



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

Vivian de Melo Soares dos Santos

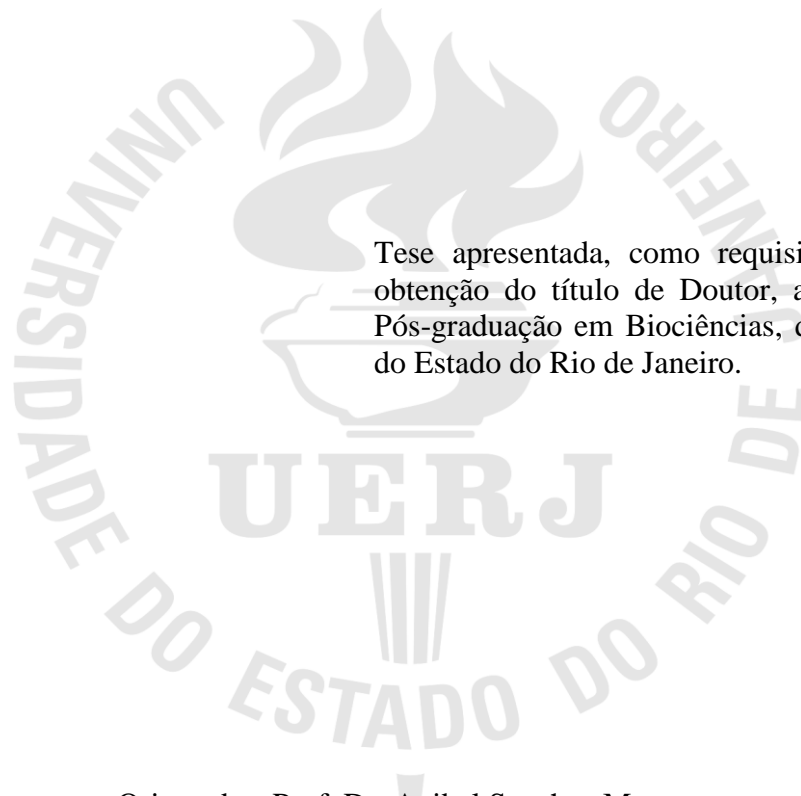
**Ação da grelina acilada sobre o metabolismo energético no tecido adiposo  
branco de camundongos jovens e adultos hiperalimentados no início da vida**

Rio de Janeiro

2016

Vivian de Melo Soares dos Santos

**Ação da grelina acilada sobre o metabolismo energético no tecido adiposo branco de camundongos jovens e adultos hiperalimentados no início da vida**



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

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

Rio de Janeiro

2016

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

S237 Santos, Vivian de Melo Soares dos.  
Ação da grelina acilada sobre o metabolismo energético no tecido adiposo branco de camundongos jovens e adultos hiperalimentados no início da vida / Vivian de Melo Soares dos. – 2016.  
108 f.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza

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

1. Grelina– Teses. 2. Obesidade - Teses. 3. Metabolismo energético - Teses. 4. Tecido adiposo- Tese. I. Moura, Aníbal Sanchez. II. Souza, Érica Patrícia Garcia de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-056.52

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira  
CRB7/6382

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

---

Assinatura

---

Data

Vivian de Melo Soares dos Santos

**Ação da grelina acilada sobre o metabolismo energético no tecido adiposo branco de camundongos jovens e adultos hiperalimentados no início da vida**

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 12 de dezembro de 2016.

Coorientadora:

---

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

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

---

Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Elaine de Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Karen de Jesus Oliveira

Universidade Federal Fluminense

---

Prof. Dr Gilson Teles Boaventura

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2016

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João Batista Soares e Márcia Soares, por todo apoio, incentivo e amor incondicional ao longo desses anos. Vocês são o meu alicerce. Ao meu marido Carlos Eduardo, pela compreensão e carinho. Você é um presente de Deus. À minha amada filha Emilia, só Deus sabe a força e alegria que sua chegada trouxe em minha vida. Aos meus irmãos Renan e Maysa, vocês são especiais em minha vida. Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois até aqui o Senhor me ajudou, renovou as minhas forças e me permitiu seguir em frente, pois quando mais temi, Ele me sustentou em suas mãos.

Ao Programa de pós-graduação em Biociências pela oportunidade de ingresso no Doutorado.

Ao meus mestres e orientadores, Prof. Dr. Anibal Moura e Profa. Dra. Érica Garcia, agradeço pela oportunidade de fazer parte desta equipe e pelo crescimento profissional que me foi concedida ao longo desses dez anos de LFND. Agradeço pela compreensão da minha ausência e por me darem força para vencer a minha batalha, pois o apoio de vocês durante meu tratamento foi fundamental. Agradeço especialmente a Profa. Dra. Érica Garcia, você foi essencial para o meu crescimento pessoal e profissional. Te agradeço pelas broncas, elogios e exigência, pois foram de extrema importância para o meu amadurecimento.

Às minhas companheiras e amigas de laboratório Fabiana Alves Neves, Amélia Faustino Bernado, Anátalia Kutianski, Glauciane Lacerda, Patrícia Pacheco, Roberta Guedes e Tayanne Malafaia. Vocês foram meu braço direito nesse doutorado! Obrigada pela força e orações de que tudo no final daria certo. Esse trabalho é nosso!!!

Aos queridos alunos de iniciação científica do LFND, Bernardo Rezende, João Paulo, Stephanie, Ana Luiza e tantos outros que passaram pelo laboratório por terem dado todo o suporte necessário.

Ao meu querido Nelcir Rodrigues e Nilton, pela ajuda e cuidado com o laboratório e biotério. Como sentirei a falta de vocês!

Às minhas queridas amigas, Elaine Nunes, Emília Magalhães, Érika Venceslau e Fernanda Ornellas, por sempre acreditarem em mim. Agradeço pela amizade e carinho de todas vocês.

À minha família, agradeço pela dedicação na minha educação. Pais, vocês foram a base para que tudo isso pudesse se tornar realidade. Ninguém teve mais fé em mim do que vocês. Espero com o fruto do meu trabalho ajuda-los muito, e mesmo assim seria pouco perto de tudo que fizeram por mim.

Ao meu marido, Carlos Eduardo, meu amigo e companheiro de todas as horas, sei que não foi fácil aceitar minha ausência nessa reta final, mas agradeço pelo amor e carinho. Te amo!

À minha herança do Senhor, Emília, como Deus me deu forças para seguir em frente e me renovou através da sua vida. Te amo filha! Espero poder oferecer sempre o melhor para você.

Aos meus familiares, avós, tios, tias, primos, que sempre acreditaram em mim. Amo vocês.

Às minhas amigas, Márcia, Micaeli, Juliane e Lucília que tanto oraram por mim e me ajudaram de maneira sem igual. Obrigada, vocês estão em meu coração.

A todos aqueles que não foram mencionados, mas que deram seu apoio e carinho. Muito obrigada!

Aos órgãos de apoio financeiro CAPES, FAPERJ e CNPQ.

Quando alguém encontra seu caminho precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada.

*Paulo Freire*



## RESUMO

SANTOS, Vivian de Melo Soares dos. *Ação da grelina acilada sobre o metabolismo energético no tecido adiposo branco de camundongos jovens e adultos hiperalimentados no início da vida*. 2016. 108 f. (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

A obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública, resultante de um desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético. O aumento da adiposidade leva ao desenvolvimento de dislipidemias, doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2. A Grelina é um hormônio sintetizado pelo estômago, que atua em diferentes tecidos através de um receptor específico (GHS-R1a). Esse hormônio modula o armazenamento e utilização dos substratos energéticos nos adipócitos, revelando-se de grande importância na manutenção do metabolismo energético. Portanto, considerando que a hiperalimentação neonatal induz obesidade na idade adulta por mecanismos ainda não totalmente elucidados, neste estudo foram pesquisados os efeitos da grelina acilada exógena sobre o metabolismo energético do tecido adiposo branco (TAB) de animais hipernutridos no início da vida. Para induzir a hiperalimentação na lactação, o tamanho da ninhada foi reduzida a 3 filhotes machos no terceiro dia, grupo hiperalimentado (GH). O grupo controle (GC) permaneceu com 9 filhotes da lactação ao desmame. Aos 21 e 120 dias os animais receberam injeção intraperitoneal de grelina (3nM) ou salina. Foram avaliados parâmetros antropométricos como: massa corporal e massa do tecido adiposo visceral, fígado e peso do tecido adiposo marrom. Avaliamos parâmetros bioquímicos e hormonais, como glicemia, insulina, grelina acilada, glicogênio hepático, triglicerídeos e colesterol -total. Através do Western Blotting e PCR tempo real avaliamos as proteínas envolvidas na sinalização de insulina e metabolismo energético no TAB. Os GC e GH foram estudados aos 21 e 120 dias de vida. Os dados demonstram que a hipernutrição induz um aumento significativo no peso corporal, gordura visceral, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipogrelinemia, aos 21 e 20 dias; redução da CPT1, redução da oxidação dos substratos energéticos e aumento do 4HNE, aos 21 dias; redução CD36, aos 21 e 120 dias; redução da pAKT/AKT, redução da expressão do GLUT4, aumento da FAS, redução pAMPK/AMPK; aumento da expressão da CPT-1 e UCP2, redução da fosforilação oxidativa com o palmitoil-L-carnitina e redução de ATP, aos 120 dias. Após a administração de grelina houve aumento da glicemia, da insulina, redução da grelina acilada, aumento da AKT, aumento da expressão do GLUT4 e CPT1, no GC aos 21 dias; no GH, aos 21 dias, a grelina aumentou o conteúdo de CD36, UCP2 e aumentou a oxidação dos substratos energéticos e ATP. Na idade de 120 dias, a grelina aumentou a glicemia, glicogênio hepático, reduziu grelina acilada plasmática, aumentou a expressão do GLUT-4, aumentou conteúdo da FAS, reduziu ATP e aumentou a expressão de UCP2, no GC. Aos 120 dias, no GH a grelina promoveu redução da glicemia, redução do glicogênio hepático, aumento da grelina acilada plasmática, redução do GHSR1a, aumento do IR $\beta$ , PI3K, pAKT e GLUT-4. Além disso, aumentou CD36 e PPAR gama. Concluímos que alterações nutricionais no início da vida levam a modificações hormonais que influenciam o metabolismo glicídico, lipídico e predispõem as mitocôndrias do TAB ao estresse oxidativo e reduz a capacidade de oxidação dos substratos energéticos. Tais modificações, além de promoverem o ganho de peso perduram até a idade adulta. A grelina acilada promove o aumento na oxidação dos substratos energéticos, melhora da sensibilidade à insulina e redução dos níveis de colesterol-total em animais do GH. Além disso, a grelina acilada desenvolve uma dupla ação sobre a homeostase glicêmica de acordo com a idade do animal e estado nutricional, reforçando que a grelina é um importante modulador do metabolismo energético do TAB.

Palavras-chave: Hipernutrição na lactação. Grelina. Tecido adiposo branco. Metabolismo energético

## ABSTRACT

SANTOS, Vivian de Melo Soares dos . *Acylated ghrelin action on energetic metabolism in white adipose tissue of mice overfed during lactation*. 2016. 108 f. (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Obesity is a major public health problem that is growing worldwide, due to an imbalance between food intake and energy expenditure. The increase adiposity leads to is a major risk factor for the development of most prevalent chronic diseases as dyslipidemias, heart disease and type 2 diabetes. Ghrelin is a hormone synthesized by the stomach that acts in different tissues via a specific receptor (GHS-R1a). Ghrelin modulates energy stores and expenditure in the adipocytes, proving to be of great importance in the maintenance of energy metabolism. Therefore, considering that overnutrition in the postnatal period lead obesity in adulthood by mechanisms not yet fully elucidated, in this study we investigated the effects of acylated ghrelin on energy metabolism of WAT in mice overnutrition during lactation. To induce overnutrition during lactation, the litter size was reduced from three male pups at the third day, overnutrition group (OG). The control group (CG) remained with 9 pups per litter at lactation until weaning. At 21 and 120 days of age, the mice received an intraperitoneal injection of either acylated ghrelin or saline. We evaluated the body mass and visceral adipose tissue mass, liver and brown adipose tissue weight. Biochemical and hormonal parameters such as glycemia, insulin, acylated ghrelin, liver glycogen content, triglycerides and total cholesterol. Through Western blotting and real-time PCR we evaluated the proteins involved in insulin signaling and energy metabolism. We analyzed the CG and OG At 21 and 120 days of age. Our data demonstrated that overnutrition during early life induces significant increases in body weight, visceral fat weight, blood glucose, increase insulin and decrease acylated ghrelin circulating levels at 21 and 120 days; At 21 days overnutrition during lactation decreased CPT1, decreased substrate oxidation and increased 4HNE; decreased CD36 at 21 and 120 days. In addition at 120 days OG showed a decrease pAKT/AKT, Glut4 expression, ratio pAMPK/AMPK, increase FAS, CPT-1 and UCP2 expression, reduced OXPHOS with palmitoyl-L-carnitine and ATP levels. After ghrelin administration, in CG at 21 days, increased blood glucose, insulin levels, decrease acylated ghrelin circulating, increase AKT, GLUT4 and CPT1 gene expression. In OG at 21 days, ghrelin administration increased CD36, UCP2 gene expression, substrate oxidation and ATP levels. At 120 days, ghrelin administration in GC increased blood glucose, liver glycogen content, decreased acylated ghrelin circulating, increased GLUT4 gene expression and protein content of FAS, decreased ATP levels and increased UCP2 gene expression. In OG at 120 days, ghrelin administration decreased blood glucose and liver glycogen content. In addition, ghrelin administration increased acylated ghrelin circulating, decreased GHSR1a, increased IR $\beta$ , PI3K, pAKT and GLUT-4. Moreover, ghrelin administration increased CD36 e PPAR gamma. In summary, our data provide evidence that overnutrition during lactation lead to hormonal changes that influence glucose metabolism, lipid metabolism and predispose the mitochondria of adipose tissue to oxidative stress and reduce the oxidation capacity of energy substrates. Such modifications, in addition to promoting the weight gain, last until adulthood. Acylated ghrelin promotes increased oxidation of energetic substrates, improved insulin sensitivity, and reduced total cholesterol levels in OG. In addition, acylated ghrelin develops a double action on glycemic homeostasis according to animal age and nutritional status, reinforcing that ghrelin is an important modulator of energy metabolism in WAT.

Keywords: Overnutrition during lactation. Ghrelin. White adipose tissue. Energy metabolism

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Deposição ectópica de gordura sobre os tecidos.....	21
Figura 2-	Captção de ácidos graxos pelo adipócito .....	25
Figura 3 –	Produção de energia mitocondrial .....	26
Figura 4 –	Estrutura Mitocondrial.....	29
Figura 5 –	Esquema da sinalização da grelina no hipotálamo.....	33
Figura 6 –	Efeitos Metabólicos mediados pela grelina acilada em diversos órgãos e tecidos.....	34
Figura 7 –	Potenciais mecanismos envolvidos na programação materna e pós-natal.....	40
Figura 8–	Esquema do modelo de formação dos grupos Hiperalimentado e Controle de 21 dias e 120 dias .....	45
Figura 9 –	Análise das proteínas da via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco de animais jovens.....	55
Figura 10 –	Análise do conteúdo da AMPK, pAMPK/AMPK, CD36 e PPAR $\gamma$ no tecido adiposo branco de animais jovens.....	57
Figura 11 –	Respirometria de alta resolução no tecido adiposo branco de animais jovens.....	59
Figura 12 –	Níveis de ATP no tecido adiposo branco de animais jovens.....	60
Figura 13 –	Análise das proteínas mitocondriais no tecido adiposo branco de animais jovens.....	61
Figura 14 –	Área do tecido adiposo epididimal dos animais adultos.....	64
Figura 15 –	Fotomicrografia dos adipócitos de camundongos machos aos 120 dias...	64
Figura 16 –	Análise do conteúdo de CD36, PPAR $\gamma$ e PGC1 $\alpha$ no fígado de animais adultos.....	68
Figura 17 –	Análise do conteúdo de AKT, pAKT/AKT, GSK3 e pGSK3/GSK3 no fígado de animais adultos.....	70
Figura 18 –	Conteúdo do GHSR1a no no tecido adiposo branco de animais adultos..	71
Figura 19 –	Análise das proteínas da via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco de animais adultos.....	72
Figura 20 –	Análise do conteúdo da AMPK, pAMPK/AMPK, FAS, CD36 e PPAR $\gamma$ no tecido adiposo branco de animais adultos.....	74

Figura 21 –	Respirometria de alta resolução no tecido adiposo branco de animais adultos.....	76
Figura 22 –	Níveis de ATP no tecido adiposo branco de animais adultos.....	77
Figura 23 –	Análise das proteínas mitocondriais no tecido adiposo branco de animais adultos.....	79

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Peso corporal, gordura visceral, gordura marrom e fígado dos grupos controle e hiperalimentado aos 21 dias.....	53
Tabela 2 –	Efeitos da administração de grelina sobre parâmetros metabólicos (glicemia, grelina acilada, insulina, triglicerídeos e colesterol total) em camundongos jovens (21 dias).....	54
Tabela 3 –	Peso corporal, gordura visceral, gordura marrom e fígado dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias.....	63
Tabela 4 -	Efeitos da administração de grelina sobre parâmetros metabólicos (glicemia, glicogênio hepático, grelina acilada, insulina, triglicerídeos e colesterol total) em camundongos adultos (120 dias).....	66
Tabela 5 -	Resumo dos principais resultados encontrados em animais submetidos ao modelo experimental de hipernutrição no início da lactação, aos 21 e 120 dias de vida pós-natal.....	80
Tabela 6 -	Resumo da ação da grelina nos animais controles e animais submetidos ao modelo experimental de hipernutrição no início da lactação, aos 21 dias de vida pós-natal, quando comparados com o controle salina e hiperalimentado salina.....	81
Tabela 7 -	Resumo da ação da grelina nos animais controles e animais submetidos ao modelo experimental de hipernutrição no início da lactação, aos 120 dias de vida pós-natal, quando comparados com o controle salina e hiperalimentado salina.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4HNE	4-hidroxinonenal
ACC	Acetil CoA carboxilase
AG	Ácido graxo
AGL	Ácido graxo livre
AgRP	Peptídeo agouti
AMPc	Adenosina monofostato cíclico
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
AKT	Proteína quinase B
CD36	Proteína transportadora de ácidos graxos integrado à membrana
CPT1	Carnitina palmitoiltransferase 1
DAG	Diacilglicerol
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FADH <sub>2</sub>	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FAS	Ácido graxo sintase
FO	Fosforilação Oxidativa
GC	Grupo controle
GH	Grupo Hiperalimentado
GLUT-4	Transportador de glicose 4
GHS-R 1a	Receptor secretagogo do hormônio do crescimento do tipo 1a
Glicerol-3-P	Glicerol-3-fosfato
GOAT	Grelina O-aciltransferase
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de massa corporal
IP3	Fosfatidil inositol 3
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1
JAK 2	Janus quinase 2
LHS	Lipase hormônio sensível
LPL	Lipoproteína lipase
α-MSH	Hormônio alfa Estimulante de Melanócito
NPY	Neuropeptídeo Y
Ob-R	Receptor de leptina

PAI-1	Inibidor da atividade do plasminogênio 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PGC1 $\alpha$	Coativador-1 $\alpha$ do receptor ativado por proliferador do peroxissomo
PKC	Proteína quinase C
PPAR	Receptor ativado pelo proliferador de peroxissomo
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição -3
SNC	Sistema nervoso central
TAB	Tecido adiposo branco
TAG	Triacilglicerol
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
UCP2	Proteína desacopladora 2

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1 <b>JUSTIFICATIVA</b> .....	41
2 <b>OBJETIVOS</b> .....	42
2.1 <b>Objetivo geral</b> .....	42
2.2 <b>Objetivos específicos</b> .....	42
2.2.1 <u>Estudar a ação da grelina sobre o perfil biométrico, bioquímico e hormonal dos camundongos jovens e adultos, hiperalimentados na lactação</u> .....	42
2.2.2 <u>Em camundongos jovens e adultos, hiperalimentados na lactação, investigar a ação da grelina no tecido adiposo branco</u> .....	42
3 <b>MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	44
3.1 <b>Animais e modelo experimental</b> .....	44
3.2 <b>Análise do peso corporal</b> .....	45
3.3 <b>Parâmetros bioquímicos e hormonais</b> .....	46
3.4 <b>Determinação dos níveis plasmáticos de grelina acilada</b> .....	46
3.5 <b>Mensuração da gordura visceral, fígado e tecido adiposo marrom</b> .....	47
3.6 <b>Análise Histológica do Tecido Adiposo Branco dos camundongos adulto</b> .....	47
3.7 <b>Determinação do glicogênio hepático</b> .....	47
3.8 <b>Análise de proteína do tecido adiposo e fígado</b> .....	48
3.8.1 <u>Western Blotting</u> .....	48
3.9 <b>Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)</b> .....	50
3.9.1 <u>Extração RNA total</u> .....	50
3.9.2 <u>PCR em tempo real</u> .....	50
3.10 <b>Respiração Mitocondrial</b> .....	51
3.11 <b>Dosagem de ATP</b> .....	52
3.12 <b>Análise estatística</b> .....	52
4 <b>RESULTADOS</b> .....	53
4.1 <b>Efeitos da administração de grelina sobre peso corporal, gordura visceral, gordura marrom e fígado</b> .....	53
4.2 <b>Efeitos da administração de grelina em parâmetros metabólicos em camundongos hiperalimentados durante o período da lactação</b> .....	54
4.3 <b>Efeito da administração de grelina sobre a via de sinalização da insulina no</b>	



	<b>tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação.....</b>	<b>55</b>
4.4	<b>Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de AMPK, CD36 e PPAR<math>\gamma</math> no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação.....</b>	<b>56</b>
4.5	<b>Efeitos da administração de grelina sobre a oxidação dos substratos energéticos no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação.....</b>	<b>58</b>
4.6	<b>Efeitos da administração de grelina sobre os níveis de ATP no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação.....</b>	<b>60</b>
4.7	<b>Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de proteínas mitocôndrias no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação.....</b>	<b>61</b>
4.8	<b>Efeito da administração de grelina sobre peso corporal, gordura visceral, gordura marrom e fígado.....</b>	<b>63</b>
4.9	<b>Análise da morfologia do tecido adiposo branco e da morfometria dos adipócitos de camundongos adultos.....</b>	<b>64</b>
4.10	<b>Efeitos da administração de grelina em parâmetros metabólicos de camundongos adultos, hiperalimentados durante o período da lactação.....</b>	<b>65</b>
4.11	<b>Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de CD36, PPAR<math>\gamma</math> e PGC1<math>\alpha</math> no fígado de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação.....</b>	<b>67</b>
4.12	<b>Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de proteínas envolvidas na regulação do glicogênio hepático de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação.....</b>	<b>69</b>
4.13	<b>Efeito da administração de grelina sobre o conteúdo do GHSR 1a no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação</b>	<b>71</b>
4.14	<b>Efeito da administração de grelina sobre a via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação.....</b>	<b>71</b>
4.15	<b>Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de AMPK, FAS, CD36 e PPAR<math>\gamma</math> no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação.....</b>	<b>73</b>
4.16	<b>Efeitos da administração de grelina sobre a oxidação dos substratos energéticos</b>	

	<b>no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação.....</b>	<b>75</b>
4.17	<b>Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo e expressão de enzimas mitocôndrias no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação.....</b>	<b>77</b>
5	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>83</b>
	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>95</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>96</b>

## INTRODUÇÃO

### Obesidade e tecido adiposo

A obesidade é uma doença multifatorial, resultado de uma complexa interação entre fatores comportamentais, culturais, genéticos, fisiológicos e psicológicos (DAMASO, 2003). Sendo um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial, seu crescimento se deve principalmente ao desequilíbrio entre ingestão alimentar e gasto energético. A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a obesidade como a “epidemia do século” e os números publicados atualmente são alarmantes. Considerando a população com sobrepeso e obesidade, utilizando o índice de massa corporal (IMC – massa corporal (kg)/estatura<sup>2</sup> (m)), estimou-se que 1,9 bilhões de pessoas no mundo acima de 18 anos de idade apresentavam excesso de peso (IMC  $\geq$  25 kg/m<sup>2</sup>), dos quais 600 milhões eram obesos (IMC  $\geq$  30 kg/m<sup>2</sup>) (WHO. Obesity and overweight, 2016).

Nos anos de 2010 e 2013, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o Ministério da Saúde divulgaram dois grandes levantamentos sobre o excesso de peso e obesidade no Brasil, a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF) e a VIGITEL Brasil 2014 (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), respectivamente. A POF apontou que 16,6% dos meninos e 11,8% das meninas na faixa etária de 5 a 9 anos eram obesos. Foi observado na população com mais de 20 anos de idade um aumento contínuo de excesso de peso e obesidade ao longo de 35 anos, onde o excesso de peso quase triplicou entre homens, passando de 18,5% para 50,1%, e entre mulheres o aumento foi menor, de 28,7% para 48% (IBGE, 1976; IBGE, 2010). A VIGITEL 2014 constatou uma frequência de 52,5% de excesso de peso em indivíduos adultos, sendo maior entre homens (56,5%) do que em mulheres (49,1%), e frequência de 17,9% de adultos obesos. Os dados de ambas as pesquisas são preocupantes, visto que evidenciam um grande aumento na frequência tanto de sobrepeso quanto de obesidade entre crianças e adultos. Um dos fatores que contribuem para o desenvolvimento da obesidade no Brasil é o consumo alimentar elevado de alimentos de alto teor energético e com baixo teor de nutrientes, configurando uma dieta de risco para o desenvolvimento da obesidade (IBGE, 2010; BRASIL, 2014).

A prevalência da obesidade na infância e adolescência tem aumentado nos últimos anos, afetando cada vez mais indivíduos de baixa e média renda, especialmente em áreas urbanas. Por exemplo, em 2013 o número de crianças obesas com idade inferior a 5 anos, foi estimado em mais de 42 milhões. A grande maioria das crianças com sobrepeso ou obesidade vive em países em desenvolvimento, onde a taxa de aumento tem sido 30% superior quando comparado ao de países desenvolvidos. Caso tal tendência seja mantida, o número de crianças com sobrepeso ou obesidade aumentará de forma global para 70 milhões até 2025 (WHO. *Childhood Obesity* - 2016).

É importante salientar que crianças obesas tendem a se tornar obesos na idade adulta, e mais propensos a desenvolver resistência à insulina, doenças cardiovasculares e câncer em idade precoce. Além disso, podem apresentar dificuldades na respiração, aumento do risco de fraturas, hipertensão e efeitos psicológicos (WHO. *Childhood overweight and obesity*, 2016). Também o aumento da adiposidade leva ao desenvolvimento de alterações funcionais que compõem a síndrome metabólica. Desta forma, pode-se dizer que a obesidade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas de maior prevalência como dislipidemias, doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2, acarretando na redução da qualidade e expectativa de vida (KAHN, FLIER, 2000; BOEHM, CLAUDI-BOEHM, 2005; QUEIROZ *et al.*, 2009). Neste contexto, o estudo do metabolismo energético do tecido adiposo é fundamental para uma melhor compreensão da obesidade e suas complicações.

