAMPK, e redução da capacidade de utilização dos ácidos graxos via redução do conteúdo da CD36 e FABP. Finalmente, foi demonstrado que a degradação de lipídios e/ou proteínas se encontra alterada entre os GC e GH a nível cardíaco, hepático e plasmático. O estudo demonstra expressivas consequências da hiperalimentação na lactação por redução de ninhada sobre a função cardíaca, a sensibilidade cardíaca à isquemia e o remodelamento cardíaco em virtude de readaptações no metabolismo energético cardíaco via alterações na via de sinalização de insulina, redução na produção de ATP e oxidação dos substratos energéticos.

Palavras chave: Coração. Isquemia/reperfusão. Hiperalimentação. Obesidade.

ABSTRACT

VIEIRA, Anatalia Kutianski Gonzalez. *Hemodynamics and mitochondrial energy metabolism in the heart of obese adult mice programmed by overnutrition in lactation*. 2016. 89f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

The nutritional imbalance at the beginning of life in the period known as critical window, leads to the development of obesity, dyslipidemia, diabetes and cardiovascular disease in adulthood. This study aimed to analyze in male Swiss mice adults at 120 days of life the effects and associations of overnutrition on lactation by reducing litter on hemodynamic parameters, in mitochondrial energy metabolism (respiratory control ratio and oxidation of carbohydrates and fatty acids), in ATP production, in cardiac, hepatic and plasma oxidative stress, in molecular biology by key proteins and collagen deposition in heart. The mice were divided into two groups (control and overfed) subject to two conditions (baseline and ischemia/reperfusion) forming four groups in total: control group baseline (CGBL), control group ischemia/reperfusion (CGIR), overfed group baseline (OGBL) and overfed group ischemia/reperfusion (OGIR). The OG developed increased weight of the left ventricle, central fat and fasting glucose. Plasma levels of insulin and leptin are increased in OG compared to the CG. EDP, Max dP/dt and Min dP/dt parameters showed significant differences in baseline and post-ischemic presenting OGIR an increase of EDP and Min dP/dt and reduce of Max dP / dt compared to OGBL and increase of EDP compared to CGIR. Imbalances in cardiac hemodynamics were associated with mitochondrial dysfunction as observed by the reduction on fatty acid and carbohydrate oxidation and in the RCR to carbohydrate in OG and the reduction in ATP production in OGIR compared to CGIR and OGBL. Furthermore, cardiac hypertrophy markers as ANP is increase in OGIR and BNP in OGBL, increased collagen deposition in OGIR compared to OGBL and GCIR as well as in CGIR compared with CGBL, increased post-ischemia sensitivity in insulin signaling pathway with increased of PTP1B, IRS1 and pAKT2 and reduced pAKT1, AKT2, AMPK, pAMPK and reduced capacity utilization of fatty acids by reducing the content of CD36 and FABP. Finally, it was showed that the degradation of lipids and/or proteins is altered between CG and OG in heart, liver and plasma. The study demonstrates significant consequences of overnutrition on lactation by reducing litter on cardiac hemodynamic, cardiac sensitivity to ischemia and cardiac remodeling due to readjustments on cardiac energy metabolism via changes in insulin signaling pathway, reduction in ATP production and oxidation of energy substrates.

Keywords: Heart. Ischemia/reperfusion. Overfeeding. Obesity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema do modelo experimental dos grupos controle e hiperalimentado.....	43
Figura 2 –	Esquema do protocolo de perfusão cardíaca em linha de base (LB) e isquemia/reperfusão (I/R).....	46
Gráfico 1 –	Curva de crescimento corporal dos grupos controle e hiperalimentado até os 120 dias de vida.....	55
Tabela 1 –	Peso corporal, do coração, das gorduras epididimal e retroperitoneal, glicemia de jejum, insulina e leptina de jejum em camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias.....	56
Tabela 2 –	Parâmetros hemodinâmicos cardíacos dos animais controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	57
Figura 3 –	Razão do controle respiratório (RCR) para ácido graxo (A) e carboidrato (B) de fibras cardíacas permeabilizadas dos grupos controle e hiperalimentado em ambas as situações (linha de base e isquemia/reperfusão).....	57
Figura 4 –	Respirometria mitocondrial para a oxidação de ácido graxo (A) e carboidrato (B) de fibras cardíacas permeabilizadas dos grupos controle e hiperalimentado em ambas as situações (linha de base e isquemia/reperfusão).....	58
Figura 5 -	Peroxidação lipídica - TBAR cardíaca (A) , hepática (B) e plasmática (C) e, carbonila cardíaca (D) , hepática (E) e plasmática (F) nos grupos controle e hiperalimentado.....	59
Figura 6 –	Produção de ATP nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado em ambas condições (linha de base e isquemia/reperfusão).....	59
Figura 7 –	O gráfico apresenta o conteúdo do IR β (A) , IRS1 (B) , PI3K (C) e da PTP1B (D) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	60
Figura 8 –	O gráfico apresenta o conteúdo e fosforilação da AKT1 (A, B) e AKT2 (C, D) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	61

Figura 9 –	O gráfico apresenta o conteúdo total da AMPK (A) , CD36 (C) e FABP (D) e, fosforilação da AMPK (B) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	62
Figura 10 -	O gráfico apresenta o conteúdo das proteínas SIRT1 (A) e PGC1 α (B) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	63
Figura 11 -	O gráfico apresenta o conteúdo total dos colágenos 1 (A) e 3 (B) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	64
Figura 12 –	O gráfico apresenta o conteúdo total e fosforilação das proteínas STAT3 α (A, B) e STAT3 β (C, D) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	65
Figura 13 -	Imagem histológica e gráfico representativo da quantificação de colágeno nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	66
Figura 14 -	Expressão dos genes das enzimas ANP (A) , BNP (B) , CPT1 (C) e UCP3 (D) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACBP	Proteína de ligação de acil-coenzima A
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína quinase B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ATP	Adenosina trifosfato
BNP	Peptídeo natriurético do tipo B
BPM	Batimentos por minuto
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CD 36	Grupo de diferenciação 36
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CPT 1	Carnitina palmitoil Transferase
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTP	Dinitrofenilhidrazina
EDP	Pressão diastólica final
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FABP	Proteína de ligação de ácido graxo
FAD	Flavinamida adenina dinucleotídeo
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GC	Grupo controle
GCIR	Grupo controle isquemia/reperfusão
GCLB	Grupo controle linha de base
GH	Grupo hiperalimentado
GHIR	Grupo hiperalimentado isquemia/reperfusão
GHLB	Grupo hiperalimentado linha de base
GLUT4	Transportador de glicose 4
GPX	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IR	Isquemia e reperfusão
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1
IR β	Receptor de insulina beta
K ₂ HPO ₄	Fosfato dibásico de potássio
KCl	Cloreto de potássio
LB	Linha de base
LPL	Lipoproteína lipase
Max dP/dt	Taxa de aumento da pressão sistólica
MDA	Malondialdeído
MEC	Matriz extracelular
Min dP/dt	Taxa de aumento da pressão diastólica
MMP	Matriz Metaloproteinase
MPTP	Poros de permeabilidade mitocondrial
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
mtDNA	DNA mitocondrial
NAD ⁺	Adenina dinucleotídeo
NHANES	National Health and Nutrition Examination Survey
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Superóxido
OH [·]	Radical hidroxila
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGC1 α	Peroxissoma ativado pelo proliferador do receptor gama 1 alfa
Pi	Fosfato inorgânico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PLA2	Fosfolipase A2
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
PPAR	Receptor ativado por proliferador de peroxissoma
PTP1B	Proteína tirosina fosfatase 1B
RCR	Razão do controle respiratório
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotação por minuto
seg	Segundos
SIRT	Sirtuína

SOD	Superóxido dismutase
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
TAM	Tecido adiposo marrom
Tau	Constante de tempo de relaxamento isovolumétrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TIMPs	Inibidores teciduais de metaloproteinases
TMP	Tetrametoxipropano
tRNA	Ácido ribonucleico transportador
UCPs	Proteínas desacopladoras
UV	Ultravioleta
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
1	OBESIDADE	17
1.1	Nutrição e obesidade	17
1.2	Programação metabólica e obesidade	18
1.3	Modelo de hipernutrição na lactação	20
1.4	Bioenergética e disfunção mitocondrial na obesidade	23
1.5	A obesidade e o remodelamento cardíaco	26
1.6	Hemodinâmica cardíaca	29
1.7	Metabolismo energético cardíaco	32
1.7.1	<u>Metabolismo energético cardíaco – Carboidrato</u>	32
1.7.2	<u>Metabolismo energético cardíaco – ácido graxo</u>	36
2	OBJETIVOS	37
2.1	Objetivo geral	41
2.2	Objetivos específicos	41
2.2.1	<u>Confirmar as alterações no perfil biométrico e bioquímico dos grupos controle (GC) e hiperalimentado (GH)</u>	41
2.2.2	<u>Investigar a hemodinâmica cardíaca de ambos os grupos na linha de Base (LB) e isquemia/reperfusão (IR)</u>	41
2.2.3	<u>Investigar a biologia molecular relacionada à bioenergética cardíaca na linha de Base (LB) e de isquemia/reperfusão (IR)</u>	41
2.2.4	<u>Investigar o acoplamento mitocondrial através da razão de controle respiratório (RCR) determinada pela relação estado3/estado4 e estado 3 em ambos os grupos na linha de Base (LB) e isquemia/reperfusão (IR)</u>	42
2.2.5	<u>Investigar os processos antioxidantes cardíacos (em ambos os grupos na linha de base e isquemia/reperfusão), hepáticos e plasmáticos</u>	42
2.2.6	<u>Investigar a produção de adenosina trifosfato (ATP) em ambos os grupos na linha de base e isquemia/reperfusão</u>	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	Animais e modelo experimental	42
3.2	Análise do ganho de peso corporal dos animais durante o crescimento	44

3.3	Eutanásia	44
3.4	Crescimento naso-anal	44
3.5	Análise hormonal e da glicemia de jejum	45
3.6	Função cardíaca – Langendorff	45
3.7	Respirometria cardíaca – Oroboros 2k	47
3.7.1	<u>Obtenção de fibras cardíacas permeabilizadas</u>	47
3.7.2	<u>Respirometria de alta resolução</u>	47
3.8	Western Blotting	48
3.8.1	<u>Preparo do tecido muscular cardíaco para Western Blotting</u>	48
3.8.2	<u>Análise por Western Blotting</u>	48
3.9	Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)	49
3.9.1	<u>Extração do RNA total</u>	50
3.9.2	<u>Transcrição reversa (RT)</u>	50
3.10	Análise histológica quantitativa para deposição de colágeno	51
3.11	Análise de estresse oxidativo cardíaco, hepático e plasmático	51
3.11.1	<u>Peroxidação lipídica</u>	52
3.11.2	<u>Carbonilação de proteína</u>	53
3.12	Dosagem de ATP	53
3.13	Análises estatísticas	54
4	RESULTADOS	55
4.1	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre os parâmetros biométricos e bioquímicos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida	55
4.2	Efeito da hiperalimentação na lactação na hemodinâmica cardíaca de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida	56
4.3	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a respiração mitocondrial de fibras cardíacas de camundongos aos 120 dias de vida	57
4.4	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a peroxidação lipídica e proteica cardíaca, hepática e plasmática de camundongos aos 120 dias de vida	58
4.5	Efeito da hiperalimentação na lactação na produção de ATP no	

	coração de camundongos aos 120 dias de vida.....	59
4.6	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo do IR β , IRS1, PI3K e da PTP1B de camundongos aos 120 dias de vida.....	60
4.7	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo e fosforilação da AKT1 e AKT2 de camundongos aos 120 dias de vida.....	61
4.8	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da AMPK, pAMPK, CD36 e FABP de camundongos aos 120 dias de vida.....	62
4.9	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da SIRT1 e PGC1 α de camundongos aos 120 dias de vida.....	63
4.10	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo dos colágenos 1 e 3 de camundongos aos 120 dias de vida.....	64
4.11	Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo e fosforilação da STAT3 α e STAT3 β de camundongos aos 120 dias de vida.....	65
4.12	Efeito da hiperalimentação na lactação na deposição cardíaca de colágeno de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.....	65
4.13	Expressões cardíacas de mRNAs para ANP, BNP, CPT1 e UCP3.....	67
5	DISCUSSÃO	68
	CONCLUSÃO	78
	REFERÊNCIAS	79

INTRODUÇÃO

A obesidade é hoje um dos maiores problemas de saúde pública e considerada uma doença de ocorrência mundial, podendo ser gerada por fatores genéticos, hormonais, nutricionais e ambientais. Enfermidades associadas à obesidade que podem estar presentes independente da idade são: doenças cardiovasculares, dislipidemia, esteatose hepática, aumento do estresse oxidativo, resistência à insulina e leptina.

Sabe-se que a modificação do aporte nutricional em um momento crítico do desenvolvimento (janela crítica) pode levar à uma (re) programação metabólica com consequências fisiopatológicas na vida adulta. Desta forma, o trabalho cujos resultados apresentaremos, teve como objetivo estudar o efeito da hiperalimentação na lactação (janela crítica) em animais quando adultos (120 dias de vida). Em nosso estudo, particular atenção é dada à hemodinâmica, biologia molecular, expressão gênica, metabolismo energético e estresse oxidativo dos cardiomiócitos, bem como o estresse oxidativo hepático e plasmático.

1 OBESIDADE

1.1 Nutrição e obesidade

A obesidade é considerada uma doença crônica e multifatorial caracterizada pelo desequilíbrio entre a quantidade calórica ingerida e o concomitante gasto energético. Como causa e resultado deste processo o organismo reorganiza os seus padrões naturais de uso e armazenamento de energia. A gravidade desta situação pode ser resumida pela atual constatação de que a excessiva gordura visceral, diferente da gordura subcutânea, predispõe o organismo ao desenvolvimento de diabetes, pressão arterial elevada, alto colesterol e ao amplo conjunto de doenças cardiovasculares. A obesidade e suas consequências têm sido cada vez mais estudadas em virtude de dados epidemiológicos que indicam a sua prevalência em diferentes países e etnias atingindo em torno de 250 milhões de pessoas no mundo.

De acordo com a National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), dados entre os anos 2003–2004 revelaram 66.2% de prevalência de sobrepeso (33.4%) e obesidade (32.9%) em adultos dos Estados Unidos entre 20-74 anos de idade (OGDEN et al., 2007). Em 2015, se estima que aproximadamente 2,3 bilhões de adultos apresentarão sobrepeso, e que pelo menos 700 milhões de pessoas no mundo, a obesidade (OGDEN et al., 2007). No Brasil, o censo do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010) publicou dados relevantes sobre a obesidade na população brasileira. O peso corporal dos brasileiros aumentou nos últimos anos de modo que o excesso de peso em homens adultos evoluiu de 18,5% em 2008-2009 para 50,1% em 2010, e nas mulheres de 28,7% para 48%. Também a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) (IBGE, 2010) relatou um declínio da prevalência de baixo peso comparado ao aumento da prevalência de excesso de peso e obesidade no Brasil. Estudos demonstram que a mudança do hábito alimentar, com o aumento da ingestão de alimentos industrializados ricos em gordura e/ou açúcar (LEVY et al., 2012; SICHIERI, 1998), associada ao sedentarismo, são as principais causas do aumento da obesidade no Brasil e nos demais países.

Acredita-se hoje que a obesidade estabelecida na idade adulta é um processo prospectivo com início na infância (OLIVEIRA, 2005). Ou seja, além do estilo de vida na infância, estudos sugerem que alterações nutricionais no ambiente intrauterino e pós-natal podem ser consideradas 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 a síndrome metabólica (JAMES et al, 2006; HABBOUT et al., 2013).

O desenvolvimento de doença cardiovascular é uma das consequências da obesidade tida como principal causa de mortalidade na sociedade ocidental. Este fato é diretamente associado com mudanças nas vias de sinalização a nível intra e intercelular desde as células endoteliais até os cardiomiócitos. Assim sendo, se fazem necessários estudos no coração com o objetivo de melhor entender as diferentes vias de sinalização assim como as relações daquelas ligadas ao crescimento celular, desenvolvimento de hipertrofia, utilização de substratos energéticos (carboidrato e ácido graxo), desenvolvimento de processos inflamatórios, regulação do estresse oxidativo dentre outros.

1.2 Programação metabólica e obesidade

O conceito de programação metabólica abrange basicamente o efeito prospectivo acima assinalado. Ou seja, programação metabólica define um processo no qual um estímulo ou insulto em um período crítico da vida, como no desenvolvimento fetal e/ou pós-natal, é capaz de gerar consequências duradouras ou permanentes ao longo da vida e na vida adulta em animais adultos (LUCAS, 1991; HABBOUT et al., 2013). Por exemplo, McCance em 1962 demonstrou através de seus estudos pioneiros sobre programação metabólica em roedores, que por meio de um ajuste de ninhada, a quantidade de alimento consumida durante o período pós-natal gerava consequências em longo prazo sobre o crescimento (McCANCE, 1962). Desta forma, as hipóteses da origem fetal das doenças no adulto, programação fetal ou resposta adaptativa precoce baseiam-se na observação de que mudanças ambientais no período pré-natal e/ou pós-natal podem alterar o desenvolvimento intrauterino, levando à obesidade e a complicações

metabólicas e histológicas a nível cardiovascular e hepático e metabólicas na idade adulta (ARMITAGE et al., 2005; Conceição et al., 2013a; VIEIRA et al., 2015). Ou seja, durante estes críticos períodos no início da vida, o organismo tem a capacidade de responder às situações ambientais tidas como inadequadas ao desenvolvimento normal.

Tais respostas que são realizadas por meio de adaptações a nível celular, molecular e bioquímico ajustam em curto prazo os sistemas às demandas fisiológicas, entretanto, a longo-prazo tais ajustes se desdobram em comprometimento das funções de diferentes tecidos e órgãos (PATEL & SRINIVASAN, 2002; PEREIRA et al., 2006; MARTINS et al., 2008; CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2009 HABBOUT et al., 2013).

Diversos estudos experimentais relacionados à obesidade utilizam a modificação nutricional na ração materna (OZANNE & HALES, 1999) ou da prole (VINCENT et al., 2001; DU TOIT et al., 2008; NEVES et al., 2014), como metodologia para análise da ação a longo prazo de alterações nutricionais no início da vida sobre o desenvolvimento e consequências do aumento de peso, da diabetes, das doenças cardiovasculares, complicações hepáticas e obesidade na idade adulta. Acrescenta-se ainda que, resultados experimentais expressivos, têm sido obtidos gerando-se reprogramação metabólica em camundongos adultos por meio de manipulação experimental da disponibilidade de leite materno no período pós-natal através da redução de ninhada (PEREIRA et al., 2006; MARTINS et al., 2008; LACERDA-MIRANDA et al., 2012; HABBOUT et al., 2013).

Em roedores o período de lactação tem sido descrito como um período importante e crítico ao desenvolvimento. A redução de ninhada (de 10-16 filhotes para 3 animais), ao aumentar a disponibilidade de leite por filhote, é capaz de determinar dislipidemia (HAHN, 1984), hiperinsulinemia (MARTINS et al., 2008), hiperleptinemia (HABBOUT et al., 2013; VIEIRA et al., 2015), esteatose hepática não-alcoólica, aumento da massa corporal e adiposa (SCHMIDT et al., 2001), alterações na hemodinâmica cardíaca e deposição de colágeno (VIEIRA et al., 2015) em proles na idade jovem e/ou adulta (120 dias) (SHIN et al., 2013; BERNARDO et al., 2015).

Desta forma, os processos acima estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de riscos à saúde dentre eles, as doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, obesidade e também ao desequilíbrio no

neurodesenvolvimento. Ao mesmo tempo, estudos sugerem que a persistência dos efeitos prospectivos de variações nutricionais na infância pode também ter como consequências modificações nos padrões de metilação do DNA em células específicas. Tais modificações por sua vez poderiam levar a alterações da expressão gênica em tecidos específicos assim como modificações nas respostas hormonais. Além disso, sugere-se que a transmissão dessas alterações às células filhas ocorreria através de replicações (PATEL & SRINIVASAN, 2002).

Especificamente, a relação de sobrepeso e obesidade com o desenvolvimento de doença cardiovascular tem sido cada vez mais demonstrada em pesquisas utilizando diferentes modelos experimentais. A cardiomiopatia metabólica e diabética também está fortemente associada com o excesso de peso oriundo da hiperalimentação crônica e do excesso de gordura nos alimentos. Este excesso de gordura derivado da alimentação pode vir a causar para além do sobrepeso e obesidade, no início da vida e persistir na idade adulta, uma desregulação nas vias de sinalização relacionadas aos substratos energéticos como ácido graxo e glicose. Estas alterações são consequências do aumento do estresse oxidativo o qual é capaz de desequilibrar o metabolismo, crescimento e proliferação celular dos tecidos e órgãos centrais e periféricos (RUPÉREZ et al., 2014). Este aumento do estresse oxidativo está associado a redução da atividade dos agentes antioxidantes e consequente desregulação das vias de sinalização metabólicas. Especificamente no coração, o sobrepeso e a obesidade levam ao aumento da fibrose intersticial, disfunção diastólica e sistólica e hipertrofia levando a insuficiência cardíaca (VIEIRA et al., 2015). Deste modo, a obesidade ao longo da vida torna os órgãos centrais mais sensíveis ao estresse oxidativo levando ao desequilíbrio na utilização dos substratos energéticos a nível central e periférico. (MANDAVIA et al., 2012).

1.3 Modelo de hipernutrição na lactação

Sabe-se que estímulos ambientais a nível físico podem gerar modificações da expressão gênica na prole e readaptações metabólicas no organismo adulto (HABBOU et al., 2013). Assim, os períodos gestacional e pós-natal são considerados uma janela crítica, uma vez que, o organismo fica vulnerável a

diversas modificações, no sistema nervoso central e órgãos periféricos em desenvolvimento nesta fase, que podem ser definitivas na idade adulta.

O modelo de redução de ninhada, originalmente descrito por Plagemann e colaboradores (SCHMIDT et al., 2001; DÖRNER & PLAGEMANN, 1994; PLAGEMANN et al., 1992), pode ser resumidamente descrito pela redução da prole em 3 (três) animais no 3º dia de vida mantendo-a desta maneira até o final da lactação e do dia do eutanásia. A partir do 4º dia de vida, os animais que são assim mantidos têm acesso a uma maior disponibilidade de leite como resultado de um processo lactogênico programado para amamentar até 10 lactentes. Conforme demonstrado em resultados anteriores de nosso laboratório, esta maior oferta induz um maior consumo de leite pelo grupo hiperalimentado, além de maior quantidade de macronutrientes presentes no leite, como por exemplo, proteínas e triglicerídeos a partir do 10º dia de vida (CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2009).

Outros estudos também evidenciam que a hiperalimentação na lactação está associada a maior suscetibilidade ao desenvolvimento de sobrepeso, obesidade e morbidades relacionadas na idade adulta, assim como, o rápido ganho de peso no início da vida associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MORRISON et al., 2008; STETTLER et al., 2005; DÖRNER & PLAGEMANN, 1994). Também se observa alterações dos níveis basais de parâmetros bioquímicos como glicemia de jejum, insulina, leptina plasmáticas, além da relação insulina/glicose descritos pelo nosso e outros grupos de pesquisa (MARTINS et al., 2008; CUNHA et al., 2009; HABBOUT et al., 2013; LIMA et al., 2013; CONCEIÇÃO et al., 2013; BERNARDO et al., 2015).

Ainda, em relação ao modelo experimental de redução de ninhada, pode-se dizer que a instalação da obesidade e/ou sobrepeso está relacionada a maior propensão destes animais ao desenvolvimento de hipertensão, remodelamento cardíaco, deficiência na utilização dos substratos energéticos (carboidrato e ácidos graxos), diabetes, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia a partir do período pós-lactação até a idade adulta (HABBOUT et al., 2013; BERNARDO et al., 2015). Tais alterações são observadas a nível central e periférico.

Especificamente no coração, as alterações nutricionais são capazes de causar modificações no processo celular de partição energética dos cardiomiócitos, ou seja, na fisiologia mitocondrial. Em decorrência deste processo, um novo padrão celular de produção e uso da energia é inaugurado. Assim, como resultado deste

novo padrão, surgem modificações da função cardíaca e do metabolismo celular que à nível celular se retroalimentam. Isto é, se modifica a relação entre a demanda e uso de O₂ por adenosina trifosfato (ATP) produzido. Tal modificação na utilização celular de oxigênio gera por sua vez o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil) (VINCENT et al., 1999; LESNEFSKY et al., 2001; SACK, 2006; BHOPAL & RAFNSSON, 2009). Desta forma, o desequilíbrio provocado pela redução da atividade respiratória da mitocôndria associa-se à presença aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerando a destruição oxidativa de proteínas, lipídios e DNA celulares (SHATTOCK & HADDOCK, 1995).

Também, contrariando tal catabolismo, demonstra-se hoje que as EROs possuem ação caracterizada como segundo mensageiro no processo de sinalização celular, principalmente na regulação da adaptação celular e autofagia (RAY et al., 2012; WANG et al., 2013). Desta forma, a relação do substrato energético disponível e equilíbrio do metabolismo oxidativo possui função vital na fisiologia dos cardiomiócitos. Por exemplo, arritmias e infarto do miocárdio são considerados hoje resultado da incapacidade de manutenção deste equilíbrio (VINCENT et al., 1987; MESSERLI & KETELHUT, 1993).

Estudos recentes com o modelo de hipernutrição na lactação têm demonstrado alterações significativas na bioenergética, hemodinâmica e estado redox dos cardiomiócitos de camundongos quando adultos. Por exemplo, Habbout e colaboradores (2013) demonstraram recentemente que animais hiperalimentados durante a lactação por meio de redução de ninhada, apresentam alterações prematuras na expressão gênica cardíaca causando na idade adulta (7 meses) impactos nas funções cardiovasculares, assim como, no remodelamento cardíaco de camundongos adultos e na sensibilidade a isquemia. Estas funções cardiovasculares de animais hiperalimentados, parecem ser alteradas na condição pós-isquêmica (30min de isquemia e 2h de reperfusão) em virtude de modificações do fluxo coronariano, assim como, dos principais parâmetros hemodinâmicos, como taxa de aumento da pressão sistólica (Max dP/dt), taxa de aumento da pressão diastólica (Min dP/dt), fluxo coronário, frequência cardíaca e pressão do ventrículo esquerdo (VE) (HABBOUT et al., 2013).

Entretanto, até a presente data não estão descritas na literatura as consequências e associações da hiperalimentação na lactação aos 120 dias de vida

na bioenergética mitocondrial e na biologia molecular por meio da via de sinalização da insulina e das proteínas vinculadas ao ácido graxo as quais estão envolvidas diretamente na oxidação dos substratos energéticos nos cardiomiócitos. E ainda a relação destes fatores com a deposição de colágeno e o subtipo específico nas alterações hemodinâmicas em condições basal e pós-isquêmica.

1.4 Bioenergética e disfunção mitocondrial na obesidade

A mitocôndria é uma das organelas celulares mais importantes dos organismos eucariotos. A sua estrutura é caracterizada pela presença de duas membranas fosfolipídicas, uma interna e outra externa, além da região limitada pela membrana interna conhecida como matriz mitocondrial. A membrana externa proporciona uma barreira de permeabilidade as moléculas citosólicas, ao mesmo tempo em que separa o espaço intermembranar do citosol. Por sua vez, este espaço apresenta uma composição iônica similar a do citosol, além de proteínas distintas e importantes para o processo de fosforilação oxidativa, como por exemplo, as proteínas carreadoras de elétrons e o citocromo c (CORTESE et al., 1991). Nas cristas mitocondriais os componentes da cadeia transportadora de elétrons formam os cinco diferentes complexos atuantes na fosforilação oxidativa, enquanto na matriz mitocondrial, as enzimas metabólicas atuantes na produção de ATP, assim como, o DNA mitocondrial (DNAm) e RNA (LESNEFSKY et al., 2001). O DNAm é suscetível à sofrer mutações em consequência de lesões oxidativas, uma vez que, não apresenta mecanismo de reparo eficiente e, ao mesmo tempo, está situado próximo a cadeia respiratória responsável pela produção de EROs na mitocôndria.

A biogênese mitocondrial, aumento da densidade mitocondrial muscular e das atividades enzimáticas, é controlada pelos níveis de Ca^{2+} e óxido nítrico (NO), assim como, pela disponibilidade de oxigênio e energia metabólica (DIAZ & MORAES, 2008). Independente dos diferentes tamanhos e formas, a mitocôndria tem como principal função produzir energia química (bioenergética mitocondrial) na forma de ATP por meio de transferências de elétrons na chamada cadeia transportadora de elétrons.

O processo de transferência de elétrons e fosforilação oxidativa mitocondrial é

realizado por cinco diferentes complexos de várias subunidades polipeptídicas denominados complexo I (NADH-CoQ redutase), complexo II (succinato- CoQ redutase), complexo III (CoQ-citocromo c redutase), complexo IV (citocromo c oxidase) e complexo V (ATP sintase), localizados na membrana interna mitocondrial (MONTEIRO et al., 2003).

Os átomos de hidrogênio acumulados no espaço intermembrana modificam o estado oxidado das moléculas nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) e flavinamida adenina dinucleotídeo (FAD), para o estado reduzido NADH e FADH₂. Assim, na medida em que o NADH é oxidado a NAD⁺ pelo complexo I (NADH-CoQ redutase) da mitocôndria, os prótons são bombeados para o exterior da mitocôndria, formando um potencial elétrico membranar (LESNEFSKY et al., 2001). A transferência de prótons para o espaço intermembrana gera um gradiente elétrico de modo que os prótons voltam para a matriz mitocondrial, passando pelo canal do complexo V (ATP sintase), resultando na síntese de ATP a partir da ligação de adenosina difosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) (WALLACE, 2005).

Neste contexto, se diz que a fosforilação oxidativa possui a função fisiológica primária de produzir alta quantidade de ATP, a partir de adenosina fosfato (ADP) e fosfato inorgânico (Pi) via oxidação dos substratos energéticos carboidrato e ácidos graxos.

Entretanto, ao mesmo tempo em que a mitocôndria é uma organela eficiente para a produção de energia química na forma de ATP, em condições metabólicas desfavoráveis ao funcionamento da cadeia transportadora de elétrons, a razão ATP produzido/calor produzido pode ser alterada. A proporção entre as produções de calor e ATP é utilizada como medidora da eficiência mitocondrial de produção de energia levando a caracterização da mitocôndria em acoplada ou desacoplada. O acoplamento mitocondrial envolve a alta eficiência da cadeia respiratória em bombear prótons, retirando-os do espaço intermembrana e produzindo ATP pela enzima ATP sintase via transporte de prótons. Deste modo a mitocôndria produz o máximo de ATP e o mínimo de calor por caloria de substrato energético. Inversamente, o desacoplamento mitocondrial se faz por uma menor eficiência da cadeia respiratória e/ou maior necessidade de prótons para a produção de ATP necessário, tendo desta forma menor produção de ATP e maior de calor (BHOPAL & RAFNSSON, 2009).

Ao mesmo tempo, o custo metabólico para a geração de ATP pela

mitocôndria via ciclo de Krebs e consumo do gás oxigênio pode variar de modo significativo não sendo interferido pelo tipo de substrato a ser oxidado (TURNER et al., 2014).

A disfunção mitocondrial ocorre, principalmente, por três processos diretamente relacionados, sendo eles o desacoplamento mitocondrial supracitado através de alterações da expressão de proteínas desacopladoras (UCPs), o aumento de espécies reativas de oxigênio via aumento de produtos da peroxidação lipídica e proteica e, alterações das atividades enzimáticas de enzimas chave no processo de produção de energia.

A primeira proteína descoberta da família UCPs, a UCP1, apresenta no tecido adiposo marrom (TAM) a função de dissipar o gradiente de prótons como uma forma de desperdiçar energia, ou seja, produzir calor ao invés de energia na forma de ATP. Desta forma, esta proteína apresenta no TAM ação termogênica (LASKOWSKI & RUSSELL, 2008). As isoformas UCP2, UCP3 e UCP4 parecem estar presentes em diferentes tecidos do corpo, entretanto, a existência da expressão da UCP2 no coração ainda é controversa e, possivelmente, espécie-dependente (SACK, 2006). As mais relacionadas com o funcionamento do miocárdio, UCP2 e UCP3, são proteínas da membrana interna mitocondrial. As proteínas desacopladoras estão diretamente relacionadas à bioenergética e disfunção mitocondrial, uma vez que, são proteínas carreadoras de ânion, e conseqüentemente, reguladoras do potencial de membrana mitocondrial. O potencial de membrana é controlado pelas transferências de prótons originados do ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs), da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana, por meio da NADH e FADH₂ na cadeia transportadora de elétrons (LASKOWSKI & RUSSELL, 2008).

A isquemia tem sido descrita como a principal causa de insuficiência cardíaca, de modo que, a isquemia e subsequente reperfusão, são descritos como processos geradores de um estado patofisiológico cardíaco altamente capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio, e conseqüentemente alterar a oxidação de lipídios e proteínas (BIENENGRAEBER et al., 2003; MATEJÍKOVÁ et al., 2009). Isso se deve ao paralelo do desequilíbrio entre a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da redução da disponibilidade de agentes antioxidantes inerentes do processo isquemia e reperfusão (DHALLA et al., 2000). Entretanto, a capacidade antioxidante nos diferentes órgãos, como coração e fígado, pode estar aumentada ou reduzida em virtude da presença ou ausência de determinadas doenças como a

diabetes e a obesidade.

Assim, alterações na ação dos agentes antioxidantes são capazes de alterar a eficiência respiratória mitocondrial bem como a produção de ATP (MATEJÍKOVÁ et al., 2009). Neste contexto, estudos demonstram que a super expressão das proteínas desacopladoras (UCPs) diminuiria a produção de EROs, assim como, melhoraria a sobrevivência e contractilidade dos cardiomiócitos em condições pós-ischêmicas (HOERTER et al., 2004; BODYAK et al., 2007).

Segundo estudos com humanos e modelos animais, o aumento de espécies reativas de oxigênio encontra-se diretamente relacionado com a deficiência cardíaca, visto que, esse aumento foi observado nos quadros clínicos de insuficiência cardíaca congestiva e hipertrofia de cardiomiócitos (SAM et al., 2005) que por sua vez, apresentavam o aumento da peroxidação lipídica, tido como um marcador de estresse oxidativo (NAKAMURA et al., 2005).

1.5 A obesidade e o remodelamento cardíaco

Uma vez a obesidade tida como uma doença multifatorial com alta capacidade de desenvolver alterações fisiológicas nos tecidos e órgãos periféricos, especificamente no coração esta doença é capaz de gerar uma adaptação do tecido cardíaco por meio do remodelamento cardíaco.

O termo remodelamento se refere ao conjunto de alterações a nível genético, molecular, neural e celular em consequência a uma nova condição biológica. O remodelamento ventricular se associa a alterações genéticas, moleculares e fisiológicas com caráter adaptativo a uma determinada fase como crescimento ou mudança de demanda energética, assim como, a ocorrência de uma determinada injúria e/ou sobrecarga do órgão em questão.

O remodelamento cardíaco, ou seja, a alteração anatômica do coração e mais especificamente do ventrículo esquerdo, está diretamente envolvido com diferentes condições cardiopatológicas tais como sobrecarga de volume e/ou pressão, estresse oxidativo, isquemia, expressão de NOS, aumento dos marcadores de hipertrofia cardíaca (ANP e BNP), necrose/apoptose, fibrose e degeneração do colágeno. O remodelamento cardíaco também deve ser visto como uma adaptação do coração

frente a uma nova demanda energética, como por exemplo, baixo suprimento de substratos energéticos e/ou eventos de isquemia/reperusão. Alterações nos parâmetros hemodinâmicos cardíacos tais como, pressão diastólica final e taxas de aumento para relaxamento e contração cardíaca sugerem a ocorrência de remodelamento cardíaco pós algum evento fisiológico (MENDES et al., 2010).

O colágeno é uma proteína predominante no tecido conjuntivo do miocárdio e possui propriedades biomecânicas instáveis o que a torna capaz de manter as necessidades estruturais e funcionais sendo rígida, resistente a tração e capaz de promover o realongamento do miocárdio contribuindo diretamente nos ciclos de sístole e diástole (COLLIER et al., 2012).

Entretanto, alterações na estrutura do colágeno do miocárdio levam ao desenvolvimento de efeitos deletérios como rigidez do miocárdio e alterações na demanda energética e difusão do gás oxigênio, aumento do risco de arritmia bem como o desacoplamento mecânico das contrações cardíacas levando, conseqüentemente, a alterações nos parâmetros hemodinâmicos. Sendo assim, a deposição de colágeno leva ao desenvolvimento da fibrose cardíaca e conseqüente perda da função contrátil, uma vez que, o rearranjo do tecido cardíaco reduz a capacidade do órgão de exercer a função cardiovascular em virtude das alterações de contratilidade/relaxamento, assim como do aumento do volume sistólico e diastólico em virtude da hipertrofia desenvolvida. Os principais subtipos de colágenos envolvidos nesse processo são os do subtipo 1 e 3 (LÓPEZ et al., 2006; HABBOUT et al., 2012).

Comparando as fibras de colágeno 1 e 3, as de colágeno 3 apresentam uma menor rigidez e elasticidade sugerindo que o aumento deste pode, portanto, expor o tecido cardíaco a maiores níveis de tensão, predispondo assim, a dilatação das cavidades. Deste modo, a alteração na razão entre os dois subtipos de colágeno leva a um remodelamento cardíaco que pode não ser benéfico do ponto de vista funcional quando o subtipo 3 está presente em maior proporção (COLLIER et al., 2012).

O remodelamento cardíaco via degeneração de colágeno é mediado a nível celular pela família das metaloproteinases tais como as metaloproteinases de matriz (MMP2, MMP9 e MMP13) que regulam a degeneração de componentes da matriz extracelular (MEC), como o colágeno, e da formação de fibrose tecidual. A manutenção da MEC pelas MMPs, componente proteico da MEC, é de extrema

importância para a manutenção da característica anatômica dos tecidos, assim como, para a viabilização da adesão célula-célula, forma, proliferação e migração celular (ADAIRKIRK & SENIOR, 2008)

A atividade enzimática das metaloproteinases é regulada por fatores genéticos e epigenéticos, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, interação célula-célula, célula-matriz e inibidores fisiológicos chamados de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) (GEURTS *et al.*, 2011).

Para fins de relacionar doença cardiovascular, remodelamento cardíaco e MMPs, trabalhos sugerem correlacionar MMP/TIMP bem como a atividade enzimática das MMPs uma vez que estas podem vir a causar vasoconstrição da artéria coronária, estimular a agregação plaquetária e contribuir para distúrbios de coagulação. Adicionando a este fato tem-se que as propriedades da matriz de colágeno podem interferir diretamente na rigidez do miocárdio bem como no desenvolvimento de disfunção diastólica e sistólica (POLYAKOVA *et al.*, 2010).

Além disso, o ANP (peptídeo natriurético atrial) e o BNP (peptídeo natriurético do tipo B) são hormônios polipeptídicos sintetizados no coração, especificamente no átrio e ventrículo, respectivamente. Ambos atuam como fatores parácrinos, exercendo efeitos antihipertrófico e antifibróticos no coração, bem como diferentes efeitos periféricos ao se ligar ao receptor guanilil ciclase A (receptor peptídeo natriurético A) presente também nos rins, vasos sanguíneos e na glândula adrenal. Estes hormônios têm sido associados com a síndrome metabólica, dado que podem aumentar a massa de gordura visceral e desenvolver resistência à insulina em humanos (RUBATTU *et al.*, 2008; CABIATI *et al.*, 2013).

Dentre as importantes proteínas reguladoras do metabolismo energético bem como do remodelamento cardíaco se tem a proteína transdutora de sinal e ativadora de transcrição 3 (STAT3) pertencente a família das proteínas STAT formada por seis isoformas. Cada isoforma se expressa em tecidos distintos bem como é regulada por diferentes fatores, como por exemplo o fator de crescimento epidérmico (EGF) e proteínas pró-inflamatórias denominadas interleucinas.

Especificamente a STAT3, é fundamental para a homeostase fisiológica e o remodelamento cardíaco em uma situação de estresse celular uma vez que o desequilíbrio na expressão, no conteúdo e/ou nas modificações pós-tradução da STAT3 podem induzir a cardiomiopatia dilatada e o remodelamento adverso após um infarto do miocárdio. A atividade da STAT3 depende de várias modificações pós-

traducionais como acetilação, fosforilação e dimerização. Esta proteína é regulada por vários sistemas via receptores que regulam este fator de transcrição por feedback positivo e negativo a fim de garantir a ação fisiológica. Nesta regulação por receptores se tem as diferentes funções desempenhadas por essa proteína em distintas vias de sinalização. Suas principais funções são regular a produção de energia pela organela mitocôndria bem como proteger as estruturas mitocondriais, modular a proliferação, diferenciação, sobrevivência, o estresse oxidativo e o metabolismo dos cardiomiócitos, fibroblastos, endotélio, células progenitoras e células inflamatórias. Desta forma, a STAT3 influencia direta e indiretamente no sistema de comunicação intercelular e está relacionada com impactos sobre a comunicação entre os cardiomiócitos, a plasticidade do microambiente cardíaco, a vasculatura, a matriz extracelular, a expressão gênica relacionada a síntese de colágeno, o estresse oxidativo e o processo inflamatório em resposta ao estresse fisiológico e patofisiológico (HAGHIKIA et al, 2014; ZHENG et al.; 2014).

A regulação da atividade desta proteína por fosforilação está descrita na literatura como sendo crítica para o desenvolvimento de um coração diabético e, portanto, resistente a insulina, bem como com cardiomiopatia dilatada. Desta maneira, a via de sinalização da STAT3 tem um papel essencial na proteção cardíaca mais especificamente contra as injúrias pós-isquêmicas. Logo, uma redução na fosforilação da STAT3 pode vir a diminuir a proteção cardíaca na condição pós-isquêmica tornando o coração mais sensível a isquemia (DAS et al., 2015; JIANG et al., 2015).

1.6 Hemodinâmica cardíaca

A função cardíaca depende basicamente da demanda e oferta de substratos energéticos fornecidos aos cardiomiócitos via fluxo coronariano. A utilização preferencial de um determinado substrato está diretamente relacionada a diversos fatores, dentre eles a condição de reserva coronária e metabólica, fatores nutricionais, enzimáticos e humorais como hormônios, íons e agentes vasoconstritores e vasodilatadores (YU, 2011).

A contractilidade cardíaca demanda de uma grande quantidade de energia

proveniente de substratos energéticos como ácidos graxos, glicose, lactato, piruvato, corpos cetônicos e aminoácidos os quais são utilizados em menor e maior quantidade em virtude de possíveis interferências hormonais e ambientais.

A reserva energética quando equilibrada entre oferta e demanda viabiliza uma condição hemodinâmica necessária ao metabolismo energético do organismo. Esta condição pode ser observada por meio de diversos parâmetros como a pressão ventricular esquerda, a frequência cardíaca, a taxa de aumento sistólica e diastólica, e o tempo de relaxamento isovolumétrico.

O funcionamento dos cardiomiócitos se dá por ciclos de contração e relaxamento, ou seja, ciclos de sístole e diástole, respectivamente. Toda via, esse evento é completamente dependente de oxigênio e energia na forma de ATP produzida por meio da fosforilação oxidativa no complexo V presente na mitocôndria, denominado de ATP sintase. Ao mesmo tempo, a síntese de ATP é dependente da integridade das estruturas mitocondriais como a membrana interna, a membrana externa e a matriz mitocondrial. Esta integridade se relaciona com a função cardíaca, uma vez que, para além das funções citadas a mitocôndria orchestra e modula uma diversidade de processos diretamente influenciáveis nos ciclos de sístole e diástole (HALESTRAP et al., 2004).

A homeostase da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, a regulação nuclear e do metabolismo de cálcio, da morte celular programada (apoptose) e das vias de sinalização de transdução são papéis também desempenhados pela mitocôndria que, em conjunto, proporcionam a viabilidade da contração cardíaca. Entretanto, um ou mais desequilíbrios podem ocorrer de modo suficiente a causar disfunções cardíacas, as quais muitas vezes, estão relacionadas com disfunções sistólicas, e conseqüente desenvolvimento de doenças cardíacas, como por exemplo, doença arterial coronariana, cardiomiopatia hipertrófica, hipertensão e cardiomiopatia congestiva (ISHIDA et al., 1986). Além disso, o fenômeno de isquemia (pré-condicionamento) e reperfusão (pós-condicionamento) é amplamente relacionado com o desenvolvimento de disfunção cardíaca e danos estruturais mitocondriais, uma vez que, o processo de isquemia aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio como ânions superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxil (AMBROSIO et al., 1991; WATANABE et al., 2010). Deste modo, no processo de reperfusão é natural a observação da geração de danos ao tecido cardíaco no qual ocorre um aumento excessivo de EROs.

Em 1976, Weiss e colaboradores, introduziu o conceito da constante de tempo de relaxamento isovolumétrico (Tau) assumindo, ao mesmo tempo, como um parâmetro hemodinâmico indicador do estado funcional cardíaco. Além do Tau, a frequência cardíaca avaliada por meio de batimentos por minuto (BPM), a taxa de aumento sistólico e diastólico do miocárdio são outros parâmetros utilizados em fins investigativos de funcionamento cardíaco.

Todavia, estudos clínicos e experimentais, relacionados à função cardíaca não apresentam explicações e interpretações restritas apenas a parâmetros hemodinâmicos, visto que, estes sofrem influências diretas do conteúdo, expressão e/ou atividade de moléculas chave tais como enzimas, proteínas e aldeídos. Estudos da literatura relatam que proteínas, tais como, a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), proteína quinase B (AKT) nas isoformas 1e 2, UCP 2 e UCP3 carnitina palmitoil transferase (CPT1) e SIRT1 estão diretamente relacionadas a função cardíaca e produção de energia via substratos energéticos como carboidratos e ácidos graxos (LASKOWSKI & RUSSEL, 2008; YOUNG, 2008; YU et al., 2011).

As funções da enzima SIRT 1, sob condições fisiológicas também se estendem ao silenciamento de genes, reparo do DNA e a regulação do metabolismo em condições de baixo fornecimento calórico. Além disso, SIRT 1 previne a apoptose, regula a transcrição e aumenta a tolerância ao estresse oxidativo em cardiomiócitos. Estudos experimentais em camundongos com super expressão desta enzima demonstrou que a hipertrofia cardíaca, fibrose, apoptose e disfunção ventricular foram suprimidos (ADAM et al., 2013).