Em termos morfológicos, tecido adiposo branco (TAB) é composto por células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol (TAG) em seu citoplasma, denominadas adipócitos. O TAB é distribuído por todo o organismo, envolvendo e se infiltrando por quase toda a região subcutânea, órgãos e vísceras da cavidade abdominal ou do mediastino e por diversos grupamentos musculares para os quais oferece proteção mecânica. Além disso, o TAB ameniza o impacto de choques e permite um adequado deslizamento de feixes musculares. Conhecido também como principal reservatório energético do organismo. Modificações no tamanho (diâmetro e volume) dos adipócitos maduros ocorrem em resposta à ativação de suas ações metabólicas típicas, que são a lipogênese e a lipólise. Tais alterações variam de acordo com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídeos, que depende, entre outros fatores, do estado nutricional do indivíduo, gasto energético, influência de hormônios (catabólicos ou anabólicos), atividade de enzimas envolvidas nestes processos e da heterogeneidade característica existente entre os diversos grupamentos adiposos do organismo (JENSEN, 1997). Além disso, o TAB desempenha papel importante na regulação da homeostase energética, sensibilidade à insulina, controle do

apetite e do balanço energético, imunidade, angiogênese, pressão arterial e metabolismo lipídico, através da secreção pelos adipócitos de uma gama de proteínas bioativas denominadas adipocinas (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; FISCHER-POSOVSZKY *et al.*, 2007).

As adipocinas são expressas e secretadas pelos adipócitos, como: citocinas, interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), fatores de crescimento, adiponectina, resistina, leptina, inibidor da atividade do plasminogênio 1 (PAI-1) e lipoproteína lipase (LPL). Podendo atuar tanto a nível local (autócrina e/ou parácrina) quanto sistêmico (endócrino). Ou seja, as adipocinas atuam como um sinal de regulação do metabolismo energético no próprio adipócito e em outros tecidos, exercendo funções relacionadas ao metabolismo de lipídios, metabolismo da glicose e processos inflamatórios. (KERSHAW, FLIER. 2004; GOOSSENS, 2008).

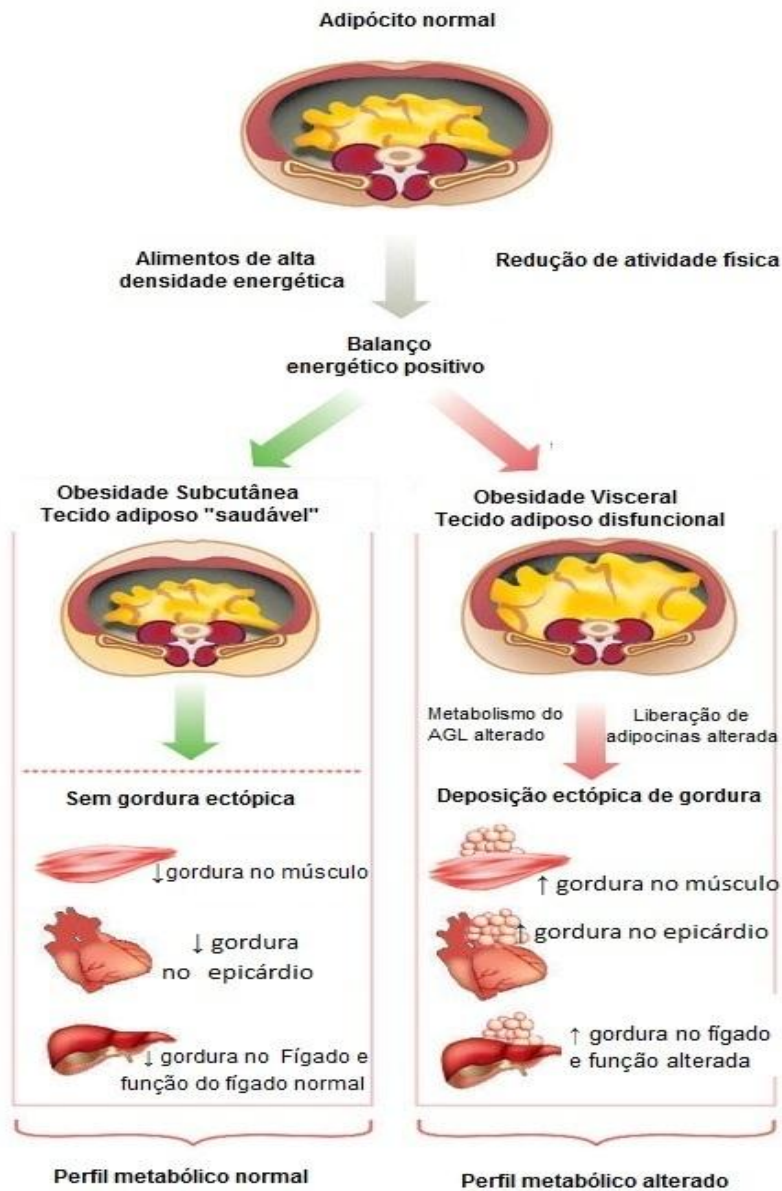
A função endócrina do tecido adiposo foi reforçada com a descoberta do gene da leptina, descrito como gene mutante ob/ob em camundongos (ZHANG *et al.*, 1994). Tal hormônio age em receptores do sistema nervoso central especificamente na região do núcleo arqueado localizado no hipotálamo, inibindo a expressão do neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo agouti (AgRP), envolvidos nos mecanismos de aumento da ingestão alimentar e na redução do gasto energético (SALTIEL, KAHN, 2001). Também, os níveis circulantes de leptina correlacionam-se positivamente com a quantidade de gordura corporal. Em pessoas obesas, a hiperleptinemia encontrada é atribuída a alterações no receptor de leptina e nas proteínas da via de sinalização da leptina, além da deficiência em seu sistema de transporte na barreira hemato-encefálica, fenômeno denominado resistência à leptina, semelhante a resistência à insulina (SALTIEL, KAHN, 2001). Outra adipocina de grande importância é a Adiponectina (também conhecida como AdipoQ ou Acrp30), foi descrita em 1995 como a proteína produzida pelo tecido adiposo mais abundante. Sua concentração plasmática correlaciona-se inversamente com a adiposidade, resistência à insulina e doenças cardiovasculares (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2007; BRANDÃO *et al.*, 2011). Estudos demonstraram que a administração aguda de adiponectina em camundongos diminuiu a resistência à insulina, os níveis de ácidos graxos livres (AGL) no plasma, o conteúdo de TAG do músculo e fígado, além de aumentar a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e do gasto energético (YAMAUCHI *et al.*, 2001).

Na obesidade, a elevação do TAB pode ser classificada pelo aumento do número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia) dos adipócitos (QUEIROZ *et al.*, 2009). Esta classificação é fundamental no prognóstico da obesidade, pois a obesidade hiperplásica é

considerada de controle mais difícil, principalmente quando associada à hipertrofia. A expansão do TAB durante a obesidade infantil resulta da combinação de ambos os processos: hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos. No adulto, os adipócitos também exibem renovação intensa e constante, embora se tenha acreditado por muito tempo, que adultos apresentavam um número fixo de adipócitos (SPALDING, 2008). A hipertrofia dos adipócitos intra-abdominais é caracterizada por um estado hiperlipolítico devido à resistência a ação da insulina (MITTELMAN *et al.*, 2002). A ação antilipolítica da insulina é atenuada pelo TNF- $\alpha$ , que reduz a fosforilação do substrato do receptor de insulina (IRS-1) e da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K), além disso também aumenta os níveis de adenosina monofostato cíclico (AMPc) que ativa a lipase hormônio sensível (LHS). O TNF- $\alpha$  é considerado como um dos fatores que contribuem para o aumento da lipólise associada a obesidade (ARNER, 1995).

O aumento da liberação de ácidos graxos (AG) dos adipócitos para a circulação leva a prejuízos no metabolismo de órgãos como o fígado, pâncreas e coração, pois a deposição ectópica de gordura ocasiona aumento da produção hepática de glicose, apoptose das células  $\beta$  pancreáticas e resistência à insulina no coração e músculo esquelético (Figura 1) (DESPRES, LEMIEUX, 2006). Estudos relatam que as respostas a essas disfunções metabólicas ocorrem de forma hierárquica, onde o tecido adiposo e o fígado agem como desreguladores primários do sistema metabólico, e o músculo esquelético e pâncreas respondem de forma secundária. O tecido adiposo age como um desregulador primário devido ao seu papel crítico na regulação metabólica, como sua capacidade de produzir hormônios que modulam efeitos sobre ingestão alimentar, balanço energético e homeostase energética (MUOIO, NEWGARD, 2006).

Figura 1 - Deposição ectópica de gordura sobre os tecidos



Fonte: Adaptação: DESPRÉS, 2006.

## Metabolismo energético

### Metabolismo energético dos adipócitos

Os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) representam a principal fonte de energia para vários tecidos e órgãos, como o músculo e fígado. Como a maioria dos tecidos contém pequenas quantidades de armazenamento de lipídios, a produção de energia depende do fornecimento contínuo de ácidos graxos, principalmente a partir do tecido adiposo branco (KERNER, HOPPEL, 2000).

Devido à sua baixa solubilidade em água, os ácidos graxos circulam ligados à albumina plasmática ou ligados covalentemente ao núcleo de triacilgliceróis das lipoproteínas circulantes, conhecidas como VLDL (MERKEL *et al.*, 2002). A captação de ácidos graxos através da bicamada fosfolipídica das membranas celulares ocorre tanto por difusão passiva quanto por proteínas transportadoras. A CD36, uma proteína específica de 88 KDa, está presente em inúmeras membranas biológicas, atua como receptor de vários tipos de moléculas, tendo papel de cooperar com o processo de captação de ácidos graxos. Logo, a CD36, apresenta a molécula de AGL para uma outra proteína integrante da membrana, FATP (proteína transportadora de AGL), que atua como facilitador da difusão para o interior da célula. Uma vez no citosol, que é um meio aquoso, o AGL se liga a outra proteína ligadora, FABP, que transporta o produto para ser acilado com coenzima A. Este processo é executado por outra proteína integrante da membrana, a acilCoA sintase (ACS). Após esta etapa, a acilCoA é levada por outra proteína, a ACBP (proteína ligadora de acilCoA), para os locais de esterificação com glicerol-3-P (Figura 2) (DROVER, ABUMRAD 2005; FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

Nos adipócitos não existe cínase de glicerol. Assim, todo o glicerol formado pela ação das lípases de lipoproteínas e hormônio-sensível perde-se para o plasma sanguíneo sendo depois metabolizado no fígado e rim (os órgãos onde existe a cínase do glicerol). O glicerol-3-fosfato necessário para a síntese de triacilgliceróis no tecido adiposo tem origem na dihidroxiacetona-fosfato que é reduzida a glicerol-3-fosfato por ação catalítica da glicerol-3-fosfato desidrogenase. Assim, o glicerol-3-P é obtido como um dos produtos da via glicolítica, a partir da biossíntese de acetil-CoA ou da captação de AGL proveniente de lipoproteínas plasmáticas (quilomícrons e VLDL) que no TAB sofrem a ação da LPL seguido



da hidrólise do TAG, liberando assim os AGL, que são transportados para o citoplasma dos adipócitos (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

A produção de glicerol-3-P requer a captação de glicose, o que envolve proteínas transportadoras específicas, como o GLUT4. Este processo é controlado pela insulina, que durante o período pós-prandial, estimula a translocação de GLUT4 para a membrana celular, aumentando a captação de glicose. Parte do fluxo de metabólitos da via glicolítica segue em direção à formação de piruvato, que é transportado para o interior das mitocôndrias e transformado em acetil-CoA pela ação da piruvato desidrogenase (PDH). Este é acoplado ao oxalacetato pela ação da citrato sintase, gerando em seguida citrato. Parte desse citrato é transportado de volta ao citoplasma, onde sofre a ação da enzima ATP-citrato liase (ATP-CL), gerando novamente acetil-CoA (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). A Acetil-CoA carboxilase (ACC) apresenta duas isorformas: ACC1 (também conhecida como ACCa) e ACC2 (conhecida como ACCb), que catalisa a carboxilação de acetil-CoA em malonil-CoA, um metabólico intermediário que tem duas tarefas principais: (1) entrar na via de síntese de ácidos graxos, catalisada pela enzima ácido graxo sintase (FAS), levando a formação de acil-CoA, que é utilizado para a esterificação com glicerol-3-P, completando a biossíntese de TAG, e desta forma ser incorporado à gotícula citoplasmática de gordura; e (2) alostericamente inibir a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1) que controla o transporte de ácidos graxos ativados para  $\beta$ -oxidação na mitocôndria (DZAMKO, STEINBERG, 2009).

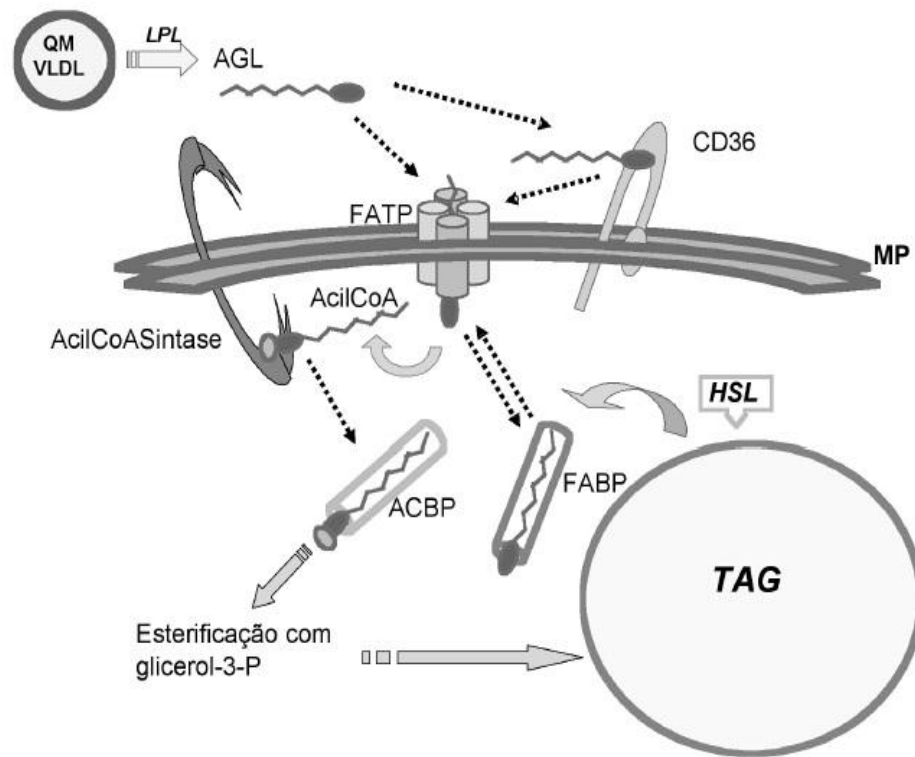
Em situações onde há redução do nível de energia celular, como no jejum, o aumento nos níveis de AMP ativa a enzima AMPK (DAVAL *et al.*, 2006). Esta proteína quinase ativada por AMP é encontrada na célula como um complexo heterodímero, possuindo uma subunidade catalítica ( $\alpha$ ) e duas subunidades regulatórias ( $\beta$  e  $\gamma$ ). No tecido adiposo, a subunidade catalítica  $\alpha 1$  é a isoforma predominante (DAVAL *et al.*, 2005). A AMPK é uma molécula chave no controle da homeostase energética. Em geral, a AMPK ativa processos catabólicos que produzem ATP e inibe processos que levam ao consumo de ATP, restaurando assim a razão AMP/ATP. A AMPK ativada tem um importante papel na regulação do metabolismo lipídico no TAG, pois essa quinase estimula a oxidação de ácidos graxos pela diminuição dos níveis de malonil-CoA através da inibição da ACC2. Essa inibição acarreta no aumento da atividade da CPT-1 e a subsequente ativação da oxidação de ácidos graxos (LIM *et al.*, 2010).

Os AGCL são ativados dentro da mitocôndria, onde a membrana mitocondrial não é permeável para os Acil-CoAs. O sistema de transporte consiste em três proteínas, a CPT-1, a carnitina aciltranslocase (CACT) e a CPT-2, cada uma com localização submitocondrial

diferente. A CPT-1 representa a chave da regulação da  $\beta$ -oxidação mitocondrial, porém sua atividade é fortemente inibida pela malonil-CoA (KERNER, HOPPEL, 2000). Tal proteína catalisa primeiro a formação do Acil-carnitina de cadeia longa a partir do Acil-CoA de cadeia longa para o espaço intermembranar e em seguida, a carnitina aciltranslocase transporta a acil-carnitina através da membrana mitocondrial interna em troca de carnitina (KERNER, HOPPEL, 2000). Após a captação dos ácidos graxos na mitocôndria, estes passam pelo processo de  $\beta$ -oxidação, gerando nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo (FADH<sub>2</sub>) que são utilizados na cadeia respiratória (Figura 3) (processo este discutido no próximo capítulo).

Estudos demonstram que, os AG são capazes de estimular seu próprio catabolismo através dos receptores ativados pelo proliferador de peroxissomo (PPARs) (ATHERTON *et al.*, 2009). Os receptores ativados por PPARs pertencem a um subgrupo da superfamília de receptores nucleares, que são identificados em três tipos: PPAR $\alpha$ , PPAR $\delta$  e PPAR $\gamma$ . Todos os subtipos de PPAR são encontrados no TAB, com predominância do PPAR $\gamma$  (CHINETTI *et al.*, 2000). A identificação do PPAR $\gamma$  foi fundamental para o entendimento da fisiologia do tecido adiposo (QUEIROZ *et al.*, 2009). O PPAR $\gamma$  influencia os estoques de gordura no tecido adiposo, além de induzir a maturação de pré-adipócitos. A maioria dos genes alvos do PPAR $\gamma$  no tecido adiposo está diretamente envolvida na via lipogênica, incluindo a LPL (KERSTEN *et al.*, 2000). O PPAR $\gamma$  está relacionado com a atividade transcricional de genes alvos, por meio do PGC1 $\alpha$ . O PGC1 $\alpha$  tem importante papel na expressão de genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, acúmulo de lipídios, gliconeogênese, biogênese mitocondrial, respiração mitocondrial e desacoplamento (PUIGSERVER, SPIEGELMAN, 2003; BOURNAT, BROWN, 2010).

Figura 2 - Captação de ácidos graxos pelo adipócito

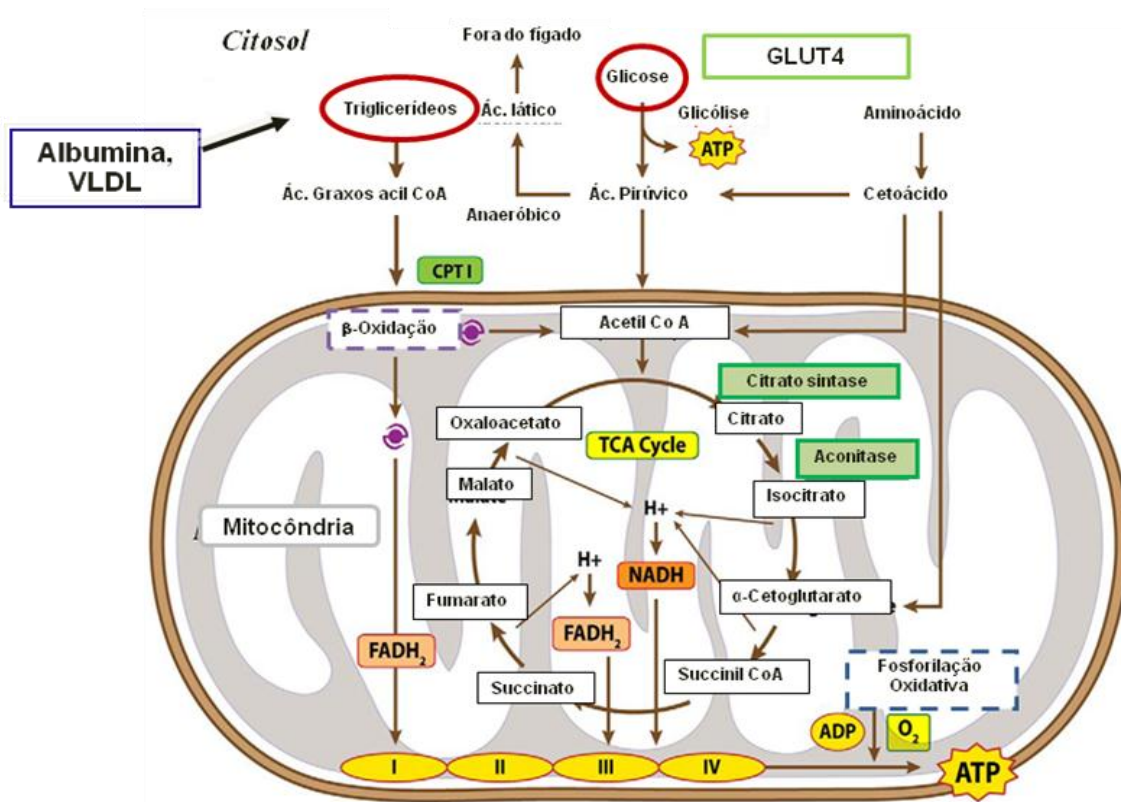


Legenda: Captação de ácidos graxos livres pelos adipócitos. Esquema ilustrativo do processo de captação de ácidos graxos livres pelos adipócitos, bem como a biossíntese de TAG.

Nota: QM= quilomícron, VLDL= lipoproteína de densidade muito baixa, AGL= ácido graxo livre, LPL= lipoproteína lipase, TAG= triacilglicerol, MP= membrana plasmática, FATP= proteína transportadora de ácidos graxos, FABP= proteína ligadora de ácidos graxos, ACBP= proteína ligadora de acilCoA, HSL= lipase hormônio-sensível.

Fonte: FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006

Figura 3 - Produção de energia mitocondrial



Legenda: Fornecimento de energia celular. Vias de substratos no metabolismo muscular. Oxidação de glicose, ácidos graxos e aminoácidos geram Acetil Coa. A energia da oxidação é conservada como NADH+H<sup>+</sup> e FADH<sub>2</sub>, que são utilizados pela cadeia transportadora de elétrons para produzir um gradiente quimiostático (força próton-motriz) no espaço intermembranas mitocondrial.

Nota: ACT = ciclo do ácido tricarboxílico; ADP = adenosina difosfato; ATP = adenosina trifosfato; CPT= carnitina palmitoil transferase; FADH<sub>2</sub> = dinucleotídeo de flavina e adenina; NADH = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina, O<sub>2</sub> = oxigênio; PDH = Piruvato desidrogenase, H<sup>+</sup> = íon hidrogênio.

Fonte: Adaptação: ROGGE, M. M. 2009.

## Mitocôndria

### Função mitocondrial no tecido adiposo branco

A mitocôndria é uma das organelas celulares mais importantes, presentes em todas as células eucarióticas. Ela tem forma e tamanho variado, possui grande mobilidade e localiza-se intracelularmente onde há maior necessidade de energia. Estruturalmente, a mitocôndria possui uma membrana externa e uma membrana interna, separada por um espaço intermembranar. A membrana externa contém várias proteínas transportadoras, chamadas de porinas, que formam grandes canais aquosos assemelhando-se a um filtro permeável, por onde várias moléculas podem entrar no espaço intermembranar, mas a maioria delas não pode passar através da membrana interna. A membrana interna é altamente especializada, contém uma variedade de proteínas transportadoras que a tornam seletivamente permeável àquelas pequenas moléculas que são metabolizadas ou requeridas pelas várias enzimas mitocondriais concentradas na matriz. Esta membrana é geralmente pregueada, formando reentrâncias na matriz chamadas de cristas, que aumentam a área da membrana interna (Figura 4) (BRUCE *et al.*, 2010). O espaço intermembranar contém várias enzimas e é o local onde se acumulam os prótons transportados da matriz (KOWALTOWSKI *et al.*, 2009).

A mitocôndria é a principal fonte de produção de energia para a célula, desempenha importante papel na vida e na morte celular, na diferenciação da maioria dos tecidos e até no desenvolvimento do organismo inteiro. É responsável por muitos processos catabólicos fundamentais para a obtenção de energia na forma de ATP, através da  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos, ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. São coordenadoras centrais e locais das transformações bioquímicas essenciais do metabolismo energético. A produção de ATP requer dois passos importantes: a oxidação e redução de metabólitos e coenzimas como o NADH e o FADH<sub>2</sub> e fosforilação de adenina difosfato (ADP) para gerar ATP para suprir as funções celulares (OXPHOS, fosforilação oxidativa). O processo de transferência de elétrons e fosforilação oxidativa (FO) mitocondrial é dependente de cinco complexos de várias subunidades polipeptídicas (I-V), 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), localizado dentro da membrana interna mitocondrial (MCFARLAND, TURNBULL, 2009; CEDIKOVA *et al.*, 2016). Para a síntese

de ATP, o fluxo de prótons do espaço intermembranar para a matriz ocorre através da ATP-sintase. O ATP da matriz mitocondrial é então trocado por ADP citosólico através do transportador de nucleotídeo de adenina (ANT) (JOHANNSEN, RAVUSSIN, 2009).

A eficiência pela qual os equivalentes redutores (a partir da oxidação de acetil-CoA) são convertidos em ATP pela fosforilação oxidativa é chamada de acoplamento mitocondrial (JOHANNSEN, RAVUSSIN, 2009). Quando as mitocôndrias não são perfeitamente acopladas (desacopladas), a força próton-motriz gerada pela fosforilação oxidativa normal é dissipada sob a forma de calor ao invés de ser utilizada para impulsionar a ATP-sintase na produção de ATP, processo conhecido como “Próton leak”. O desacoplamento mitocondrial pode ser responsável por 20 a 25% da taxa metabólica basal (TMB) (ROLFE, BRAND, 1997). Este processo é realizado por proteínas desacopladoras (UCPs) situadas na membrana interna da mitocôndria, sendo a UCP1 a primeira isoforma descoberta e encontrada somente na gordura marrom de mamíferos, inclusive humanos (JOHANNSEN, RAVUSSIN, 2009; ANDREWS *et al.*, 2010).

No indivíduo adulto, a expressão da UCP1 é limitada, visto que o tecido adiposo marrom está diminuído. Em 1997, duas novas isoformas de UCPs (UCP2 e UCP3) foram descobertas, sendo ambas homólogas à UCP1 e expressas em adultos. A UCP2 é expressa em vários tecidos (incluindo o tecido adiposo, músculo, coração, rins, sistema digestório e cérebro), enquanto que a expressão da UCP3 se limita ao músculo esquelético (ROUSSET *et al.*, 2004; CARDOSO *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2015). Tanto a UCP2 quanto a UCP3 tem sido relacionada à determinação da TMB.

Além da UCP2 contribuir com a TMB, também a proteína regula a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), considerados segundo mensageiro dentro da célula (TODA *et al.*, 2014). A transcrição do gene da UCP2 é regulada por vários fatores, entre eles os AG, que nos adipócitos aumentam sua expressão através dos PPARs (REILLY, THOMPSON, 2000).

Os ácidos graxos, especialmente os poliinsaturados, e as EROS, gerados durante a fosforilação oxidativa, podem aumentar a atividade da UCP2. Por exemplo, o produto derivado da peroxidação lipídica, 4- hidroxinonenal (4HNE), promove o “próton leak” através da UCP2, sendo a UCP2 um regulador negativo da produção de peróxido de hidrogênio mitocondrial (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (TODA *et al.*, 2014).