Ao mesmo tempo, a expressão de proteínas envolvidas no metabolismo energético cardíaco pode ser influenciada por alterações nutricionais no início da vida, uma vez que, estas são capazes de modificar os padrões de metilação do DNA de células específicas, e assim, ocasionar alterações nos níveis de expressão gênica em tecidos específicos (PATEL & SRINIVASAN, 2002).

Especula-se que o estresse celular causado pela condição isquemia/reperfusão a qual origina uma grande liberação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, em conjunto com as alterações metabólicas induzidas pela hiperalimentação pós-natal, torna o miocárdio mais suscetível a injúrias nos cardiomiócitos, e conseqüentemente, na função cardíaca (VERGELY et al., 1998; VERGELY et al., 2001; HABBOUT et al., 2012).

Estudo recente da literatura demonstrou que em corações isolados de

camundongos ou ratos hiperalimentados na lactação, os parâmetros cardíacos basais encontram-se semelhantes àqueles dos animais controle. Mas, no entanto, após 30 minutos de isquemia seguida de reperfusão, a recuperação do rendimento cardíaco estava diminuída, e a quantidade total de lactato desidrogenase, um marcador de lesão celular liberado no efluente coronário durante o período de reperfusão, foi encontrada significativamente elevada nos cardiomiócitos dos animais hiperalimentados (HABBOUT et al., 2012).

1.7 Metabolismo energético cardíaco

1.7.1 Metabolismo energético cardíaco – Carboidrato

A resistência à insulina e a síndrome metabólica são condições associadas com o aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Tal associação decorre, entre outros fatores, de características peculiares do tecido muscular. Especificamente o coração, é um órgão que apresenta a capacidade de aumentar a oxidação em quantidade e tipo de substrato a ser utilizado como fonte de energia frente a demanda do metabolismo seja basal ou em alta demanda (TURNER et al., 2014).

O funcionamento e resposta dos cardiomiócitos às condições fisiológicas aeróbica e anaeróbica, como por exemplo, a transição da isquemia para a reperfusão, envolvem proteínas responsivas as modificações fisiológicas celulares. A exemplo desses tipos de proteína se tem a AMPK, AKT, PTP1B, IR beta e IRS1 que estão envolvidas diretamente na via de sinalização do hormônio insulina, ou seja, no metabolismo do carboidrato.

De maneira geral, as células apresentam mecanismos de proteção contra mudanças ambientais com a finalidade de manter a homeostase celular. Especificamente no coração, o estresse celular a partir do processo de isquemia gera a redução do fornecimento de energia (ATP). Deste modo, a AMPK é uma das principais proteínas recrutadas para controlar a demanda energética à sobrevivência dos cardiomiócitos (YOUNG, 2008). A AMPK é formada por um complexo de 3

subunidades, α , β e γ , sendo a isoforma $\alpha 2$ a mais abundante nos cardiomiócitos e sensível as mudanças da concentração intracelular de AMP (KUDO et al., 1995).

A AMPK, sendo uma proteína quinase, apresenta a particularidade de transferir grupamentos fosfato para aminoácidos formadores de diferentes proteínas-alvo. Este processo, conhecido como fosforilação, induz mudanças conformacionais de outras enzimas, de canais iônicos, proteínas estruturais e reguladoras, sendo assim, capaz de alterar as funções das mesmas (YOUNG, 2008). Por exemplo, a enzima acetil-CoA carboxilase é regulada pela atividade quinase da AMPK, uma vez que, fosforilada inibe a síntese da molécula malonil-CoA que, por sua vez, tem a função de inibir a oxidação de ácidos graxos no coração (KUDO et al., 1995). Portanto pode se dizer que a AMPK é uma proteína indiretamente reguladora da síntese de ácido graxo.

Ao mesmo tempo, a AMPK atua como um sensor de estresse celular, ativada principalmente, por um aumento intracelular de adenosina monofosfato (AMP). Este aumento ocorre quando moléculas de adenosina difosfato (ADP) não são convertidas apenas em ATP, mas também em AMP e, portanto, sinalizando ineficiência na produção e utilização de energia na forma de ATP a partir dos substratos energéticos. Entretanto, a molécula AMP é capaz de ativar a glicogênio fosforilase que por sua vez possibilita ao tecido cardíaco a obtenção de glicose a partir da quebra de moléculas de glicogênio (SALT et al., 1998; YOUNG, 2008).

Diante das funções da AMPK, trabalhos da literatura relacionados à isquemia e reperfusão cardíaca a descrevem como uma proteína central na geração de energia em ambas as situações, aeróbica (linha de base e reperfusão) e anaeróbia (isquemia), uma vez que, proporciona o recrutamento do transportador de glicose (GLUT4) para a superfície das células cardíacas, e conseqüentemente, a entrada de glicose para o interior das células fornecendo energia via carboidrato (YOUNG et al., 1997). Durante a isquemia cardíaca, o metabolismo energético é alterado de maneira drástica em virtude da redução parcial ou total do fornecimento de oxigênio. No entanto, a isquemia aumenta o metabolismo da glicose através da via glicolítica que gera ATP ainda que na ausência de oxigênio uma vez que a AMPK está diretamente relacionada com a via de sinalização da insulina e é tido como um sensor do balanço ADP/ATP, ou seja, da utilização de energia independente do estado metabólico.

Ao contrário, na situação de reperfusão, a AMPK ativada promove a β -

oxidação de ácidos graxos gerando energia ao coração pós-isquêmico e cardioproteção limitando a ocorrência de morte celular programada (apoptose). Entretanto, a oxidação de ácidos graxos em excesso na reperfusão interfere de maneira negativa na oxidação de carboidrato, visto que, um aumento da produção de lactato é ocasionado, e conseqüente alteração do pH e da concentração de cálcio intracelular. Deste modo, uma acentuada expressão da AMPK em corações reperfundidos pode ser prejudicial aos mesmos (YOUNG, 2008). O consumo de oxigênio cardíaco se faz necessário para obtenção de energia a partir da oxidação de ácidos graxos e carboidrato, sendo a β oxidação de ácidos graxos, via CPT1, a que apresenta maior demanda de oxigênio apesar de ser a menos eficiente para fins de produção de ATP.

O metabolismo cardíaco obtém a energia necessária à manutenção dos batimentos cardíacos a partir da fosforilação oxidativa a qual através do complexo V (ATP sintase) sintetiza ATP. Entretanto, em um quadro de isquemia cardíaca, o metabolismo oxidativo de substratos diminui na medida em que o fornecimento de oxigênio é reduzido. No entanto, a produção de ATP via glicólise aumenta e via β oxidação de ácidos graxos diminui durante a isquemia como uma solução eficiente para a melhora da função cardíaca e diminuição das injúrias causadas pelo processo de isquemia/reperfusão (MAARMAN et al., 2012).

A geração de ATP no tecido cardíaco em situação pós-isquêmica é capaz de causar danos estruturais nas mitocôndrias, além do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, e abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial (MPTP) a qual altera o potencial de membrana desta organela. Além da AMPK, o complexo enzimático fosfatidilinositol 3 quinase - proteína quinase B (PI3K-AKT) ativado pelo hormônio insulina, apresenta função protetora via redução da abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial (YU et al., 2011; RAY et al., 2012).

Outra proteína envolvida no metabolismo da glicose é a PGC1 α , um co-ativador transcricional do PPAR α e γ que também que tem como principal função promover a biogênese mitocondrial, termogênese adaptativa e regular o metabolismo oxidativo. Também induz a expressão de enzimas antioxidantes com a finalidade de melhorar a oxidação dos substratos (RUPÉREZ et al., 2014).

A AKT, uma serina/treonina proteína quinase é dependente da treonina para ativação e serina para ativação máxima. A PI3K também se faz necessária para ativação da proteína em questão de modo que a relação AKT-PI3K é responsável

para além do metabolismo da glicose, também pela mediação de diversos mecanismos celulares como crescimento, proliferação e mecanismos de sobrevivência (TANIYAMA, 2005). Para além da expressiva ação anti-apoptótica da STAT3 nos cardiomiócitos quando fosforilada, paralelamente ela também está diretamente envolvida na regulação da via de sinalização da insulina mais especificamente na relação AKT-PI3K (JIANG et al., 2015).

Esta proteína pode ser expressa a partir de 3 diferentes tipos de genes apresentando cada um funções e expressões distintas em vários tecidos sendo AKT1/PKB α , AKT2/PKB β e AKT3/PKB γ os genes. A AKT1 regula o crescimento e apoptose celular, a AKT2 o metabolismo da glicose e AKT3 crescimento celular em tamanho. Animais deficientes para os genes AKT1 e AKT2 apresentaram letalidade perinatal assim como problemas no crescimento e defeitos múltiplos de desenvolvimento pós-natal.

Especificamente no coração, a AKT1 promove crescimento cardíaco, regula a função contrátil e angiogênese coronária, melhora das condições metabólicas pós injúria dos miocárdios e do metabolismo da glicose. A super expressão desta isoforma pode levar ao desenvolvimento da hipertrofia, e ao mesmo tempo proteger o músculo cardíaco contra injúrias de uma situação pós-isquêmica.

Estudos da literatura envolvendo expressão da proteína AKT em animais selvagem e transgênico demonstram que ela está diretamente envolvida em ambas situações, normais (crescimento cardíaco, produção de óxido nítrico endotelial) e anormais (transmigração de leucócitos e ativação de plaquetas) do crescimento e desenvolvimento cardíaco de modo a garantir a sobrevivência dos cardiomiócitos (I. Hers, 2011). Ao mesmo tempo, Taniyama et al (2005) sugere que as funções das isoformas 1 e 3 são similares apesar da alta expressão da AKT1 e baixa da AKT3 no coração de camundongos selvagens. A isoforma AKT3 se difere das demais isoformas uma vez que ela se encontra expressa de maneira restrita no cérebro e nos testículos, e no coração, apenas em animais transgênicos.

Assim sendo, o coração é um órgão amplamente sensível a substratos energéticos e a ações hormonais. A insulina, por exemplo, é um hormônio com importante papel na função cardíaca e na cardioproteção, uma vez que, um desequilíbrio na cascata de sinalização celular e na captação de glicose via AKT e GLUT4 pode causar o desenvolvimento de insuficiência cardíaca em algumas condições patológicas como hipertensão e isquemia. Assim, em um quadro de

resistência à insulina, o tecido cardíaco apresenta redução da flexibilidade metabólica do miocárdio apesar de utilizar a glicose como substrato energético preferencial para rápida conversão em ATP (MARTINS et al., 2008; YU et al., 2011).

1.7.2 Metabolismo energético cardíaco – ácido graxo

Resistência a insulina, doença cardiovascular, hipertensão e dislipidemia estão diretamente relacionadas com a obesidade e síndrome metabólica. A obesidade é uma doença altamente capaz de desenvolver um quadro inflamatório no qual o tecido adiposo se torna capaz de secretar hormônios, citocinas e lipídios que apresentam diferentes efeitos e interferências metabólicas. A desregulação do metabolismo lipídico é um exemplo de grande importância e interferência no desenvolvimento de resistência a insulina assim como de outros hormônios como leptina e grelina (MAKOWSKI, 2004).

Diferentes trabalhos na literatura têm demonstrado o importante papel dos ácidos graxos nas cascatas de sinalização nos diferentes tipos celulares como mediadores de respostas metabólicas e inflamatórias. Assim sendo, o estudo das vias de sinalização relacionadas com o metabolismo e a inflamação mediadas pelos lipídios em diferentes tecidos periféricos se faz necessário em condições normais, e talvez ainda mais em condições fisiopatológicas como em um quadro de síndrome metabólica.

Pouco ainda está descrito sobre a relação dos ácidos graxos e proteínas ligantes e transportadoras na via de sinalização relacionada ao metabolismo energético cardíaco de animais programados a nível metabólico. A importância das proteínas envolvidas no processo de translocação e transporte de ácido graxo está bem descrita na literatura, entretanto a modulação intracelular destas proteínas tais como a FABP, ACBP e CD36 pouco está descrito.

A FABP, proteína ligante de ácido graxo é apresentada na literatura como uma proteína de extrema importância na intercomunicação das vias de sinalização do carboidrato via AKT e do ácido graxo via translocador CD36. Para além desta função, a FABP preserva a integridade celular na medida em que possui a capacidade de proteger a célula contra possíveis ações detergentes externas e

viabiliza o transporte de ácidos graxos e mediadores lipídicos para dentro da célula (MAKOWSKI, 2004). Assim sendo, a FABP apresenta papel fundamental no metabolismo energético e no processo inflamatório de maneira geral realizando uma intercomunicação celular.

Diferentes isoformas já foram descritas e estão relacionadas com o tecido onde são expressas sendo elas FABP 1 (fígado), FABP 2 (intestino), FABP 3 (coração), FABP 4 (macrófago/adipócitos) e FABP 5 (epiderme). Estudos relacionados a essa proteína têm relacionado com o desenvolvimento da síndrome metabólica uma vez que a deficiência e/ou ausência leva ao mal funcionamento das vias de sinalização com lipídios como mediadores.

Uma vez que a proteína FABP está diretamente relacionada com o metabolismo energético e a regulação do processo inflamatório, estudos têm relacionado o novo padrão de vida, ou seja, aumento da ingestão de calorias em excesso, redução do gasto de energia (sedentarismo) e o estilo de vida moderno com alto nível de estresse, com a incapacidade das FABPs de manter a homeostase metabólica e inflamatória.

Os ácidos graxos podem ser encaminhados para o interior das células por diferentes tipos de mediadores como as partículas lipoproteicas (LPL), proteínas de membrana (PLA2), assim como via transportador de membrana de ácido graxo como a CD36. Estudo recente demonstrou que o conteúdo da proteína transportadora de ácido graxo (CD36) promove um crosstalk com o metabolismo dos ácidos graxos via FABP, e ao mesmo tempo com o metabolismo do carboidrato via AMPK. Em condições de transição de disponibilidade de oxigênio (aeróbia - anaeróbia), como por exemplo, isquemia/reperfusão, este translocador encontra-se aumentado para compensar a disponibilidade de substrato energético, neste caso ácido graxo. Durante a isquemia a AMPK é ativada que por sua vez ativa a entrada de ácidos graxos via translocação de CD36 (MAKOWSKI & HOTAMISLIGIL, 2004).

1.8 Metabolismo e estresse oxidativo

A cardioproteção ocorre através da ação de vários agentes moleculares que regulam os processos de morte celular programada e o estresse oxidativo cujas

ações são ajustadas por prótons, íons, proteínas e substratos energéticos (VERNARDOS et al.,2007).

O estresse oxidativo é uma condição biológica na qual a produção demasiada de espécies reativas de oxigênio não é interrompida e regulada de modo a não causar danos celulares a nível metabólico e estrutural. Essa produção é regulada por enzimas antioxidantes, como por exemplo, a superóxido desmutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX) e catalase, bem como pelos processos de oxidação lipídica e proteica que podem vir a comprometer a utilização do substrato energético na produção de energia na forma de ATP pela mitocôndria, e danificar as estruturas celulares em consequência da degradação de proteínas.

Para os organismos aeróbios, o oxigênio e mais especificamente o gás oxigênio (O_2) é uma molécula chave para a produção de energia pela mitocôndria onde os substratos energéticos são oxidados. Entretanto, no processo chamado de fosforilação oxidativa o oxigênio pode se envolver em diferentes rotas metabólicas gerando consequências celulares favoráveis ou lesivas. A maior parte do oxigênio é reduzida a água pela enzima citocromo oxidase mitocondrial o que seria considerada uma rota favorável. Entretanto, a outra parte é transformada em superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila ($OH\cdot$) ou oxigênio atômico ($1O_2$) considerados como os principais radicais livres que atuam como sinalizadores celulares e agentes oxidantes nocivos para as células quando não regulados de maneira efetiva pelas enzimas antioxidantes (GIORGIO et al., 2007; VERNARDOS et al.,2007). A ação dos radicais livres como sinalizadores celulares envolve a regulação de microrganismos envolvidos nos processos de infecção, assim como para a manutenção das funções celulares basal abrangendo a proliferação, diferenciação e sinalização (GOUGH & COTTER et al., 2011).

As enzimas antioxidantes têm a função de regular a produção e ação desses agentes oxidantes para que não ocorra dano celular nos órgãos e tecidos a nível molecular, energético e/ou estrutural. Essa regulação se faz necessária uma vez que as EROs são capazes de degradar lipídios, proteínas e ácidos nucleicos por meio da oxidação. Diversos fatores podem influenciar na ativação do estresse oxidativo por meio da perda da capacidade de regulação dos danos ou redução da mesma, como por exemplo, tabagismo, poluição, fator genético, idade, radiação com exposição excessiva aos raios UV, químicos alimentares, exercícios intensos ou falta de atividade física, doenças inflamatórias, alimentação pobre em antioxidantes e

obesidade (TURRENS, 2013).

Dentre as consequências físicas que a má regulação da ação das EROs pode causar tem-se aterosclerose, hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes, doença pulmonar e mental. Essas consequências estão atreladas ao fato da obesidade conjugada com a diabetes, apresentar um acúmulo de gordura visceral que por sua vez aumenta a secreção de adipocitocinas bem como com o aumento de ácidos graxos e carboidratos no plasma e em órgãos de grande importância metabólica como o coração e o fígado. Este acúmulo de substratos leva ao aumento da produção das EROs e do estresse no retículo endoplasmático em virtude da sobrecarga da cadeia transportadora de elétrons o que por sua vez leva ao aumento mais especificamente do peróxido de hidrogênio capaz de gerar resistência a insulina além de danificar as cristas mitocondriais comprometendo o metabolismo energético (RODRIGUES et al., 2011; RUPÉREZ et al., 2014).

Segundo a literatura, o sobrepeso e a obesidade em humanos e em estudos experimentais levam ao acúmulo de gordura visceral comprometendo a regulação do estresse oxidativo hepático, cardíaco e plasmático uma vez que no fígado se observa esteatose hepática, no coração o aumento da gordura epicárdica e, no plasma aumento de triglicerídeos e colesterol desde o período pós-lactação até a idade adulta (MARCHINGTON et al., 1989, HABBOUT et al., 2013; CONCEIÇÃO et al., 2013a; IACOBELLIS, 2015).

O estresse oxidativo nos tecidos, órgãos e no plasma é observado por meio da dosagem de proteína carbonilada e do acúmulo de malondialdeídos, produto final da peroxidação lipídica, e posteriormente, pela análise das enzimas antioxidantes SOD, GPX e catalase.

A medição do teor de proteína carbonilada é utilizada como um indicador geral para oxidação de proteínas no intuito de analisar para cada caso, ou seja, tecido, órgão e plasma o aumento ou redução da degradação de proteína. Os organismos estão constantemente realizando a degradação de proteína e lipídio com objetivo de manter a homeostase fisiológica, como por exemplo obter aminoácidos por meio da quebra de proteínas e/ou obter energia via degradação de lipídio. Entretanto, segundo estudos da literatura, o aumento da frequência de degradação de lipídio e proteína caracteriza a ocorrência de estresse oxidativo no material estudado. Com isso, a análise de estresse oxidativo se faz necessária para compor o entendimento do desenvolvimento de determinadas patofisiologias.

Na análise do nível de degradação lipídica se tem como objetivo quantificar o produto final da peroxidação, os malondialdeídos (MDA). Estes reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA) resultando na formação do complexo colorido TBA-MDA que é medido espectrofotometricamente. Assim, a quantificação da formação desse complexo é utilizada como um indicador do nível de comprometimento lipídico.

O excesso de peroxidação lipídica e proteica leva a danos estruturais na medida em que os ácidos graxos que compõem a bicamada fosfolipídica das membranas celulares são desestruturados levando a ruptura total ou parcial da membrana celular. Com isso, a célula se torna mais exposta a ocorrência de mutações no DNA, formação de resíduos químicos e degradação da matriz mitocondrial imprescindível para o funcionamento da organela na produção de ATP, fatores esses que aumentam o comprometimento estrutural e metabólico do tecido e órgão (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004; RUPÉREZ et al., 2014).

Especificamente no coração, o processo de isquemia e reperfusão aumenta significativamente a produção de EROs, que por sua vez, podem causar danos celulares e degradação de organelas membranosas em diferentes níveis visto que as consequências são dependentes da capacidade de ação das enzimas antioxidantes. A reperfusão, embora necessária para reverter o quadro isquêmico através do fornecimento dos substratos e gases necessários, vem a acarretar lesões além daquelas já ocasionadas pela isquemia. Isso se deve as alterações na permeabilidade da membrana celular e mitocondrial e aumento da susceptibilidade a ocorrência de apoptose em virtude da peroxidação lipídica. Como consequência dessa maior sensibilidade do tecido, a estrutura sofre um rearranjo que pode vir a influenciar na função contrátil dos cardiomiócitos. Em condições basais e pós-isquêmicas os cardiomiócitos de um organismo saudável são capazes de manter as funções cardíacas normais, entretanto em organismos que apresentam algum tipo de doença prévia seja em humanos ou em animais experimentais, como por exemplo, a obesidade, esta capacidade é perdida principalmente em uma situação pós-isquêmica, ou seja, o coração se torna mais sensível a isquemia (WATANABE et al., 2010; HABBOUT et al., 2013).

Em resumo, pode-se sugerir que a relação entre a obesidade e o aumento do estresse oxidativo, resulta da hiperglicemia, aumento de ácidos graxos circulantes, diminuição das defesas antioxidantes e desenvolvimento de inflamação crônica (RUPÉREZ et al., 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar em camundongos machos Swiss adultos aos 120 dias de vida os efeitos e associações da hiperalimentação na lactação na função cardíaca em condições basal e pós isquêmica.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Confirmar as alterações no perfil biométrico e bioquímico dos grupos controle (GC) e hiperalimentado (GH) analisando os seguintes parâmetros

- a) Peso corporal;
- b) Peso do coração (ventrículo esquerdo)
- c) Peso total da gordura visceral e retroperitoneal;
- d) Glicemia de jejum
- e) Nível plasmático de insulina e leptina plasmática

2.2.2 Investigar a função cardíaca de ambos os grupos na linha de base (LB) e isquemia/reperfusão (IR) analisando os parâmetros

- a) - EDP (pressão diastólica final)
- b) Max dP/dT (taxa de aumento máximo da pressão sistólica)
- c) Min dP/dT (taxa de aumento máximo da pressão diastólica)
- d) Tau (Tempo de relaxamento cardíaco isovolumétrico)
- e) BPM (Frequência cardíaca em batimentos por minuto)

2.2.3 Investigar a biologia molecular relacionada à bioenergética cardíaca na linha de base (LB) e de isquemia/reperfusão (IR) analisando o

- a) Conteúdo e/ou fosforilação das proteínas AKT1, AKT2, AKT3, pAKT, IRS1, PTP1B, PI3K, AMPK α , pAMPK, PGC1 α , SIRT1, FABP, CD36, colágeno 1 e 3, STAT3 alfa e beta, pSTAT3 alfa e beta.
- b) Expressão gênica das proteínas ANP, BNP, CPT1 e UCP3 por PCR em tempo real.