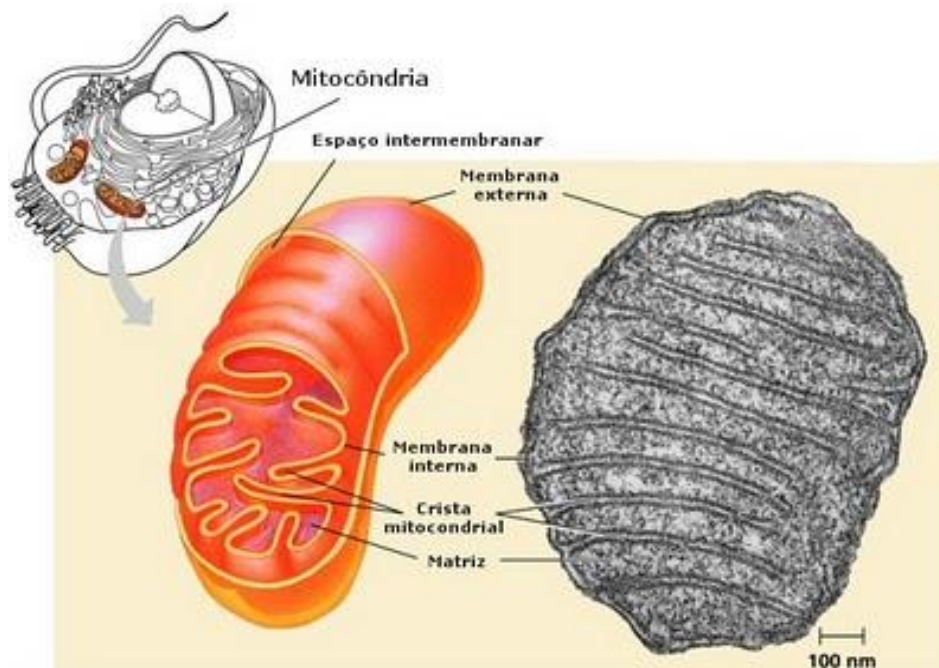
Na estrutura do adipócito, reduzida densidade mitocondrial é frequentemente observada, assim como o baixo volume citoplasmático. E dependendo da posição anatômica, os adipócitos maduros apresentam conteúdo mitocondrial e atividade metabólica diferente.

Por exemplo, os adipócitos epididimais (visceral) têm conteúdo mitocondrial maior que os adipócitos inguinais (subcutânea) (MEDINA-GOMEZ, 2012). A mitocôndria no TAB tem papel crucial na regulação da lipólise e reesterificação de AGL, assim como na diferenciação e maturação do adipócito, dado pela sincronização da adipogênese e biogênese mitocondrial (DE PAUW *et al.*, 2009).

Na obesidade, as mitocôndrias dos adipócitos alteram a lipogênese e lipólise, regulam a diferenciação dos adipócitos, apoptose, produção de EROS e a eficiência da fosforilação oxidativa (CEDIKOVA *et al.*, 2016). Logo, os excessos de substratos energéticos, característico na obesidade e síndrome metabólica, podem levar à disfunção mitocondrial, resultando em alterações metabólicas que afetam o metabolismo energético (BOURNAT, BROWN, 2010).

A disfunção mitocondrial no adipócito está associada com a redução da oxidação de ácidos graxos, alteração da secreção de adipocinas e desregulação da homeostase energética. Nesta condição, o aumento da produção de EROS resulta em acúmulo de lipídios e resistência à insulina (MEDINA-GOMEZ, 2012).

Figura 4 - Estrutura mitocondrial



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

## Grelina

A grelina é um hormônio gastrointestinal que atua como ligante endógeno do receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R), que é um receptor acoplado a proteína G, e está expresso no cérebro e tecidos periféricos (ZIGMAN *et al.*, 2006). É composta por 28 aminoácidos, com modificação na cadeia de AG sobre o terceiro aminoácido N-terminal (KORBONITS *et al.*, 2004). Tal hormônio foi identificado, por Kojima e colaboradores (1999), no estômago (isolado da mucosa oxíntica) de ratos de uma linhagem celular que expressavam o receptor secretagogo do hormônio do crescimento (GHS-R), durante a monitoração da mudança de concentração intracelular de cálcio.

A grelina é sintetizada como um pré-pró-hormônio que contém 117 aminoácidos. A clivagem da pré-pro-grelina é realizada pelo pró-hormônio convertase 1 (PC1), gerando assim, uma molécula madura constituída por 28 aminoácidos. Durante as modificações pós-transcricionais, o terceiro resíduo, uma serina, é acilada com o ácido n-octanóico. Esse processo de acilação é essencial para que a grelina possa se ligar ao GHS-R do tipo 1a (GHS-R1a) e desta forma, exercer suas ações biológicas (ROMERO *et al.*, 2010). A acilação da grelina é realizada por uma enzima conhecida como grelina O-aciltransferase (GOAT). Esta enzima está expressa em vários tecidos humanos, inclusive estômago, hipófise, pâncreas e miocárdio (LIM *et al.*, 2011). Alguns estudos sugerem que o sistema grelina-GOAT, informa ao sistema nervoso central sobre a disponibilidade de calorias, e que a GOAT seria regulada pela disponibilidade de nutrientes, utilizando lipídios dietéticos específicos como substrato para o processo de acilação e regulação da adiposidade em ratos (KIRCHNER *et al.*, 2009).

A maior parte dos níveis de grelina circula sem o grupo Acil, conhecida como Des-acil grelina ou grelina não acilada. Estudos demonstram que a Des-acil grelina possui efeitos metabólicos diversos através de mecanismos independente do GHSR, incluindo controle sobre a alimentação, temperatura corporal, metabolismo lipídico e secreção de insulina estimulada por glicose (THOMPSON *et al.*, 2004; TOSHINAI *et al.*, 2007; GAUNA *et al.*, 2006; DELHANTY *et al.*, 2010). Entretanto, Heppner e colaboradores (2014) demonstraram que a grelina não acilada aumenta a secreção de insulina estimulada por glicose e a adiposidade corporal através da interação com o GHSR no SNC. Além disso, os autores enfatizam que essas modificações são independentes de alterações na ingestão alimentar.

Outro aspecto importante do mecanismo de ação da grelina é a sinalização intracelular. Este processo é tempo-dependente e modulador da atividade da AKT e da



AMPK, que são proteínas quinases que ocupam um importante papel no metabolismo energético (CASTANEDA *et al.*, 2010). Ao atravessar a barreira hematoencefálica, a grelina atua em pelo menos duas vias de sinalização no hipotálamo que regulam o cálcio, importante regulador da sinalização utilizado pelos receptores GHS-R1a (CASTANEDA *et al.*, 2010). Na primeira via, a grelina promove o aumento do cálcio através da adenilato ciclase e proteína quinase A (AC-PKA) em células que expressam o NPY no núcleo arqueado, regulando os efeitos orexigênicos e promovendo o controle da homeostase energética (KOHNO *et al.*, 2003). Na segunda via, a grelina promove a liberação do hormônio de crescimento pela ativação da via fosfolipase C e proteína quinase C (PLC-PKC), a PLC hidrolisa o fosfatidil inositol 4,5 bifosfato (PIP<sub>2</sub>) liberando dois segundos mensageiros diacilglicerol (DAG) e fosfatidil inositol (IP<sub>3</sub>) (CHEN *et al.*, 1996). O DAG promove a ativação da PKC e a mobilização de cálcio para dentro da célula, enquanto o IP<sub>3</sub> liga-se a canais de cálcio no retículo endoplasmático promovendo o aumento de cálcio no citosol (CASTANEDA *et al.*, 2010) (Figura 5). O complexo grelina-GHSR, além de ativar estas duas vias de sinalização no hipotálamo, também age diretamente sobre a AMPK no jejum. Como resultado direto da ativação da AMPK, a atividade da ACC é reduzida devido à redução dos níveis hipotalâmicos da malonil-CoA, aumentando a atividade da CPT-1 e levando, dessa forma, à ativação da  $\beta$ -oxidação (LOPEZ *et al.*, 2008).

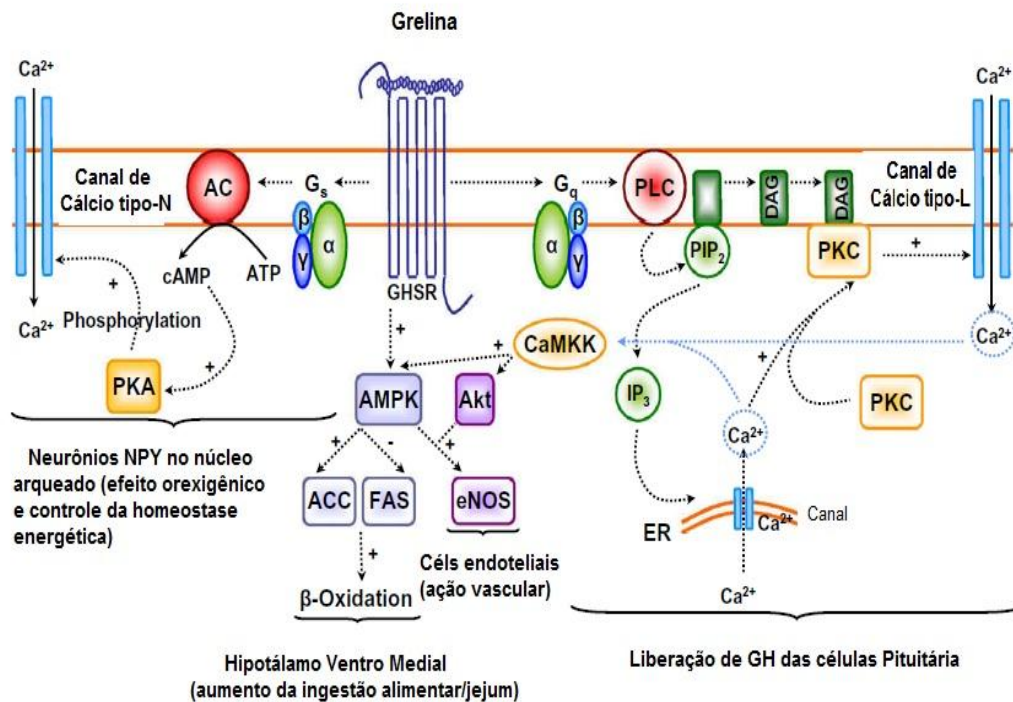
A grelina apresenta ação central e periférica que varia de acordo com o tecido. A grelina, ao ativar o GHS-R1a no hipotálamo, estimula neurônios orexigênicos como o NPY e AGRP (COWLEY *et al.*, 2003) e bloqueia a ação anorexigênica da leptina pela inibição dos receptores MC4 hipotalâmicos (HOSODA *et al.*, 2002). Além disso, promove ingestão preferencial por gordura, devido ao aumento de galanina no núcleo paraventricular (SHIMBARA *et al.*, 2004). A descrição dos efeitos orexígenos da grelina enfatizam sua relevância ao ser considerado um mediador central e periférico da homeostase energética. A grelina acilada também estimula outras áreas do cérebro que influenciam o consumo alimentar e gasto energético, como o núcleo ventromedial e o núcleo dorsomedial (ANDRICH *et al.*, 2012).

A nível periférico, a grelina estimula a secreção de insulina (KORBONITS *et al.*, 2004), induz resposta lipogênica e glicogênica no fígado, através da redução da atividade AMPK, AKT e GSK (BARAZZONI *et al.*, 2007) promove o acúmulo de TAG no fígado (DAVIES *et al.*, 2009). No coração, os níveis de grelina acilada estão associados com o remodelamento cardíaco na obesidade, através da ativação da via PI3K/AKT (LACERDA-MIRANDA *et al.*, 2012). No músculo esquelético, a grelina acilada estimula a lipólise, reduz

a sensibilidade à insulina e o gasto energético (VESTERGAARD *et al.*, 2008). Além disso, ratos submetidos a uma dieta rica em gordura tiveram um menor acúmulo de triglicérides no músculo esquelético, reduzindo também os níveis de marcadores inflamatórios como o NF- $\kappa$ B e o TNF $\alpha$  (BARAZONI *et al.*, 2007). No TAB, a grelina promove o aumento do volume dos adipócitos e ganho de peso (DAVIES *et al.*, 2009), principalmente através do aumento da adiposidade em humanos e roedores (TSCHOP *et al.*, 2000), sem necessariamente haver aumento da ingestão alimentar. Além disso, foi demonstrado que a grelina aumenta a captação de glicose em adipócitos, sugerindo um papel na regulação da homeostase da glicose (PATEL *et al.*, 2006). Estudos indicam que a administração periférica de grelina induz aumento do teor de triglicéridos e aumento da UCP2 no TAB, e diminuição da expressão da UCP1 no tecido adiposo marrom (TSUBONE *et al.*, 2005), demonstrando que a grelina está diretamente envolvida na regulação energética mitocondrial (Figura 6).

Em situações em que a redução das reservas energéticas pode comprometer as funções vitais, a grelina se torna essencial, visto que sua dupla função, central e periférica, determinam singular importância na plasticidade metabólica do organismo. Por exemplo, demonstrou-se que o metabolismo energético dos animais durante os episódios de jejum, mesmo após utilização prolongada dos estoques de AGL, a normoglicemia é mantida por ação da grelina. Assim, a importância desse hormônio pode ser definida por conferir ao animal a capacidade de troca de substrato energético em diferentes condições ou mesmo na ausência de nutrientes específicos (GOLDSTEIN *et al.*, 2011; GOLDBERG *et al.*, 2013).

Figura 5 - Esquema da sinalização da grelina no hipotálamo

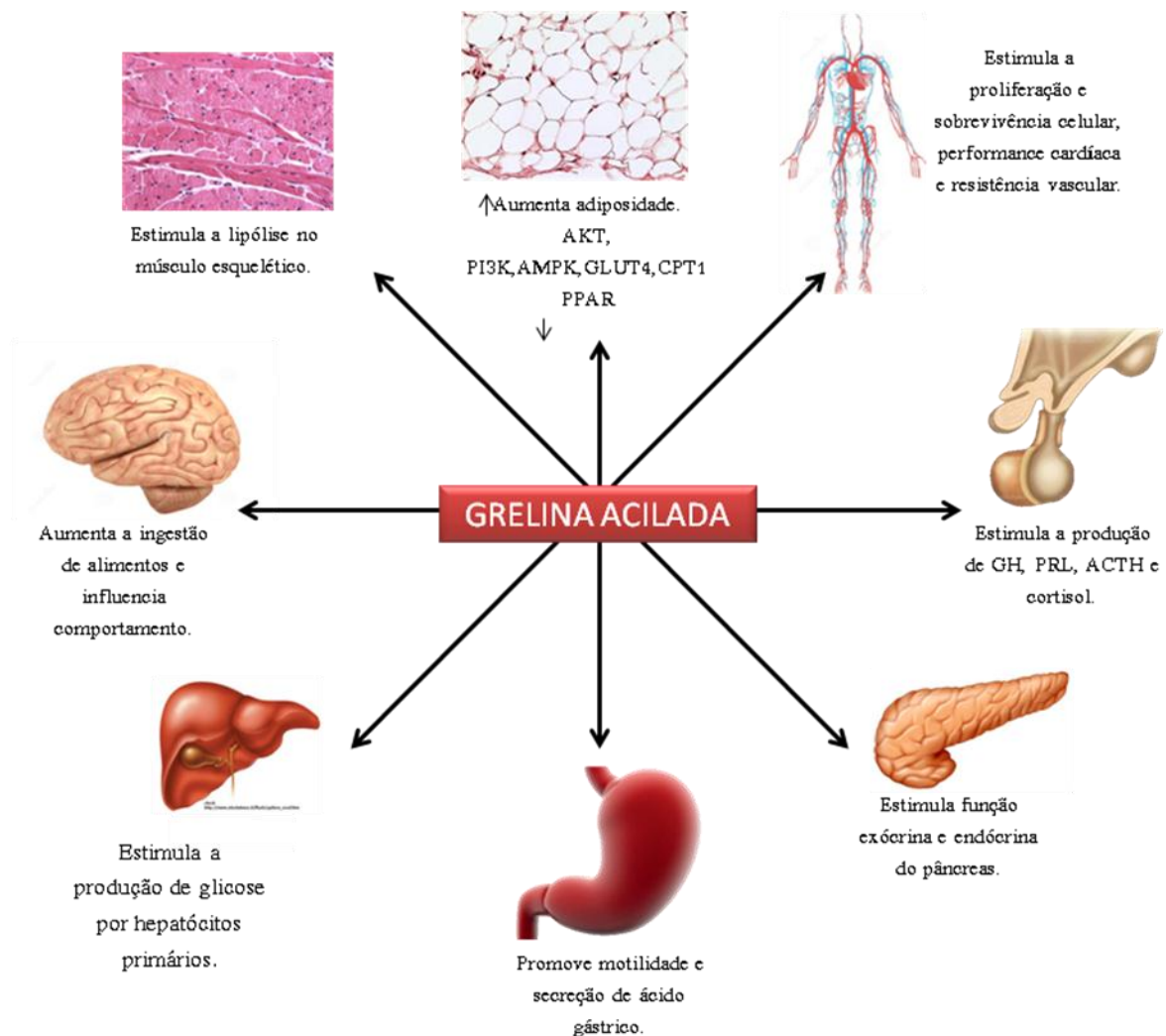


Legenda: Sinalização celular da grelina no hipotálamo. A grelina ao se ligar ao GHS-R1a promove a liberação dos segundos mensageiros cAMP, DAG e IP<sub>3</sub>, que acarretam no influxo de cálcio. O aumento de cálcio intracelular promove o controle da homeostase energética, efeito orexigênico e liberação de GH. O complexo grelina-GHSR promove uma ativação direta sobre a AMPK.

Nota: AC= adenilato ciclase, PLC = fosfolipase C, DAG= diacilglicerol, PKC= proteína quinase C, PKA= proteína quinase A, AMPK= proteína quinase ativada por AMP, ACC= acetil CoA carboxilase, FAS= ácido graxo sintase.

Fonte: Adaptação: CASTANEDA *et al.*, 2010.

Figura 6 - Efeitos metabólicos mediados pela grelina acilada em diversos órgãos e tecidos



Legenda: Efeito central e periférico da grelina acilada.

Nota: GH= hormônio do crescimento, PRL= prolactina, ACTH= hormônio adrenocorticotrófico.

Fonte: Adaptação: Aldrich et al., 2012.

## Grelina e obesidade

Os níveis circulantes de grelina têm sido correlacionados negativamente com o índice de massa corporal, ou seja, indivíduos obesos, tanto adultos quanto crianças, apresentam baixos níveis plasmáticos de grelina acilada comparados a indivíduos eutróficos (TSCHOP *et al.*, 2001).

Existem algumas mutações no gene da grelina que estão ligados a alterações metabólicas em seres humanos. Um polimorfismo no gene da pré-pro-grelina (Leu72Met) não induz alterações na grelina madura, mas se encontra associado à obesidade e diabetes tipo 2. Outro polimorfismo humano raro, localizado no códon 51 (Arg51Gln) está relacionado à redução dos níveis plasmáticos de grelina e também é postulado como um fator de risco para diabetes tipo 2 (HEIMAN, WITCHER, 2006). Hinney e colaboradores (2002) demonstraram que mutações genéticas podem levar a alterações da grelina ou da pré-pro-grelina na obesidade. Neste estudo, identificaram dois polimorfismos do gene precursor da grelina (Leu72Met, Arg51Gln) em crianças e adolescentes com IMC > 39,8 Kg/m<sup>2</sup> (obesos grau II), que não foram identificados nos classificados com IMC < 18,9 Kg/m<sup>2</sup>.

Humanos saudáveis apresentam aumento pré-prandial dos níveis plasmáticos de grelina acilada e este parece ter um importante papel no início da refeição. Após uma hora do início do consumo de uma refeição, os níveis de grelina diminuem (CUMMINGS *et al.*, 2001). Brandão (2011) observou que indivíduos obesos apresentam níveis de grelina menores em relação aos indivíduos eutróficos, e após a ingestão alimentar estes não têm redução da grelina plasmática. Indivíduos obesos com compulsão alimentar apresentam níveis menores de grelina antes do início da refeição, que reduzem após a ingestão alimentar, fornecendo um sinal mais fraco de saciedade, comparado aos níveis de grelina nos indivíduos obesos sem compulsão alimentar. Desta forma, sugere-se que a concentração de grelina plasmática de jejum e pós-prandial pode estar associado com a fisiopatologia da compulsão alimentar periódica (GELIEBTER *et al.*, 2005).

Em pacientes obesos portadores da Síndrome de Prader-Willi, os níveis de grelina são elevados, apresentando uma concentração plasmática em jejum até três vezes maior quando comparados a indivíduos obesos sem a Síndrome (BIZZARRI *et al.*, 2010). As possíveis causas para o elevado nível de grelina neste caso seriam a inervação parassimpática anormal do estômago ou defeitos na sinalização do GHS-R1a (SCERIF *et al.*, 2011; LIM *et al.*, 2011). No caso de pacientes com a Síndrome de Cushing, caracterizada pela obesidade abdominal e resistência à insulina, os níveis de grelina encontraram-se reduzidos, provavelmente pela hiperinsulinemia (OTTO *et al.*, 2004).

Os efeitos da grelina sobre o aumento dos depósitos de gordura no TAB foram observados em animais que receberam injeção de grelina central e periférica, onde este hormônio promoveu aumento da adiposidade e da captação de glicose no tecido adiposo branco epididimal de forma independente do excesso de ingestão alimentar (hiperfagia) (TSCHOP *et al.*, 2000; THEANDER-CARRILLO *et al.*, 2006). Alguns autores já

demonstraram a ação da grelina no TAB sobre enzimas envolvidas na regulação da lipogênese (ACC e FAS), oxidação de lipídios (CPT-1) (BARAZZONI *et al.*, 2005) e metabolismo energético (AMPK) (KOLA *et al.*, 2005). Desta forma, a grelina apresenta ação periférica direta sobre o tecido adiposo, sugerindo que o aumento da adiposidade depende da presença de GHSR neste tecido (DAVIES *et al.*, 2009).

Em estudo anterior, nosso grupo demonstrou que camundongos obesos, aos 21 dias, apresentaram redução significativa nos níveis plasmáticos de grelina acilada. Em contrapartida, no TAB, nós observamos aumento do GHSR1a e de proteínas envolvidas no metabolismo energéticos, como AMPK, AKT, GLUT4 e CPT1. Esses dados enfatizam que, apesar da redução da grelina acilada, o TAB aumenta a resposta a esse hormônio através do GHSR1a e das proteínas abaixo do receptor, o que pode favorecer uma maior captação dos substratos energéticos, acarretando no aumento do peso corporal observado na idade adulta (SOARES *et al.*, 2012).

### **Programação metabólica ou plasticidade ontogenética**

Estudos epidemiológicos e experimentais demonstram forte correlação entre alterações nutricionais em períodos críticos da vida, gestação e lactação, com o desenvolvimento de fatores de risco cardiovascular, hipertensão, dislipidemia, redução da lipoproteína de alta densidade (HDL), hiperinsulinemia e tolerância à glicose, na idade adulta (CRUZ, GORAN, 2004). Este fenômeno é conhecido como programação metabólica (LUCAS, 1991; WATERLAND, GARZA, 1999), o qual recentemente tem sido descrito como plasticidade ontogenética (GLUCKMAN, HANSON, 2007), por possuir características mais probabilísticas que determinísticas.

O ambiente onde o embrião e o feto se desenvolvem é capaz de induzir alterações fenotípicas em longo prazo, sem alterar o genoma. Desta forma, a qualidade do ambiente de desenvolvimento em que os fetos e embriões são expostos é capaz de induzir mudanças ao longo da vida no fenótipo das crianças, tanto em termos morfológicos quanto metabólicos (LILLYCROP, BURDGE, 2011).

Hillier e colaboradores (2007), através de uma análise de estudo populacional multiétnica dos Estados Unidos, verificaram que o aumento da glicemia durante o período gestacional está associado com o aumento do risco de desenvolvimento da obesidade infantil,

sugerindo que a programação metabólica ocorrida durante o período gestacional poderia levar ao desenvolvimento da obesidade no futuro. Por sua vez, a exposição à obesidade materna também é capaz de induzir alterações fisiológicas no TAB da prole (ALFARADHI, OZANNE, 2011). Proles de mães obesas demonstraram hipertrofia dos adipócitos e aumento da expressão do PPAR $\gamma$ , assim como, redução da expressão dos adrenoreceptores  $\beta 2$  e  $\beta 3$ , indicativo de aumento na regulação da lipogênese e diminuição da lipólise (SAMUELSSON *et al.*, 2008). O acúmulo de TAG no fígado também está associado com modelos de hipernutrição materna (SAMUELSSON *et al.*, 2008). Shankar e colaboradores (2010) observaram que a hipernutrição materna altera a regulação de genes envolvidos na biossíntese de lipídios hepáticos, como a redução da SREBP-1 e redução da expressão do PPAR $\alpha$  (Figura 7).

Alguns estudos demonstram a associação de marcadores do estresse oxidativo com a obesidade, resistência à insulina e diabetes, pela interferência na sinalização da insulina (URAKAWA *et al.*, 2003; NISHIKAWA *et al.*, 2007). A produção de EROS, pode ser o evento que precede o início da resistência à insulina e obesidade em resposta a nutrição materna, como a elevação de genes associados com o estresse oxidativo na placenta de mães obesas e no músculo esquelético de fetos (Figura 7) (RADAELLI *et al.*, 2003; YAN *et al.*, 2010). Estes dados sugerem que o estresse oxidativo pode ser um mecanismo associado às alterações na expressão de genes, resistência à insulina, e subsequentemente com alterações no fenótipo metabólico (ALFARADHI, OZANNE, 2011).

Inúmeros mecanismos fisiológicos e metabólicos não estão totalmente desenvolvidos no nascimento e estes processos de maturação continuam logo após esse período (GLUCKMAN, HANSON, 2007), período pós-natal que também é conhecido como janela crítica da programação, já que até o 16º dia de vida pós-natal, o circuito neuronal não está totalmente maduro (ALFARADHI, OZANNE, 2011; LILLYCROP, BURDGE, 2011). Desta forma, inúmeros estudos suportam a hipótese de que alterações nutricionais e hormonais durante o período gestacional e pós-natal podem induzir alterações metabólicas a longo-prazo e aumentar a suscetibilidade de doenças metabólicas na vida adulta (MOURA *et al.*, 1997; GARCIA-SOUZA *et al.*, 2008; TREVENZOLI *et al.*, 2010; FIDALGO *et al.*, 2013; LISBOA *et al.*, 2012)

Plagemann e colaboradores (1992) descreveram o modelo de redução de ninhada durante o período da lactação. Eles demonstraram que a redução da ninhada no terceiro dia de vida era um período crítico para o aumento da adiposidade, desenvolvimento de

hiperleptinemia e hipertensão em ratos adultos alimentados com dieta padrão comerciais após o desmame.

Nosso grupo seguiu o modelo de hipernutrição durante o período da lactação, e demonstrou que animais hipernutridos apresentam modificações fisiológicas que são prejudiciais em longo prazo, como aumento da secreção de insulina e dos níveis de GLUT-2 nas ilhotas pancreáticas, hipertrofia do ventrículo esquerdo com prejuízo na sinalização da insulina, alteração da sinalização da grelina via GHSR/PI3K e AKT no coração (MARTINS *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2009; LACERDA-MIRANDA *et al.*, 2012), alterações na hemodinâmica cardíaca e deposição de colágeno (VIEIRA *et al.*, 2015) em proles na idade jovem e/ou adulta (120 dias) (BERNARDO *et al.*, 2016), prejuízo na via de sinalização da insulina em adipócitos de ratos (RODRIGUES *et al.*, 2007), e hipogrelinemia, acompanhado de aumento na regulação da via de sinalização de grelina no TAB de camundongos jovens (SOARES *et al.*, 2012).