2.2.4 Investigar o acoplamento mitocondrial através da razão do controle respiratório (RCR) determinada pela relação estado3/estado4 e da oxidação em ambos os grupos na linha de base (LB) e isquemia/reperfusão (IR) para os substratos

- a) Ácidos graxos
- b) Carboidratos

2.2.5 Investigar os processos antioxidantes cardíacos (em ambos os grupos na linha de base e isquemia/reperfusão), hepáticos e plasmáticos analisando a

- a) Carbonilação de proteínas
- b) Peroxidação lipídica

2.2.6 Investigar a produção de adenosina trifosfato (ATP) em ambos os grupos na linha de base e isquemia/reperfusão

3 MATERIAIS E MÉTODOS

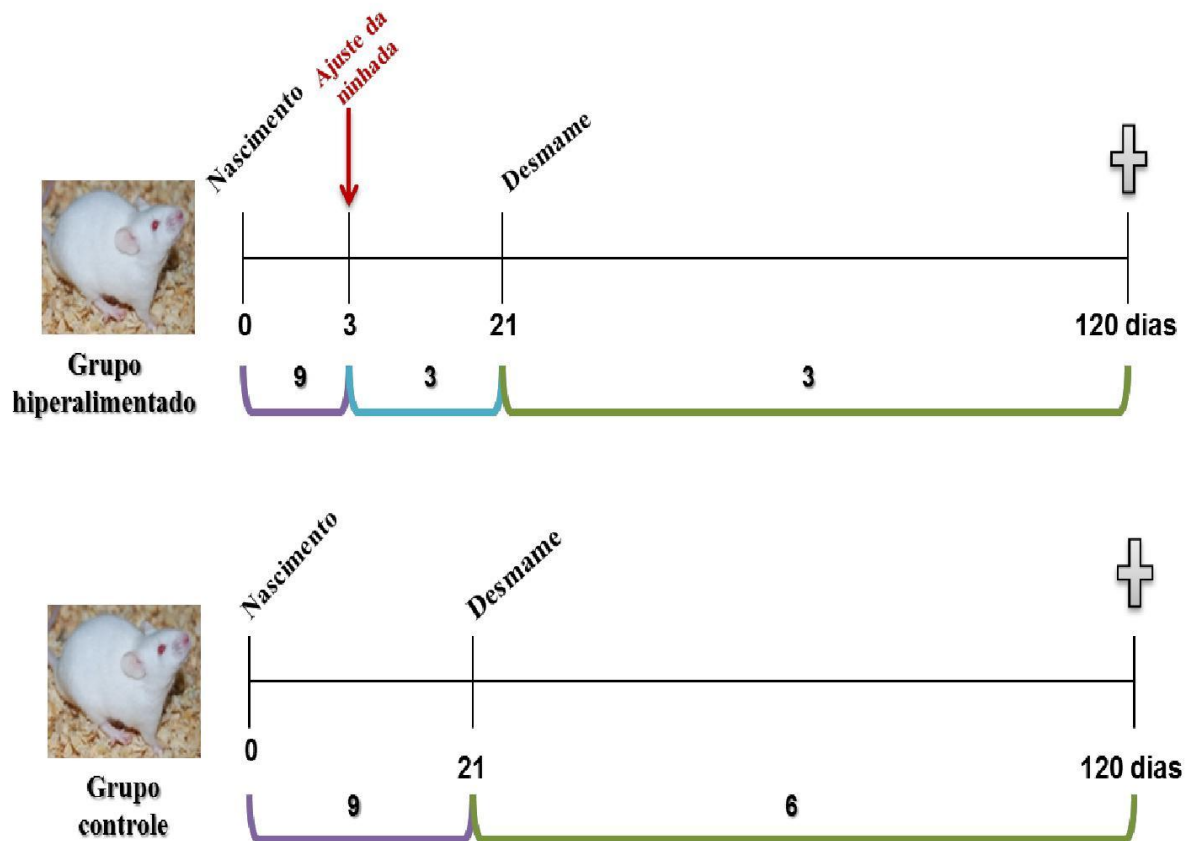
3.1 Animais e modelo experimental

Utilizamos modelo de redução de ninhada (PLAGEMANN et al., 1992) já implementado em nosso laboratório, para a produção de animais obesos. Camundongos 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 12h de escuro (07:00 às 19:00h) e ciclo de exaustão de ar em caixas de polipropileno recebendo dieta padrão Nuvilab®, além de água *ad libitum* (CEUA/055/2011). Após o acasalamento, as fêmeas prenhas foram separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais durante todo o período de gestação. Após o nascimento dos filhotes, as ninhadas foram ajustadas para 9 filhotes por lactante e divididos em dois grupos (figura 1):

Grupo controle (GC) - Ninhadas com 9 filhotes amamentadas até o 21º dia (fim da lactação/desmame) de vida por lactantes alimentadas com ração comercial normal. No 21º dia um ajuste de ninhada é feito para 6 animais machos por caixa.

Grupo hiperalimentado (GH) - Ninhadas com 9 filhotes amamentadas até o 3º dia de vida por lactantes alimentadas com ração comercial normal. No 3º dia de vida a ninhada é reduzida para apenas 3 animais machos por caixa os quais permanecem em período de lactação até o 21º dia (fim da lactação/desmame) de vida como os animais do grupo controle.

Figura 1 - Esquema do modelo experimental dos grupos controle e hiperalimentado



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

Após o nascimento, a partir do terceiro dia de vida, os camundongos Swiss machos pertencentes aos grupos controle e hiperalimentado foram pesados até o dia da eutanásia (120 dias). As pesagens foram conduzidas da seguinte maneira: os animais foram pesados no 3º dia de vida (dia 3), no 10º dia de vida (dia 10) e no 21º dia de vida (dia 21). Após o final da lactação (21º dia de vida) os animais foram pesados no 30º dia de vida (dia 30) e a partir daí a cada 30 dias até os 120 dias de vida.

3.3 Eutanásia

Aos 120 dias de vida, os filhotes machos de ambos os grupos foram sacrificados após jejum de 12 horas.

Os animais foram anestesiados com pentobarbital sódico (Hypnol 3%) na concentração 50 mg/Kg via intraperitoneal e heparinizados 15 minutos antes (heparina 5000UI/Kg de peso corporal) para impedir a coagulação do sangue. Posteriormente, o coração foi retirado (com batimentos cardíacos), colocado na solução de Krebs-Henseleit em placa de petri para iniciar a canulação da aorta conforme método Langendorff. Após a remoção do tecido cardíaco, foram coletadas, e posteriormente pesadas em balança eletrônica de precisão, as gorduras retroperitoneal, epididimal e epicárdica.

3.4 Crescimento naso-anal

Os animais dos grupos controle e hiperalimentado, aos 120 dias de vida, tiveram seus comprimentos naso-anal verificados através da utilização do paquímetro.

3.5 Análise hormonal e da glicemia de jejum

A glicemia de jejum após 12 horas de jejum dos animais controle e hiperalimentados foi medida através da utilização de glicosímetro e fitas teste (Accu-Chek active) e os valores expressos em mg/dl.

Os níveis plasmáticos dos hormônios insulina (Millipore, ELISA Kit, insulina de rato/camundongo) e leptina (Millipore, ELISA Kit, insulina de rato/camundongo) foram analisados por meio do método ELISA utilizando as recomendações do kit comercial. O limite de detecção foi de 0.1ng/ml (17.5 pM) para 10µL por amostra e a leitura foi realizada espectrofotometricamente a 450nm corrigida pela leitura a

590nm.

3.6 Função cardíaca – Langendorff

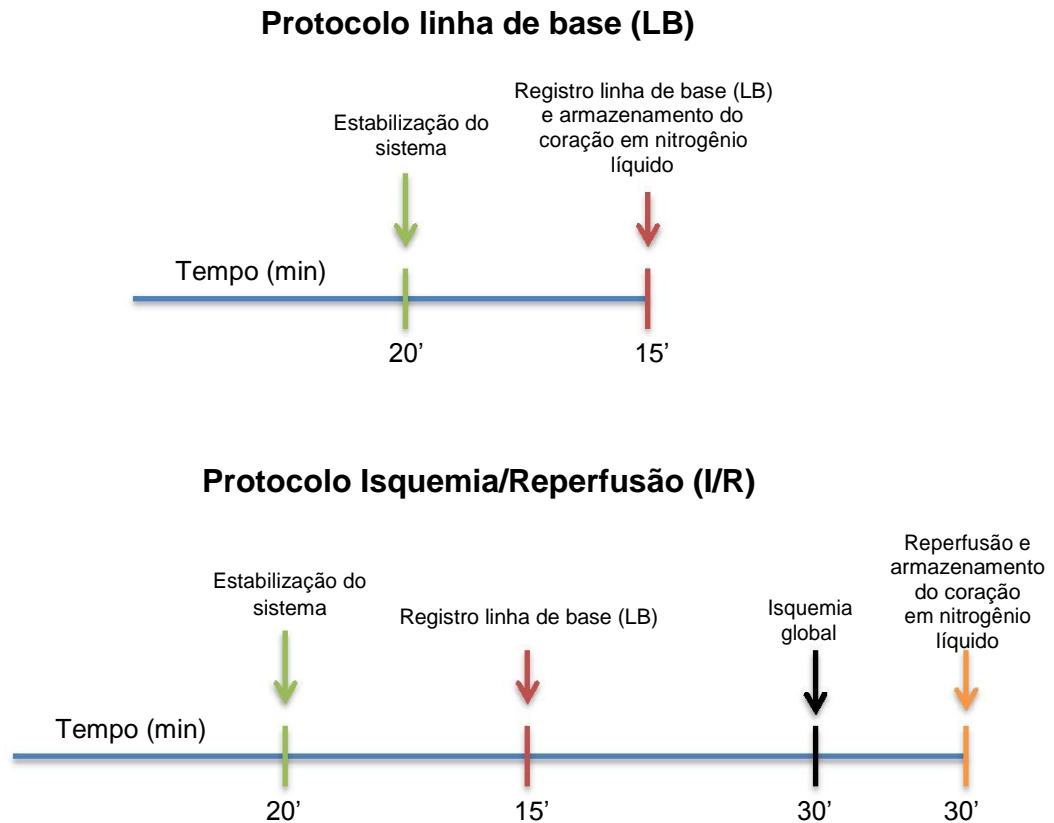
O coração dos camundongos Swiss machos com 120 dias de vida, dos grupos controle e hiperalimentado, foi rapidamente extraído da cavidade torácica e colocado em placa de petri contendo solução Krebs-Henseleit em temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a canulação da aorta torácica ascendente pela porção superior com duração aproximada de 2 minutos, e então, colocado no sistema Langendorff de perfusão retrógrada.

Cada coração foi posteriormente perfundido com solução de Krebs-Henseleit a 3ml/min (110.0 NaCl, 4.6 KCl, 1.2 MgSO₄*7H₂O, 2.5 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 2.0 piruvato e 10 glicose em mmol/L), contendo mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) e mantida à temperatura constante de 37,5°C (BROADLEY,1979). Ambos os grupos, controle e hiperalimentado, foram divididos em dois grupos sendo eles linha de base e isquemia/reperfusão. Assim, o estudo trabalhou com 4 grupos: grupo controle linha de base (GCLB), grupo controle isquemia/reperfusão (GCIR), grupo hiperalimentado linha de base (GHLB) e grupo hiperalimentado isquemia/reperfusão (GHIR). Os registros dos parâmetros hemodinâmicos tiveram duração de 15 minutos de linha base e/ou 15 minutos de linha de base, 30 minutos de isquemia global e 30 minutos de reperfusão (Figura 2).

Para a realização dos registros, um pequeno balão produzido por uma cânula plástica e filme de PVC, era conectado a uma estrutura diretamente ligada a um detector de pressão e amplificador de sinal. O sinal era transmitido para um equipamento Labchart Bioamplified (ADInstruments®) que através do software Labchart 7.1 transformava os sinais dos batimentos cardíacos em números e gráficos. A partir do gráfico, o mesmo programa era capaz de obter os parâmetros hemodinâmicos de todos os ciclos observados.

Dentre os parâmetros hemodinâmicos oferecidos pelo programa Labchart 7.1 os principais foram analisados sendo eles a pressão diastólica final (EDP), taxa de aumento máximo da pressão sistólica (Max dP/dt), taxa de aumento máximo da pressão diastólica (Min dP/dt), constante de tempo de relaxamento isovolumétrico (Tau) e frequência cardíaca em batimentos por minuto (BPM).

Figura 2 - Esquema do protocolo de perfusão cardíaca em linha de base (LB) e isquemia/reperfusão (I/R)



Fonte: A autora, 2015.

Ao final dos registros, parte do coração (5-7 mg de peso úmido) especificamente do ventrículo esquerdo, foi retirada para isolamento da fibra cardíaca e posterior análise de respirometria mitocondrial; a outra parte dividida para congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento em freezer -80°C para análises em Western Blotting e por reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR), e para armazenamento em formol tamponado visando a análise histológica.

3.7 Respirometria cardíaca – Oroboros 2k

3.7.1 Obtenção de fibras cardíacas permeabilizadas

O coração, após ser retirado do sistema Langendorff e antes de ser congelado em nitrogênio líquido, teve o ventrículo esquerdo obtido após os registros

de linha de base ou reperfusão e colocado em solução de relaxamento e preservação, BIOPS gelada. A porção do ventrículo esquerdo obtida foi fatiada (2–4 mm de comprimento, 1–1.5 mm de diâmetro, 5–7 mg de peso úmido, aproximadamente) seguindo a orientação da fibra para evitar danos mecânicos às células. Usando pinças microcirúrgicas, as fibras musculares foram parcialmente separadas umas das outras, deixando pequenas áreas de contato. O grau de separação pode ser avaliado observando a mudança de coloração de vermelho para pálido. Em seguida, as fibras foram transferidas para um recipiente com solução BIOPS gelada contendo 50µg/ml de saponina e incubadas no gelo, com agitação suave, por 30 minutos para a solubilização do sarcolema. As fibras permeabilizadas foram, então, lavadas por 10 minutos em meio de respiração mitocondrial, MIR05 (em mM: EGTA 0.5, MgCl₂ 3.0, K-MES 60, taurina 20, K₂HPO₄ 10, HEPES 20, Sacarose 110 e BSA 1g/L, pH 7.1 ajustado a 25°C) no gelo.

3.7.2 Respirometria de alta resolução

Após a permeabilização, as fibras foram pesadas em balança analítica e 2-3 mg de tecido foram adicionados à câmara do oxígrafo OROBOROS® 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 O₂.ml⁻¹. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de O₂.s⁻¹.mg de peso úmido⁻¹. O estudo foi realizado com dois grupos de substratos independentes em cada câmara: (câmara A, em mM) glutamato 10, malato 2 e succinato 10, para a análise dos complexos I e II da cadeia respiratória e (câmara B, em mM) palmitoil-carnitina 0.02 e malato 2, para a análise da oxidação de ácidos graxos. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: taxa respiratória basal, antes da adição de adenosina difosfato (ADP), estado 2; taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM), estado 3 e taxa respiratória na ausência de fosforilação de ADP, após a adição de oligomicina (2 µg/ml), estado 4. Para examinar a integridade mitocondrial através de todas as preparações, a respiração foi mensurada em presença de 10µM de citocromo c.

3.8 Western Blotting

3.8.1 Preparo do tecido muscular cardíaco para Western Blotting

O ventrículo esquerdo dos corações foi isolado e 100mg foi cortado e homogeneizado em gelo com um sonicador (Wheaton, EUA) durante 15 segundos num tampão contendo 20 mM de Tris HCl, 5 mM de EDTA, 10 mM de fluoreto de sódio, 1 M de sódio pirofosfato, 2 mM ortovanadato de sódio, 1%NP40 e 0,1% SDS adicionado de coquetel de inibidor de protease Complete EDTA-free em comprimido (Roche Diagnostics, Califórnia, EUA). Os homogenatos foram centrifugados a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C. Os pellets foram descartados e os sobrenadantes congelados a -80 °C.

3.8.2 Análise por Western Blotting

O conteúdo total de proteínas no extrato celular cardíaco do ventrículo esquerdo dos camundongos controle e hiperalimentado foi determinado através do método BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, U.S.A). O conteúdo da AMPK α (#2532S, Cell Signaling Technology), pAMPK α (#4188X, Cell Signaling Technology), AKT1 (#2938, Cell Signaling Technology), AKT2 (sc7127), AKT3 (sc11521), pAKT (sc-7985–R, Santa Cruz Biotechnology, USA), IRS1(sc-559), IR β (sc-711), PTP1B (sc-1718), PI3K (SC-423), PGC1alfa (SC-5815), FABP (sc-15974-R), CD36 (sc-9154), pSTAT3 (sc-7993), STAT3 (sc-483), SIRT1 (sc-15404), colágeno 1 (sc-25974) e colágeno 3 (sc-8781) foram detectados por imunoblotting.

As amostras de proteína de cada animal foram solubilizadas no tampão de amostra Laemmli (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, SDS a 1%; β -mercaptoetanol 5%, glicerol a 10; azul de bromofenol a 0,001%), durante 3 minutos a 100°C e congeladas antes de serem submetidos a SDS-PAGE. Quantidades iguais de proteína (30 μ g) foram aplicadas em géis de poliacrilamida a 8, 10 ou 12% na presença de SDS (SDS-PAGE), juntamente com padrões de peso molecular colorido (Full Range Rainbow,

Amersham Biosciences, UK Limited).

Após separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas PVDF (Hybond P, Amersham Biosciences, UK Limited), bloqueadas com TBS-Tween (1% de Tween 20) contendo 5% de leite em pó desnatado durante 1 hora e incubadas com os anticorpos apropriados por 1h ou overnight na concentração 1:1000. Posteriormente, as membranas PVDF foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com biotina adequados anti-rabbit, anti-goat ou anti-mouse (sc-2040, sc-2042, sc-2039 – 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 ou 1:5000, Santa Cruz Biotechnology), seguido por 1h de incubação com estreptavidina peroxidase conjugada (1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000 ou 1:5000, Invitrogen, Camarillo, EUA). A imunorreatividade foi visualizada por quimioluminescência aumentada (ECL-Prime, Amersham Biosciences ou Thermo Scientific), a imagem obtida por meio do equipamento ChemiDoc MP system (Biorad) e subsequentemente quantificados por densitometria utilizando o software Image J® (NIH, Bethesda, MD, EUA).

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

3.9.1 Extração do RNA total

Para análise da expressão gênica, 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 µl de clorofórmio, misturando-se vigorosamente por cerca de 15 segundos e, novamente, deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 3 minutos. O homogenato foi centrifugado a 12.000 RPM, a 4°C, por 15 minutos, para separação de fases.

A fase aquosa sobrenadante foi cuidadosamente transferida para outro microtubo. Em seguida, foram acrescentados e misturados 500 µl 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 ressuspenso 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 ressuspenso em 50 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60°C, por 10 minutos, para melhor dissolução do RNA.

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

3.9.2 Transcrição reversa (RT)

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas utilizando Taq-Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) com volume de reação de 25 µL. Todas as reações foram realizadas em triplicatas com controle negativo. As reações de PCR foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) nas seguintes condições de amplificação: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15s 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 ANP (Mm01255747_g1), BNP (Mm01255770_g1), CPT1 (Mm01308156_g1) e UCP3 (Mm00494077_m1) e o controle endógeno actina (Mm006077939_s1) foram obtidos a partir do catálogo de expressão gênica ABI TaqMan (Foster City, CA, EUA). Este ensaio (kit) contém uma mistura de reação mix 20x, de detecção de junções éxon-éxon otimizado para se obter ~ 100% de eficiência.

3.10 Análise histológica quantitativa para deposição de colágeno

Os ventrículos esquerdos foram fixados em formaldeído a 4%, embebidos em parafina, seccionados em fatias 5 μ m e coradas com Picro Sirius Red, que cora fibras de colágeno. Para quantificar a fibrose cardíaca, 15 campos aleatórios por coração/animal de cada grupo foram capturados auxiliados com a luz do microscópio acoplada a câmera CCD e, em seguida, analisados com o programa Image Pro.

3.11 Análise de estresse oxidativo cardíaco, hepático e plasmático

O ventrículo esquerdo e o fígado foram processados no equipamento potter com tampão KPE. O tampão KPE foi preparado utilizando 1,088g de KH_2PO_4 e 7,14g de K_2HPO_4 em 500ml de água destilada, posteriormente o pH foi aferido e ajustado para 7,5, e então, 0,93g de EDTA adicionado a solução.

O processamento do tecido cardíaco e hepático congelado foi iniciado com o descongelamento e posterior pesagem para o cálculo do volume necessário de tampão para cada amostra a ser lisada. Em um tubo específico para o equipamento potter foi adicionado o tampão KPE na proporção 1(mg):20 (μ L) em cada amostra para a lise completa do tecido. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 10min a 4000rpm em 4°C e após este processo o sobrenadante foi aliqotado.

Plasma, fígado e coração foram aliqotados para as análises de TBAR (duplicata de 200 μ L), e proteína carbonilada (duplicata de 100 μ L). O resto das amostras foi armazenado com temperatura de -80°C caso haja necessidade de posteriores análises.

A dosagem de proteína foi realizada pelo método BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, U.S.A) com as amostras diluídas na proporção 1:8.

3.11.1 Peroxidação lipídica

A partir da alíquota de cada amostra para TBAR foram adicionados 400 μL (fígado e coração) e 300ul (plasma) de ácido tricloroacético 10% (TCA 10%) e, os tubos de eppendorf centrifugados por 10min a 7000rpm a 4°C. Posteriormente, 300 μL do sobrenadante de cada amostra mais 300 μL de ácido tiobarbitúrico 0,67% foi adicionado a tubos de ensaio nos quais se tinham 600 μL de volume final. Todos os tubos de ensaio foram colocados em banho maria por 30min a 95°C juntamente com os tubos de ensaio referentes a curva padrão para TBAR. Após o banho maria, os tubos foram deixados 15min em temperatura ambiente para esfriar. Para a leitura das concentrações, foi montada uma placa de 96 poços contendo 200 μL em cada poço referente a cada tubo em duplicata obtendo-se assim quadruplicata de cada amostra. A leitura foi realizada a 532nm.

A curva padrão foi preparada com a solução tetrametoxipropano (TMP) nas concentrações 0, 0.02, 0.1, 0.5 e 1.0 nmol. O preparo dos reagentes da curva foi realizado da seguinte maneira: solução A (10 μL TMP + 500 μL H₂O), solução B (100 μL A + 4900 μL de H₂O) e solução C (41 μL B + 5000 μL de H₂O). Para as diferentes concentrações da curva foram adicionados volumes diferentes da solução C diluídos em água destilada.

Para a análise plasmática o processamento foi o mesmo, excluindo-se a etapa de processamento e utilizando a metade dos volumes citados.

3.11.2 Carbonilação de proteína

Para a determinação da carbonilação de proteína foram primeiramente preparadas 8 soluções sendo estas HCl 2M, HCl 2M + acetona PA (420 ml de acetona PA + 13ml de HCl 2M), TCA 10%, 20% e 30%, 2,4 dinitrofenilhidrazina (60mg de DNTP em 30ml de HCl 2M), etanol + acetato de etila (proporção 1:1) e guanidina 8M (50ml de água, 17,5g de guanidina e 0,1375g de KH₂PO₄ em pH 2,3).