O desenvolvimento da hiperfagia no período da lactação (CUNHA *et al.*, 2009) e na idade adulta (RODRIGUES *et al.*, 2009 e 2011), observada na prole de mães obesas e em proles hiperalimentados no início da vida, sugerem alterações persistentes nas vias de sinalizações que controlam a ingestão alimentar e gasto energético através da síntese de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos no hipotálamo (Figura 7), integrando-os com sinais periféricos do estado nutricional. A desregulação na expressão hipotalâmica desses neuropeptídeos está associada com a obesidade (ALFARADHI, OZANNE, 2011).

A regulação da alimentação a longo e curto prazo são exercidas pelos níveis circulantes de grelina, leptina e insulina. A grelina tem efeito sobre a regulação do balanço energético, pois este hormônio estimula a ingestão alimentar e reduz o gasto energético através da ativação do NPY/AgRP no núcleo arqueado (CASTANEDA *et al.*, 2010). Alguns estudos demonstraram que animais nocaute para o GHSR ou grelina, alimentados com dieta de alto teor de gordura logo após o desmame (4-6 semanas de idade), apresentaram resistência ao desenvolvimento da obesidade quando comparados com os animais controles (WORTLEY *et al.*, 2005; ZIGMAN *et al.*, 2005). Em contrapartida, animais adultos nocaute para grelina quando alimentados com dieta de alto teor de gordura apresentaram maior ganho de peso comparados com os animais controles (SUN *et al.*, 2003; WORTLEY *et al.*, 2004), sugerindo uma interação da grelina com o desenvolvimento do circuito neuronal (hipotálamo) durante o período pós-desmame, e que a falta do sinal da grelina neste período pode ser o responsável pela resistência à obesidade induzida por dieta (WORTLEY *et al.*, 2005). Grove e Cowley (2005) sugerem que os camundongos jovens (4 - 6 semanas de idade) que foram nocauteados



para o receptor de grelina ou para grelina, podem ser expostos a uma relativa hiperleptinemia (devido à ausência do sinal da grelina), resultando no estímulo inibitório nos neurônios NPY/AgRP. Desta forma, os camundongos jovens tornam-se resistentes ao desenvolvimento da obesidade induzida por dieta, devido à supressão do circuito orexigênico.

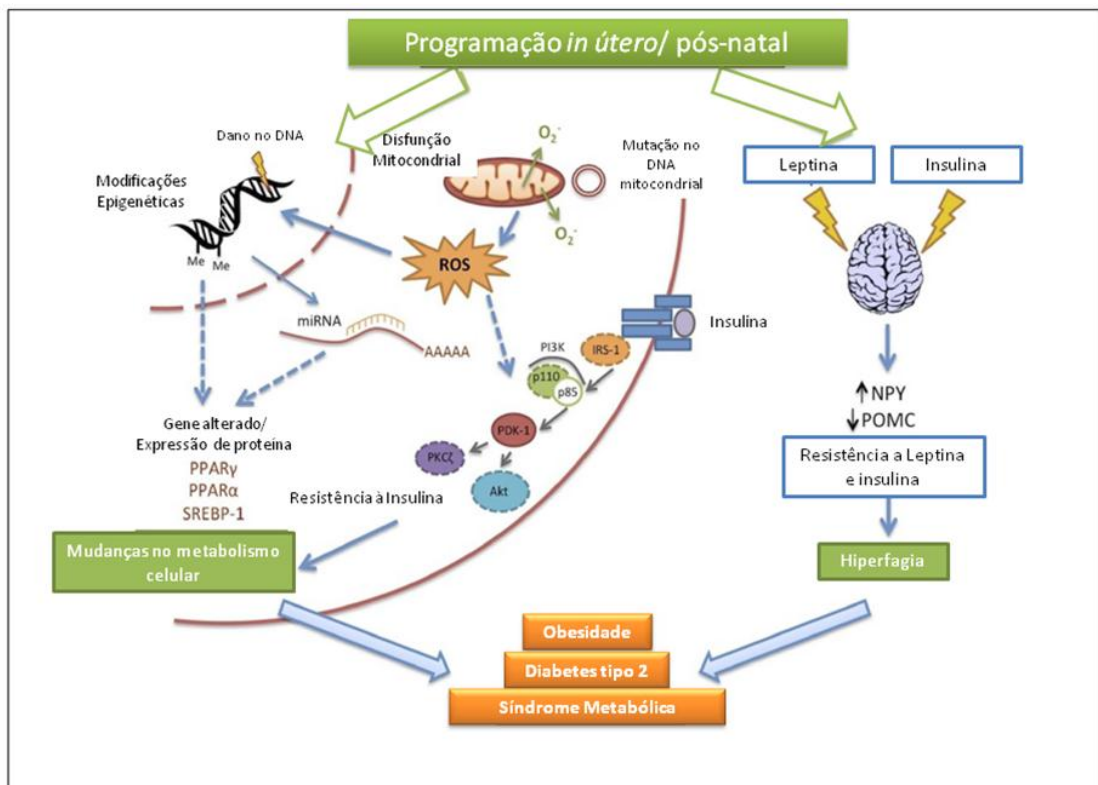
A leptina hormônio produzido nos adipócitos, tanto de seres humanos quanto de roedores, age como fator de sinalização no tecido adiposo e no SNC, reduzindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético, através da inibição dos neurônios orexigênicos produtores de NPY/AgRP e ativação dos neurônios anorexigênicos produtores de  $\alpha$ -MSH (EGUCHI *et al.*, 2008). No modelo de hipernutrição por redução de ninhada, foi descrito que animais jovens (21 dias) apresentam hiperleptinemia (PEREIRA *et al.*, 2006; PLAGEMANN *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2011), apesar de não apresentarem alteração no conteúdo de Ob-R e na via de sinalização da leptina hipotalâmico (RODRIGUES *et al.*, 2011). Na idade adulta esses animais apresentam resistência à leptina hipotalâmica, caracterizada pela redução no conteúdo de JAK2 e menor fosforilação de STAT3, principais proteínas envolvidas na via de sinalização da leptina. Apesar da redução da sensibilidade à leptina, os animais adultos não apresentam alterações nos níveis plasmáticos de leptina e no conteúdo de Ob-R (RODRIGUES *et al.*, 2011).

Por sua vez, a insulina também apresenta papel neurotrófico na regulação da ingestão alimentar, além de demonstrar envolvimento na formação de sinapse, morfogênese dendrítica e plasticidade (ALFARADHI, OZANNE, 2011). Além disso, a insulina apresenta feedback negativo sobre os neurônios do núcleo arqueado (predominantemente nos neurônios NPY e AgRP), emitindo um sinal de saciedade. Este efeito é reduzido no período pós-natal em ratos hiperalimentados, sugerindo resistência à insulina induzida durante o desenvolvimento da prole e que persiste na vida adulta (DAVIDOWA, PLAGEMANN, 2007).

Todos estes achados demonstram que o período gestacional e pós-natal tem papel crítico na indução do desenvolvimento da obesidade. Neste campo, existem evidências de que processos epigenéticos são mecanismos essenciais pelos quais a nutrição no início da vida pode aumentar a susceptibilidade à obesidade na idade adulta (Figura 7). O termo epigenética significa “além da genética” refere-se aos processos que induzem alterações hereditárias na expressão do gene sem alterar a sequência de nucleotídeos (LILLYCROP, BURDGE, 2011). Os principais processos epigenéticos são metilação do DNA e modificação das histonas, ambos os quais servem para regular a expressão do gene sem alterar a sequência de DNA. A metilação do DNA está relacionada ao silenciamento de genes que normalmente ocorre nas ilhas CpG (nucleótidos de citosina e guanina ligados por fosfato) que estão associadas aos

promotores gênicos (LILLYCROP, BURDGE, 2011). As mudanças epigenéticas são fortemente influenciadas pelo ambiente, como o tipo de alimentação. Animais submetidos à hipernutrição no início da vida apresentam hipermetilação da pró-opiomelanocortina (POMC), um gene essencial para a regulação do peso corporal que resulta em alterações na homeostase do apetite e de energia e aumento da prevalência da obesidade na vida adulta (PLAGEMANN *et al.*, 2009). A hipermetilação no receptor de insulina hipotalâmico também foi observada na prole com ninhada reduzida, acarretando em resistência à insulina hipotalâmica, hiperfagia e obesidade em ratos jovens (PLAGEMANN *et al.*, 2010).

Figura 7 - Potenciais mecanismos envolvidos na programação materna e pós-natal



Fonte: Adaptação: ALFARADHI & OZANNE, 2011.

## 1 JUSTIFICATIVA

A grelina é um hormônio com propriedades orexígenas que atua na regulação do balanço energético, além de induzir o aumento da adiposidade e alterar a expressão de enzimas envolvidas na regulação da lipogênese e metabolismo energético no tecido adiposo branco.

Observamos que a redução dos níveis plasmáticos de grelina acilada estão associados a hiperglicemia, hiperinsulinemia, resistência à insulina e alterações no metabolismo lipídico. Ademais, camundongos jovens que foram hiperalimentados na lactação apresentam aumento do conteúdo do GHSR1a, AMPK, CPT1, PI3K e AKT, as quais são ativadas pelo GHSR1a no tecido adiposo branco, mostrando que a hiperalimentação modula positivamente a sinalização do receptor de grelina, afetando o balanço energético nesses animais (SOARES et al., 2012).

Sendo assim, o presente estudo propõe investigar os efeitos agudo da injeção intraperitoneal de grelina acilada sobre o metabolismo energético do tecido adiposo branco de camundongos jovens e adultos hiperalimentados no período da lactação, para testar a hipótese de que a grelina acilada promove modificações no metabolismo energético desses animais.

Este estudo é inédito, e sua relevância deve-se ao fato da grelina ser um hormônio com importante papel na regulação da homeostase energética que ainda é pouco descrita nos estudos científicos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos agudo da grelina acilada sobre os processos de lipogênese, metabolismo glicídico e metabolismo energético mitocondrial no tecido adiposo branco de camundongos obesos que foram submetidos à hiperalimentação na lactação, aos 21 e 120 dias de vida, avaliando a hipótese de que a grelina seria um hormônio modulador destes processos nestes animais.

### 2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Estudar a ação da grelina sobre o perfil biométrico, bioquímico e hormonal dos camundongos jovens e adultos, hiperalimentados na lactação, analisando os seguintes parâmetros

- a) Peso corporal;
- b) Peso da gordura visceral e retroperitoneal;
- c) Peso da gordura marrom e fígado;
- d) Glicemia;
- e) Nível plasmático de insulina e grelina acilada;
- f) Nível plasmático de triglicerídeos e colesterol-total.

2.2.2 Em camundongos jovens e adultos, hiperalimentados na lactação, investigar a ação da grelina no tecido adiposo branco sobre:

- a) Conteúdo protéico do GHSR1a;

- b) O conteúdo de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico (CD36, FAS, PPAR $\gamma$  e PGC1 alfa) ;
- c) Fisiologia mitocondrial;
- d) Quantificação de ATP;
- e) O conteúdo e expressão gênica de proteínas envolvidas no metabolismo energético mitocondrial e na sinalização de insulina (CPT1, UCP2, AMPK $\alpha$ , pAMPK $\alpha$ , IR $\beta$ , PI3K, Akt, pAkt e GLUT4);
- f) O conteúdo de 4HNE.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais e modelo experimental

Para o desenvolvimento do modelo experimental, utilizamos o método de hipernutrição na lactação através de redução de ninhada (PLAGEMANN et al.,1992). 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 são acasaladas (3 fêmeas: 1 macho). As fêmeas prenhas foram mantidas individualmente em gaiolas de prolipropileno sob condições padrão de ciclo claro/escuro de 12 horas (07:00h às 19:00h) e ciclo de exaustão de ar (15min/hora), com temperatura ambiente de 23° C, recebendo água e ração comercial padrão Nuvilab® *ad. Libtum*. Após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para nove filhotes por lactante e divididas em dois grupos: **Grupo Controle (GC)**: Ninhadas de lactantes que amamentaram 9 filhotes (6 machos e 3 fêmeas) com dieta normal até o 21° dia (final da lactação ou desmame). **Grupo Hiperalimentado (GH)**: Ninhadas de lactantes que amamentaram 9 filhotes com dieta normal até o 3° dia, sendo reduzido somente a 3 filhotes machos por gaiola, até o 21° dia (final da lactação ou desmame).

Para estudo dos animais adultos, logo após o desmame os filhotes foram separados das lactantes e colocados em gaiolas com 3 filhotes machos por grupo, receberam água *ad. Libtum* e ração comercial padrão Nuvilab® e mantidos sob as condições padrão descritas anteriormente até a data do sacrifício (120 dias)

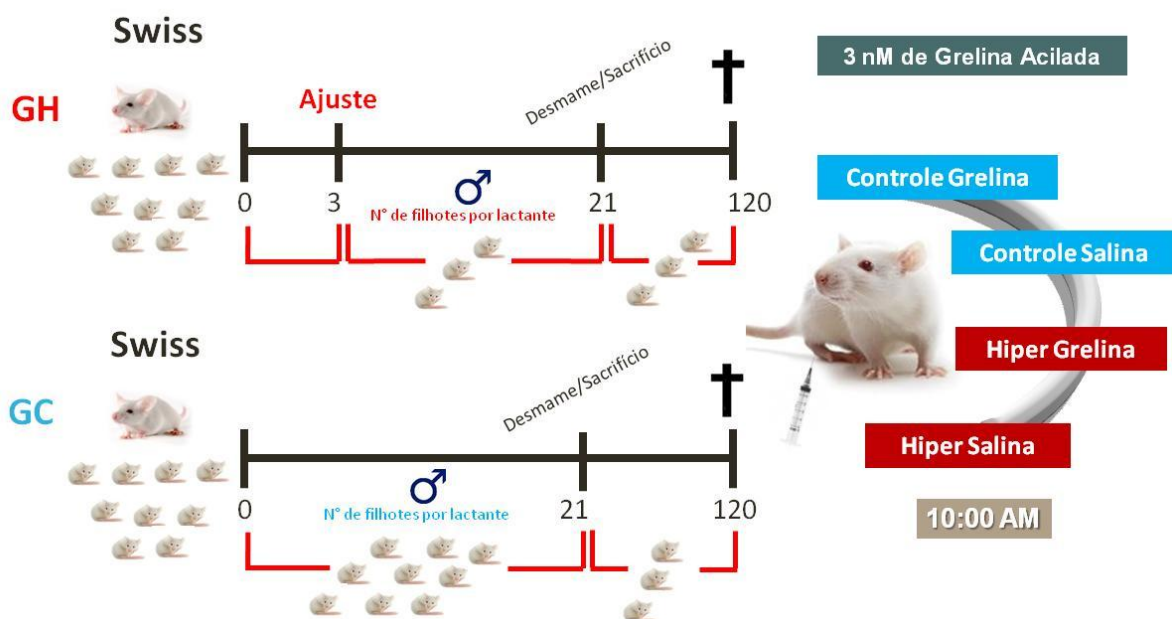
**Dia da eutanásia:** Aos 21 e 120 dias de idade, os animais receberam injeção intraperitoneal de grelina acilada (3nM) (Rat ghrelin – SIGMA), ou solução salina, em um volume final de 100µl e 200 µl, para animais jovens e adultos, respectivamente. Os grupos controles e hiperalimentados foram subdivididos em quatro grupos: **Grupo controle salina, Grupo controle grelina, Grupo hiperalimentado salina e Grupo hiperalimentado grelina**. A dose de grelina foi escolhida após testes demonstrarem efeitos estimulatórios do hormônio (WREN *et al.* 2000)

As injeções de grelina acilada e salina foram realizadas às 10:00 h da manhã e a ração retirada nesse momento. Uma hora após à injeção, os animais foram anestesiados com Avertin intraperitoneal e o tórax aberto para a coleta de sangue e retirada dos tecidos. O horário da injeção e o tempo para a eutanásia foram escolhidos de acordo com trabalhos anteriores, que

demonstraram os efeitos agudos da grelina em diversos tecidos (KOLA et al., 2005). Os animais não foram sacrificados em condições de jejum, a fim de evitar um potencial fator de confusão nos níveis de grelina e insulina (Barazzoni et al. 2005).

Foram utilizados doze (12) ninhadas, das quais foram retirados dois machos de cada ninhada, totalizando seis animais por grupo. Os animais são tratados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, usados pelo colégio brasileiro de experimentação animal (COBEA) e os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (CEUA|053|2011).

Figura 8 - Esquema do modelo de formação dos grupos Hiperalimentado e Controle de 21 dias e 120 dias



Fonte: A autora, 2016.

### 3.2 Análise do peso corporal

Para verificar o efeito da hiperalimentação no início da vida sobre o ganho de peso após o nascimento, foi avaliado o peso corporal das ninhadas do grupo controle e grupo

hiperalimentado. Os animais foram pesados mensalmente dos 21 dias até a idade de 120 dias em balança analítica de precisão (Marte A-1500).

### 3.3 Parâmetros bioquímicos e hormonais

Uma hora após a injeção i.p. de grelina (3 nM) e salina, os animais foram anestesiados com Avertin (0,3 g / kg de peso corporal). A glicemia foi verificada através do sangue retirado da cauda dos animais utilizando glicosímetro e fitas teste (Accu-Chek, Roche, Sao Paulo, Brasil). O tórax foi aberto e o sangue recolhido por punção cardíaca para analisar parâmetros bioquímicos e hormonais.

O plasma foi obtido após centrifugação (3000 rpm / 10 min/ 4° C) em tubo de ensaio contendo EDTA K3 e armazenado em eppendorf a -70°C para subsequente determinação da insulina, colesterol total e triacilglicerol. As concentrações de insulina no plasma foram determinadas utilizando um kit de radioimunoensaio RIA (utilizando o kit ImmuChem™ Insulin Assay <sup>125</sup>I (MP Biomedicals, São Francisco, CA, USA®). Os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol total foram determinados por métodos enzimáticos colorimétricos (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil).

### 3.4 Determinação dos níveis plasmáticos de grelina acilada

O sangue foi coletado por punção cardíaca, posteriormente as amostras de sangue foram vertidas em tubos de ensaio contendo EDTA K3 e 10 µl de Pefabloc (1 mg/ml). Em seguida, os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos para a coleta do plasma. Em seguida, o plasma foi acidificado com HCL (0.05N) e as alíquotas foram mantidas a -20° C para posterior quantificação da grelina acilada através do método de Elisa utilizando-se “kit” comercial específico (*Millipore®*, ELISA Kit, rat/mouse ghrelin active EUA). Após a realização da técnica segundo a orientação do fabricante, foi realizada leitura dual nos comprimentos de onda 450 nm e 590 nm em espectrofotômetro de microplacas universal



modelo  $\mu$ Quant (*Bio-tek Instruments*, EUA). O limite de detecção é de 8 pg/ml e o coeficiente de variação intraensaio é de 2,7%

### **3.5 Mensuração da gordura visceral, fígado e tecido adiposo marrom**

Depósitos de gordura (retroperitoneal e epididimal) dos animais jovens e adultos foram completamente removidos de ambos os lados do animal. A gordura retroperitoneal foi considerada como os depósitos distintos em torno de cada rim ao longo dos músculos lombares, e a gordura epididimal incluiu o tecido adiposo ao redor dos ureteres, bexiga e epidídimo. O fígado e tecido adiposo marrom (TAM) também foram retirados e pesados em balança analítica. Biópsias do fígado foram armazenadas para análise do glicogênio hepático.

### **3.6 Análise Histológica do tecido adiposo branco dos camundongos adultos**

Após o sacrifício, o tecido adiposo branco epididimal dos animais controle e hiperalimentado foram coletados e fixados em formol tamponado por 72 horas. Após este período, o tecido foi desidratado em 5 baterias de álcool absoluto, diafinizados com 3 baterias de xilol e 3 banhos de parafina e por último incluído em parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo com secções de 5 $\mu$ m e os cortes corados com método de Hematoxilina e Eosina.

As imagens digitais foram capturadas com o sistema de câmera de vídeo Optronics CCD pelo microscópio de luz Olympus BX 40, na objetiva de 20x. Foram utilizadas 10 lâminas por animal, dos quais foram selecionados 10 campos aleatórios. Para a determinação da área foi utilizado o software IMAGE J – NIH.

### **3.7 Determinação do glicogênio hepático**

A glicose produzida pela hidrólise do glicogênio hepático foi avaliada pelo método colorimétrico utilizando kit comercial (Glucox 500, Doles, Goiânia, GO, Brazil) em método previamente descrito por Carroll e colaboradores (CARROLL et al., 1956). As amostras do

fígado foram pesadas e homogeneizadas com 1 ml de TCA (10 %) e centrifugadas a 3000 rpm, 4°C, por 15 min. O sobrenadante (com glicogênio em suspensão) foi decantado para um tubo de ensaio em separado e o *pellet* foi ressuspendido novamente em 1ml de TCA (segunda extração) e homogeneizado novamente por 1 min. Mais duas extrações foram feitas da mesma maneira, para extração de maior percentagem (aprox. 97%) do glicogênio presente. Juntaram-se todos os sobrenadantes de cada amostra para análise da concentração de glicogênio. Após a centrifugação, foram adicionados 8 ml de etanol absoluto (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) em 5 ml do sobrenadante. Após 12 h de incubação a -20°C, a mistura foi centrifugada a 3000 rpm, 4°C, por 15 min e o sobrenadante foi descartado. O glicogênio foi hidrolisado pela incubação do *pellet* dissolvido em 2 ml de água destilada e HCl 1M (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR), a 60°C por 5 min. Adicionou-se 50 µl de NaOH 1 M (Vetec, Duque de Caxias, RJ, BR) para neutralizar a mistura. A glicose foi quantificada em 200 µl do sobrenadante a 510 nm em espectrofotômetro Biochrom Assys UVM 340 Scanning Microplate.

### 3.8 Análise de proteína do tecido adiposo e fígado

#### 3.8.1 Western Blotting

Parte da gordura epididimal e fígado foram retirados após o sacrifício e congelados imediatamente em nitrogênio líquido. Os materiais foram lisados em 20 mM Tris HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM Na<sub>3</sub>Vo<sub>4</sub>, 1% NP-40, 0.1% SDS, acrescentado com o inibidor de protease Complete EDTA-Free (Roche Diagnostics, California, USA), por trituração manual com o homogeneizador potter-Elvehjem e posteriormente deixado em repouso no gelo por 30 minutos. Após a lise, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13000 rpm a 4° C, e o sobrenadante coletado e transferido para novos eppendorfs. A dosagem da concentração de proteínas nas amostras foi realizada usando-se o reagente BCA Protein Assay Kit (Pierce, EUA). Em todos os padrões e amostras, pipetamos 200 µl de reagente de trabalho, seguido de incubação em estufa a 37°C por 30 minutos. A leitura foi realizada no leitor de Elisa. Em seguida, o lisado foi desnaturado em

solução tampão (Tris-HCL 50mM; pH 6,8; SDS 1%; 2 $\beta$ -mercaptoetanol 5%; glicerol 10; de azul de bromofenol 0,001%) por 3 minutos a 100°C.

As proteínas totais foram separadas em gel de poliacrilamida a 8, 10 ou 12% (SDS-PAGE), e submetidas a eletroforese. Em seguida, as proteínas foram transferidas por 1 hora utilizando o sistema semi-dry (BIO-RAD, EUA) para membrana PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech). As membranas foram incubadas em solução de bloqueio Tween-TBS (NaCl 0,5M, Tris-HCL 20mM, pH 7,5, Tween-20 0,05%) com 5% de albumina a 25°C por 1 hora sob agitação constante e incubadas overnight a 4°C com anticorpo apropriado.

Foram utilizados os seguintes anticorpos para as amostras do tecido adiposo branco: Anti-GHS-R1a obtido em cabra (C-18, Sc-10368, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-IR $\beta$  (C19, Sc-711), anti-Akt 1/2 obtido em coelho (H-136, Sc-8312, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-pAKT 1/2/3 obtido em coelho (Ser<sup>473</sup>, Sc-7985-R, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-PI3K p85 $\alpha$  obtido em coelho (Z-8, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-GLUT-4 obtidos em coelho (Sc-7938, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-AMPK (1:1000, Upstate Biotechnology, USA), pAMPK $\alpha$  obtidos em coelho (Thr<sup>172</sup>, 1:000, Upstate Biotechnology, USA), anti-FAS obtido em coelho (C20G5 1:500, Cell Signaling), anti-CD36 (Sc-9154, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-PPAR $\gamma$  (Sc-H-100, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-CPT1 (Sc-98834, 1:1000), anti-UCP2 (Sc-6525, 1:1000), PGC1 $\alpha$  (P-19, Sc-5815, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology) obtido em cabra, anti-4HNE (ab 46545) anti-actina (A2066, 1:1000, Sigma-Aldrich) e anti-tubulina. Para análise no fígado foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD36 (Sc-9154, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-PPAR $\gamma$  (Sc-H-100, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-PGC1 $\alpha$  (P-19, Sc-5815, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-AKT 1/2 obtido em coelho (H-136, Sc-8312, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology), anti-pAKT 1/2/3 obtido em coelho (Ser<sup>473</sup>, Sc-7985-R, 1:1000, Santa Cruz Biotechnology, USA), anti-GSK3 (L-17, sc-8257) obtido em cabra, anti-pGSK3 (6D3, sc-81496) obtido em camundongo.

As membranas foram lavadas 3 vezes em tampão TTBS por 5 minutos cada, e posteriormente incubadas com anticorpo secundário conjugado com biotina apropriado (1:2000 ou 1:3000 ou 1:5000, Santa Cruz Biotechnology), seguida por incubação de 1 hora com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:1000 ou 1:2000 ou 1:3000; Invitrogen, Camarillo, USA). As proteínas imunorreativas foram visualizadas através da revelação por

quimiluminescência (ECL-Plus, Amersham Biosciences, Pittsburgh, PA, USA) e subsequentemente quantificadas por desintometria utilizando o software Image J (NIH, Bethesda, MD, USA).

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

#### 3.9.1 Extração do RNA total

O RNA foi isolado a partir de 200 mg de tecido adiposo epididimal utilizando kit RNeasy de extração de tecidos de lipídios (QIAGEN, Valencia, CA) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, o *pellet* foi ressuspenso em 30 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60°C, por 10 minutos, para melhor dissolução do RNA.

Quantidade e qualidade do RNA foram determinadas utilizando um espectrofotômetro NanoVue ® Plus (GE Healthcare, EUA). Alíquotas do RNA total foram diluídas em água DEPC estéril. As leituras foram realizadas nos comprimentos de ondas de 260 nm para ácido nucléico e 280 nm para contaminantes proteicos. A relação entre essas leituras demonstrou uma razão maior que 1,6, garantindo a qualidade do RNA obtido, segundo as exigências vigentes para a biologia molecular.

#### 3.9.2 PCR em tempo real

O RNA total extraído (2,0 µg) foi reversamente transcrito em cDNA a 42°C, na presença da enzima transcriptase reversa e de Random primers. As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas utilizando Taq-Man Universal PCR Master Mix® (Applied Biosystems) com volume de reação de 25 µl. Todas as reações foram realizadas em triplicatas com controle negativo. As reações de PCR foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism 7500® (Applied Biosystems) nas seguintes condições de amplificação: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. A quantificação relativa de cDNA foi obtida pelo software do sistema 7500, que utiliza o método comparativo ( $\Delta\Delta CT$ ).