Os procedimentos desse ensaio para o plasma e os tecidos cardíaco e hepático foram realizados da seguinte maneira em centrífuga refrigerada para a obtenção do

pellet: 3 repetições adicionando 1ml da mistura HCl 2M + Acetona PA, vortexando e centrifugando por 4min a 14000rpm em 4°C; 3 repetições adicionando 500µL de TCA 10%, vortexando e centrifugando por 4 min a 8000rpm em 4°C; adição nas amostras A de 500 µL de HCl 2M e nas amostras B de 500 µL de DNTP mantendo no escuro por 1hora e vortexando a cada 10min; sem desprezar os volumes das amostras A e B, foram adicionados 500 µL de TCA 30% e posteriormente os tubos eppendorf incubados por 10min a -20°C; os mesmos tubos eppendorf foram em seguida centrifugados por 4min a 10000rpm em 4°C e o sobrenadante descartado; 3 repetições adicionando 500 µL de TCA 20%, vortexando e centrifugando por 4min a 10000rpm em 4°C; 3 repetições adicionando 500 µL de etanol-acetato de etila, vortexando e centrifugando por 4min a 10000rpm em 4°C. Após a terceira repetição o sobrenadante foi descartado e em cada tudo de eppendorf com os respectivos pellets formados, foi adicionado 1ml de guanidina e os mesmos encubados em banho maria por 30min a 60°C vortexando nos tempos 15 e 30min após centrifugação de 10000 por 3min.

Após os 30min as amostras foram deixadas em temperatura ambiente por 15min e posteriormente a placa de 96 poços foi montada com as respectivas amostras com a quantidade de 200 µL em duplicata e a leitura realizada a 380nm.

3.12 Dosagem de ATP

Os ventrículos esquerdos frescos após retirados do aparelho Langendorff foram pesados em balança analítica obtendo-se 50mg de tecido que foi imediatamente homogeneizado em 1ml de ácido tricloroacético (1%) para ocorrer a precipitação das proteínas e preservação do ATP conforme descrito previamente por Stanley (1969). As amostras foram centrifugadas por 10min a 3000rpm a 4°C e o sobrenadante coletado e congelado em freezer -80°C.

Antes de realizar as análises, o pH foi ajustado para 7,0. As concentrações de ATP foram determinadas por emissão de luz no comprimento de onda de ~560nm de acordo com o protocolo descrito no kit de determinação de ATP (Invitrogen, EUA). Os valores estão expressos em milimol (mM).

3.13 Análises estatísticas

Todos os dados estão representados como a média \pm EPM e valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados foram analisados com o programa estatístico GraphPad Prism 5.

O teste one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a significância estatística das diferenças entre os quatro grupos para a função cardíaca, western blotting, PCR, análise histológica, estresse oxidativo cardíaco, dosagem de ATP e respirometria mitocondrial.

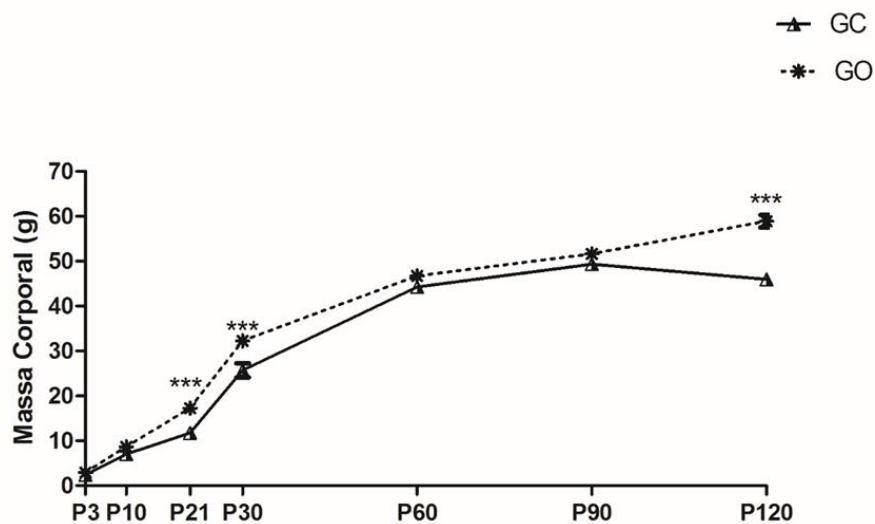
O teste t de student foi utilizado para analisar os parâmetros biométricos, bioquímicos e o estresse oxidativo hepático e plasmático entre os grupos controle e hiperalimentado.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre os parâmetros biométricos e bioquímicos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida

Camundongos do GH apresentaram diferenças significativas no peso corporal analisado aos 21, 30 e 120 dias (gráfico 1). O grupo hiperalimentado apresentou aumento do peso do ventrículo esquerdo ($P=0,0028$), da gordura epididimal (68.64%, $P<0.001$), da gordura retroperitoneal (109.38%, $P<0.01$), da glicemia de jejum (19.52%, $P<0.05$) e dos níveis plasmáticos de insulina ($p<0,05$) e leptina ($p<0,0001$) quando comparado ao grupo controle (tabela 1).

Gráfico 1 – Curva de crescimento corporal dos grupos controle e hiperalimentado até os 120 dias de vida



Legenda: Resultados expressos em média \pm EPM. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ e *** $P<0.0001$, quando comparado ao grupo controle. N=12 animais/grupo.

Tabela 1 - Peso corporal, do coração, das gorduras epididimal e retroperitoneal, glicemia de jejum, insulina e leptina de jejum em camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias

Parâmetros	Controle	Hiperalimentado
Massa Corporal (g)	46.64 ± 0.63	65.15 ± 1.38 ^{***}
Peso VE/comprimento da tibia (mg/cm)	0.10 ± 0.004	0.12 ± 0.003 ^{**}
Gordura epididimal (g)	1.20 ± 0.07	2.02 ± 0.18 ^{***}
Gordura retroperitoneal (g)	0.72 ± 0.07	1.50 ± 0.19 ^{**}
Glicemia (mg/dL)	144.40 ± 12.36	172.60 ± 7.00 [*]
Insulina plasmática (pM)	371.1 ± 48.04	633.3 ± 97.29 [*]
Leptina plasmática (pM)	1288.0 ± 238.5	3136.0 ± 239.3 ^{***}

Legenda: Resultados expressos em média ± EPM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.0001$, quando comparado ao grupo controle. N=12 animais/grupo.

4.2 Efeito da hiperalimentação na lactação na função cardíaca de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida

Os resultados da tabela 2 mostram que o GHIR apresenta aumento significativo dos parâmetros hemodinâmicos EDP quando comparado ao GHLB e GCIR ($P < 0.001$) e, da Min dP/dt quando comparado ao GHLB ($P < 0.0001$) bem como redução da Max dP/dt comparado ao GHLB ($P < 0.05$). Na condição basal o GH apresenta redução da EDP comparado ao GCLB ($P < 0.0001$).

Ao mesmo tempo o GCIR apresentou apenas aumento da EDP ($P < 0.01$) e da Min dP/dt quando comparado ao GCLB ($P < 0.0001$).

Os parâmetros Tau e frequência cardíaca não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Tabela 2 - Parâmetros hemodinâmicos cardíacos dos animais controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida

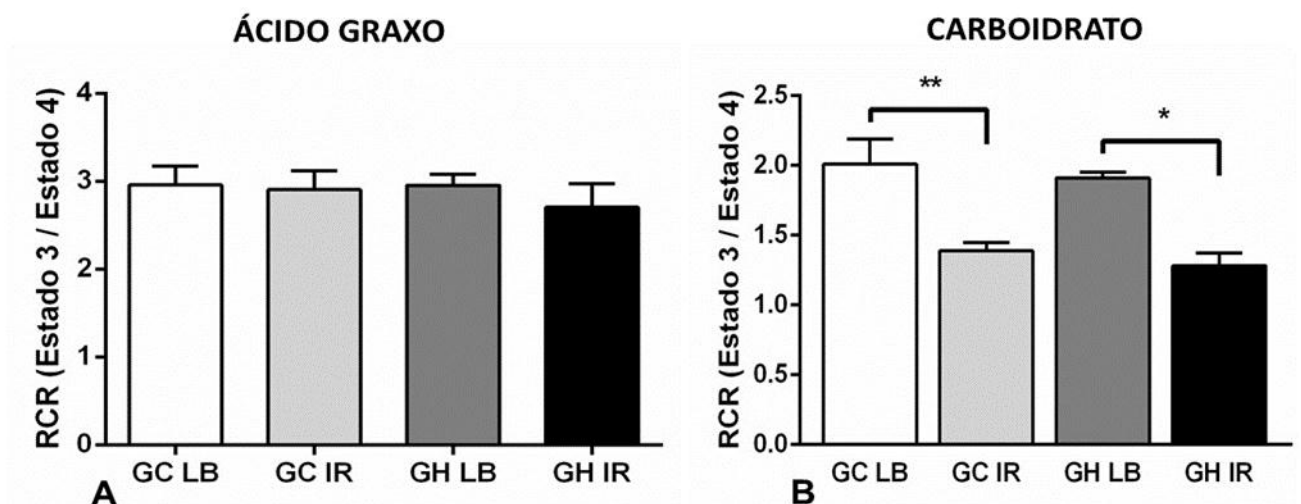
Parâmetros hemodinâmicos	GCLB	GCIR	GHLB	GHIR
EDP (mmHg)	8.21 ± 0.90	17.63 ± 1.61**	3.44 ± 0.59***	26.02 ± 3.24#### ††
Frequência (BPM)	343.6 ± 30.21	320.2 ± 49.93	326.1 ± 23.87	336.9 ± 14.93
Max dP/dt (mmHg/s)	4289.0 ± 347.4	3850.0 ± 546.1	4600.0 ± 222.6	3157.0 ± 457.6#
Min dP/dt (mmHg/s)	-1191.0 ± 68.32	-636.0 ± 50.36***	-1332.0 ± 41.31	-699.5 ± 90.41####
Tau (ms)	25.52 ± 7.51	15.84 ± 7.88	25.13 ± 10.16	6.332 ± 1.16

Legenda: EDP (pressão diastólica final – mmHg), Tau (constante de tempo de relaxamento isovolumétrico – ms), Max dP/dt (taxa de aumento da pressão sistólica - mmHg/s), Min dP/dt (taxa de aumento da pressão diastólica - mmHg/s) e frequência (BPM) nos grupos GCLB (grupo controle linha de base), GHLB (grupo hiperalimentado linha de base), GCIR (grupo controle isquemia/reperfusão), GHIR (grupo hiperalimentado isquemia/reperfusão); **P<0.01, ***P<0.0001, significativo comparado ao GCLB; #P<0.05, ####P<0.0001, significativo comparado ao GHLB; ††P<0.01, significativo comparado ao GCIR. Resultados expressos em média ± EPM. N= 10 camundongos/grupo.

4.3 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a respiração mitocondrial de fibras cardíacas de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados demonstram que os grupos GCIR (P<0.01) e GHIR (P<0.05) apresenta redução da razão do controle respiratório (RCR) para oxidação de carboidrato quando comparado aos respectivos grupos na linha de base. Para a RCR de ácido graxo não foram observadas diferenças significativas (figura 3).

Figura 3 - Razão do controle respiratório (RCR) para ácido graxo (A) e carboidrato (B) de fibras cardíacas permeabilizadas dos grupos controle e hiperalimentado em ambas as situações (linha de base e isquemia/reperfusão)

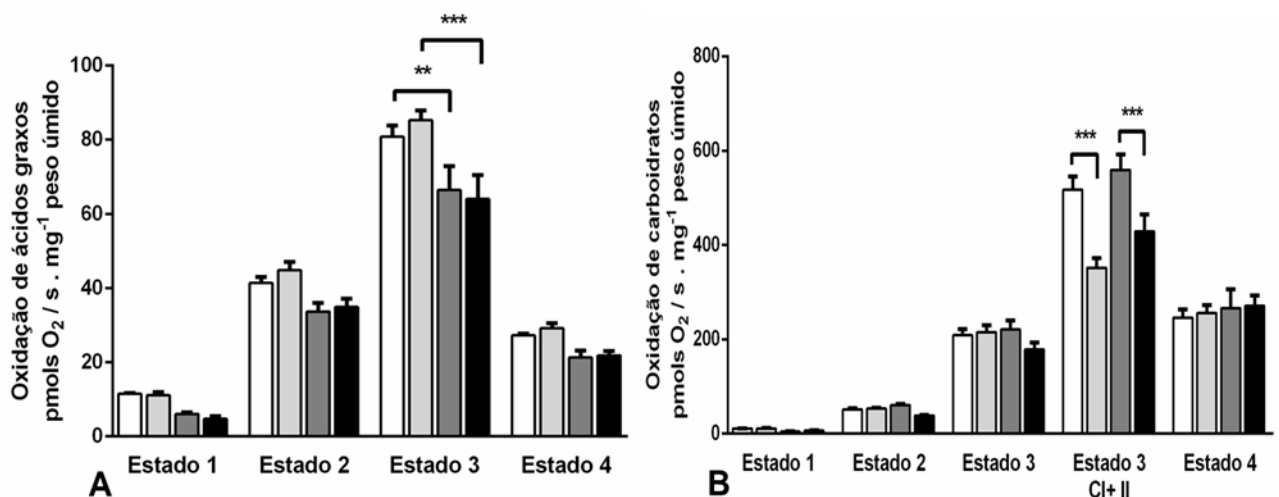


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais para a razão estado3/estado4. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, quando comparado ao grupo controle. N=6 animais/grupo.

Os resultados demonstram que a oxidação de ácidos graxos (**A**) no estado 3 está reduzida nos grupos GHLB ($P < 0,01$) e GHIR ($P < 0,0001$) quando comparados aos grupos controle na mesma condição.

Entretanto, na oxidação de carboidrato a diferença significativa foi observada apenas intragrupos no estado 3, ou seja, redução nos grupos GCLB e GHLB comparados com os grupos GCIR e GHIR, respectivamente ($P < 0,0001$) (figura 4).

Figura 4 - Respirometria mitocondrial para a oxidação de ácido graxo (**A**) e carboidrato (**B**) de fibras cardíacas permeabilizadas dos grupos controle e hiperalimentado em ambas as situações (linha de base e isquemia/reperfusão)



Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo em pmol de $O_2 \cdot s^{-1} \cdot mg$ peso úmido⁻¹. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

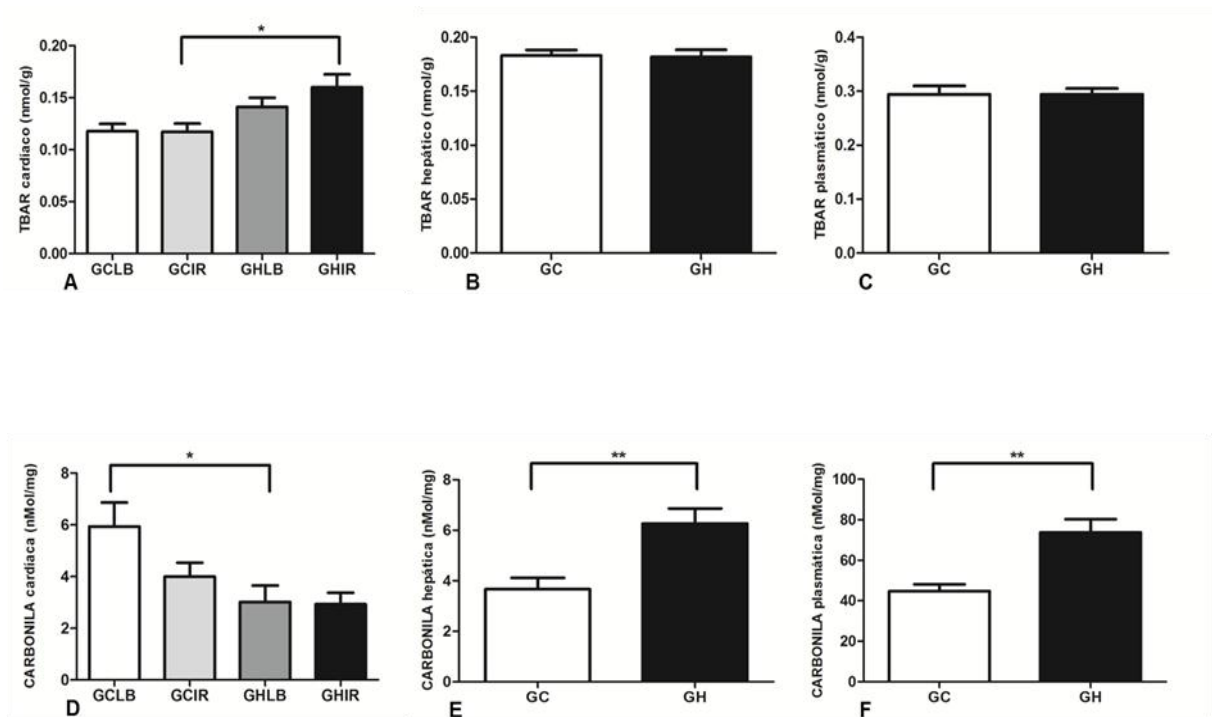
4.4 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a peroxidação lipídica e proteica cardíaca, hepática e plasmática de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados da figura 5 demonstram que o GH apresenta aumento significativo na peroxidação lipídica cardíaca na isquemia/reperfusão quando comparado ao GCIR ($P < 0,05$) e redução da carbonilação na linha de base quando comparado ao GCLB ($P < 0,05$).

O GH apresenta aumento da carbonila hepática ($P < 0,01$) e plasmática

($P < 0.01$) quando comparado ao GC. Entretanto, não foi observada diferença significativa para a peroxidação lipídica hepática e plasmática.

Figura 5 - Peroxidação lipídica - TBAR cardíaca (A), hepática (B) e plasmática (C) e, carbonila cardíaca (D), hepática (E) e plasmática (F) nos grupos controle e hiperalimentado.

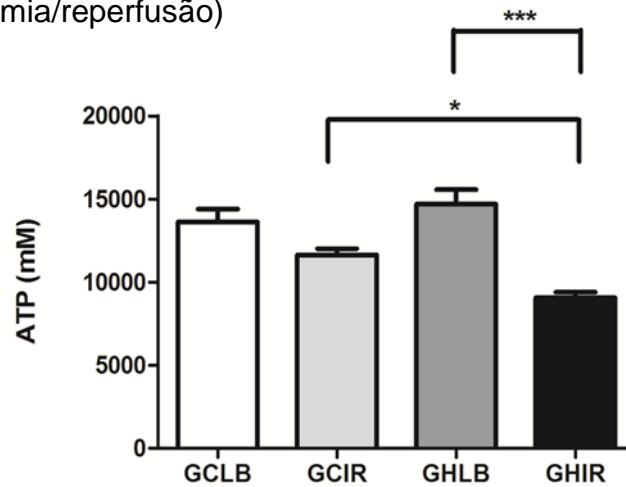


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ quando comparado ao grupo controle. N=7-10 animais/grupo.

4.5 Efeito da hiperalimentação na lactação na produção de ATP no coração de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados demonstram que o GHIR apresenta redução da produção de ATP quando comparado ao GCIR ($P < 0.05$) e ao GHLB ($P < 0.0001$) (figura 6).

Figura 6 - Produção de ATP nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado em ambas condições (linha de base e isquemia/reperfusão)



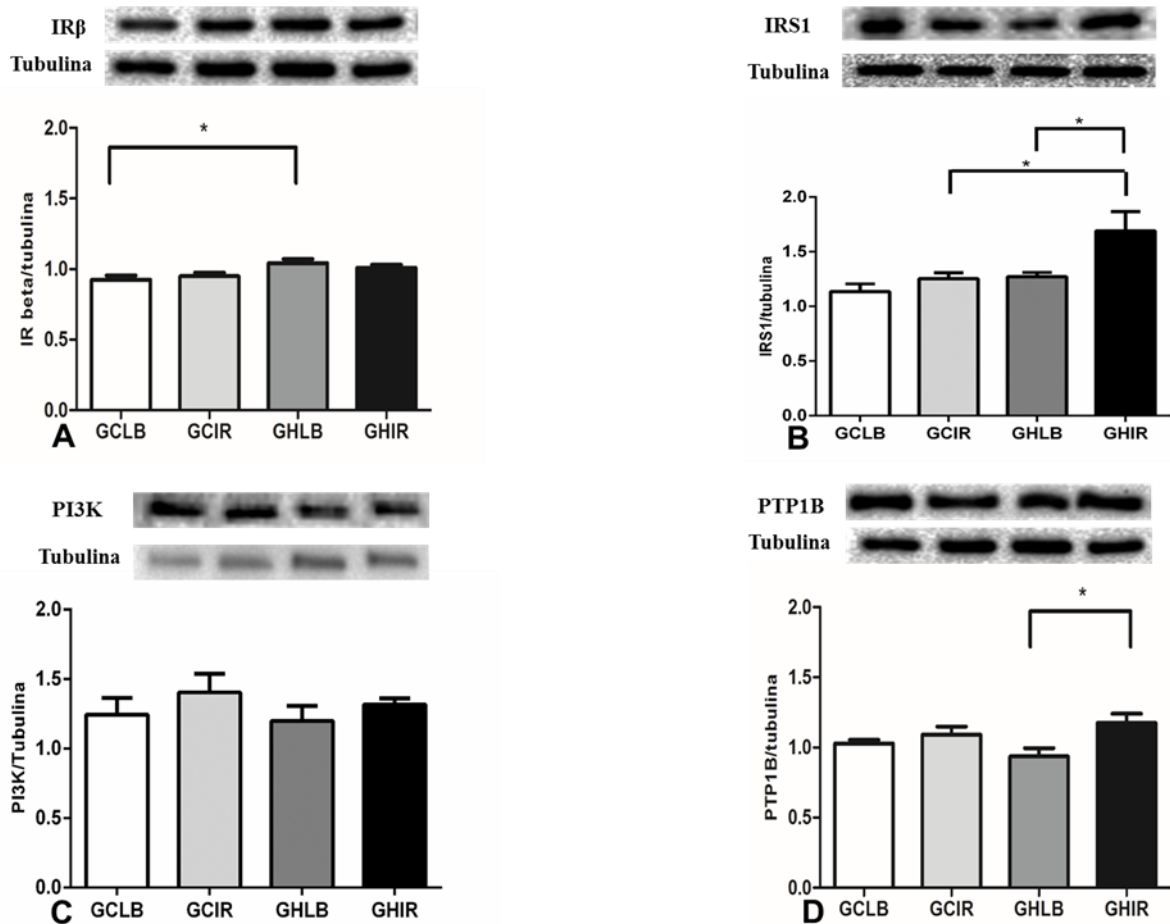
Legenda: Os valores estão representados em micromol (mM) em média \pm EPM de cada grupo. * $P < 0.05$, *** $P < 0.0001$; N=7-10 animais/grupo.

4.6 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo do IR β , IRS1, PI3K e da PTP1B de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados da figura 7 demonstram que o GHLB apresenta aumento do IR β comparado ao GCLB ($P < 0.05$) e o GHIR aumento do IRS1 comparado ao GCIR e GHLB ($P < 0.05$) e da PTP1B comparado ao GHLB ($P < 0.05$).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para o conteúdo total da PI3K.