Primers e sondas específicas para TaqMan CPT1, UCP2, GLUT4 e actina foram obtidos a partir do catálogo de expressão gênica ABI TaqMan® (Foster City, CA, EUA). Este kit de ensaio contém uma mistura de reação mix 20x, de detecção de junções éxon-éxon otimizado para se obter aproximadamente 100% de eficiência.

### 3.10 Respiração mitocondrial

O tecido adiposo foi preparado para mensurações das taxas de fluxo respiratório por dissecação mecânica com pinça microcirúrgicas em solução de relaxamento e preservação BIOPS (em mM: CaK<sub>2</sub>EGTA 2,77, 7,23 K<sub>2</sub>EGTA, MgCl<sub>2</sub> 6,56, ditiotretitol 0,5, K-MES 50, imidazol 20, taurina 20, Na<sub>2</sub>ATP 5,77, fosfocreatina 15, pH 7,1, ajustado a 25 ° C) em gelo. Após a dissecação, o tecido adiposo foi lavado em meio de respiração mitocondrial (MIR05 - em mM: EGTA 0,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,0, K-MES 60, 20, taurina, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10, HEPES 20, Sacarose 110 e BSA 1 g / L, pH 7,1 ajustado em 25 ° C) durante 10 min no gelo.

A taxa respiratória do tecido adiposo foi determinada com o Oroboros Oxygraph - 2k (Oroboros Instruments , Innsbruck , Áustria). O peso úmido foi mensurado em balança analítica e foram utilizadas amostras de 50 mg por câmara, contendo 2 mL de MIR05 a 37 ° C com agitação contínua.

Todas as medidas foram realizados em concentrações de oxigênio superiores a 400 nmol mL<sup>-1</sup> na câmara . Taxas de consumo de oxigênio foram expressos em pmol de O<sub>2</sub>.s<sup>-1</sup>.mg de peso úmido<sup>-1</sup>. Os estudos foram realizados com dois conjuntos independentes de substratos em cada uma das câmaras (em mM):. (Câmara A) glutamato 10, malato 2 e succinato 10, e ( câmara B ) palmitoil - L - carnitina e 0,02 malato. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: estado 3 - taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM), e estado 4 - taxa respiratória na ausência de fosforilação de ADP, após a adição de oligomicina (1 µg/mL), um inibidor da ATP-sintase. Para examinar a integridade da membrana mitocondrial através de todas as preparações, a respiração foi mensurada em presença de 10µM de citocromo c.

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

### 3.11 Dosagem de ATP

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

### 3.12 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de 6 animais por grupo. Foram utilizados para análise estatística ANOVA two-way seguido de pós-teste Bonferroni. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism v.6.05 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA) e o nível de significância foi estabelecido como  $P < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### Animais jovens (21 dias)

#### 4.1 Efeitos da administração de grelina sobre peso corporal, gordura visceral, gordura marrom e fígado

Observamos que os animais hiperalimentados no início da lactação apresentaram um aumento de 48% de ganho de peso em relação ao grupo controle (GC-Sal x GH-Sal). Como resultado das alterações observadas no peso corporal, o grupo hiperalimentado apresentou um aumento significativo (três vezes) da gordura epididimal em relação ao grupo controle ( $p < 0.0001$ ) (Tabela 1). Além disso, o grupo hiperalimentado apresentou aumento do peso do fígado e gordura marrom ( $p < 0.0001$ ). Não foram observadas modificações nos parâmetros biométricos após a injeção i.p. de grelina acilada ( $p > 0,05$ ), quando comparados com os grupos salinas (GC-Sal x GC-Grel; GH-Sal x GH-Grel).

Tabela 1 - Peso corporal, gordura visceral, gordura marrom e fígado dos grupos controle e hiperalimentado aos 21 dias

Parâmetros	<i>GC-Sal</i>	<i>GC-Grel</i>	<i>GH-Sal</i>	<i>GH-Grel</i>
<b><i>Peso corporal</i></b>	12,528±0,487	13,342±0,426	18,657±0,296 <sup>a</sup>	19,142±0,568 <sup>b</sup>
<b><i>Gordura epididimal (g)</i></b>	0,036±0,002	0,0446±0,008	0,242±0,025 <sup>a</sup>	0,2862±0,030 <sup>b</sup>
<b><i>Gordura marrom/PC (g)</i></b>	0,0845±0,003	0,087±0,005	0,1267±0,010 <sup>a</sup>	0,126±0,007 <sup>b</sup>
<b><i>Fígado (g)</i></b>	0,469±0,043	0,384±0,029	0,782±0,071 <sup>a</sup>	0,81875±0,076 <sup>b</sup>

Legenda: GC-Sal= grupo controle com injeção de salina; GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

Nota: Resultados expressos como Média  $\pm$  E.P.M. n= 6 animais por grupo. **a**, significante em comparação ao GC-Sal; **b**, significante em comparação ao GC-Grel; **c**, significante em comparação ao GH-Sal.

#### 4.2 Efeitos da administração de grelina em parâmetros metabólicos em camundongos hiperalimentados durante o período da lactação

Os animais jovens hiperalimentados na lactação apresentaram aumento significativo da glicemia, insulina e triglicerídeos. Entretanto, os níveis plasmáticos de grelina acilada apresentaram uma redução significativa, quando comparado com os animais do grupo controle. Após a injeção i.p. de grelina houve um aumento significativo na glicemia e triglicerídeos nos animais controles, enquanto que os níveis de insulina e grelina acilada apresentaram uma redução significativa. Nos animais hiperalimentados, a injeção de grelina reduziu significativamente os níveis plasmáticos de insulina, mas não observamos alterações significativas na glicemia, grelina acilada, triglicerídeos e colesterol total, quando comparados com os animais hiperalimentados com injeção de salina.

Tabela 2 - Efeitos da administração de grelina sobre parâmetros metabólicos (glicemia, insulina, triglicerídeos e colesterol total) em camundongos jovens

Parâmetros	GC-Sal	GC-Grel	GH-Sal	GH-Grel
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	146,8 $\pm$ 3,926	179,9 $\pm$ 6,56 <sup>a</sup>	201,1 $\pm$ 7,27 <sup>a</sup>	195,7 $\pm$ 6,088
<b>Insulina (pM)</b>	177,38 $\pm$ 45,57	89,90 $\pm$ 13,29 <sup>a</sup>	389,64 $\pm$ 41,9 <sup>a</sup>	174,26 $\pm$ 13,154 <sup>c</sup>
<b>Grelina acilada (pg/ml)</b>	155,8 $\pm$ 15,094	111,2 $\pm$ 5,386 <sup>a</sup>	113,6 $\pm$ 4,084 <sup>a</sup>	124,2 $\pm$ 11,193
<b>TAG (mg/dl)</b>	95,20 $\pm$ 5,597	137,0 $\pm$ 5,900 <sup>a</sup>	151,3 $\pm$ 10,30 <sup>a</sup>	153,0 $\pm$ 6,878
<b>Colesterol total (mg/dl)</b>	63,00 $\pm$ 5,698	63,71 $\pm$ 4,358	60,20 $\pm$ 6,074	71,17 $\pm$ 2,395

Legenda: Resultados expressos como Média  $\pm$  E.P.M. n= 6 animais por grupo. **a**, significante em comparação ao GC-Sal; **b**, significante em comparação ao; **c**, significante em comparação ao GH-Sal GC-Grel. GC-Sal= grupo controle com injeção de salina; GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal

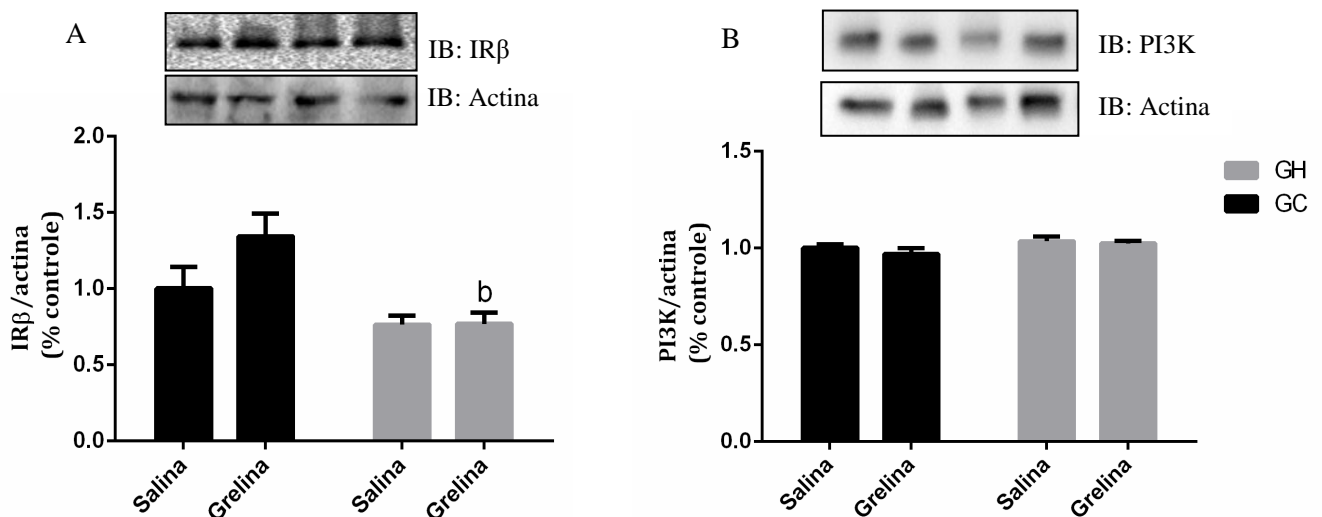


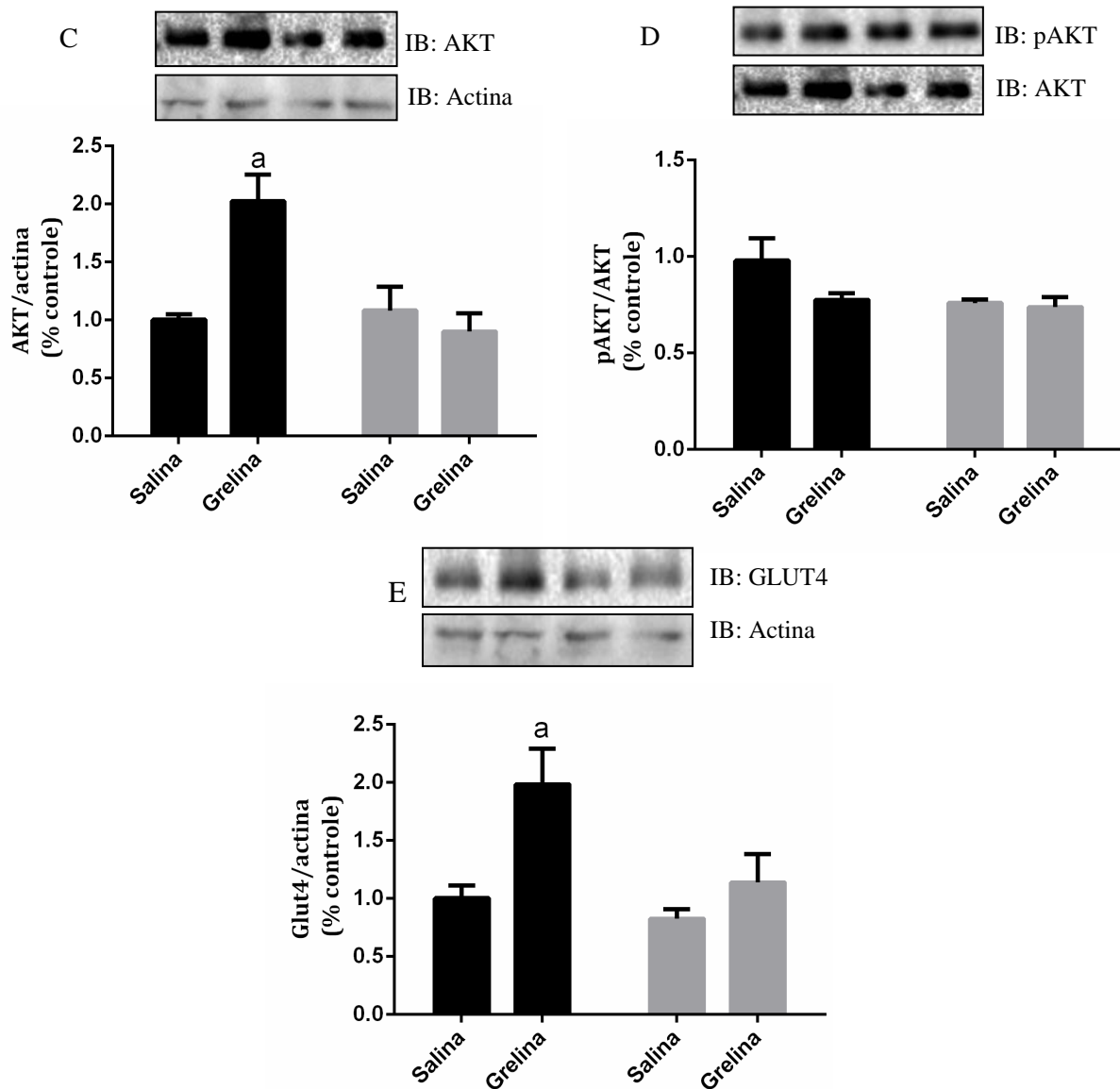
= grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

#### 4.3 Efeito da administração de grelina sobre a via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação

Para avaliar os efeitos agudos da grelina sobre a via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco, algumas proteínas chaves foram estudadas. Os animais expostos à hiperalimentação durante a lactação não demonstraram uma diferença significativa no conteúdo de IR $\beta$  (Fig. 9 A), PI3K (Fig. 9 B), AKT, pAKT/AKT ((Fig. 9 C, D), e GLUT4 (Fig. 9 E), em comparação com o grupo controle ( $P > 0,05$ ). A injeção periférica de grelina acilada em camundongos do grupo controle aumentou significativamente o conteúdo AKT ( $P < 0,05$ ) e GLUT4 ( $P < 0,001$ ) em comparação com ao GC-Sal. A interação entre os fatores estudados potencializaram positivamente o aumento da AKT (*Two way ANOVA*,  $p < 0,001$ ), enquanto que o conteúdo de GLUT4 foi influenciado independentemente pelos fatores estudados (*Two way ANOVA*,  $p < 0,05$ ). No entanto, os animais hiperalimentados não demonstraram diferença significativa na IR $\beta$ , PI3K, AKT, pAKT/AKT e GLUT4 ( $P > 0,05$ ) após a injeção periférica de grelina em comparação com GH-Sal (Fig. 9 A, B e D). Houve uma interação entre os fatores hiperalimentação e injeção de grelina contribuindo as modificações observadas (*Two way ANOVA*,  $p < 0,001$ ).

Figura 9 - Análise das proteínas da via de sinalização da insulina no TAB de animais jovens





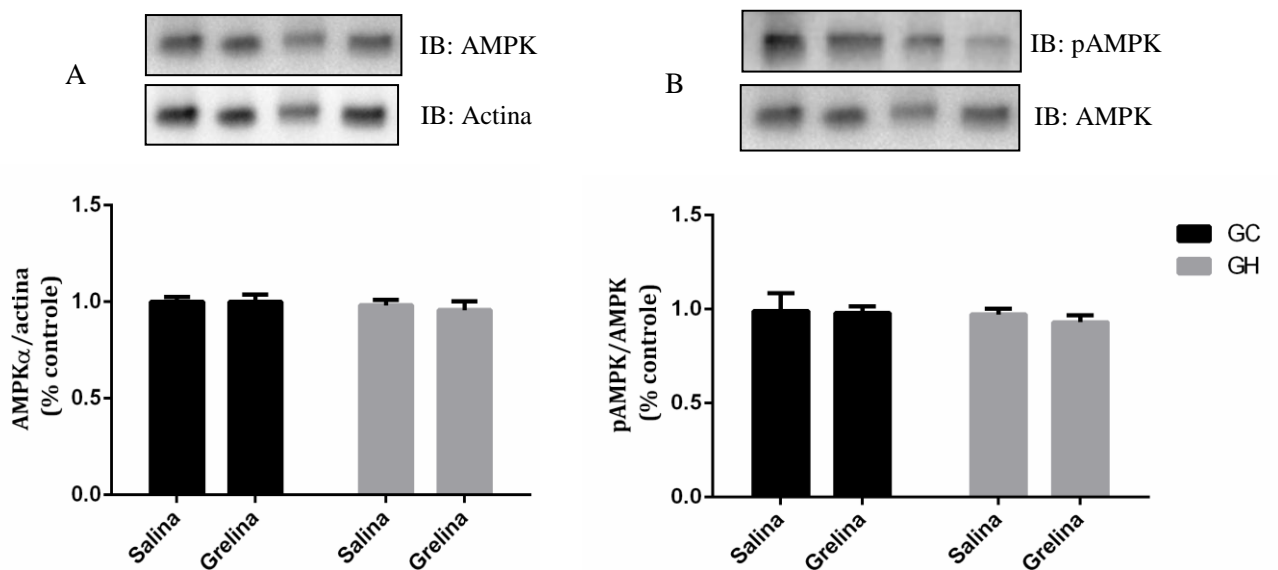
Legenda: O gráfico representa o conteúdo total do IR $\beta$  (A), PI3K (B), AKT (C), pAKT / AKT (D) e GLUT4 (E) do TAB dos animais controles e hiperalimentados com injeção de salina e grelina acilada (3 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Gre; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

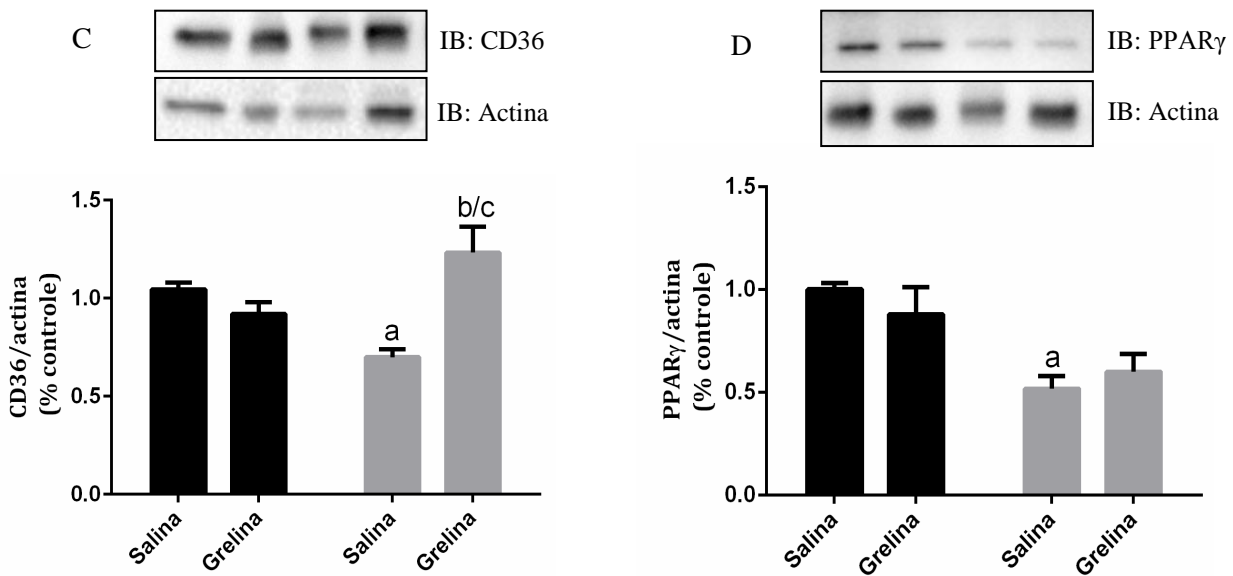
#### 4.4 Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de AMPK, CD36 e PPAR $\gamma$ no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação

Os animais jovens hiperalimentados durante a lactação não apresentaram diferença significativa no conteúdo das proteínas AMPK, pAMPK/AMPK (Fig. 10 A, B), mas o conteúdo de CD36 (Fig. 10 C) e do fator de transcrição PPAR $\gamma$  (Fig. 10 D) foi menor no

grupo hiperalimentado ( $p < 0,001$ ), quando comparados com os animais do grupo controle. Após a injeção de grelina acilada, não foi observada alterações no conteúdo da AMPK, pAMPK/AMPK e PPAR $\gamma$  (Fig. 10 A, B, D) nos animais controles e hiperalimentados. Entretanto, a injeção de grelina aumentou o conteúdo de CD36 (Fig. 10 C) no TAB do grupo hiperalimentado, em comparação com o grupo hiperalimentado salina ( $p < 0,001$ ). No grupo controle, a injeção de grelina não modificou o conteúdo da CD36, em comparação grupo controle salina ( $p > 0,05$ ). Houve uma interação entre os fatores hiperalimentação e injeção de grelina contribuindo para o aumento do CD36 (*Two way ANOVA*,  $p < 0,001$ ).

Figura 10 - Análise do conteúdo da AMPK, pAMPK/AMPK, CD36 e PPAR $\gamma$  no tecido adiposo branco de animais jovens





Legenda: O gráfico representa o conteúdo total do AMPK (A), pAMPK/AMPK (B), CD36 (C) e PPAR $\gamma$  (D) do TAB dos animais controles e hiperalimentados com injeção de salina e grelina acilada (3 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Grel; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

#### 4.5 Efeitos da administração de grelina sobre a oxidação dos substratos energéticos no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação

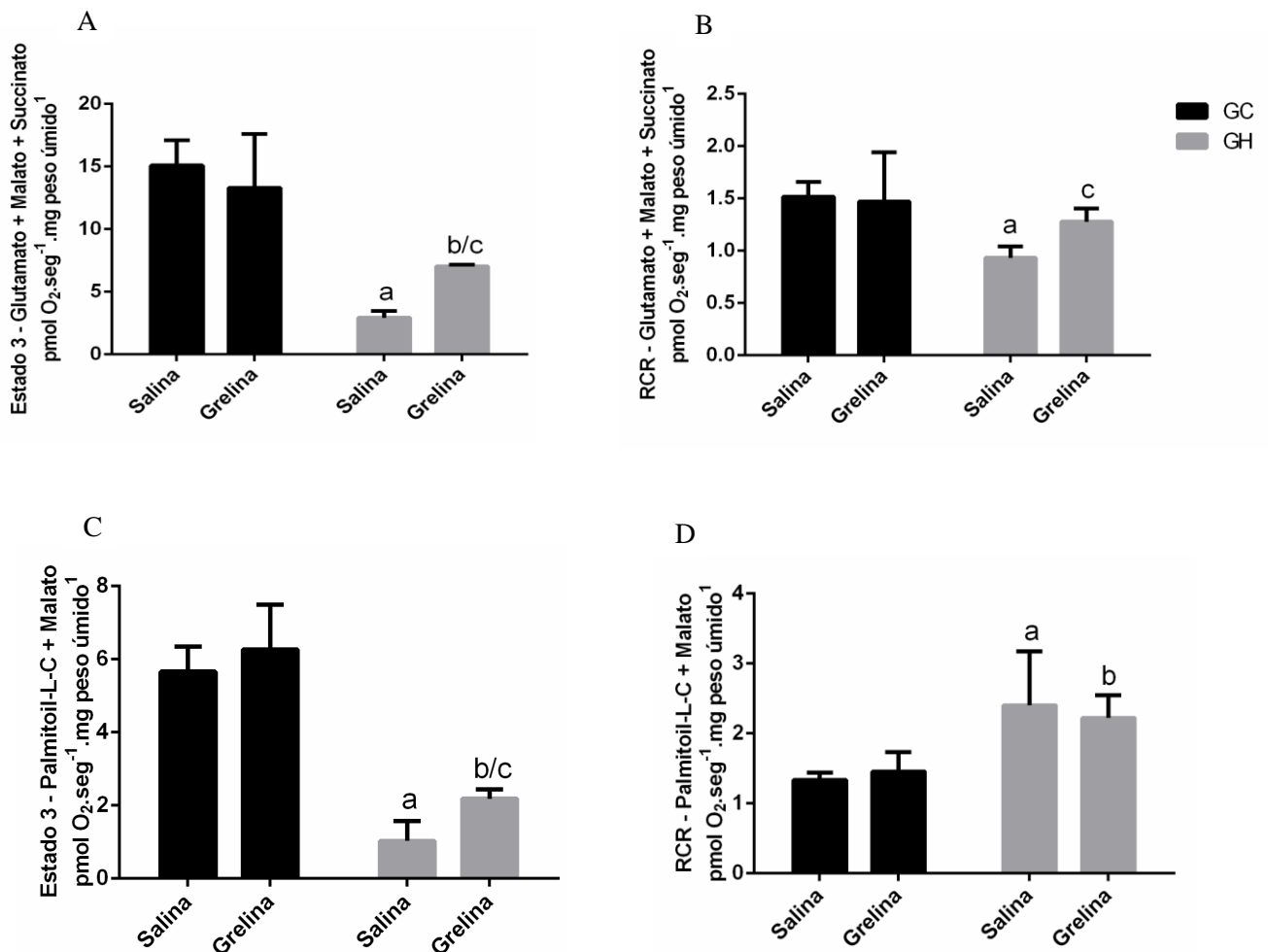
Através da respirometria de alta resolução avaliamos a oxidação dos substratos energéticos no tecido adiposo branco e a ação da grelina sobre este processo. Por mensuração da taxa respiratória máxima estimulada por ADP, observou-se que a hiperalimentação durante a lactação diminuiu a taxa de respiração máxima (estado 3) com os substratos glutamato, malato, succinato (Fig. 11 A) e palmitoil-L-carnitina (Fig. 11 C), quando comparado com grupo controle ( $p < 0,0001$ ), ou seja, a hipernutrição promoveu uma redução da oxidação dos substratos energéticos no tecido adiposo branco de nos animais jovens. No entanto, a injeção de grelina aumentou a oxidação desses substratos nos animais hiperalimentados em comparação aos animais hiperalimentados com injeção de salina (Fig. 11 A, C,  $p < 0,05$ ) Não observamos modificações na oxidação de substratos energéticos no tecido adiposo branco após a injeção de grelina no grupo controle ( $p > 0,05$ ).

Além disso, observamos que a hiperalimentação promove uma diminuição do RCR com os substratos glutamato, malato e succinato (Fig. 11 C), ao passo que, no protocolo com

malato e palmitoil-L-carnitina (Fig. 11 D), o RCR encontra-se aumentado em comparação com o grupo controle ( $p < 0,01$ ). Entretanto os animais hiperalimentados apresentaram um maior RCR no protocolo com malato e palmitoil-L-carnitina, comparados ao grupo controle (GC-Sal x GH-Sal,  $p < 0,0001$ ), indicando um maior acoplamento da fosforilação oxidativa.

A injeção de grelina aumentou o RCR no protocolo com os substratos glutamato, malato e succinato no grupo hiperalimentado (Fig. 11 C,  $p < 0,05$ ), indicando melhora do acoplamento da fosforilação oxidativa, porém não alterou o RCR no protocolo com malato e palmitoil-L-carnitina, (Fig. 11 D,  $p > 0,05$ ).

Figura 11 - Respirometria de alta resolução do tecido adiposo branco de animais jovens



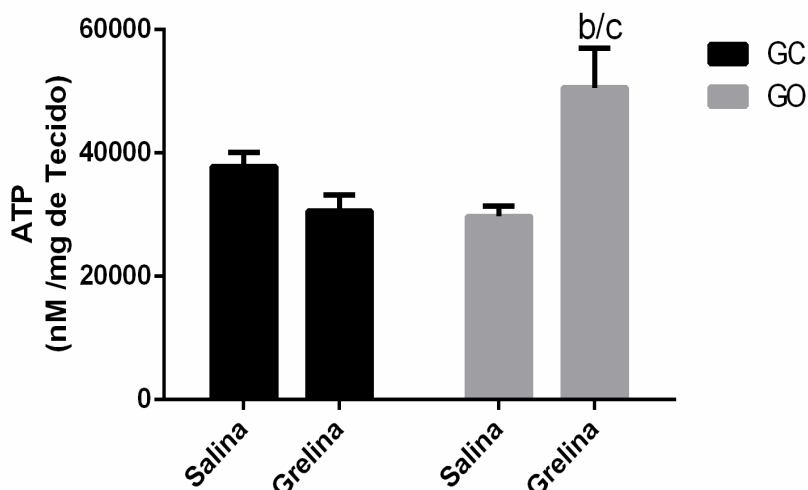
Legenda: Respirometria de alta resolução do tecido adiposo após a injeção de salina e grelina acilada (3 nM) em animais Jovens. O gráfico mostra o estado 3 (estimulado por ADP) durante a oxidação dos substratos glutamato, malato e succinato na câmara A (A) e palmitoil-carnitina e malato na câmara B (C). A razão do controle respiratório (RCR) foi calculada com a razão das taxas respiratórias dos estados 3 e 4 (B e D). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 6$  animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Gre; **c**, significativo

em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

#### 4.6 Efeitos da administração de grelina sobre os níveis de ATP no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação

Nós analisamos os efeitos da hiperalimentação e da grelina acilada sobre os níveis de ATP no tecido adiposo branco de animais jovens. Animais hiperalimentados durante a lactação não apresentaram diferença significativa nos níveis de ATP ( $p > 0,05$ ) no TAB, quando comparados com o grupo controle (Fig. 12). Após a injeção de grelina o grupo controle não apresentou alteração ( $p > 0,05$ ) nos níveis de ATP, quando comparado com o grupo controle com injeção de grelina ( $p > 0,05$ ), porém o grupo hiperalimentado apresentou aumento dos níveis de ATP ( $p < 0,001$ ) no TAB. Tal resultado foi maximizado pela interação entre os fatores hiperalimentação e injeção de grelina.

Figura 12 - Níveis de ATP no tecido adiposo branco de animais jovens



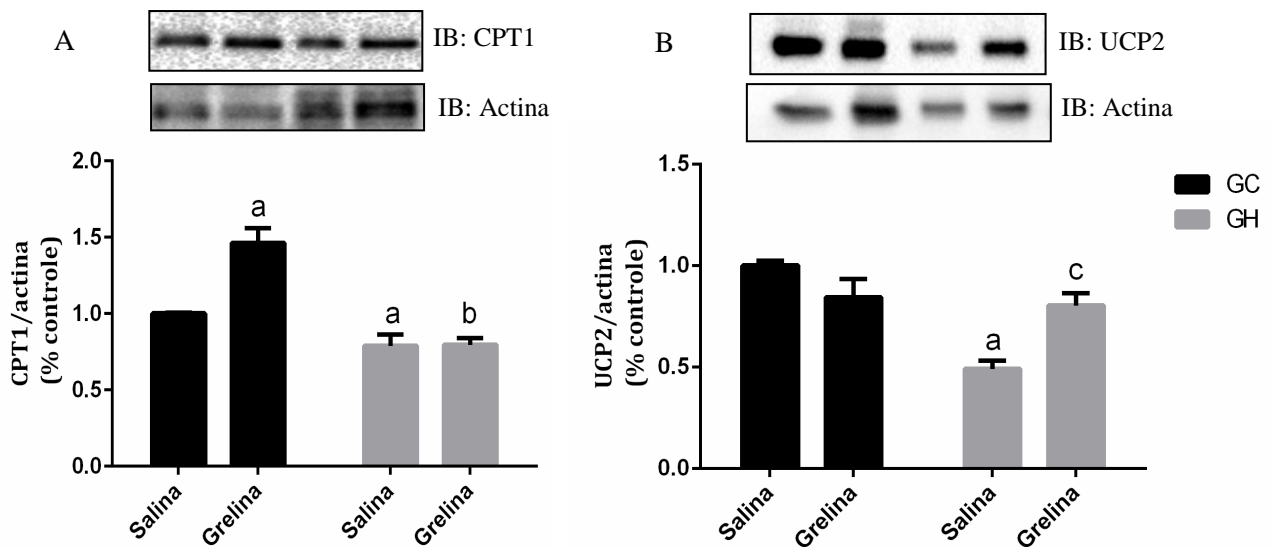
Legenda: O gráfico representa os níveis de ATP no do TAB dos animais controles e hiperalimentados com injeção de salina e grelina acilada (3 nM)). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 6$  animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Gre; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

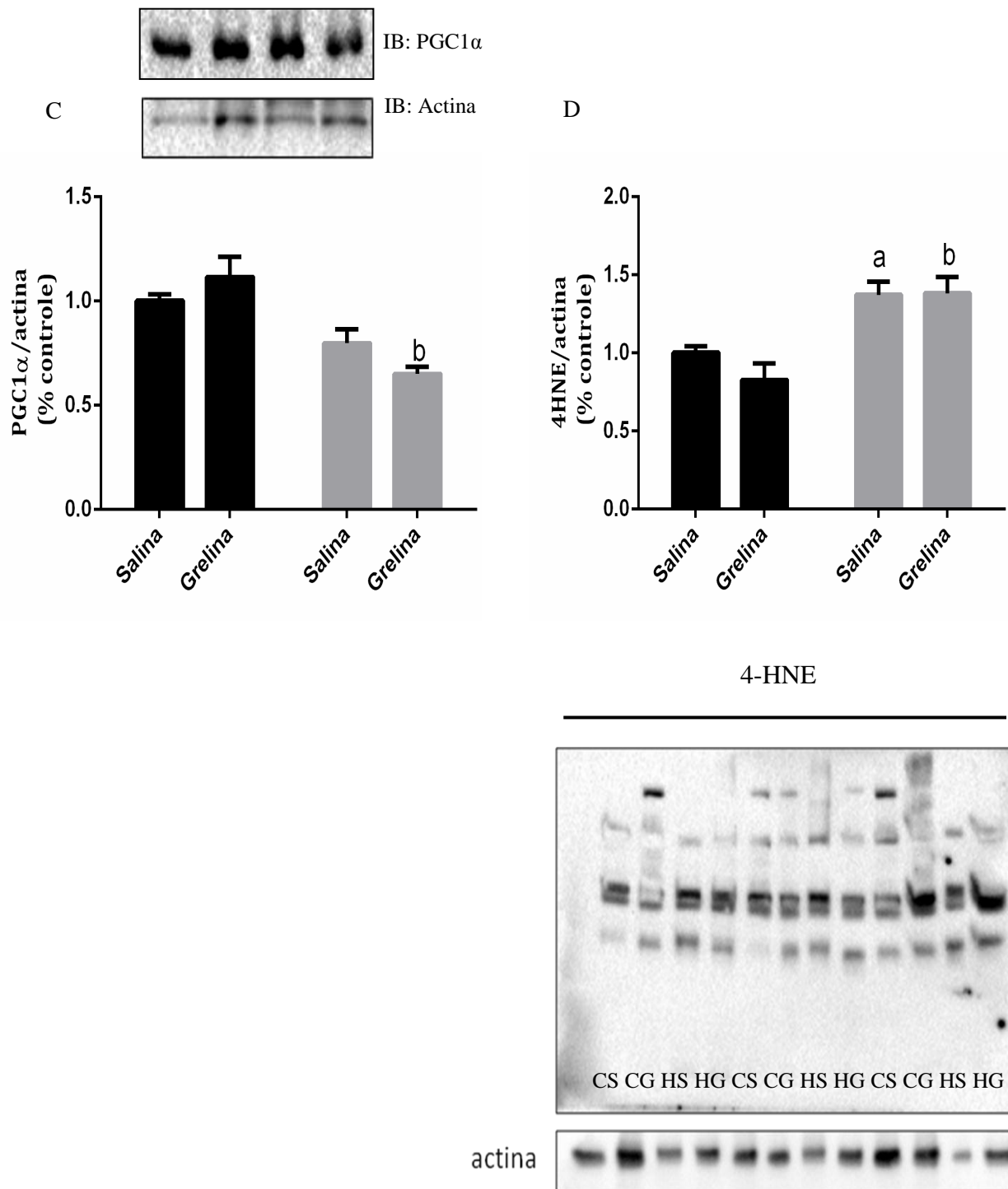
#### 4.7 Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de proteínas mitocondriais no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação

No presente estudo, observamos que os animais hiperalimentados apresentaram uma redução significativa no conteúdo da CPT-1, UCP2 e aumento no conteúdo de 4-HNE (Fig. 13 A, B e D,  $p < 0,05$ ), quando comparado com o grupo controle. Entretanto, a hiperalimentação não modificou o conteúdo da PGC1 $\alpha$  ( $p > 0,05$ ) nesses animais (Fig. 13 C).

Após a injeção de grelina observamos um aumento do conteúdo da CPT-1 (Fig. 13 A,  $p < 0,001$ ) no grupo controle (GC- Sal x GC- Grel), porém não houve diferença significativa no grupo hiperalimentado (GH- Sal x GH- Grel,  $p > 0,05$ ). Além disso, a injeção de grelina aumentou o conteúdo de UCP2 (Fig. 13 B) nos animais hiperalimentados (GH- Sal x GH- Grel,  $p < 0,05$ ). Em relação ao conteúdo da PGC1 $\alpha$  e do 4-HNE (Fig. 13 C, D) a injeção de grelina acilada não alterou o conteúdo desses marcadores no TAB dos animais jovens, controles e hiperalimentados, quando comparados com seus respectivos grupos salinas (GC- Sal x GC- Grel, GH- Sal x GH- Grel,  $p > 0,05$ ).

Figura 13 – Análise das proteínas mitocondriais no tecido adiposo branco de animais jovens





Legenda: Análise do conteúdo total de CPT1 (A), UCP2 (B), PGC1 $\alpha$  (C) e 4HNE (D) do TAB dos animais controles e hiperalimentados com injeção de salina e grelina acilada (3 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Gre; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina



Animais adultos (120 dias)

**4.8 Efeito da administração de grelina sobre peso corporal, gordura visceral, gordura marrom e fígado**

Observamos que os animais hiperalimentados no início da lactação permanecem com um aumento significativo de massa corporal ( $P < 0,0001$ ) em comparação ao grupo controle (GC-Sal x GH-Sal) (Tabela 3). Analisou-se o peso da gordura epididimal ( $P < 0,0001$ ), gordura marrom interescapular ( $P < 0,001$ ) e peso do fígado desses animais e verificamos que o grupo hiperalimentado apresentou um aumento significativo em relação ao grupo controle (GC-Sal x GH-Sal). Não foram observadas modificações nos parâmetros biométricos após a injeção i.p. de grelina acilada ( $p > 0,05$ ), quando comparados com os grupos salinas (GC-Sal x GC-Grel; GH-Sal x GH-Grel).

Tabela 3 - Peso corporal, gordura epididimal, gordura marrom e fígado dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias

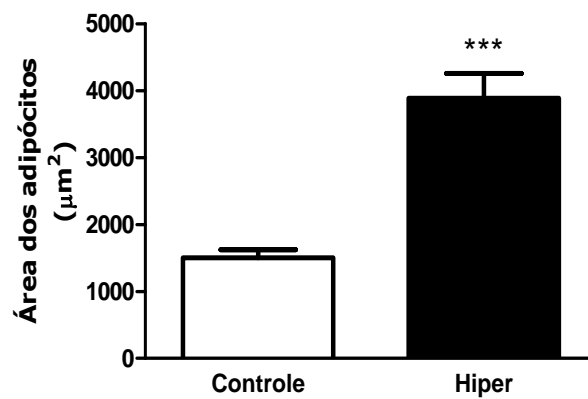
Parâmetros	GC-Sal	GC-Grel	GH-Sal	GH-Grel
<b>Peso corporal</b>	49,30±0,904	50,025±0,977	67,557±2,399 <sup>a</sup>	66,130±2,43
<b>Gordura epididimal (g)</b>	1,553±0,120	1,391±0,210	3,530±0,357 <sup>a</sup>	2,842±0,173
<b>Gordura marrom/PC (g)</b>	0,0026±0,000243	0,003±0,000243	0,00454±0,0002 <sup>a</sup>	0,004±0,0003
<b>Fígado</b>	1,806± 0,0974	1,884± 0,1215	2,452±0,1541 <sup>a</sup>	2,397±0,2377 <sup>b</sup>

Legenda: Resultados expressos como Média ± E.P.M. n= 6 animais por grupo. **a**, significante em comparação ao GC-Sal; **b**, significante em comparação ao GC-Grel; **c**, significante em comparação ao GH-Sal. GC-Sal= grupo controle com injeção de salina; GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

#### 4.9 Análise da morfologia do tecido adiposo branco e da morfometria dos adipócitos de camundongos adultos

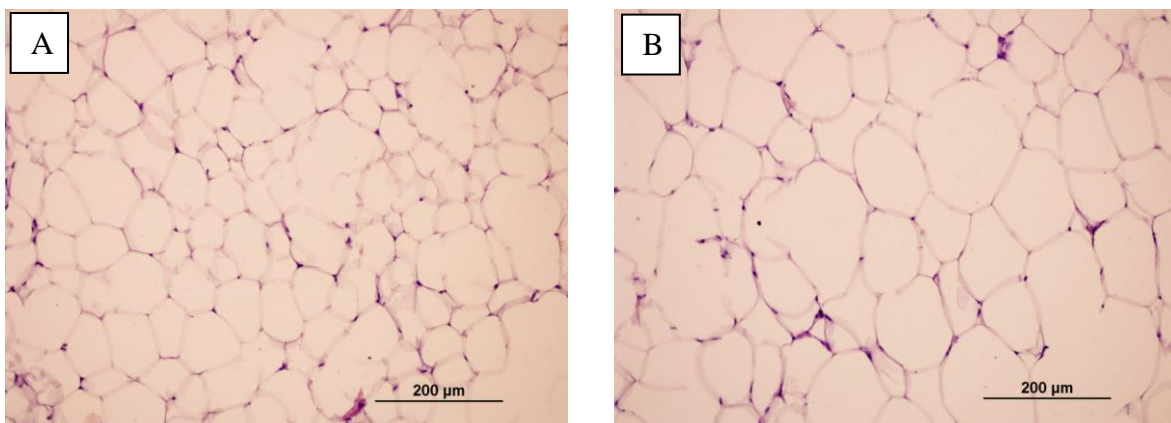
Através da análise morfométrica, observamos que o grupo hiperalimentado apresenta um aumento significativo ( $p < 0,0001$ ) na área do adipócito, em relação ao grupo controle (Fig. 14).

Figura 14 - Área do tecido adiposo epididimal dos animais adultos



Legenda: Os valores representam a MÉDIA±EPM \* $P < 0,0001$  quando comparado ao GC. GC= grupo controle. GH= grupo hiperalimentado.

Figura 15 - Fotomicrografias dos adipócitos epididimais de camundongos aos 120 dias de idade



Legenda: A – Grupo Controle; B- Grupo Hiperalimentado. n=6 animais por grupo. Objetiva de 20x. Coloração HE.

#### **4.10 Efeitos da administração de grelina em parâmetros metabólicos de camundongos adultos, hiperalimentados durante o período da lactação**

Avaliando primeiramente os efeitos da hiperalimentação sobre os parâmetros metabólicos, observamos que o GH-Sal apresentou uma maior glicemia ( $P < 0,0001$ ), insulina plasmática ( $P < 0,001$ ), triglicerídeos ( $P < 0,01$ ) e maior conteúdo de glicogênio hepático ( $P < 0,05$ ) em comparação com o GC-Sal. O GH-Sal apresentou diminuição significativamente (48,36%) nos níveis plasmáticos de grelina acilada ( $P < 0,001$ ) em comparação com o CG-Sal.

A administração de grelina induziu um aumento significativo na glicemia dos animais controles, enquanto que nos animais hiperalimentados houve uma redução de 20%, comparado ao GC-Sal e GH-Sal. O glicogênio hepático encontrou-se elevado (45%) no grupo controle e reduzido (40%) no grupo hiperalimentado, após a injeção de grelina comparados aos GC-Sal e GH-Sal, respectivamente. Os níveis de grelina acilada plasmática reduziram (60%) no GC-Grel, após a injeção, enquanto no GH houve um aumento (77%) significativo no GH-Grel, comparados aos GC-Sal e GH-Sal, respectivamente. Tais parâmetros foram influenciados pela interação dos fatores estudados ( $P < 0,0001$ ). A injeção i.p de grelina acilada não alterou os níveis plasmáticos de insulina nos grupos controle e hiperalimentado, nem nos níveis de triglicerídeos, porém os animais hiperalimentados apresentaram redução (58,8%) significativa do colesterol total.

Tabela 4 - Efeito da administração de grelina sobre os parâmetros metabólicos (glicemia, glicogênio, grelina acilada, insulina, triglicerídeos e colesterol total) em animais adultos (120 dias)

Parâmetros	<i>GC-Sal</i>	<i>GC-Grel</i>	<i>GH-Sal</i>	<i>GH-Grel</i>
<b>Glicemia (mg/dl)</b>	154,9 ± 6.396	198,9 ± 2.489 <sup>a</sup>	270,2 ± 21,44 <sup>a</sup>	220,1 ± 10,68 <sup>c</sup>
<b>Glicogênio (mg/g tec)</b>	0,932 ± 0,0504	1,355 ± 0,119 <sup>a</sup>	1,418 ± 0,144 <sup>a</sup>	0,863 ± 0,0685 <sup>c</sup>
<b>Grelina acilada (pg/ml)</b>	166,04 ± 16,80	109,00 ± 12,92 <sup>a</sup>	86,875 ± 6,818 <sup>a</sup>	150,625 ± 12,283 <sup>c</sup>
<b>Insulina (mUI/ml)</b>	13,93 ± 1,357	15,20 ± 1,111	26,83 ± 4,174 <sup>a</sup>	29,02 ± 2,362 <sup>b</sup>
<b>TAG (mg/dl)</b>	101,9 ± 8,628	110,6 ± 7,897	146,5 ± 6,682 <sup>a</sup>	133,3 ± 8,288
<b>Colesterol-total (mg/dl)</b>	107,0 ± 6.382	92,25 ± 6.227	96,20 ± 12,85	56,60 ± 8,029 <sup>b,c</sup>

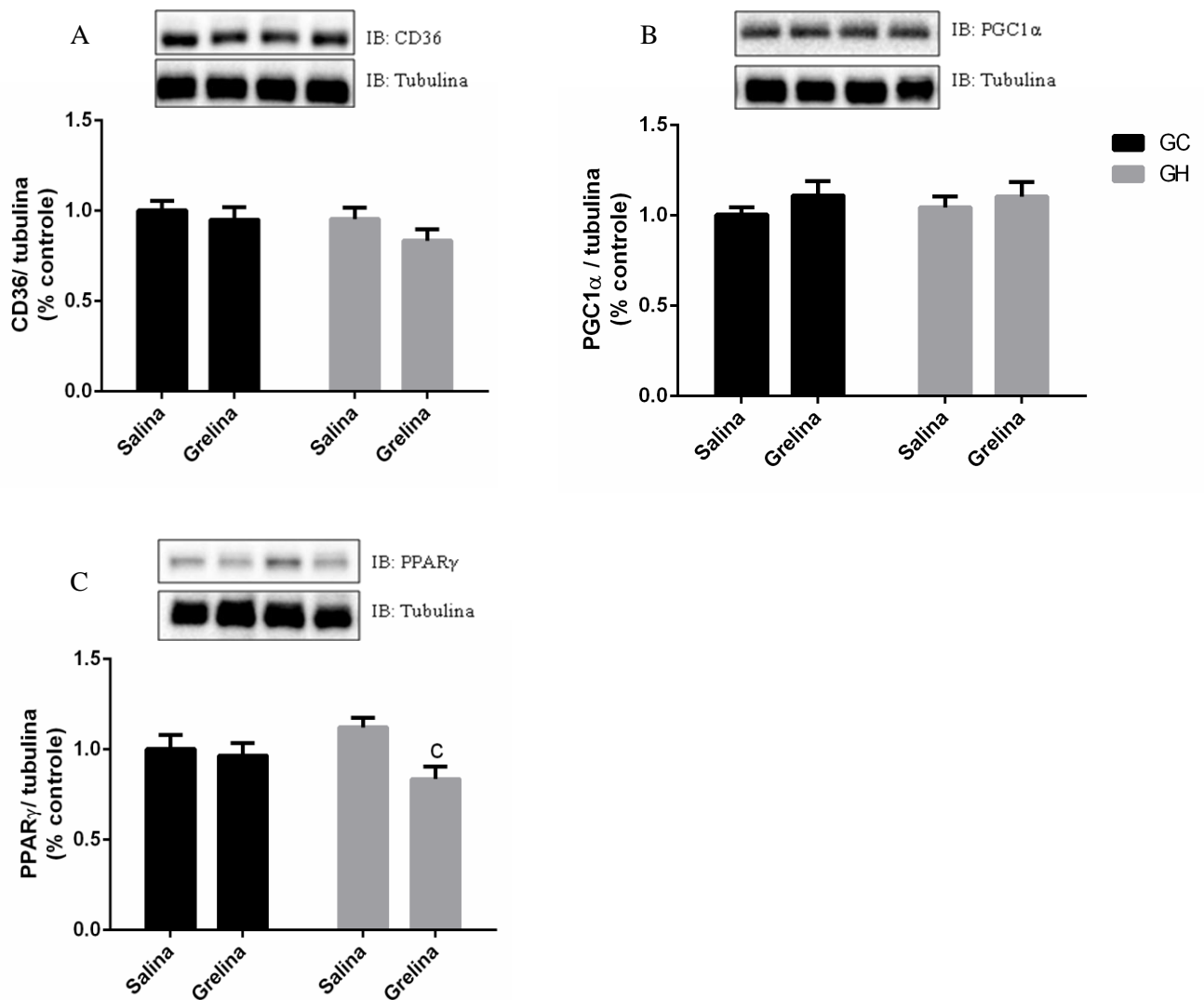
Legenda: Resultados expressos como Média ± E.P.M. n= 6 animais por grupo. **a**, significante em comparação ao GC-Sal; **b**, significante em comparação ao GC-Grel; **c**, significante em comparação ao GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina

#### **4.11 Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de CD36, PPAR $\gamma$ e PGC1 $\alpha$ no fígado de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação**

Diante dos resultados encontrados com relação ao colesterol, decidimos investigar os efeitos da hiperalimentação e injeção de grelina acilada sobre o conteúdo de proteínas e fatores de transcrição envolvidos na regulação do colesterol no tecido hepático. A escolha das proteínas CD36, PGC1 $\alpha$  e do fator de transcrição PPAR $\gamma$  ocorreu devido a alguns trabalhos na literatura mostrarem que elas estão envolvidas com a inibição da síntese de colesterol no hepatócito (RODRIGUE-WAY et al., 2014). A hiperalimentação durante a lactação não alterou o conteúdo de CD36 (Fig 16 A), PGC1 $\alpha$  (Fig 16 B) e PPAR $\gamma$  (Fig 16 C) no fígado, quando comparado com o grupo controle (GC-Sal x GH-Sal,  $p > 0,05$ ).

Após a injeção de grelina acilada não observamos modificações nos conteúdos de CD36, PGC1 $\alpha$  no fígado dos animais hiperalimentados (GH-Sal x GH-Grel,  $p > 0,05$ ), mas o PPAR $\gamma$  reduziu significativamente ( $p < 0,05$ ) nesses animais, apesar de haver uma redução nos níveis plasmáticos de colesterol, como mostrado anteriormente.