Figura 7 - Gráficos e bandas representativas do conteúdo do IR β (A), IRS1 (B), PI3K (C) e da PTP1B (D) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida



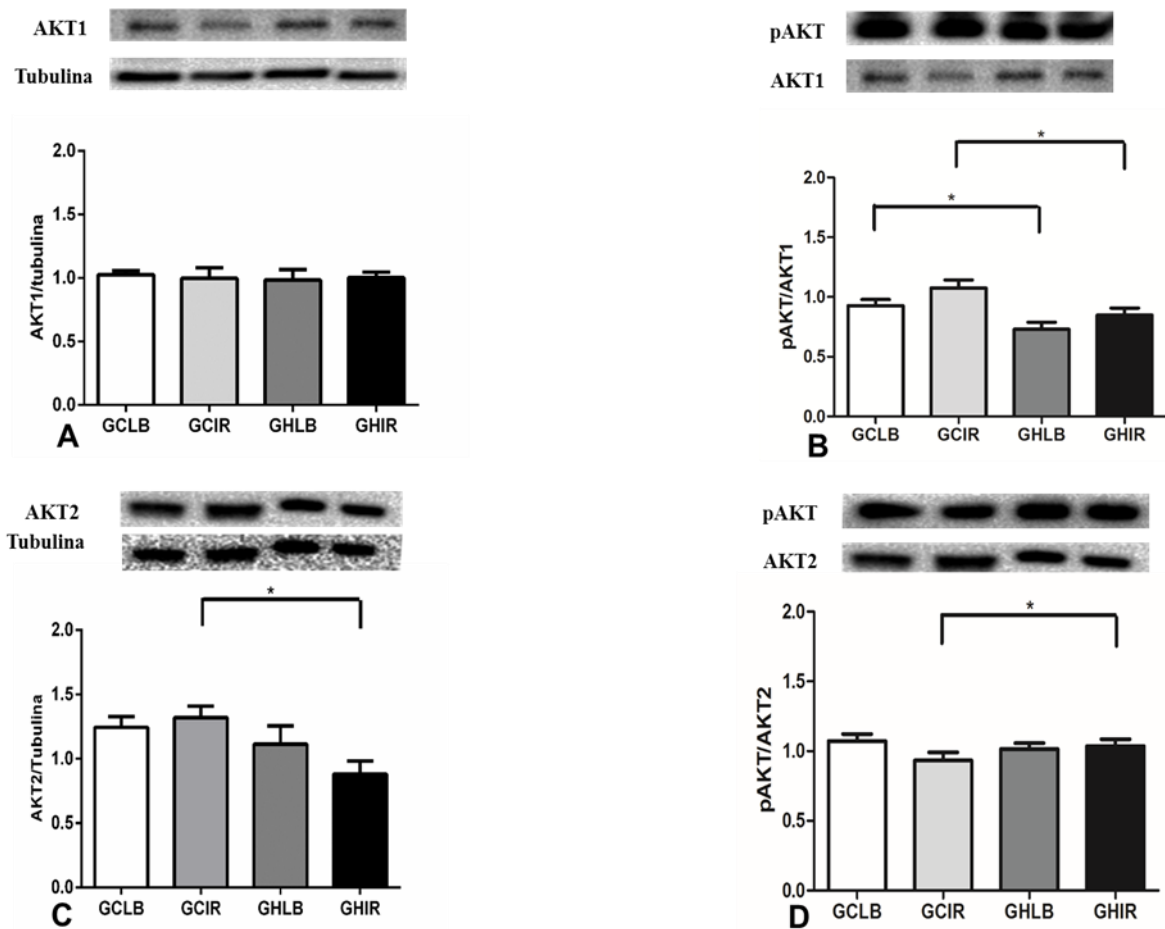
Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais. N=6-7 animais/grupo.

4.7 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo e fosforilação da AKT1 e AKT2 de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados da figura 8 demonstram que os grupos controle e hiperalimentado não apresentam diferença significativa para o conteúdo total de AKT1, entretanto, a pAKT1 está reduzida no GHLB e GHIR quando comparado ao GCLB e GHIR, respectivamente ($P < 0.05$).

O conteúdo total da AKT2 está reduzido e a pAKT2 aumentada no GHIR comparado ao GCIR ($P < 0.05$).

Figura 8 - Gráficos e bandas representativas do conteúdo e fosforilação da AKT1 (A,B) e AKT2 (C, D) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.



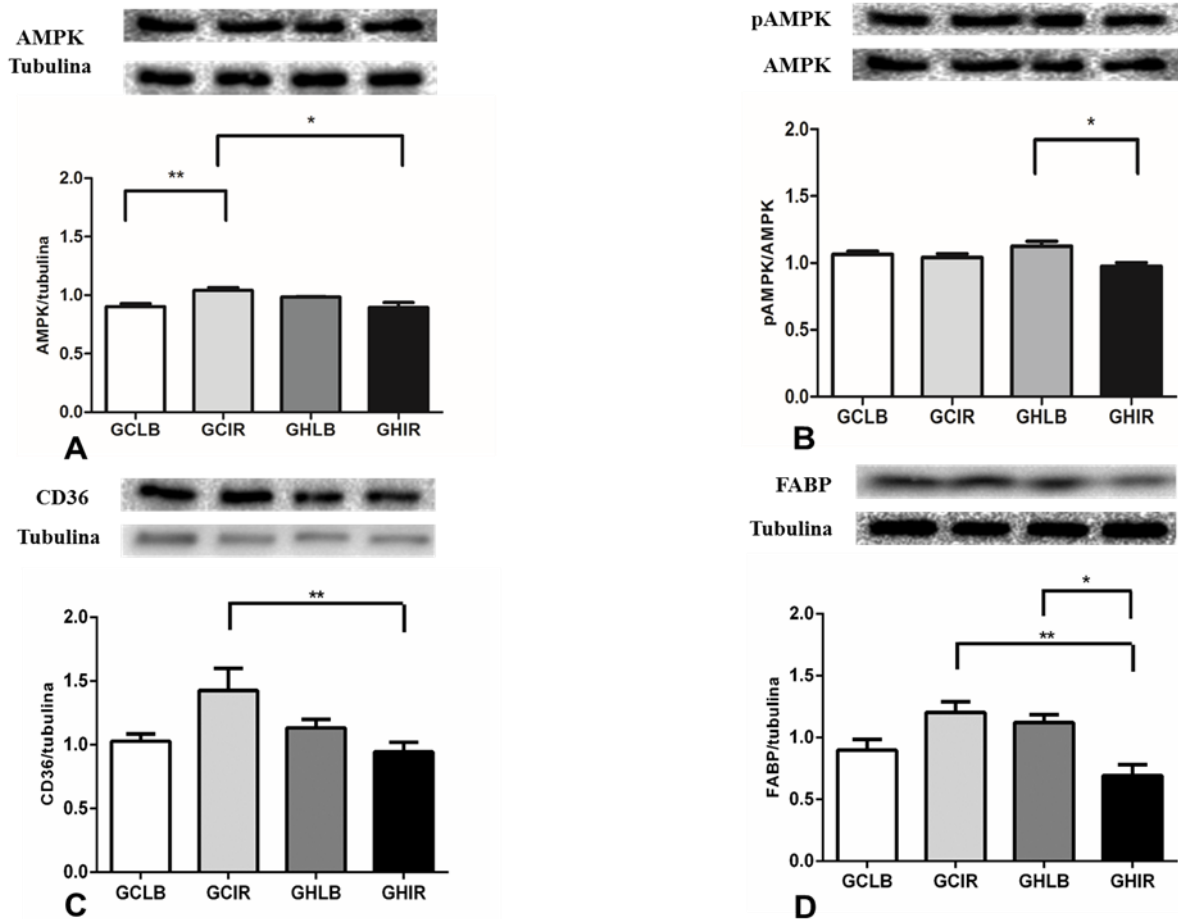
Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.8 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da AMPK, pAMPK, CD36 e FABP de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados da figura 9 demonstram que o GCIR apresenta aumento do conteúdo total de AMPK quando comparado ao GCLB ($P < 0.01$) e GHIR ($P < 0.05$), entretanto a pAMPK está reduzida apenas no GHIR comparado ao GHLB ($P < 0.05$).

O GHIR apresenta redução dos conteúdos totais de CD36 e FABP quando comparado ao GCIR e, redução da FABP quando comparado ao GHLB.

Figura 9 - Gráficos e bandas representativas do conteúdo total da AMPK (A), CD36 (C) e FABP (D) e fosforilação da AMPK (B) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida



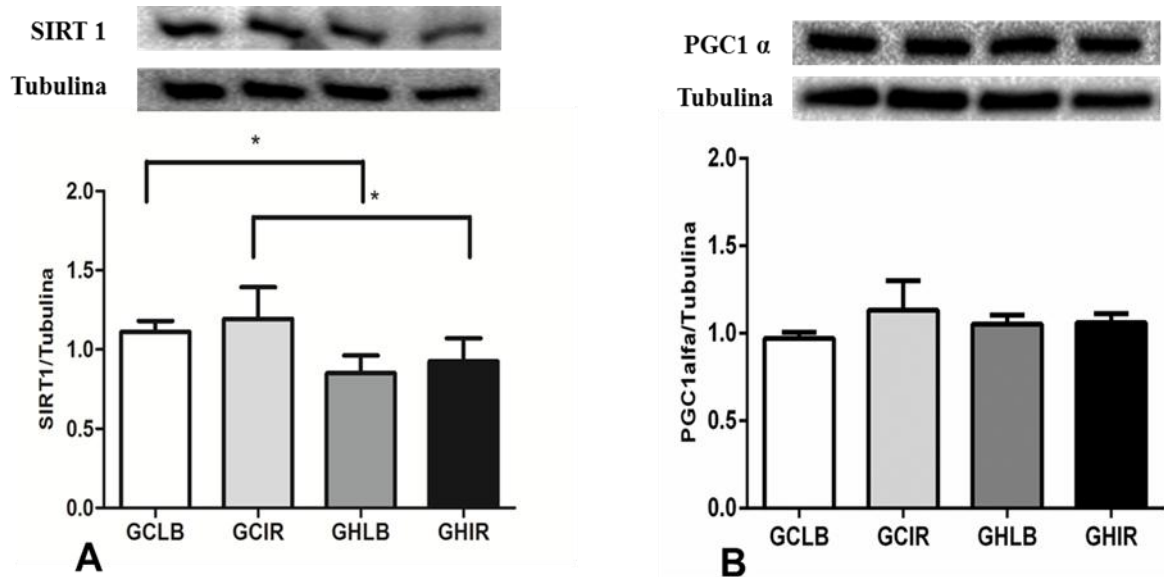
Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.9 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da SIRT1 e PGC1 α de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados da figura 10 demonstram que o conteúdo total da SIRT1 está reduzido no GH em ambas condições quando comparado com os respectivos GC ($P < 0.05$).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos para o conteúdo total da PGC1 α .

Figura 10 - Gráficos e bandas representativas do conteúdo das proteínas SIRT1 (A) e PGC1 α (B) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida



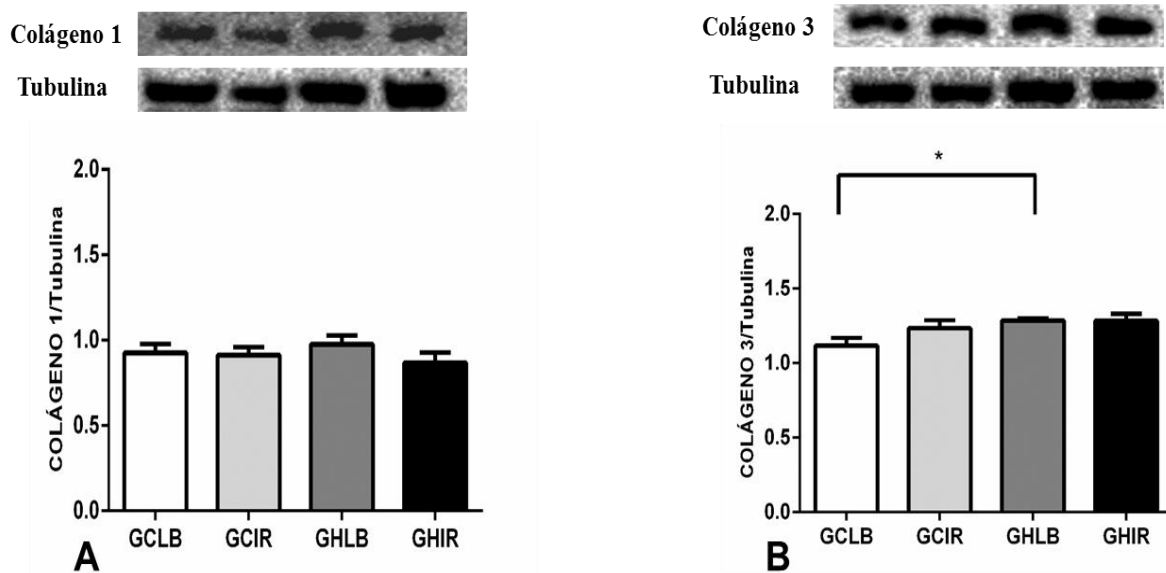
Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais N=6-7 animais / grupo.

4.10 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo dos colágenos 1 e 3 de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados da figura 11 demonstram que o GHLB apresenta aumento do conteúdo total de colágeno 3 quando comparado ao GCLB ($P < 0.05$).

Não foi observada diferença significativa entre os grupos para o conteúdo total de colágeno 1.

Figura 11 - Gráficos e bandas representativas do conteúdo total dos colágenos 1 (A) e 3 (B) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.



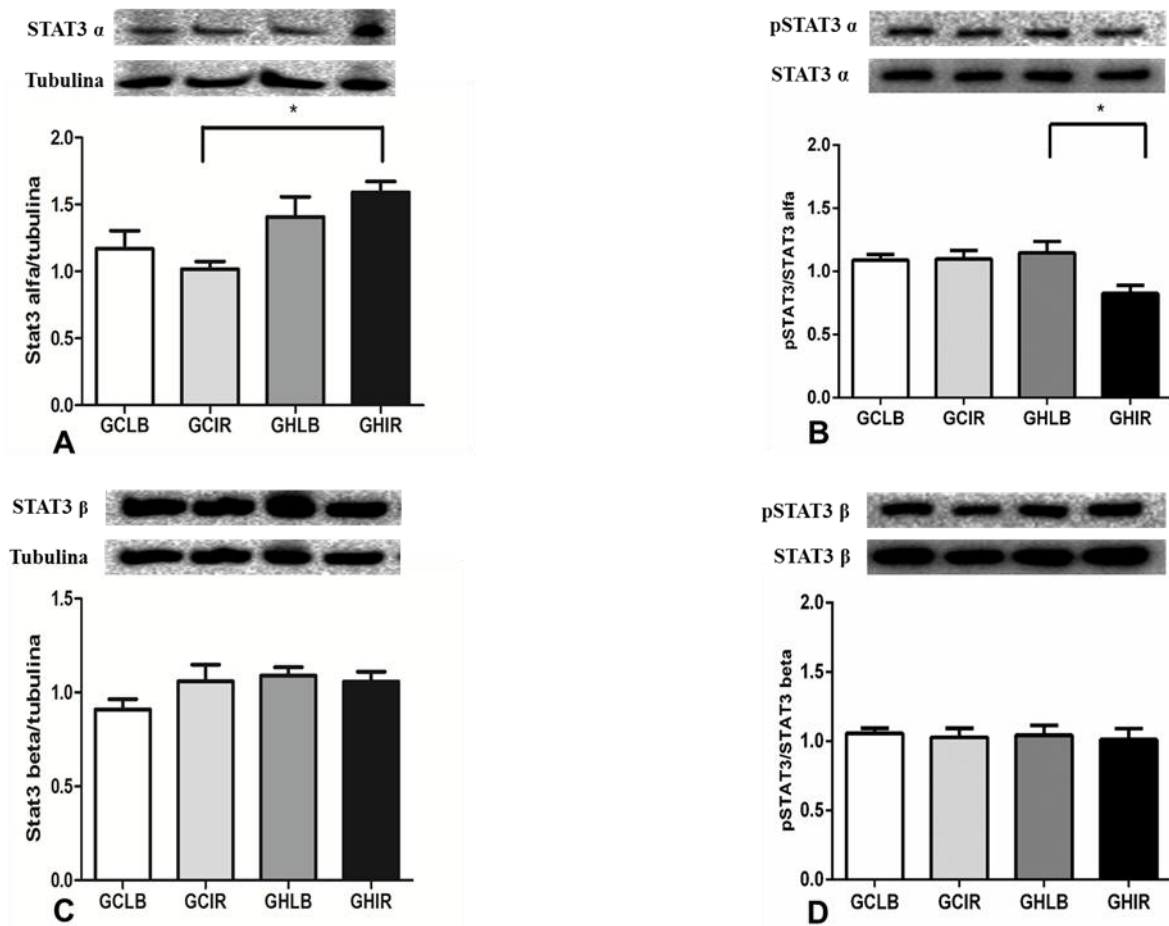
Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.11 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo e fosforilação da STAT3 α e STAT3 β de camundongos aos 120 dias de vida

Os resultados da figura 12 demonstram que o GHIR apresenta aumento do conteúdo total da STAT3 α quando comparado ao GCIR ($P < 0.05$) e redução da fosforilação (pSTAT3 α) quando comparado ao GHLB ($P < 0.05$).

Não foram observadas diferenças significativas para o conteúdo total e fosforilação da STAT3 β .

Figura 12 - Gráficos e bandas representativas do conteúdo total e fosforilação das proteínas STAT3 α (A, B) e STAT3 β (C, D) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida

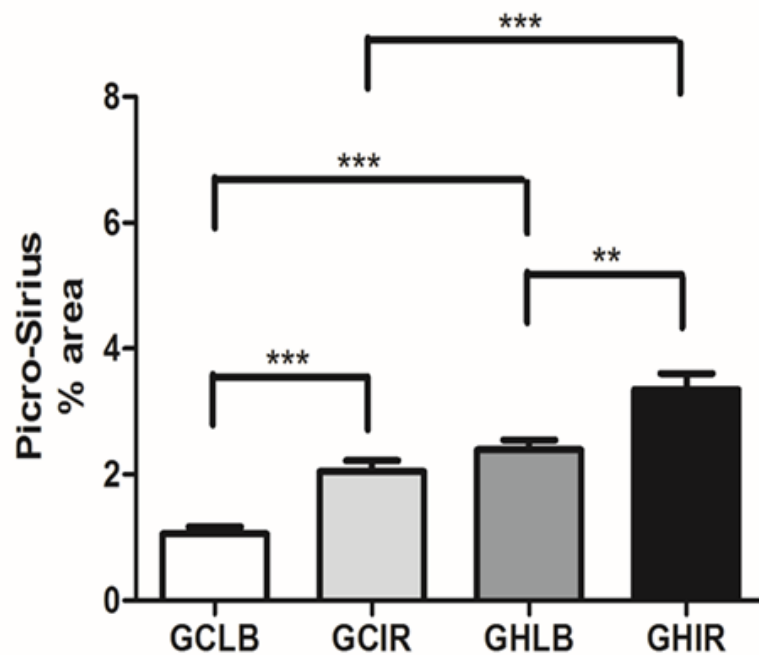
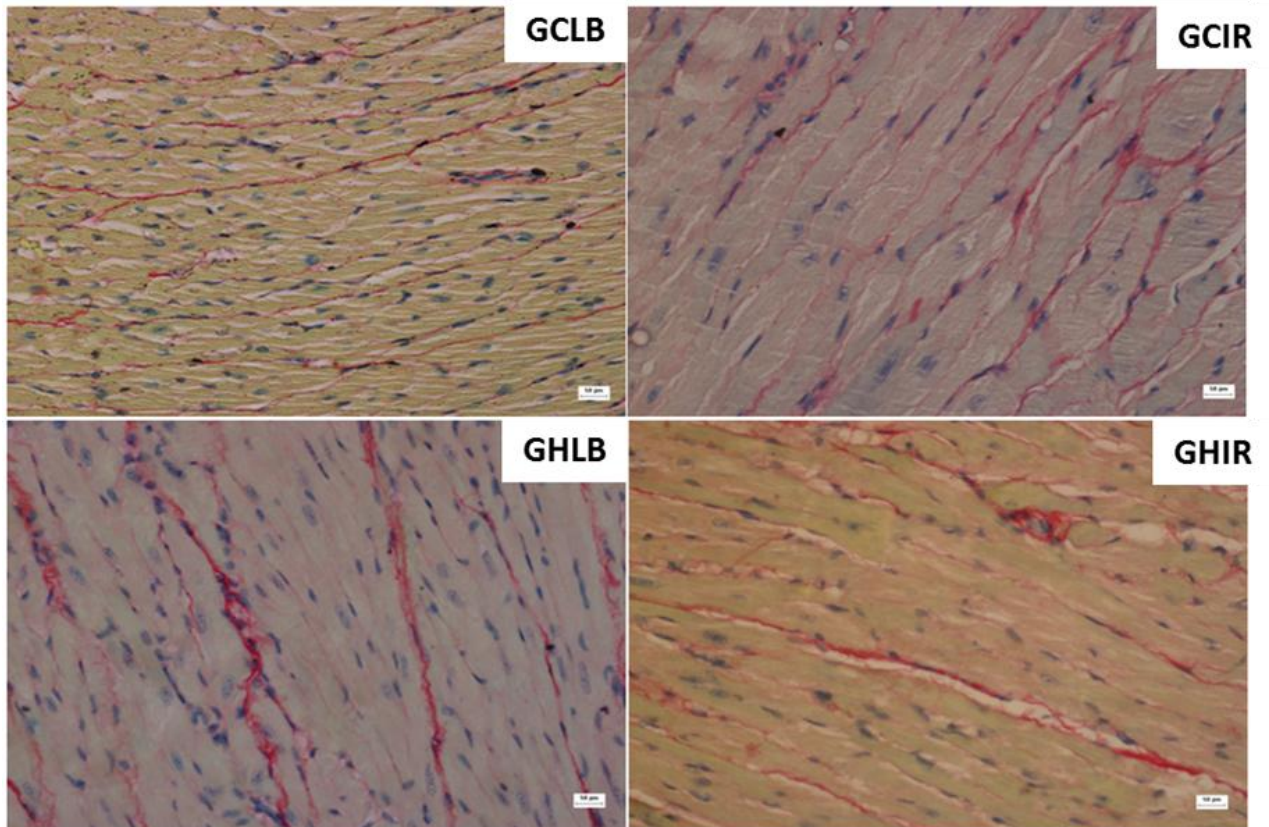


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.12 Efeito da hiperalimentação na lactação na deposição cardíaca de colágeno de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida

Os resultados da figura 13 demonstram que a deposição de colágeno (coloração vermelha) está aumentada inter e intra grupos, ou seja, no GHIR comparado ao GHLB ($P < 0.01$) e GCIR ($P < 0.0001$), no GHLB comparado ao GCLB ($P < 0.0001$) e no GCIR compara ao GCLB ($P < 0.0001$).