Figura 16 – Análise do conteúdo de CD36, PPAR $\gamma$  e PGC1 $\alpha$  no fígado de animais adultos

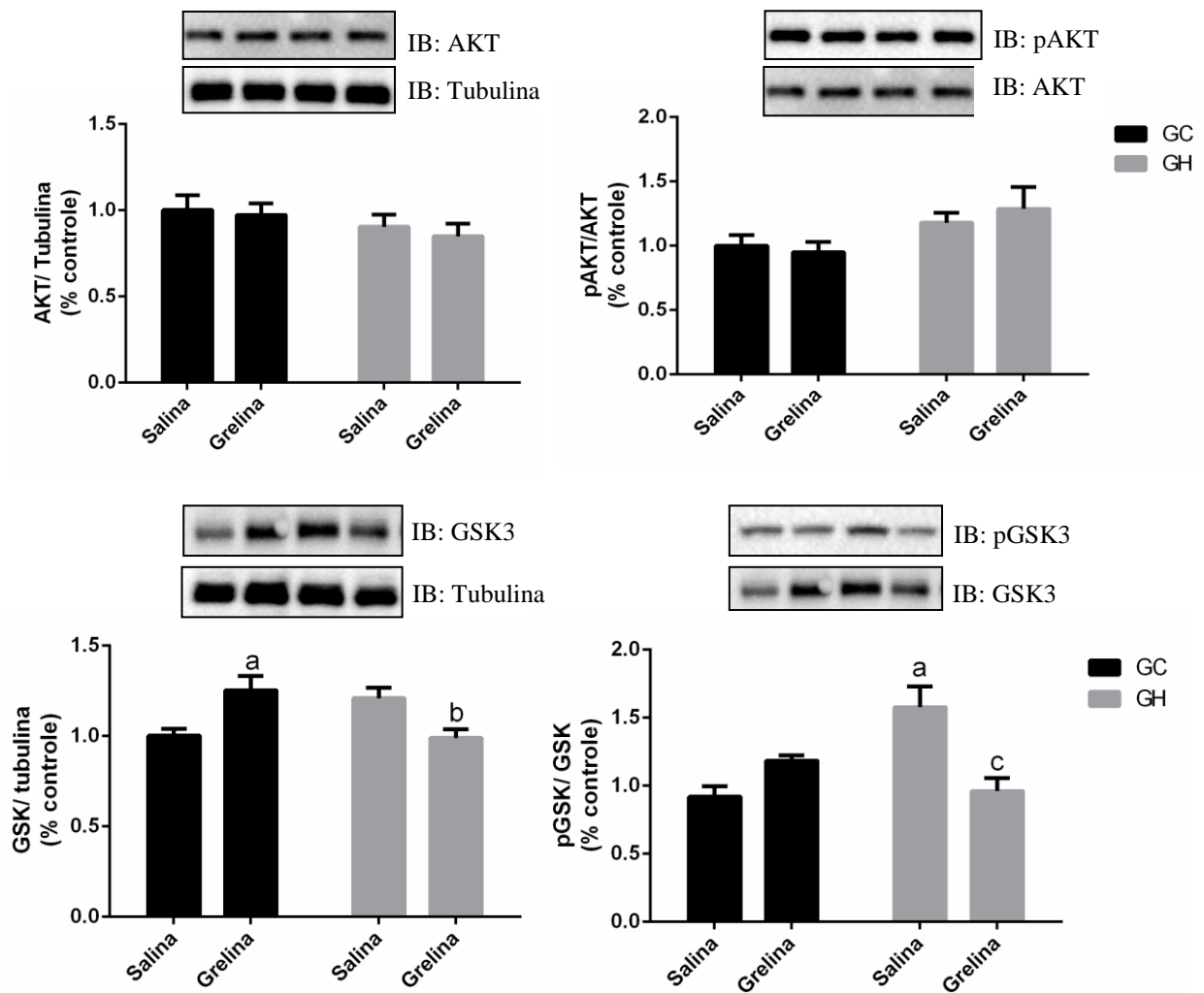


Legenda: Análise do conteúdo total de CD36 (A), PGC1 $\alpha$  (B) e PPAR $\gamma$  (C) do fígado dos animais controles e hiperalimentados com injeção de salina e grelina acilada (3 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Grel; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

#### 4.12 Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de proteínas envolvidas na regulação do glicogênio hepático de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação

Diante dos resultados encontrados com relação ao nível de glicogênio hepático, decidimos investigar os efeitos da hiperalimentação e injeção de grelina acilada sobre o conteúdo de proteínas envolvidas na regulação da síntese glicogênese. A literatura demonstra que as proteínas AKT e GSK3 elas são reguladas pela grelina no hepatócito (BARAZZONI et al., 2007). Desta forma, decidimos investigar essas proteínas no nosso modelo experimental. Observamos que a hiperalimentação durante a lactação não alterou o conteúdo de AKT (Fig. 17 A), pAKT/AKT (Fig. 17 B) e GSK3 (Fig. 17 C), quando comparados com o grupo controle (GC-Sal x GH-Sal,  $p > 0,05$ ), mas a hiperalimentação durante a lactação acarretou em um aumento da fosforilação na GSK3 (Fig. 17 D) no fígado, quando comparados com o grupo controle (GC-Sal x GH-Sal,  $p < 0,0001$ ). Após a injeção de grelina acilada não observamos modificações no conteúdos de AKT e pAKT/AKT, em ambos os grupos (GC-Sal x GC-Grel, GH-Sal x GH-Grel,  $p > 0,05$ ). Entretanto, nos animais do GC-Grel houve uma aumento significativo no conteúdo total de GSK3 (GC-Sal x GC-Grel,  $p < 0,05$ ), sem alterações nos animais hiperalimentados (GH-Sal x GH-Grel,  $p > 0,05$ ). Apesar do aumento do conteúdo total de GSK3 no GC-Grel, não observamos diferença significativa na razão pGSK3/GSK3 (GC-Sal x GC-Grel,  $p > 0,05$ ). Enquanto que, no GH-Grel a injeção de grelina diminuiu significativamente o fosforilação da GSK3, quando comparado com o GH-Sal (GH-Sal x GH-Grel,  $p > 0,001$ ). Tais resultados foram influenciados pela interação dos fatores estudados (*Two way ANOVA*,  $p < 0,0001$ )

Figura 17 - Análise do conteúdo de AKT e GSK3 no fígado de animais adultos



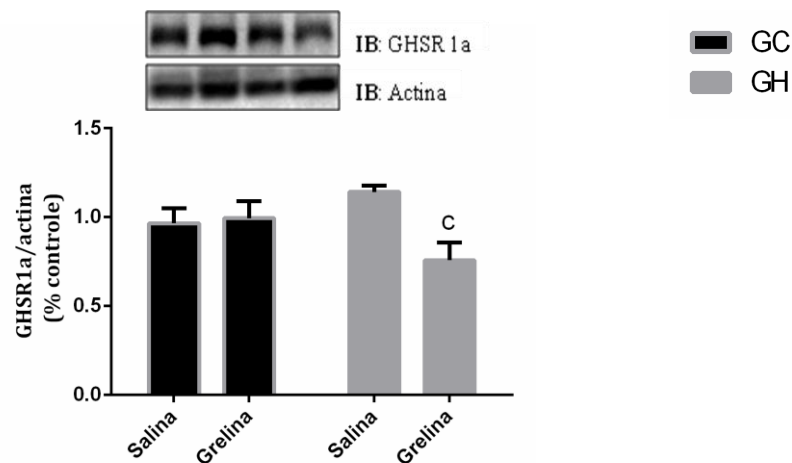
Legenda: Análise do conteúdo total de AKT (A), pAKT/AKT (B) GSK3 (C) e pGSK3/GSK3 (D) do fígado dos animais controles e hiperalimentados com injeção de salina e grelina acilada (3 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Grel; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.



#### 4.13 Efeito da administração de grelina sobre o conteúdo do GHSR 1a no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação

A hiperalimentação durante a lactação não alterou os níveis de GHSR1a. Porém, após a injeção de grelina, observamos que o grupo hiperalimentado apresentou uma redução significativa ( $p < 0,001$ ) do GHSR-1a no TAB, quando comparado ao GH-Sal. No grupo controle a grelina não alterou o conteúdo do GHSR-1a ( $p > 0,05$ ).

Figura 18 - Conteúdo de GHSR1a no TAB epididimal



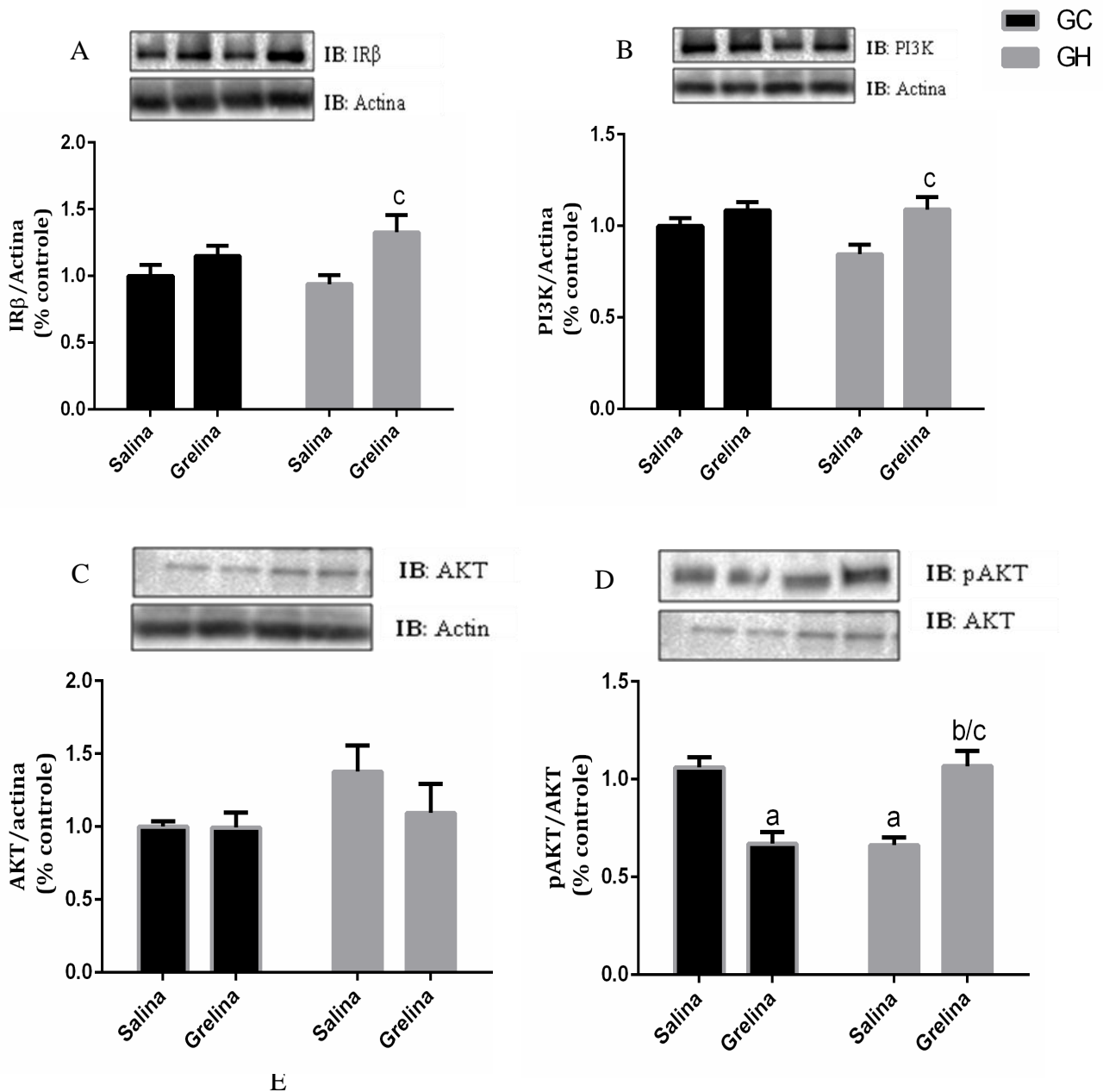
Legenda: O gráfico representa o conteúdo de GHSR1a nos GC eGH após a injeção i.p. de grelina. Resultados são expressos como Média  $\pm$  E.P.M. n= 6 animais por grupo; **a**, significativo em comparação ao GC-Sal; **b**, significativo em comparação ao GC-Grel; **c**, significativo em comparação ao GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina

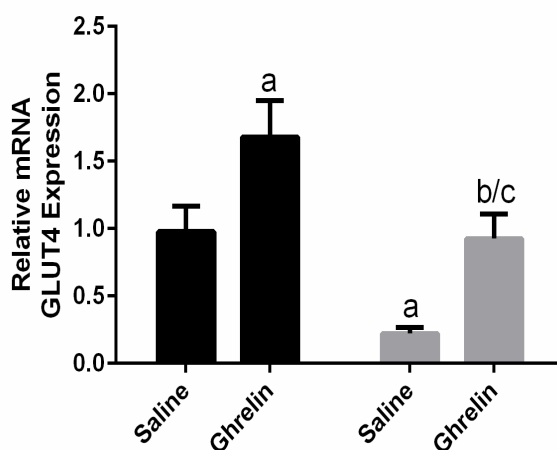
#### 4.14 Efeito da administração de grelina sobre a via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação

Avaliando o efeito da hiperalimentação sobre a via de sinalização da grelina, nós observamos que o GH-Sal não apresentou diferença significativa com relação ao conteúdo de IR $\beta$ , PI3K e AKT. Entretanto, os animais hiperalimentados apresentaram redução na razão pAKT/AKT e na expressão gênica de GLUT4, quando comparados com o grupo controle. A injeção i.p. de grelina acilada aumentou o conteúdo do IR $\beta$  (Fig 19 A,  $p < 0,05$ ), PI3K e pAKT/AKT (Fig 19 B e C,  $p < 0,001$ ) no grupo de hiperalimentado, quando comparados com

o GH-Sal. A injeção i.p. de grelina não afetou o conteúdo das proteínas analisadas grupo controle ( $p > 0,05$ ), quando comparados com o GC-Sal. Análise quantitativa em PCR tempo real realizada em extratos de RNAm do tecido adiposo mostrou que a injeção de grelina aumentou a expressão de GLUT-4 RNAm em ambos os grupos (Fig 19 E), controle ( $p < 0,05$ ) e hiperalimentados ( $p < 0,001$ ), em comparação ao GC-Sal e GH-Sal, respectivamente. Por outro lado, o GH-sal apresentou diminuição (80%) da expressão de GLUT-4 em comparação GC-Sal

Figura 19 - Análise das proteínas da via de sinalização da insulina no tecido adiposo branco de animais adultos





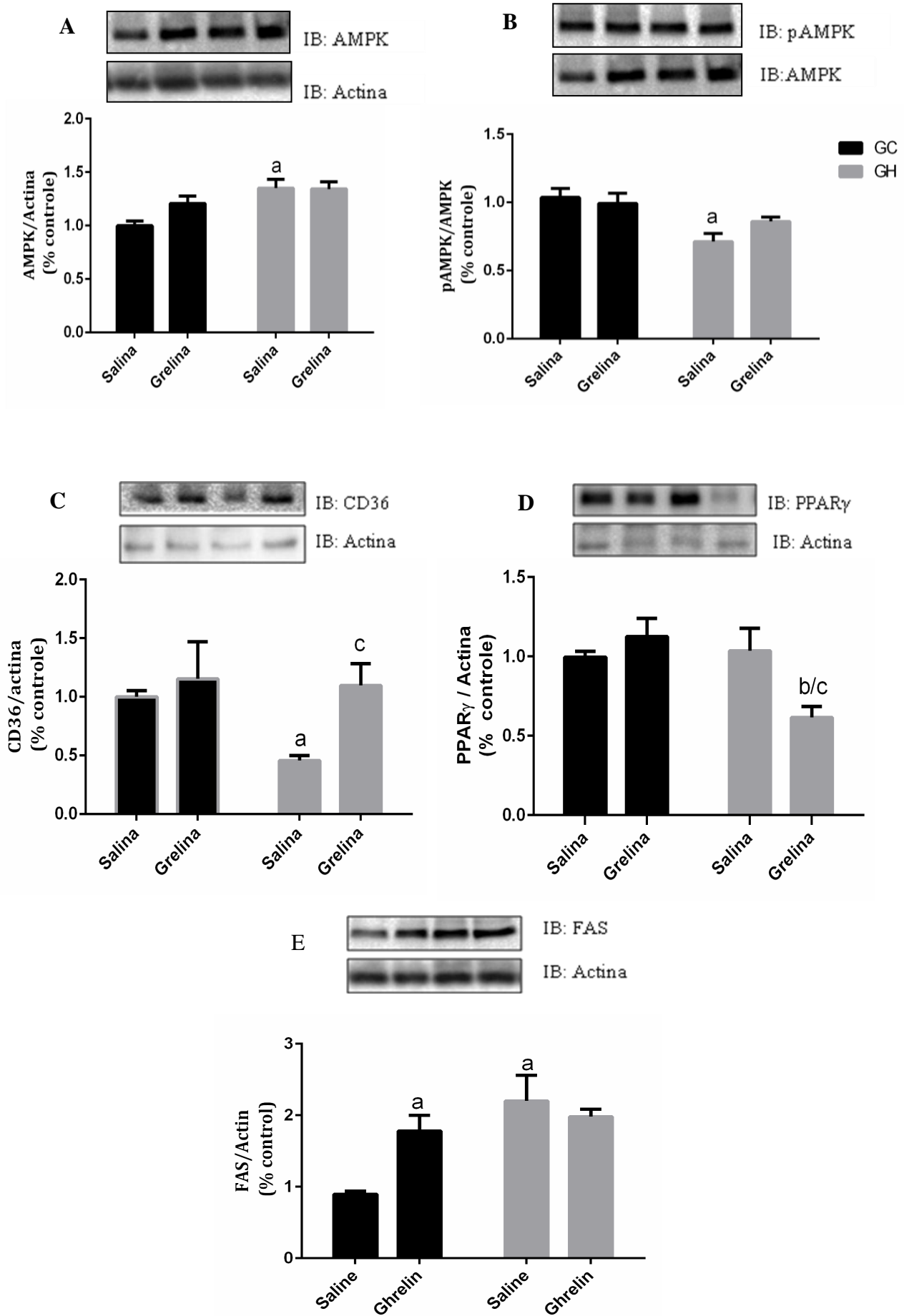
Legenda: O gráfico representa o conteúdo total do IR $\beta$  (A), PI3K (B), AKT (C), pAKT / AKT (D) e da expressão de GLUT4 mRNA (E) em TAB dos animais controles e hiperalimentados com injeção de salina e grelina acilada (3 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Gre; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina

#### 4.15 Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo de AMPK, FAS, CD36 e PPAR $\gamma$ no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período de lactação

Animais hiperalimentados durante a lactação apresentaram um aumento do conteúdo proteico de AMPK (Fig. 20 A), e redução na razão pAMPK/AMPK (Fig. 20 B,  $p < 0,05$ ), quando comparados com o GC-Sal. O GH-Sal apresentou um aumento no conteúdo proteico da FAS (Fig. 20 E,  $p < 0,05$ ) redução do conteúdo da CD36 (Fig. 20 C,  $p < 0,001$ ), comparados ao CG-Sal. O conteúdo de PPAR $\gamma$  (Fig. 20 D) foi similar entre os grupos controles e hiperalimentados ( $p > 0,05$ ).

Observamos que após a injeção i.p. de grelina não houve modificações no conteúdo total da AMPK entre os grupos analisados ( $p > 0,05$ ), porém a injeção de grelina aumentou a fosforilação da AMPK ( $p < 0,05$ ) em todos os grupos analisados. A injeção i.p. de grelina aumentou significativamente o conteúdo total da FAS ( $p < 0,05$ ) no grupo controle ( $p < 0,05$ ) em comparação com o GC-Sal, mas não observamos diferença na GH-Grel ( $p > 0,05$ ) em relação ao GH-Sal. Com relação ao conteúdo de CD36, o GH-Grel apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o GH-Sal. O grupo controle não apresentou modificações do conteúdo de CD36 ( $p > 0,05$ ) após a injeção de grelina. A grelina acilada induziu uma diminuição no conteúdo do PPAR $\gamma$  no GH-Grel, quando comparado com o GH-Sal ( $p < 0,05$ ).

Figura 20 - Análise do conteúdo proteico das proteínas AMPK, FAS, CD36 e PPAR $\gamma$  no TAB



Legenda: O gráfico representa o conteúdo total do (A) AMPK, (B) pAMPK / AMPK, (C) CD36, (D) PPAR $\gamma$  e (E) FAS no TAB dos animais controles e hiperalimentados com injeção de salina e grelina acilada (3 nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  E.P.M, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Gre; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina

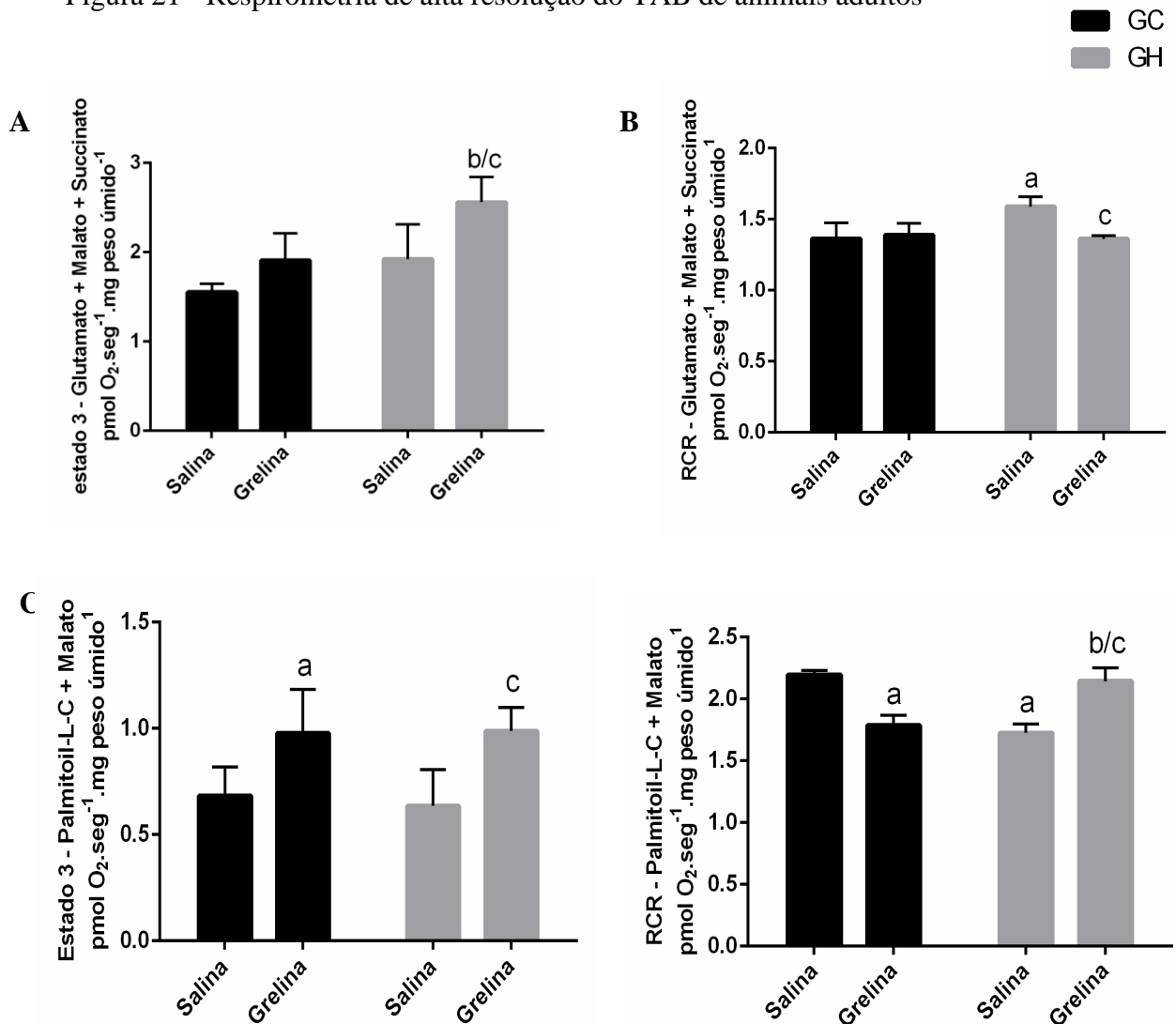
#### 4.16 Efeitos da administração de grelina sobre a oxidação dos substratos energéticos no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação

Através da respirometria de alta resolução avaliamos os efeitos da hiperalimentação durante a lactação sobre a oxidação dos substratos energéticos. Observamos que a hiperalimentação não alterou a oxidação dos substratos glutamato, malato, succinato e palmitoil-L-carnitina, quando comparado com grupo controle (Fig 21 A, C ,  $p > 0,05$ ). A grelina aumentou significativamente a oxidação dos substratos glutamato, malato e succinato (Figura 21 A) no grupo hiperalimentado (GH-Grel x GH-Sal,  $p < 0,01$ ), entretanto no GC-Grel não observamos modificações da oxidação desses substratos, quando comparados com o GC-Sal ( $p > 0,05$ ).

Por medição da taxa respiratória máxima estimulada por ADP, observamos que a grelina acilada aumentou a oxidação dos substratos palmitoil-L-carnitina e malato (Fig 21 C) nos GC-Grel ( $p < 0,0001$ ) e GH-Grel ( $p < 0,01$ ) em comparação com os respectivos grupos salinos (GC-Sal, GH-Sal ).

A razão do controle respiratório (RCR, Estado3 / Estado4) é um índice de qualidade para a função respiratória mitocondrial, que reflete a capacidade de produção de ATP. O RCR (com os substratos glutamato, malato e succinato) foi maior no GH-Sal em comparação com o GC-Sal ( $p < 0,01$ , Fig 21B), mas a injeção de grelina acilada diminuiu o RCR [GH-Grel em comparação com a GH-Sal ( $P < 0,01$ )]. O RCR para palmitoil-L-carnitina e malato foram menores no GH-Sal, quando comparado com o GC-Sal, indicando um menor acoplamento mitocondrial. A injeção de grelina no GC-Grel também diminuiu o RCR ( $p < 0,01$ , Fig 21 D), enquanto que nos animais hiperalimentados a grelina acilada promoveu um aumento do RCR em comparação com o GH-Sal ( $p < 0,01$ , Fig 21 D).

Figura 21 - Respirometria de alta resolução do TAB de animais adultos

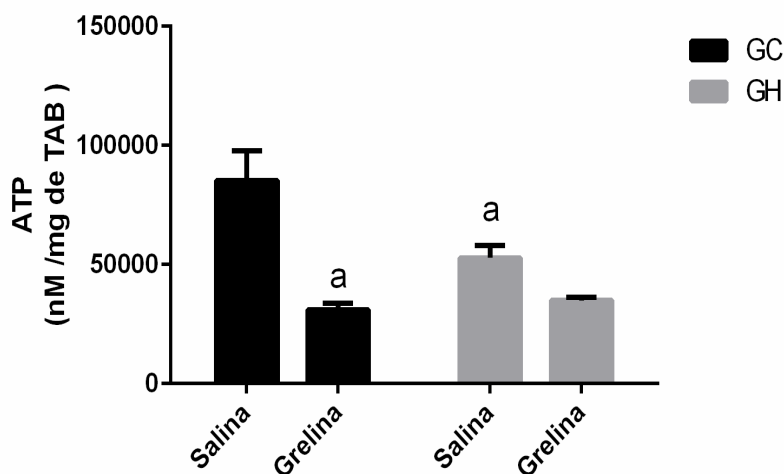


Legenda: Respirometria de alta resolução do tecido adiposo após a injeção de grelina acilada (3 nM) em animais adultos. (A) O gráfico mostra o estado 3 (estimulado por ADP) durante a oxidação dos substratos glutamato, malato e succinato na câmara A e (C) palmitoil-carnitina e malato na câmara B. (B e D) A razão do controle respiratório (RCR) foi calculada com a razão das taxas respiratórias dos estados 3 e 4. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Grel; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel = grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina.

Nós analisamos os efeitos da hiperalimentação e da grelina acilada sobre os níveis de ATP no tecido adiposo branco. Animais hiperalimentados durante a lactação apresentaram redução nos níveis de ATP (Fig 22,  $p < 0,05$ ) no TAB, quando comparados com o grupo controle. Após a injeção de grelina o GH-Grel não apresentou alteração ( $p > 0,05$ ) nos níveis de ATP, quando comparados com o GH-Sal ( $p > 0,05$ ), porém o GC-Grel apresentou redução

dos níveis de ATP ( $p < 0,001$ ) no TAB. Tais resultados foram influenciados pela interação dos fatores estudados (*Two way ANOVA*,  $p < 0,001$ ).

Figura 22 - Níveis de ATP no TAB de animais adultos



Legenda: O gráfico representa os níveis de ATP no tecido adiposo branco de animais controles e hiperalimentados. Os animais receberam injeção de salina e grelina acilada (3nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM,  $n = 6$  animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Gre; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina

#### 4.17 Efeitos da administração de grelina sobre o conteúdo e expressão de enzimas mitocôndrias no tecido adiposo branco de camundongos hiperalimentados durante o período da lactação

No presente estudo, não observamos modificações no conteúdo da CPT-1 (Fig 23 B), PGC1 $\alpha$  (Fig 23E) e 4-HNE (Fig 23 F), nos animais hiperalimentados durante a lactação ( $p > 0,05$ ). Entretanto, a hiperalimentação causou um aumento na expressão da CPT1 (Fig 23 A) e UCP2 (Fig 23 C) ( $p < 0,001$ ) nesses animais, quando comparados com o grupo controle.