Figura 13 - Imagem histológica e gráfico representativo da quantificação de colágeno nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida

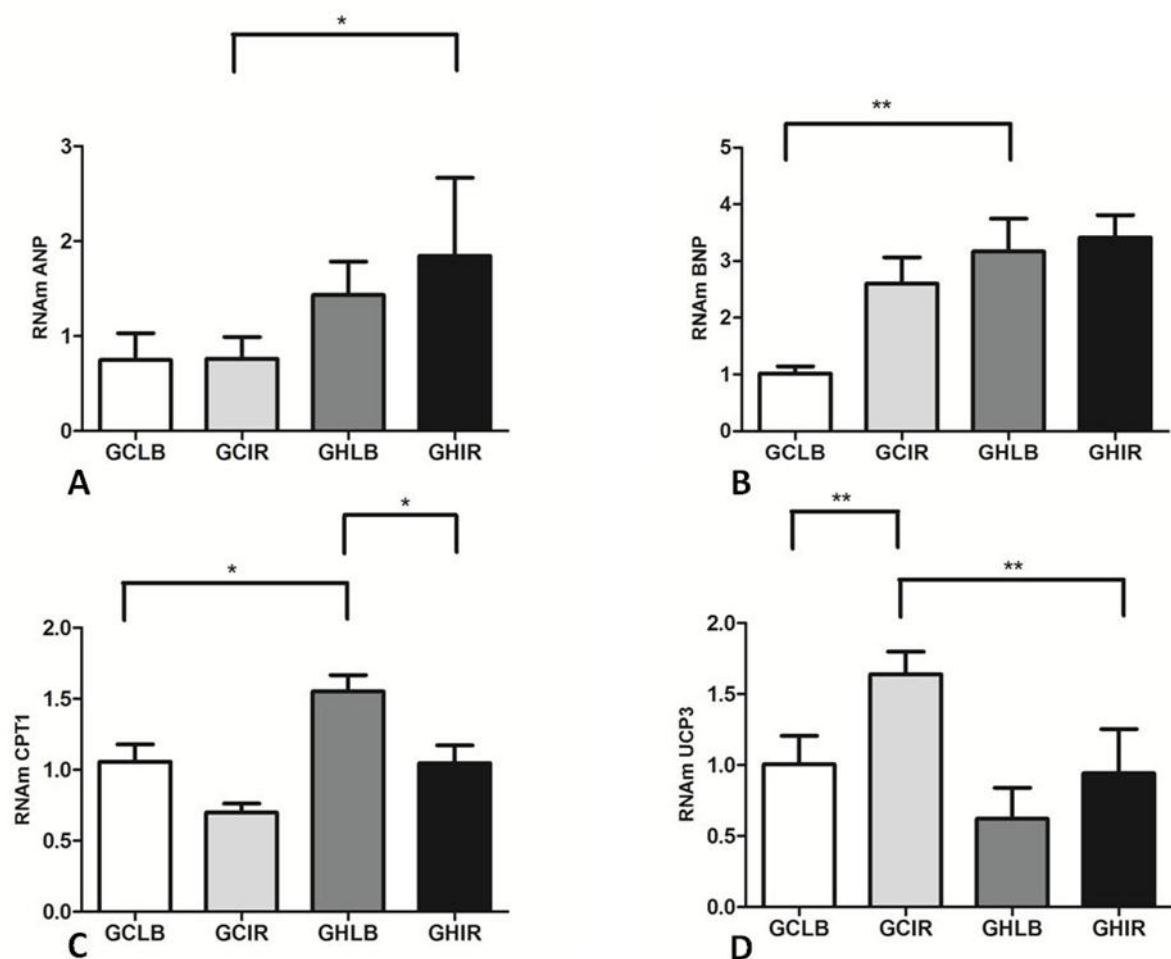


Legenda: Imagem e gráfico representativos dos grupos GCLB, GCIR, GHLB e GHIR quanto a deposição de colágeno (coloração vermelha). Os valores representam média \pm EPM de cada grupo. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$ N=7 animais/grupo.

4.13 Expressões cardíacas de mRNAs para ANP, BNP, CPT1 e UCP3

Os resultados da figura 14 demonstram aumento da expressão do RNAm do ANP no GHIR comparado ao GCIR ($P < 0.05$), aumento do RNAm do BNP no GHLB comparado ao GCLB ($P < 0.01$), aumento para o RNAm da CPT1 no GHLB comparado ao GCLB ($P < 0.05$) e redução no GHIR comparado ao GHLB ($P < 0.05$), e finalmente, aumento do RNAm da UCP3 no GCIR comparado ao GCLB ($P < 0.01$) e redução no GHIR comparado ao GCIR ($p < 0.01$).

Figura 14 - Expressão dos genes das enzimas ANP (A), BNP (B), CPT1 (C) e UCP3 (D) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida



Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ quando comparado ao grupo controle. N=6 animais/grupo.

5 DISCUSSÃO

Os resultados de nosso trabalho demonstram que a hiperalimentação exclusivamente durante o período de lactação, desenvolve em camundongos na idade adulta (120 dias) a obesidade visceral, hiperglicemia de jejum, razão peso ventrículo esquerdo/comprimento da tibia aumentada e níveis plasmáticos elevados dos hormônios insulina e leptina (tabela 1). Também, distúrbios fisiológicos, moleculares e gênicos são observados.

O excesso de nutrientes disponível não vem sendo relacionado com eficiência energética uma vez que essa disponibilidade leva ao aumento da demanda mitocondrial, e conseqüentemente da atividade da cadeia transportadora de elétrons, que por sua vez acarreta no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, este excesso de substratos energéticos na obesidade, independente do modelo experimental, também está relacionado com o desenvolvimento do que se chama de estresse do retículo endoplasmático. Tendo em vista que essa organela tem como uma das principais funções controlar e sintetizar proteína, o desenvolvimento do estresse oxidativo em virtude do excesso de EROs levaria a má formação de proteínas (RUPÉREZ et al., 2011; CONCEIÇÃO et al., 2013; CITELLI et al., 2015).

Considerando-se que o estresse oxidativo inicia uma série de comprometimentos nos tecidos e órgãos, atenção especial foi dedicada neste trabalho às mudanças e associações ocasionadas nos camundongos adultos hiperalimentados na lactação, como: alterações na função cardíaca, no consumo de oxigênio mitocondrial e produção de ATP, na biologia molecular, na expressão gênica, no remodelamento cardíaco e no conteúdo de proteínas-chave envolvidas na regulação do metabolismo energético da glicose e dos ácidos graxos. Além disso, estudos anteriores sugerem que, em diferentes células, tecidos e órgãos como o coração, adipócitos, fígado e ilhotas pancreáticas (BRAND & ESTEVES, 2005; LACERDA-MIRANDA et al., 2012; MARTINS et al., 2008), as conseqüências da obesidade geradas pelo método de redução de ninhada têm características diferentes e riscos potenciais. Especificamente no coração, fortes associações têm sido estabelecidas entre a obesidade, a função cardíaca e o aumento do estresse oxidativo.

Portanto, a fim de estudar as implicações da hiperalimentação no desempenho cardiovascular, foram estudados primeiramente os principais parâmetros hemodinâmicos como EDP (pressão diastólica final), Max dP/dt (taxa de aumento da pressão sistólica), Min dP/dt (taxa de aumento da pressão diastólica), Tau (tempo de relaxamento isovolumétrico) e frequência cardíaca (batimentos por minuto) nas condições basais e pós-isquêmica.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos para os parâmetros frequência cardíaca e Tau. Entretanto, foi observado que camundongos hiperalimentados na lactação apresentam modificações na funcionalidade dos miocárdios com a diminuição da EDP no GHLB comparado ao GCLB e aumento no GHIR comparado com GCIR e GHLB enquanto o GCIR apresentou aumento deste parâmetro quando comparado ao GCLB, redução da Max dP/dt no GHIR comparado ao GHLB e aumento da Min dP/dt no GHIR comparado ao GHLB o que também ocorreu para o grupo controle (tabela 2). Esses dados demonstram que o modelo experimental empregado é capaz de alterar a função cardíaca em condições basais, levando ao aumento da sensibilidade as injúrias causadas pela isquemia na reperfusão. Ressalta-se que maior sensibilidade nos cardiomiócitos dos camundongos hiperalimentados foi observada nos parâmetros EDP e Max dP/dt corroborando com estudos recentes que demonstram disfunção mecânica, principalmente diastólica, como consequência da obesidade (RIDER et al., 2013a; RIDER et al., 2013b; HABBOUT et al., 2013; RUPÉREZ et al., 2014).

Resultados semelhantes foram recentemente publicados por outros autores, suportando a hipótese de que camundongos hiperalimentados na lactação, são incapazes de suportar as injúrias causadas pela isquemia. Principalmente devido ao aumento do estresse oxidativo, via redução da atividade das enzimas antioxidantes, e ao dano mitocondrial cardíaco em camundongos jovens, persistindo o quadro até a idade adulta (VINCENT et al., 1999; HABBOUT et al., 2012; WANG et al., 2013; BERNARDO et al., 2015). De fato, e conforme descrito nos resultados, podemos sugerir que o aumento da sensibilidade à isquemia se deve ao aumento da peroxidação lipídica no GHIR comparado ao GCIR. Ou seja, maior degradação, e, portanto, menor capacidade de utilização deste substrato energético, apesar da capacidade aumentada de reduzir a degradação de proteína na condição basal (figura 5).

Estudos sugerem que defeitos no metabolismo mitocondrial cardíaco podem

levar a oxidação de substratos de maneira inadequada, acúmulo de metabólitos lipídicos, precipitados intracelulares, prejuízo na via de sinalização da insulina e subsequente desenvolvimento de resistência à insulina (TURNER, 2014).

Este panorama vai de encontro com o que foi observado nas vias de sinalização e expressão gênica de agentes moduladores da utilização do ácido graxo. Uma vez aumentada a expressão de RNAm da proteína CPT1 no GHLB comparado com o GCLB, sugere-se que os cardiomiócitos de camundongos hiperalimentados apresentam em condição basal o aumento da expressão da CPT1 como um processo compensatório de consumo energético (VIEIRA et al., 2015). Entretanto, na condição pós-isquêmica os cardiomiócitos não conseguem manter este processo apresentando uma redução na expressão desta proteína (figura 14). Visto que a enzima CPT1 tem a função de ativar a β -oxidação dos ácidos graxos, estes dados demonstram a ineficiência dos camundongos hiperalimentados de realizar tal processo posteriormente à isquemia global.

Assim, uma vez que as mitocôndrias são organelas centrais responsáveis pela regulação da produção de energia e morte celular programada (HONDA et al., 2005), este estudo também objetivou investigar a produção de ATP e o acoplamento mitocondrial na oxidação dos substratos carboidrato e ácido graxo, e através do RCR (razão do controle respiratório) observar a relação da hiperalimentação na lactação com as alterações na função cardíaca e a disfunção mitocondrial.

As análises neste trabalho relativas à oxidação dos substratos energéticos em condições basais evidenciam que não há diferença na oxidação de carboidratos entre os grupos controle e hiperalimentado. Porém, o GH apresenta redução na oxidação de ácidos graxos sem diferença na RCR para o mesmo substrato. Logo, na condição basal, os cardiomiócitos dos camundongos hiperalimentados demonstram alterações que comprometem a função mecânica cardíaca (figuras 3 e 4).

De maneira surpreendente, as alterações na oxidação de ambos os substratos continuam evidentes na condição pós-isquêmica. Tanto o grupo controle quanto o hiperalimentado apresentaram redução significativa na oxidação de carboidrato e na RCR quando comparados com a condição basal. Ao passo que o GCIR e o GHIR mantiveram seu padrão de oxidação de ácidos graxos quando comparado aos seus respectivos controles. Entretanto, assim como na condição basal, a oxidação de ácidos graxos no GHIR está reduzida quando comparada ao GCIR (figuras 3 e 4).

Assim sendo, a redução da expressão da CPT1 e a incapacidade de contrabalançar a utilização de substratos, demonstra que a hiperalimentação na lactação torna os cardiomiócitos mais sensíveis a isquemia descompensando o equilíbrio na utilização dos substratos. Tal fato sugere que o estresse oxidativo via aumento da peroxidação lipídica possam estar intimamente relacionados.

Conforme descrito, a obesidade causa mudanças no metabolismo cardíaco capazes de reduzir a eficiência na produção e utilização de ATP. Por sua vez determinam consequências funcionais que estão ligadas ao aumento da taxa de insuficiência cardíaca em indivíduos obesos (RIDER et al., 2013b). Portanto, paralelamente a relação metabólica e hemodinâmica, originalmente se observou neste trabalho a redução na produção de ATP no GHIR comparado aos grupos GCIR e GHLB corroborando com a relação entre o desenvolvimento da obesidade, redução da oxidação mitocondrial e da produção de ATP.

Estudos na literatura suportam a ideia de que a obesidade leva ao aumento dos níveis circulantes de ácidos graxos livres, aumentando por sua vez a oferta para os cardiomiócitos realizar a oxidação dos mesmos. Contudo, gerando efeitos deletérios. Isto aumentaria a taxa de oxidação deste substrato, e conseqüentemente, diminuiria a de carboidrato via inibição da piruvato desidrogenase, resultando no acúmulo intracelular de lactato e prótons. Juntamente com o que já foi discutido, esta hipótese é corroborada por dados da literatura que relacionam o excesso de substrato com o aumento do estresse oxidativo nos órgãos (RUPEREZ et al., 2014).

Por sua vez, o acúmulo de lactato, prótons e EROs levam ao comprometimento da função cardíaca principalmente em situação pós-isquêmica. Para reduzir o comprometimento da função mecânica é sugerido a diminuição da oxidação de ácidos graxos e aumento da oxidação de carboidrato (STANLEY et al., 1997; MAARMAN et al., 2012). Assim sendo, os resultados deste trabalho demonstram a incapacidade do GH realizar esse balanço uma vez que apresenta redução da oxidação para ambos os substratos (figura 3).

Outra proposta para relacionar as alterações da função cardíaca com o metabolismo energético dos ácidos graxos na hiperalimentação na lactação, é a eficácia do funcionamento da via de sinalização envolvendo este substrato energético. Como, por exemplo, proteínas envolvidas na via de sinalização dos ácidos graxos como a CD36, tida como uma proteína integral de membrana com a função de translocar ácido graxo e, a FABP, um transportador de ácido graxo

facilitador de entrada deste substrato entre os meios extra e intracelular (MAKOWSKI & HOTAMISLIGIL, 2004).

Resultados deste trabalho demonstram que o GHIR apresenta redução do conteúdo de FABP e CD36 comparado ao GCIR e redução de FABP comparado ao GHLB. Sendo assim, estes dados indicam que os cardiomiócitos dos animais hiperalimentados apresentam redução da β -oxidação na reperfusão em virtude da menor capacidade de captação de ácidos graxos para serem utilizados pela mitocôndria na produção de ATP.

Segundo a literatura, o translocador CD36 encontra-se aumentado via AMPK em condição pós-isquêmica para compensar a disponibilidade de substrato energético, neste caso ácido graxo. Uma vez que o conteúdo deste translocador e da AMPK está reduzido no GHIR, comparado ao GCIR, sugere-se menor capacidade dos cardiomiócitos em realizar um efeito compensatório para manter as condições fisiológicas dos cardiomiócitos sem sobrecarga (TURNER, 2014) (figura 9).

A razão do controle respiratório (RCR) tem como objetivo avaliar a eficiência do acoplamento da fosforilação oxidativa, processo este decorrente da ação de proteínas desacopladoras que são consideradas importantes por alguns autores pelo fato de serem negligenciadas na fisiologia dos cardiomiócitos (GNAIGER, 2014).

Por exemplo, as proteínas desacopladoras UCP2 e UCP3, funcionam de acordo com a emissão de espécies reativas de oxigênio (EROs) via feedback negativo na tentativa de neutralizar o acúmulo de EROs na mitocôndria, não somente as inerentes a produção de ATP, mas aquelas decorrentes da alta atividade da cadeia transportadora de elétrons em virtude do aumento de fornecimento de substratos (KARL et al., 2008). Assim sendo, nosso estudo observou uma redução da expressão do RNAm da UCP3 no GHIR comparado ao GCIR, corroborando com a associação da UCP3 ao desacoplamento mitocondrial cardíaco em situação de reperfusão. Ao mesmo tempo, o GCIR apresentou aumento da expressão de UCP3 quando comparado ao GCLB. Neste caso, a elevada expressão do RNAm de UCP3 sugere aumento do desacoplamento no sentido de ampliação da capacidade de balancear o acúmulo de EROs inerentes ao processo de produção de ATP, e ao mesmo tempo, prejudiciais para a estrutura mitocondrial. Logo, estes dados ajudam a esclarecer a hipótese da função cardioprotetora das

proteínas desacopladoras. Assim, a redução da expressão da UCP3 nos cardiomiócitos do GHIR indica que animais hiperalimentados apresentam redução da cardioproteção pós-isquêmica também via UCP3 demonstrando uma maior sensibilidade à isquemia por disparidade nessa via gênica (BRAND & ESTEVES, 2005; LASKOWSKI & RUSSELL, 2008).

Uma vez que os animais hiperalimentados na lactação apresentam hiperinsulinemia, a redução da expressão da UCP3 pode estar relacionada com o aumento da insulina plasmática. Yang e colaboradores (2012) demonstraram que a expressão das proteínas UCP2 e UCP3 encontram-se reduzidas em células musculares tratadas com insulina. Logo, a hiperinsulinemia dos camundongos hiperalimentados pode estar relacionada com a disfunção mitocondrial via aumento do desacoplamento.

Outra explicação para essa relação da redução da expressão da UCP3 e menor cardioproteção é observada no estudo de Perrino e colaboradores (2013), onde a deleção genética da UCP3 promove disfunção mitocondrial, aumento da produção de EROs e morte celular por apoptose em condições de baixo fornecimento de oxigênio, como no processo de isquemia. Como consequência da baixa oxigenação há o aumento do tamanho da área infartada acelerando, assim, as injúrias cardíacas.

Estes resultados sugerem que camundongos obesos apresentam disfunção mitocondrial por aumento do desacoplamento e redução da utilização de substratos energéticos, fato este diretamente associado à capacidade de contração dos cardiomiócitos dependente de ATP.

A proteína quinase B (AKT) e suas isoformas Akt1/PKB α , Akt2/PKB β e Akt3/PKB γ têm sido descritas como proteínas chave na sinalização de sobrevivência celular, uma vez que, o complexo PI3K-AKT-eNOS resulta em uma modulação metabólica e proteção cardiovascular. Este papel pode estar associado aos complexos eventos de proteção cardiovascular, principalmente, por meio de ações anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e anti-estresse oxidativo (QIUJUN et al., 2011; WANG et al., 2013). Neste estudo o GH, apresentou alterações na via de sinalização de insulina, como aumento do conteúdo do IR β , e redução da SIRT1 e pAKT1 na linha de base, quando comparado ao GC. Na condição pós-isquêmica, redução da pAKT1, AKT2, AMPK e SIRT1 e aumento do IRS1 e pAKT2 (figuras 8, 9 e 10). Tais resultados sugerem que o coração de camundongos hiperalimentados na lactação é

mais suscetível a danos em ambas as condições, basal e de reperfusão, por meio de alterações na via de sinalização da insulina, indicando desta forma, uma possível resistência a este hormônio (MARTINS et al., 2008).

Uma vez que a AMPK está envolvida na redução da oxidação dos ácidos graxos, quando apresenta-se na sua forma ativa (fosforilada) e com o aumento do recrutamento de glicose via ativação da translocação do GLUT4, na sinalização da morte celular programada nos cardiomiócitos (em condição basal) e aumento da β -oxidação na condição pós-isquêmica na tentativa de recrutar o substrato energético, o aumento do conteúdo desta proteína seria relevante para a sobrevivência das células, entretanto esta função está associada a sua forma ativa fosforilada. Uma vez que o GHIR apresenta redução da AMPK comparado ao GCIR e, da fosforilação comparado ao GHLB e o GC apresenta aumento da AMPK e igual fosforilação em ambas as condições, se sugere menor eficiência no controle energético tanto para a via de insulina como para o controle da oxidação de ácidos graxos (LASKOWSKI & RUSSEL, 2008; YOUNG, 2008; YU et al., 2011). Ressalta-se que a oxidação de ácidos graxos do GHLB e GHIR está reduzida comparada aos respectivos GC.

O aumento do conteúdo do receptor de insulina indica um mecanismo compensatório para regularizar a via de sinalização. Entretanto, o panorama de alterações se sobrepõe a essa tentativa, visto que ainda na condição basal a redução da pAKT1 (isoforma relacionada ao remodelamento cardíaco) e da SIRT1, relacionada com resistência à insulina via aumento da PTP1B que por sua vez desfosforila o receptor de insulina e substratos, indicam a ineficiência no controle da via e consequente utilização do substrato.

Para além dessa relação da SIRT1 com a via de sinalização da insulina, ela participa do reparo do DNA, da regulação do metabolismo em condições de baixo fornecimento calórico (como no processo de isquemia/reperfusão), previne apoptose, regula a transcrição e aumenta a tolerância ao estresse oxidativo em cardiomiócitos (ADAM et al., 2013). Uma vez que o GH na condição basal e pós-isquêmica apresenta redução do conteúdo da SIRT1 comparado ao GC, reforça o efeito negativo da programação metabólica no início da vida nos cardiomiócitos capaz de permanecer na idade adulta.

Na condição pós-isquêmica, estas alterações na condição basal levaram ao aumento do IRS1, PTP1B, pAKT 2 e STAT3 α , e redução da pAKT 1 e pSTAT3 α . Ou seja, há um desequilíbrio na fosforilação do receptor de insulina via PTP1B, no

controle do remodelamento cardíaco via pAKT1 e pSTAT3 α , e simultaneamente, uma tentativa compensatória via aumento da pAKT2 que regula o metabolismo da glicose (figuras 7,8,9 e 12).

O aumento do IRS1 no GHIR comparado ao GCIR e GHLB, assim como, aumento da PTP1B comparado ao GHLB é sugestivo para um processo compensatório dos animais hiperalimentados, aumentando o substrato do receptor de insulina, entretanto sem efeitos esperados em virtude do aumento do conteúdo da PTP1B que desfosforila o substrato e o receptor de insulina, diminuindo a eficácia da sinalização. Este dado corrobora com o trabalho do nosso grupo que demonstrou resistência à insulina nos cardiomiócitos de animais hiperalimentados via PTP1B aos 150 dias de vida (MARTINS et al., 2008).

Apesar do complexo enzimático fosfatidilinositol 3 quinase - proteína quinase B (PI3K-AKT) apresentar função protetora via redução da abertura dos poros de permeabilidade mitocondrial, mediação do metabolismo da glicose, e de diversos mecanismos celulares como crescimento, proliferação e mecanismos de sobrevivência, não observamos diferença significativa no conteúdo da PI3K na linha de base e na isquemia/reperfusão (TANIYAMA, 2005; YU et al., 2011; RAY et al., 2012).

Também não foi observada diferença significativa no conteúdo da PGC1 α em ambas as condições estudadas. Assim, apesar da função de regular a biogênese mitocondrial, e conseqüentemente, a oxidação dos ácidos graxos, não observamos relação entre essa proteína e o metabolismo energético nos grupos analisados (RUPÉREZ et al., 2014).

Dado que a STAT3, é fundamental para a homeostase fisiológica e o remodelamento cardíaco em uma situação de estresse celular, uma vez que o desequilíbrio na expressão, no conteúdo e/ou nas modificações pós-tradução da STAT3 podem induzir a cardiomiopatia dilatada e o remodelamento adverso após um infarto do miocárdio, o aumento da STAT3 α no GHIR comparado ao GCIR e redução da sua fosforilação no GHIR comparado ao GHLB, evidenciam o papel desta proteína nos cardiomiócitos de animais programados metabolicamente. Ou seja, esta redução da fosforilação reforça os dados referentes à ocorrência de remodelamento cardíaco pós isquemia global (DAS et al., 2015; JIANG et al., 2015). Ao mesmo tempo, estes dados nos levam a sugerir que a isoforma α , e não a β , é a envolvida no remodelamento cardíaco deste modelo experimental, uma vez que não

foram observadas diferenças significativas inter e intragrupos para o conteúdo e fosforilação da STAT3 β (figura 12).

Mendes e colaboradores (2010) descreveram que, o remodelamento cardíaco ocorre em consequência de mecanismos genéticos, moleculares e celulares que podem vir a ocorrer como um mecanismo compensatório e adaptativo para manter as funções cardíacas basais mediante a oferta dos substratos energéticos. O remodelamento cardíaco também pode ser mediado pelas enzimas metaloproteinases de matriz, regulando a degradação de colágeno e o desenvolvimento de fibrose.

No presente estudo, os resultados demonstram a relação das alterações dos parâmetros hemodinâmicos com as alterações histológicas via aumento gradativo da deposição de colágeno (figura 13), corroborando com o estudo de Habbout e colaboradores (2013). Alterações moleculares também são observadas, como o aumento do colágeno 3 na condição basal no GH comparado ao GC e da normalização do conteúdo de colágeno 1 nas condições basal e pós-isquêmica (figura 11). Ou seja, uma vez que o aumento de colágeno cardíaco está associado com a redução da capacidade contrátil dos cardiomiócitos, sugere-se que as alterações nos parâmetros EDP, Max dP/dt e Min dP/dt estão diretamente relacionadas com o aumento de colágeno 3. Ao mesmo tempo, em virtude das diferentes funções dos colágenos 1 e 3, o colágeno 3 teria maior participação na perda da capacidade contrátil já na condição basal, uma vez que a mudança para o excesso de síntese de colágeno 3 está associada com o desenvolvimento da rigidez e dilatação cardíaca (COLLIER et al., 2012). Essa perda da função contrátil se soma ao resultado da expressão gênica dos marcadores de hipertrofia cardíaca ANP e BNP que se encontram aumentados na condição pós-isquêmica e basal, respectivamente, ao comparar o GC com o GH. Assim sendo, as alterações hemodinâmicas, o aumento dos marcadores de hipertrofia e da deposição e conteúdo de colágeno, levam a caracterizar o coração dos animais hiperalimentados como um coração hipertrofiado, corroborando com estudos experimentais deste modelo (HABBOU et al., 2013).

Estudos experimentais e clínicos relatam a forte relação entre a obesidade, a resistência à insulina e o aumento do estresse oxidativo hepático e plasmático (CONCEIÇÃO et al., 2013; PIRGON et al., 2013). Assim como no coração, o aumento da peroxidação lipídica e formação de carbonila associado à redução da

atividade das enzimas antioxidantes (SOD, GPX e catalase), sugerem a ocorrência de estresse oxidativo e consequente comprometimento das funções basais das células, tecidos e órgãos. Especificamente no modelo de hiperalimentação na lactação, foi observado recentemente em ratos aos 6 meses de vida o aumento do composto malondialdeídos e redução da atividade das enzimas antioxidantes, tanto no fígado como no plasma. Entretanto, sem alterações na formação de carbonila no fígado. No presente trabalho não se observou diferença significativa na peroxidação lipídica (figura 5), porém houve aumento da carbonilação de proteína tanto no fígado como no plasma dos camundongos. Resultado contrário foi relatado por Conceição e colaboradores (2013b) em ratos *Wistar* aos 180 dias de vida, sugerindo que neste modelo experimental de hiperalimentação na lactação ocorre primeiramente um dano estrutural com aumento da formação de carbonila. Tardiamente, comprometeria a manutenção do substrato lipídico hepático e plasmático mesmo este estando em níveis elevados, característico da obesidade. Ressalta-se que, tanto em camundongos *Swiss*, estudados neste trabalho, como nos ratos *Wistar* foi observado a resistência à insulina, sugerindo uma relação entre tal resistência com o desenvolvimento do estresse oxidativo no coração, fígado e plasma.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e apresentados, concluímos que a hiperalimentação da lactação gera consequências prejudiciais em longo prazo, uma vez que, este trabalho demonstra que na idade adulta os animais hiperalimentados apresentaram alterações acentuadas nos parâmetros biométricos e bioquímicos, do mesmo modo que, na função cardíaca e no remodelamento cardíaco em virtude das modificações na respiração mitocondrial e oxidação dos substratos energéticos carboidrato e ácidos graxos, nas vias de sinalização que abrangem estes substratos, no estresse oxidativo, na produção de ATP e expressão gênica os quais em conjunto induziram o aumento a sensibilidade a isquemia cardíaca e redução expressiva da cardioproteção nos animais hiperalimentados.

REFERÊNCIAS

ADAIKIRK T L & SENIOR RM. Fragments of Extracellular Matrix as Mediators of Inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.40, n.7, p.11011110, 2008.

ADAM T, SHARP S, OPIE LH, LECOUR S. Loss of cardioprotection with ischemic preconditioning in aging hearts: role of sirtuin 1? *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 18(1):46-53. 2013

AMBROSIO G, ZWEIER JL, FLAHERTY JT. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.*, v. 23, p. 1359– 74. 1991.

ARMITAGE JA, TAYLOR PD, POSTON L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol.*, v. 565 (Pt 1), p. 3–8. 2005.

BERNARDO AF, CORTEZ E, NEVES FA, VIEIRA AKG, SOARES VM, RODRIGUES CUNHA ACS, ANDRADE DC, THOLE A, CABRAL-COSTA DG, BRUM PC, MOURA AS, SOUZA EPG. Overnutrition during lactation leads to impairment in insulin signaling, upregulation of GLUT1 and increased mitochondrial carbohydrate oxidation in heart of weaned mice. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 2863, p. 272-277. 2015

BHOPAL RS, RAFNSSON SB. 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.1072-81. 2009.

BIENENGRAEBER M, OZCAN C, TERZIC A. Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line. *J Mol Cell Cardiol.* v.35, p.861–865.2003.

BODYAK N, RIGOR DL, CHEN YS, HAN Y, BISPING E, PU WT, KANG PM. Uncoupling Protein-2 Modulates Cell Viability in Adult Rat Cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v.293, n.1, p.H829-35. 2007.

BRAND MD, ESTEVES TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.*, v. 2, n.2, p. 85-93. 2005.

BROADLEY KJ. The Langendorff heart preparation—Reappraisal of its role as a research and teaching model for coronary vasoactive drugs. *Journal of Pharmacological Methods.* v.2, p.143-156. 1979.

CABIATI M, RAUCCI S, LIISTRO T, BELCASTRO E, PRESCIMONE T, CASELLI C, MATTEUCCI M, IOZZO P, MATTII L, GIANNESI D, DEL RY S. Impact of obesity on the expression profile of natriuretic peptide system in a rat experimental model. *PLoS One* 8(8): e72959. 2013

CITELLI M, FONTE-FARIA T, NASCIMENTO-SILVA V, RENOVATO-MARTINS M, SILVA R, LUNA AS, SILVA SV, BARJA-FIDALGO C. Obesity promotes alterations in iron recycling. *Nutrients*. 7(1):335-48. 2015

COLLIER P, WATSON CJ, VAN ES MH, PHELAN D, MCGORRIAN C, TOLAN M, LEDWIDGE MT, MCDONALD KM, BAUGH JA. Getting to the heart of cardiac remodeling; how collagen subtypes may contribute to phenotype. *J Mol Cell Cardiol*. 52(1):148-53. 2012

CONCEIÇÃO EP, MOURA EG, TREVENZOLI IH, PEIXOTO-SILVA N, PINHEIRO CR, YOUNES-RAPOZO V, OLIVEIRA E & LISBOA PC (2013a). Neonatal overfeeding causes higher adrenal catecholamine content and basal secretion and liver dysfunction in adult rats. *Eur J Nutr* 52, 1393–1404.

CONCEIÇÃO EP, FRANCO JG, OLIVEIRA E, RESENDE AC, AMARAL TA, PEIXOTO-SILVA N, PASSOS MC, MOURA EG, LISBOA PC. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance. *J Nutr Biochem.*, v.24, n.1, p.81-7. 2013b.

CORTESE, JD; VOGLINO, AL; HACKENBROCK, CR. Ionic strength of the intermembrane space of intact mitochondria as estimated with fluorescein-BSA delivered by low pH fusion. *J Cell Biol.*, v.113, n.6, p.1331-40.1991.

CUNHA AC, PEREIRA RO, PEREIRA MJ, SOARES VDE M, MARTINS MR, TEIXEIRA MT, SOUZA EP, MOURA AS. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem.*, v.20, p.435–42. 2009.

DAS A, SALLOUM FN, FILIPPONE SM, DURRANT DE, ROKOSH G, BOLLI R, KUKREJA RC. Inhibition of mammalian target of rapamycin protects against reperfusion injury in diabetic heart through STAT3 signaling. *Basic Res Cardiol*, 110(3):31. 2015

DHALLA NS, ELMOSELHI AB, HATA T, MAKINO N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 47: 446-456, 2000.

DIAZ, F; MORAES, CT. Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium.*, v.44, p. 24–35. 2008.

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, p.213–21.1994.

DU TOIT EF, SMITH W, MULLER C, STRIJDOM H, STOUTHAMMER B, WOODIWISS AJ, NORTON GR, LOCHNER A. Myocardial susceptibility to ischemic-reperfusion injury in a prediabetic model of dietary-induced obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v.294, n.5, p.H2336-43. 2008.

- GEURTS N, OPDENAKKER G, VAN DEN STEEN PE. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in protozoan parasitic infections. *Pharmacology & Therapeutics*, v.133, n.3, p.257279, 2011.
- GIORGIO M, TRINEI M, MIGLIACCIO E, PELICCI PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(9):722-8. 2007.
- GNAIGER E. Mitochondrial pathways and respiratory control. An introduction to OXPHOS analysis. 4th ed. *Mitochondrial Physiology Network* 19.12. OROBOROS MiPNet Publications, Innsbruck. 2014
- GNAIGER E. Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int J Biochem Cell Biol.*, v.41, p.1837-1845. 2009.
- HABBOU A, GUENANCIA C, LORIN J, RIGAL E, FASSOT C, ROCHETTE L, VERGELY C. Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters. *PLoS one.*, v.8, n.2, p.e56981.2013a.
- HABBOU A, DELEMASURE S, GOIRAND F, GUILLAND JC, CHABOD F, SEDIKI M, ROCHETTE L, VERGELY C. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie.*, v.94, p.117–24. 2012.
- 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.553-62. 2013b.
- HAGHIKIA A, RICKE-HOCH M, STAPEL B, GORST I, HILFIKER-KLEINER D. STAT3, a key regulator of cell-to-cell communication in the heart. *Cardiovasc Res.*, 1;102(2):281-9. 2014.
- HAHN, P. Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. *J Nutr.*, v.114, n.7, p.1231-4. 1984.
- HALESTRAP AP, CLARKE SJ, JAVADOV SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.*, v.61, n.3, p.372-85. 2004.
- HERS I, VINCENT EE, TAVARÉ JM. Akt signalling in health and disease. *Cell Signal*. 23(10):1515-27,2011
- HOERTER J, GONZALEZ-BARROSO MD, COUPLAN E, MATEO P, GELLY C, CASSARD-DOULCIER AM, DIOLEZ P, BOUILLAUD F. Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation.*, v.110, p.528–533. 2004.

HONDA HM, KORGE P, WEISS JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci.*, n. 1047, p.248-258, 2005.

IACOBELLIS G. Local and systemic effects of the multifaceted epicardial adipose tissue depot. *Nat Rev Endocrinol.* 11(6):363-71. 2015

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

ISHIDA Y, MEISNER JS, TSUJIOKA K, GALLO JI, YORAN C, FRATER RW, YELLIN EL. Left ventricular filling dynamics: influence of left ventricular relaxation and left atrial pressure. *Circulation.*, v.74, p.187-196. 1986.

JAMES WPT, RIGBY N, LEACH R. Obesity and the Metabolic Syndrome. *Annals of the New York Academy of Sciences.* v.1083, p. 1–10. 2006.

JIANG X, GUO CX, ZENG XJ, LI HH, CHEN BX, DU FH. A soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits myocardial apoptosis induced by ischemia/reperfusion via the JAK2/STAT3 pathway. *Apoptosis.* 20(8):1033-47. 2015

KUDO N, BARR AJ, BARR RL, DESAI S, LOPASCHUK GD. 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.17513-20.1995.

LACERDA-MIRANDA G, SOARES VM, VIEIRA AK, LESSA JG, RODRIGUES-CUNHA AC, CORTEZ E, GARCIA-SOUZA EP, MOURA AS. Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice. *Peptides.* v.35, n.1, p.65-73. 2012.

LASKOWSKI KR; RUSSELL RR. Uncoupling Proteins in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep.*, v. 5, n.2, p.75-79. 2008.

LESNEFSKY EJ, MOGHADDAS S, TANDLER B, KERNER J, HOPPEL CL. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia-- reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.*, v.33, n.6, p.1065-89. 2001.

LEVY RB; CLARO RM. Distribuição regional e socioeconômica da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil em 2008-2009. *Revista de Saúde Pública.* v. 46, p. 06-15. 2012.

LIMA NS, MOURA EG, FRANCO JG, PINHEIRO CR, PAZOS-MOURA CC, CABANELAS A, CARLOS AS, NASCIMENTO-SABA CC, DE OLIVEIRA E, LISBOA PC. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res.* v.45, n.1, p.22-30. 2013.

LÓPEZ SALAZAR B, RAVASSA ALBÉNIZ S, ARIAS GUEDÓN T, GONZÁLEZ MIQUEO A, QUEREJETA R, DÍEZ MARTÍNEZ J. Altered fibrillar collagen metabolism in hypertensive heart failure. Current understanding and future prospects. *Rev Esp Cardiol.* 59(10):1047-57. 2006

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.*, v.156, p.38-50. 1991.

MAARMAN G, MARAIS E, LOCHNER A, DU TOIT EF. Effect of chronic CPT-1 inhibition on myocardial ischemia-reperfusion injury (I/R) in a model of diet-induced obesity. *Cardiovasc Drugs Ther.*, v.26, n.3, p.205-16. 2012.

MAKOWSKI L, HOTAMISLIGIL GS. Fatty acid binding proteins--the evolutionary crossroads of inflammatory and metabolic responses. *J Nutr.* 134(9):2464S-2468S, 2004.

MANDAVIA CH, PULAKAT L, DEMARCO V, SOWERS JR. Over-nutrition and Metabolic Cardiomyopathy. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 61(9), 1205–1210. 2012

MARCHINGTON JM, MATTACKS CA, POND CM. Adipose tissue in the mammalian heart and pericardium: structure, fetal development and biochemical properties. *Comp Biochem Physiol B.* 94(2):225-32. 1989

MARTINS MR, VIEIRA AK, DE SOUZA EP, MOURA AS. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *J Endocrinol.*, v.198, p.591–8. 2008.

MATEJÍKOVÁ J, KUCHARSKÁ J, PINTÉROVÁ M, PANCZA D, RAVINGEROVÁ T. Protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction conferred by preconditioning in the rat heart: involvement of mitochondrial K(ATP) channels and reactive oxygen species. *Physiol Res.* 58(1):9-19. 2009

MCCANCE, RA. Food, growth, and time. *Lancet.*, v.2, p.671-6.1962.

MENDES ODE C, CAMPOS DH, DAMATTO RL, SUGIZAKI MM, PADOVANI CR, OKOSHI K, CICOGNA AC. Cardiac remodeling: serial analysis and indexes for early detection of ventricular dysfunction. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.94, n.1, p.5966, 2010.

MESSERLI FH, KETELHUT R. Left ventricular hypertrophy: a pressure-independent cardiovascular risk factor. *J Cardiopulm Pharm.*, v.22, n.1, p. S7 ± S13. 1993.

MONTEIRO P, OLIVEIRA PJ, GONÇALVES L. Mitocôndrias: que papel na isquémia, Reperusão e morte celular?. *Rev Port Cardiol.*, v.22, p.233-254. 2003.

MOREIRA AS, TEIXEIRA M, DA SILVEIRA OSSO F, PEREIRA RO, DE OLIVEIRA SILVA-JUNIOR G, GARCIA DE SOUZA EP, MANDARIM DE LACERDA CA, MOURA AS. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, v.19, n.11, p.805-10. 2009.

MORRISON JA, FRIEDMAN LA, WANG P, GLUECK CJ. Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. *J Pediatr.*, v.152, p.201– 6. 2008.

- NAKAMURA K, KUSANO KF, 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.
- OGDEN CL, YANOVSKI SZ, CARROLL MD, FLEGAL KM. The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterology.* v.132, n.6, p. 2087-2102. 2007.
- OLIVEIRA LPM. Alimentação complementar nos primeiros dois anos de vida. *Revista de Nutrição. Campinas.* v. 18, n.4, p. 459-469. 2005.
- OZANNE SE, HALES CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc.*, v.58, n.3, p.615-9.1999.
- PATEL, MS; Srinivasan, M. Metabolic programming: causes and consequences. *J Biol Chem.*, v.277, n.3, p.1629-32. 2002.
- PEREIRA RO, MOREIRA AS, DE CARVALHO L, MOURA AS. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rat's hearts. *Regul Pept.*, v.136, p.117–21. 2006.
- PERRINO C, SCHIATTARELLA GG, SANNINO A, PIRONTI G, PETRETTA MP, CANNAVO A, GARGIULO G, ILARDI F, MAGLIULO F, FRANZONE A, CAROTENUTO G, SERINO F, ALTOBELLI GG, CIMINI V, CUOCOLO A, LOMBARDI A, GOGLIA F, INDOLFI C, TRIMARCO B, ESPOSITO G. Genetic deletion of uncoupling protein 3 exaggerates apoptotic cell death in the ischemic heart leading to heart failure. *J Am Heart Assoc.* 20;2(3):e000086. 2013
- 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.154-8. 1992.
- POLYAKOVA V, LOEFFLER I, HEIN S, MIYAGAWA S, PIOTROWSKA I, DAMMER S, RISTELI J, SCHAPER J, KOSTIN S. Fibrosis in endstage human heart failure: Severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles. *Int. J. Cardiol.*, v.151, n.1, p.1833, 2010.
- RAY PD, HUANG BW, TSUJI Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.*, v.24, n.5, p.981-90. 2012.
- RIDER OJ, COX P, TYLER D, CLARKE K, NEUBAUER S. Myocardial substrate metabolism in obesity. *Int J Obes (Lond).* 37(7):972-9. 2013b
- RIDER OJ, FRANCIS JM, TYLER D, BYRNE J, CLARKE K, NEUBAUER S. Effects of weight loss on myocardial energetics and diastolic function in obesity. *Int J Cardiovasc Imaging.* 29(5):1043-50. 2013a
- RODRIGUES AL, DE MOURA EG, PASSOS MC, TREVENZOLI IH, DA CONCEIÇÃO EP, BONONO IT, NETO JF & LISBOA PC. Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem* 22, 109–117. 2011

RUBATTU S, SCIARRETTA S, VALENTI V, STANZIONE R, VOLPE M. Natriuretic peptides: an update on bioactivity, potential therapeutic use and implication in cardiovascular diseases. *Am J Hypertens* 21: 733-774. 2008

RUPÉREZ AI, GIL A, AGUILERA CM. Genetics of Oxidative Stress in Obesity. *Int J Mol Sci.* 15(2): 3118–3144. 2014

SACK MN. Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovascular Research.*, v.72, p.210–219. 2006.

SALT I, CELLER JW, HAWLEY SA, PRESCOTT A, WOODS A, CARLING D, HARDIE DG. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *J. Biochem.* v.334, p.177–187. 1998.

SAM F, KERSTETTER DL, PIMENTAL DR, MULUKUTLA S, TABAEE A, BRISTOW MR, COLUCCI WS, SAWYER DB. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail.*, v.11, p.473–480. 2005.

SCHMIDT I, FRITZ A, SCHÖLCH C, SCHNEIDER D, SIMON E, PLAGEMANN A. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v.25, n.8, p.1168-74. 2001.

SCHNEIDER C D, OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte.* v. 10, n. 4, p. 308-313. 2004.

SHATTOCK MJ, HADDOCK PS. Oxidant stress and the heart: modulation of ion transport mechanisms during ischaemia and reperfusion. In: Black D, Winyard PG, editors. *Immunopharmacology of Free Radical Species.* London, UK: Academic Press Ltd. pp. 65–72. 1995

SHIN JA, LEE JH, LIM SY, HA HS, KWON HS, PARK YM, LEEWC, KANG MI, YIM HW, YOON KH & SON HY. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness. *J Diabetes Investig* 8, 334–343. 2013

SICHERI, R. *Epidemiologia da Obesidade.* Rio de Janeiro: EDUERJ, 1998.

STANLEY PE, WILLIAMS SG. Use of the liquid scintillation spectrometer for determining adenosine triphosphate by the luciferase enzyme. *Anal Biochem,* 29(3):381-92.1969

STANLEY WC, LOPASCHUK GD, MCCORMACK JG. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovasc Research.* 34:25–33. 1997

STETTLER N, STALLINGS VA, TROXEL AB, ZHAO J, SCHINNAR R, NELSON SE, ZIEGLER EE, STROM BL. 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, p.1897–903. 2005.

TANIYAMA Y, ITO M, SATO K, KUESTER C, VEIT K, TREMP G, LIAO R, COLUCCI WS, IVASHCHENKO Y, WALSH K, SHIOJIMA I. Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 38(2):375-85, 2005.

TURNER N, COONEY GJ, KRAEGEN EW, BRUCE CR. Fatty acid metabolism, energy expenditure and insulin resistance in muscle. *J Endocrinol.* 220(2):T61-79, 2014.

TURRENS JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 15;552(Pt 2):335-44. 2003

VENARDOS KM, PERKINS A, HEADRICK J, KAYE DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem.*;14(14):1539-49. 2007

VERGELY C, MAUPOIL V, BENDERITTER M, ROCHETTE L. Influence of the severity of myocardial ischemia on the intensity of ascorbyl free radical release and on post-ischemic recovery during reperfusion. *Free Radic Biol Med.*, v.24, p.470–9. 1998.

VERGELY C, TABARD A, MAUPOIL V, ROCHETTE L. Isolated perfused rat hearts release secondary free radicals during ischemia reperfusion injury. Cardiovascular effect of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *Free Radic Res.*, v.35, p.475–89. 2001.

VINCENT HK, POWERS SK, DIRKS AJ, SCARPACE PJ. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v.25, n.3, p.378-88. 2001.

VINCENT HK, POWERS SK, STEWART DJ, SHANELY RA, DEMIREL H, NAITO H. Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. *Int J Obes Relat Metab Disord.* Jan;23(1):67-74. 1999

MESSERLI FH, NUNEZ BD, VENTURA HO, SNYDER DW. Overweight and sudden death: increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch Intern Med.*, v.147, p.1725 ± 1728.1987.

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

WANG CH, WU SB, WU YT, WEI YH. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: Implication in the pathophysiology of aging. v.238, n.5, p.450-60. 2013.

WEISS JL, FREDERIKSEN JW, WEISFELT ML. Hemodynamic determinants of the time-course of fall in canine left ventricular pressure. *J Clin Invest.*, v.58, p. 751. 1976.

YANG C, AYE CC, 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.*;32(5):465-78, 2012.

YOUNG LH, RENFU Y, RUSSELL R, HU X, CAPLAN M, REN J, SHULMAN GI, SINUSAS AJ. Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation.* v.95, p.415–422. 1997.

YOUNG, LH. AMP-activated protein kinase conducts the ischemic stress response orchestra. *Circulation.* v.117, n.6, p.832-40. 2008.

YU Q, GAO F, MA, XL. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.*, v.89, n.3, p.516-524. 2011.

ZHENG LY, ZHANG MH, XUE JH, LI Y, NAN Y, LI MJ, WANG J, DU XP. Effect of angiotensin II on STAT3 mediated atrial structural remodeling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 18(16):2365-77. 2014