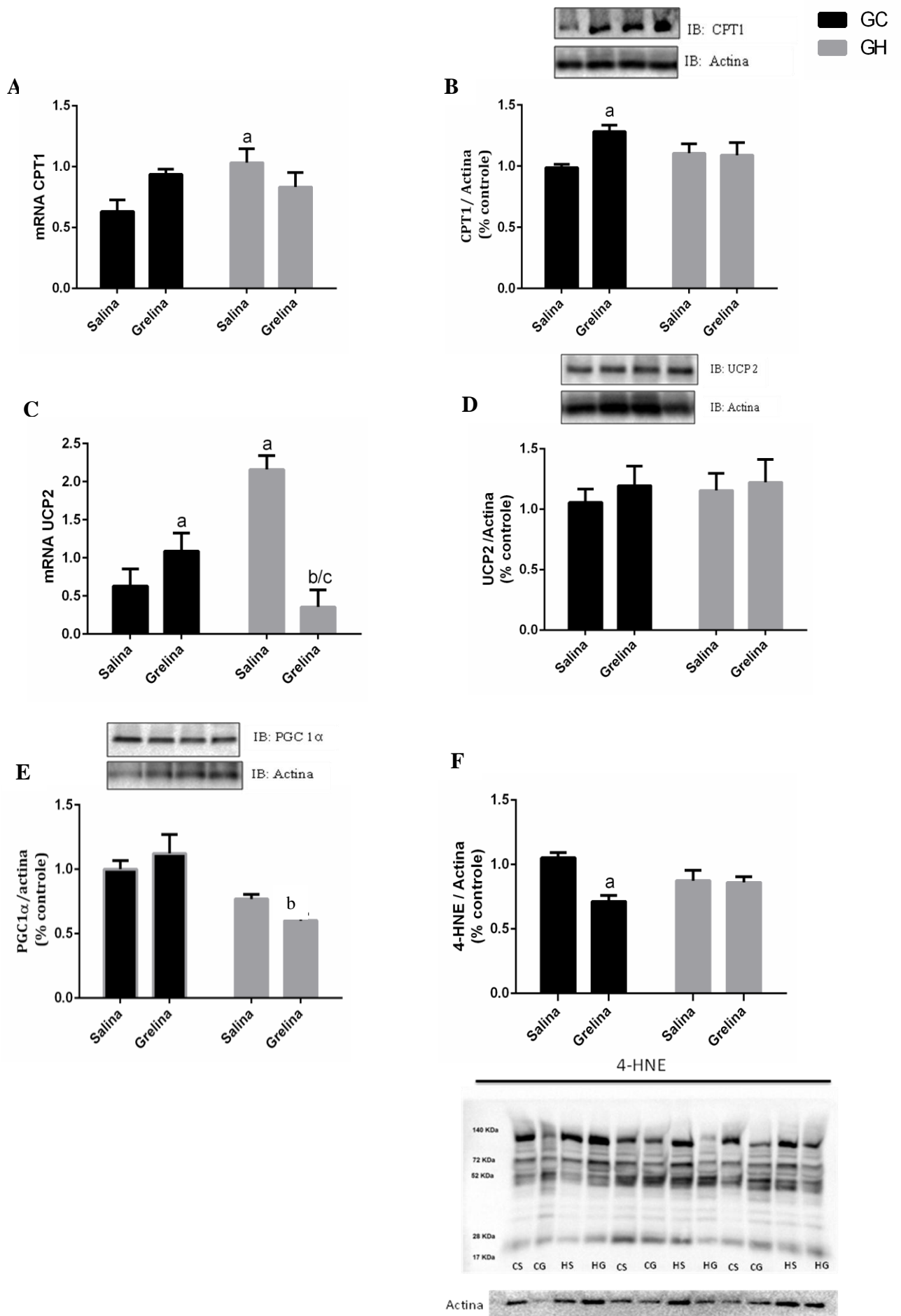
A injeção de grelina não alterou a expressão de RNAm da CPT-1 nos animais controles ( $p > 0,05$ ), mas o conteúdo proteico foi maior no CG-Grel ( $p < 0,05$ ), quando comparado com o GC-Sal. Com relação aos animais hiperalimentados não observamos efeitos da grelina acilada sobre a expressão gênica e conteúdo proteico da CPT1, quando comparados com o GH-Sal ( $p > 0,05$ ). Observamos que a administração de grelina aumentou a expressão da UCP2 no grupo controle, porém ação inversa foi observada no grupo hiperalimentado, onde

houve uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ) da expressão de RNAm, comparado ao GC-Sal e GH-Sal, respectivamente. O conteúdo total da PGC1 $\alpha$  nos animais controles e hiperalimentados não foram alterados após a injeção de grelina acilada ( $p > 0,05$ ), comparados ao GC-Sal e GH-Sal, respectivamente.

O 4-HNE, derivado da peroxidação de ácidos graxos n-6 poliinsaturados, é um dos peróxidos de lipídeo mais abundantes e ativos. Observou-se que a hiperalimentação durante a lactação não alterou o conteúdo de 4-HNE no GH-Sal em comparação com o GC-Sal ( $p > 0,05$ ). A injeção de grelina não alterou o conteúdo 4-HNE no grupo hiperalimentado [GH-Sal x GH-Grel ( $p < 0,01$ )], mas diminuiu o teor de 4-HNE no grupo controle [GC-Sal, GC-Grel ( $P > 0,05$ )].



Figura 23 - Análise das proteínas mitocondriais no tecido adiposo branco de animais adultos



Legenda: Conteúdo total e expressão gênica de proteínas mitocondriais no TAB de animais controles e hiperalimentados. (A) mRNA CPT1, (B) CPT1, (C) mRNA UCP2, (D) UCP2, (E) PGC1 $\alpha$ , (F) 4HNE. Os animais receberam injeção de salina e grelina acilada (3nM). Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM, n = 6 animais por grupo. **a**, significativo em comparação com CG-Sal; **b**, significativo em comparação com CG-Gre; **c**, significativo em comparação com GH-Sal. GC-Grel= grupo controle com injeção de grelina, GH-Sal = grupo hiperalimentado com injeção de salina, GH-Grel = grupo hiperalimentado com injeção de grelina

Tabela 5 - Resumo dos principais efeitos da hiperalimentação durante a lactação em animais jovens (21 dias) e adultos (120 dias) sobre os parâmetros biométricos, metabólicos e proteínas no TAB

Análises	Hiper jovem	Hiper adulto
Massa corporal	↑	↑
Gordura epididimal	↑	↑
Gordura marrom	↑	↑
Peso do Fígado	↑	=
Área do Adipócito	----	↑
Glicemia	↑	↑
Glicogênio Hepático	----	↑
Insulina	↑	↑
Grelina acilada	↓	↓
Triglicerídeos	↑	↑
Colesterol-total	=	=
pAKT/AKT (Fígado)	=	=
pGSK3/GSK3 (Fígado)	=	↑
CD36 (Fígado)	=	=
PGC1 $\alpha$ (Fígado)	=	=
PPAR $\gamma$ (Fígado)	=	=
GHSR1a	-----	=
IR $\beta$ / PI3K	=	=
pAKT/AKT	=	↓
GLUT4	=	↓
pAMPK/AMPK	=	↓
FAS	-----	↑
CD36	↓	↓
PPAR $\gamma$	↓	=
Oxidação de glutamato, malato e succinato	↓	=
RCR (glutamato, malato e succinato)		↑
Oxidação de palmitoil-L-carnitina e malato	↓	=
RCR (palmitoil-L-carnitina e malato)		↓
ATP	=	↓
CPT1 RNAm	↓	↑
UCP2 RNAm	↓	↑
PGC1 $\alpha$	=	=
4HNE	↑	=

Tabela 6 - Resumo da ação da grelina nos animais controles e animais hiperalimentados durante a lactação, aos 21 dias de vida pós-natal, quando comparados com o controle salina e hiperalimentado salina

Análises	Controle grelina	Hiperalimentado grelina
Glicemia	↑ (22%)	=
Insulina	↓ (49%)	↓ (55%)
Grelina acilada	↓ (29%)	=
Triglicerídeos	↑ (43,9%)	=
Colesterol-total	=	=
IRβ / PI3K	=	=
pAKT/AKT	=	=
GLUT4	↑	=
pAMPK/AMPK	=	=
CD36	=	↑
PPARγ	=	=
Oxidação de glutamato, malato e succinato	=	↑
RCR (glutamato, malato e succinato)	=	↑
Oxidação de palmitoil-L-carnitina e malato	=	↑
RCR (palmitoil-L-carnitina e malato)	=	=
ATP	=	↑
CPT1	↑	=
UCP2	=	↑
PGC1α	=	=
4HNE	=	=

Tabela 7 - Resumo da ação da grelina nos animais controles e animais hiperalimentados durante a lactação, aos 120 dias de vida pós-natal, quando comparados com o controle salina e hiperalimentado salina

Análises	Controle grelina	Hiperalimentado grelina
Glicemia	↑	↓
Glicogênio Hepático	↑	↓
Insulina	=	=
Grelina acilada	↓	↑
Triglicerídeos	=	=
Colesterol-total	=	↓
pAKT/AKT (Fígado)	=	=
pGSK3/GSK3 (Fígado)	=	↓
CD36 (Fígado)	=	=
PGC1α (Fígado)	=	=
PPARγ (Fígado)	=	↓
GHSR1a	=	↓
IRβ / PI3K	=	↑
pAKT/AKT	↓	↑
GLUT4	↑	↑
pAMPK/AMPK	=	=

<b>Oxidação de glutamato, malato e succinato</b>	=	↑
<b>RCR (glutamato, malato e succinato)</b>	=	↓
<b>Oxidação de palmitoil-L-carnitina e malato</b>	↑	↑
<b>RCR (palmitoil-L-carnitina e malato)</b>	↓	↓
<b>ATP</b>	↓	=
<b>CPT1 RNAm</b>	=	=
<b>UCP2 RNAm</b>	↑	↓
<b>PGC1<math>\alpha</math></b>	=	=
<b>4HNE</b>	↓	=

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo reforçam que a hipernutrição no início da lactação promove aumento progressivo de peso corporal, gordura visceral e hipertrofia do adipócito branco na idade adulta. Além disso, a hipernutrição no período da lactação promove aumento do tecido adiposo marrom interscapular (TAMi) aos 21 e 120 dias. Esses resultados estão em conformidade com os trabalhos anteriores, pois além do aumento do peso do TAMi foi observado que os animais hiperalimentados apresentam modificações na arquitetura dos adipócitos marrons, que podem levar à termo-hipoatividade, no entanto, observaram uma redução da temperatura do TAMi, o que contrasta com o aumento do tecido, que também mostrou mudanças na composição das gotículas lipídios, sendo mais semelhante ao TAB (DE ALMEIDA *et al.*, 2013). Além das alterações no peso dos depósitos de gordura, trabalhos anteriores de nosso grupo demonstraram que os animais hiperalimentados apresentam modificações na via de sinalização da insulina no coração (MARTINS *et al.*, 2008, BERNARDO *et al.*, 2016), hipertrofia do músculo cardíaco (MOREIRA *et al.*, 2009), alteração da sinalização de leptina e grelina no coração e tecido adiposo branco (PEREIRA, 2006; LACERDA-MIRANDA *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2012) e redução da translocação do GLUT4 associado a uma menor captação de glicose em adipócitos (RODRIGUES, 2007).

Adicionalmente, nossos atuais resultados demonstram que possivelmente o aumento da disponibilidade de nutrientes induz alterações metabólicas nos animais jovens do GH, como hiperglicemia, hiperinsulinemia e aumento dos triglicerídeos, que persistem até a idade adulta (120 dias). Tais alterações podem ser resultantes das modificações qualitativas e quantitativas no leite ingerido pela prole no início da vida. Sabemos hoje que o grupo de animais com ninhada reduzida tem um maior consumo de leite materno, e ainda a análise do leite de mães que tiveram suas ninhadas reduzidas no terceiro dia pós-natal apresentaram um aumento no conteúdo de TAG, sugerindo que essas alterações são importantes para o estabelecimento de efeitos deletérios nos lactentes (CUNHA *et al.*, 2009), resultando em um processo diferenciado para estoque e utilização dos substratos energéticos nesses animais.

Neste estudo investigamos os diferentes efeitos da injeção intraperitoneal de grelina acilada sobre os parâmetros metabólicos e metabolismo energético nos animais do grupo controle e do grupo hiperalimentado, jovens (21 dias) e adultos (120 dias).

Os hormônios grelina e insulina apresentam ações em várias vias metabólicas, responsáveis por suas ações celulares, principalmente na modulação do metabolismo

energético (CHACKO *et al.*, 2012). Aos 21 dias, a injeção de grelina acilada aumentou os níveis de glicemia no grupo controle, ao passo que, no grupo hiperalimentado não houve modificação do nível glicêmico, além disso a insulina plasmática em ambos os grupos foi reduzida pela injeção de grelina. Em contraste, na idade adulta (120 dias) a injeção de grelina, apesar de não levar a normoglicemia, resultou na redução significativa da glicemia no grupo hiperalimentado e aumento da glicemia no grupo controle, mas sem alteração na insulinemia em ambos os grupos.

Reimer e colaboradores (2003) observaram *in vitro* que a grelina inibe a secreção de insulina pelas células beta pancreáticas na presença de glicose (concentrações de 8.3, 11.1 ou 22.2 nmol/litro de glicose). Contudo, na presença de uma menor concentração de glicose (3.3 ou 5.5 nmol/litro de glicose) a grelina acilada não teve efeitos sobre a secreção de insulina. Através de uma análise *in vivo*, o mesmo estudo verificou a redução da secreção de insulina estimulada por glicose, após a injeção de grelina. Um estudo realizado em humanos verificou que a administração intravenosa de grelina acilada reduziu os níveis circulantes de insulina, apesar de aumentar a glicemia (BROGLIO *et al.*, 2001). Porém, em indivíduos obesos não foram observadas modificações na glicemia e insulina após a administração de grelina (ALVAREZ-CASTRO *et al.*, 2005). Adicionalmente, estudos em roedores verificaram que a grelina acilada promove uma hiperglicemia nos animais, sem alterar os níveis de insulina (BARAZZONI *et al.*, 2005). Diante do exposto, podemos inferir que fatores como espécies, concentração de grelina, via de injeção e duração do tratamento podem causar modificação diversa na resposta da glicemia e insulina. Além disso, fatores como idade e estado nutricional também alteram a ação da grelina sobre a resposta glicêmica e insulinêmica como observado no presente estudo.

O fígado é um importante órgão na regulação da homeostase energética, além de ser responsável pelos processos de glicogenólise, glicogênese e gliconeogênese, que são regulados pela glicose e hormônios como a leptina e insulina (TREVENZOLI *et al.*, 2010; CONCEIÇÃO *et al.*, 2013), além de ser responsável pela síntese de colesterol. Em nosso estudo, a análise do nível do colesterol total não foi modificada nos animais jovens de ambos os grupos (controle e hiperalimentado), mas na idade adulta (120 dias) a injeção de grelina ocasionou uma redução significativa no colesterol- total dos animais hiperalimentados. Estudos anteriores demonstraram que a hexarelina, um análogo sintético da grelina, inibe a síntese de colesterol nos hepatócitos. Essa inibição ocorre pela ativação da via LKB1-AMPK, a qual é sinalizada pela CD36, levando a inibição da HMG-CoA redutase. A inibição da HMG-CoA leva ao aumento do recrutamento de Insig-1 e Insig-2, através da ativação PPAR $\gamma$ /

PGC1- $\alpha$  (RODRIGUES-WAY *et al.*, 2014). No entanto, nossos dados demonstraram que não houve alteração no conteúdo de CD36 e PGC-1 $\alpha$  no fígado do grupo hiperalimentado, após a injeção de grelina. Além disso, houve uma redução no conteúdo do PPAR $\gamma$  nestes animais, significando que a grelina pode modificar o metabolismo lipídico e de carboidrato no fígado. Devido a divergência dos resultados do presente estudo com as informações da literatura, sugerimos que a grelina pode não ter a afinidade semelhante ao receptor CD36 no fígado como Hexarelina. Sendo assim, se faz necessário a avaliação de outras vias envolvidas na regulação de síntese e excreção do colesterol, a fim de elucidar os mecanismos celulares pelo qual a grelina acilada promove a diminuição do colesterol nos animais hiperalimentados.

Está descrito na literatura, que a administração de grelina pode induzir a hiperglicemia (BARAZZONI *et al.*, 2005) através do aumento da gliconeogênese hepática (MURATA *et al.*, 2002), sendo a proteína quinase B (AKT) essencial na regulação deste processo (HOLMAN, KASUGA, 1997). Sendo assim, avaliamos o conteúdo de glicogênio hepático e proteínas chaves envolvidas na síntese de glicogênio, como AKT e glicogênio sintase quinase (GSK-3). Observamos que aos 120 dias, a injeção de grelina acarretou no aumento do conteúdo de glicogênio hepático, porém não houve alteração na fosforilação da AKT e GSK-3 nos animais do grupo controle. Entretanto, nos animais hiperalimentados, a grelina levou a uma redução no conteúdo do glicogênio hepático e redução na fosforilação da GSK-3, porém não observamos modificações na fosforilação da AKT. Estudos *in vitro* demonstraram que a grelina atenua os efeitos da insulina sobre a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK) e glicose 6-fosfatase (G6Pase), favorecendo o aumento da gliconeogênese (MURATA *et al.*, 2002). Barazzoni (2007) observou que *in vivo* que a grelina reduz a fosforilação da GSK3. Além disso, a AKT e PGC1- $\alpha$  interagem para modular a produção de glicose, visto que a PGC1- $\alpha$  pode aumentar diretamente a gliconeogênese. Visto que, no presente estudo não observamos alterações da fosforilação da AKT e do conteúdo da PGC1- $\alpha$ , outros estudos devem ser realizados a fim de elucidar os mecanismos pelos quais a grelina leva a modificações na atividade da GSK3.

O hormônio grelina exerce efeitos diversos sobre a homeostase energética, e seus níveis circulantes variam de acordo com o estado alimentado e massa corporal, tanto em humanos quanto em roedores (revisado em CASTAÑEDA *et al.*, 2010; GLOY *et al.*, 2010). A hipernutrição durante a lactação promove a redução nos níveis circulantes de grelina acilada aos 21 e 120 dias. Estes dados corroboram com trabalhos anteriores do nosso grupo e outros autores, demonstrando que os níveis circulantes de grelina são inversamente correlacionados com o peso corporal em humanos (TSCHOP *et al.*, 2001) e roedores (SOARES *et al.*, 2012;

LACERDA-MIRANDA *et al.*, 2012; COLLDEN *et al.*, 2014). Collden e colaboradores (2014) sugerem que a redução dos níveis plasmáticos de grelina é, pelo menos em parte, devido à alteração na produção de grelina pelo estômago, uma vez que camundongos jovens (22 dias) hiperalimentados durante a lactação apresentam uma redução da razão grelina total/grelina acilada e diminuição da expressão de mRNA grelina no estômago.

A injeção periférica de grelina acilada promoveu uma redução nos níveis plasmáticos de grelina acilada nos animais do grupo controle, aos 21 e 120 dias. A primeira hipótese para que isso ocorra é o tempo de meia-vida da grelina, porque após sua administração a grelina permanece na corrente sanguínea por um intervalo de tempo que varia de 10 a 30 minutos (revisado em CASTAÑEDA, 2009). Dessa forma, sugerimos que a sensibilidade à sinalização de grelina não foi alterada, ou seja, há um ajuste fino de regulação dos seus substratos. Sendo assim, após a injeção de grelina esta será metabolizada e seus níveis plasmáticos irão diminuir, visto que o nosso estudo analisa a concentração plasmática de grelina acilada apenas uma hora após a injeção. A segunda hipótese para a redução dos níveis plasmáticos de grelina acilada nos animais do grupo controle é a hiperglicemia, visto que o aumento da glicemia promove redução da secreção de grelina (revisado em otto-Buczowska *et al.*, 2012). No entanto, os animais jovens do grupo hiperalimentado não tiveram alterações nos níveis de grelina, ao passo que na idade adulta, o grupo hiperalimentado apresentou aumento nos níveis de plasmáticos de grelina. Estudos demonstram que a injeção de grelina acilada leva ao aumento nos níveis plasmáticos de grelina em animais hiperalimentados (COLLDEN *et al.*, 2014). Além disso, a hipernutrição durante a lactação altera a capacidade da grelina periférica atravessar a barreira hematoencefálica e ativar neurônios do núcleo arqueado como o NPY, AgRP e POMC em animais jovens, indicando uma resistência central ao hormônio grelina. Por outro lado, uma injeção intracerebroventricular de grelina ativou a cFOs no núcleo arqueado de forma similar em animais controles e hiperalimentados. Dessa forma, os neurônios do núcleo arqueado mantêm a capacidade de responder a grelina, e sugere que o transporte de grelina a partir da periferia para o cérebro pode ser defeituosa (COLLDEN *et al.*, 2014).

Considerando que o sistema grelina / GHS-R1a apresenta ação sobre as proteínas envolvidas na via de sinalização da insulina nos adipócitos (CHACKO *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2004; PATEL *et al.*, 2006), o presente estudo investigou o efeito agudo da grelina acilada sobre as proteínas envolvidas na sinalização da insulina. Após a injeção de grelina, observamos que o grupo controle, aos 21 dias apresentou aumento do conteúdo total de AKT, porém sem modificação na razão pAKT/AKT, e aumento no conteúdo de GLUT4. Sugerimos



que o aumento do GLUT4 seja um mecanismo compensatório, na tentativa de aumentar a captação de glicose no grupo controle, visto que, esses animais apresentam hiperglicemia após a injeção de grelina. Em relação ao grupo hiperalimentado não houve diferença significativa nas proteínas IR $\beta$ , PI3K, AKT/AKT e GLUT4 no estado basal, quando comparados com o grupo controle. Entretanto, Soares e colaboradores (2012) observaram que aos 21 dias os animais hiperalimentados apresentaram aumento no conteúdo de AKT e GLUT4. Sugerimos que a ausência de jejum nos animais do presente estudo seja o motivo de não observarmos modificações sobre essas proteínas chave da via de sinalização da insulina. Mesmo após a injeção, a grelina acilada não foi capaz de induzir modificações sobre as proteínas chaves da sinalização de insulina nos animais hiperalimentados, sugerindo resistência ao hormônio no TAB.

Trabalhos anteriores mostraram que há uma comunicação entre o receptor tirosina quinase e receptor acoplado a proteína G (IMAMURA *et al.*, 1999). Sendo assim, avaliamos os efeitos da injeção de grelina acilada sobre o conteúdo do GHS-R1a e as proteínas da via de sinalização da insulina na idade adulta. Nossos resultados mostraram que a injeção de grelina não alterou GHSR-1a nos animais controles, mas diminuiu o conteúdo do receptor nos animais obesos. Sugerimos que a regulação negativa da GHS-R1a observada no TAB de ratos obesos seja um processo de ubiquitinação e dessensibilização precoce do GHS-R1a, tal como observado por Kola (2005) no hipotálamo após a injeção de grelina. Estudos mostram que a internalização do GPCR é mediada por ubiquitinação, processo que ocorre pela ação da proteína ubiquitina. A ubiquitina controla a via de endocitose e serve como um sinal para a internalização do GPCR. Essa internalização pode ser seguida por uma reciclagem ou subsequente degradação do GPCR (revisado em ALONSO & FRIEDMAN, 2013).

A grelina acilada aumenta a captação de glicose em adipócitos via PI3K/AKT (KIM *et al.*, 2004) sendo esse processo dependente do GHS-R1a, principalmente nos depósitos de gordura epididimal (PATEL *et al.*, 2006). Nossos resultados demonstram que a injeção de grelina, na idade adulta, não alterou o conteúdo de IR $\beta$ , PI3K, porém reduziu a razão pAKT/AKT e aumentou a expressão do GLUT4 no TAB do grupo controle. A alteração da expressão do GLUT4 demonstra que a grelina acilada afeta a nível transcricional a expressão de RNA desse transportador, podendo este ser um mecanismo de regulação devido ao aumento da glicemia nesses animais. Além disso, uma análise de fração de membrana seria indicada para saber se há uma menor translocação do GLUT4 para a membrana celular dos adipócitos.

Por outro lado, nos animais hiperalimentados, a grelina acilada promoveu o aumento no conteúdo IR $\beta$ , PI3K, pAKT/AKT e GLUT4 no TAB. Provavelmente o aumento na sensibilidade da ação da insulina em conjunto com a redução da produção hepática de glicose favoreça a diminuição nos níveis de glicemia observado nos animais hiperalimentados. Contudo, alguns estudos demonstram que a retirada da grelina (camundongos grelina -/-) promove uma melhora na sensibilidade à insulina, como redução nos níveis glicêmicos e aumento da secreção e ação da insulina em camundongos com fenótipo ob/ob (SUN *et al.*, 2006). Esses dados evidenciam que a grelina acilada apresenta uma dupla ação sobre a homeostase glicêmica, visto que, o aumento ou redução na tolerância à glicose e/ou insulina é modificada de acordo com a idade do animal, estado nutricional e nível plasmático glicêmico desses animais.

Vários estudos demonstram que a hipernutrição no início da vida pode influenciar a homeostase energética. Especificamente no adipócito, a hipernutrição causa alterações no metabolismo lipídico e metabolismo da glicose, promovendo acúmulo de TG e hipertrofia das células adiposas (revisado em HABBOUT *et al.*, 2013). Diante do exposto, investigamos o efeito da grelina e da hiperalimentação no início da vida sobre alguns dos biomarcadores lipogênicos como AMPK, CD36, FAS e PPAR $\gamma$  no TAB em camundongos jovens e adultos.

A AMPK é uma enzima que induz uma cascata de eventos intracelulares em resposta à mudança da carga energética celular (SANTOMAURO *et al.*, 2008) e estimula caminhos que aumentam a produção de energia (transporte de glicose, oxidação de ácidos graxos) e desliga caminhos que consomem energia (lipogênese, síntese de proteína, gliconeogênese), tendo um importante papel na manutenção da homeostase energética (RUTTER *et al.*, 2003). Também, está diretamente envolvida com processo de sinalização da grelina e insulina. Basicamente, AMPK fosforila e inibe ACC, diminuindo o fluxo de substratos na via anabólica. Em consequência, a redução dos níveis de malonil - CoA conduzem a um aumento na atividade da CPT-1 e fosforilação oxidativa (FAO). Nossos resultados demonstram que aos 21 dias os animais do grupo hiperalimentado não apresentaram diferença na razão pAMPK/AMPK. Todavia, ao chegar à idade adulta (120 dias) os animais hiperalimentados apresentam redução da razão pAMP/AMPK. Após a injeção de grelina acilada não houve modificação na fosforilação da AMPK nos animais jovens e adultos em nenhum dos grupos analisados. Essa falta de ação foi observada em outros estudos sobre a associação entre grelina e AMPK. (SANGIAO-ALVARELLOS *et al.*, 2009). Sugerimos, em concordância com Sangiao-Alvarellos (2009) que a fosforilação da AMPK pode ser dependente de muitos fatores como jejum, idade e tempo de tratamento com grelina.

O PPAR $\gamma$  é conhecido por ser um importante regulador envolvido nas vias de transcrição da adipogênese, além de influenciar o metabolismo de lipídios e carboidratos (SUGII *et al.*, 2009). Como regulador principal da formação de células de gordura, o PPAR $\gamma$  é necessário para o acúmulo de tecido adiposo e, portanto, contribui para a obesidade (revisado em LEHRKE & LAZAR, 2005). O presente estudo demonstrou que os animais, aos 21 dias, hiperalimentados durante a lactação exibiram redução no conteúdo de PPAR $\gamma$ , enquanto que, na idade adulta não foi observado modificações desse fator de transcrição. Estudos anteriores mostraram que a hiperalimentação leva a redução na expressão do PPAR $\gamma$  e aumento da FAS em animais jovens (SOARES *et al.*, 2012; CONCEIÇÃO *et al.*, 2015). Desta forma, sugere-se que a capacidade de armazenamento do adipócitos atinge um limite, porque há menos estímulo para a proliferação, favorecendo a hipertrofia dos adipócitos e a hipertrigliceridemia (CONCEIÇÃO *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2011).

Observamos que a injeção de grelina acilada promoveu uma redução no conteúdo do PPAR $\gamma$  nos animais adultos hiperalimentados. Liu e colaboradores (2009) demonstraram que a grelina possui uma ação sobre o processo de proliferação e diferenciação de pré-adipócitos 3T3-L1, pelo aumento da expressão RNAm do PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$ . No tecido adiposo branco de humanos a grelina acilada promoveu o aumento no conteúdo e expressão de PPAR $\gamma$  e SREBF-1, além de aumentar o acúmulo intracelular de TG, FAS e LPL (RODRÍGUEZ *et al.*, 2009). Porém trabalhos com injeção in vivo em ratos demonstram que a grelina não altera a expressão do PPAR $\gamma$  e C/EBP $\alpha$  no tecido adiposo (DAVIES, 2009). Sugerimos que a divergência entre os resultados do presente com os dados da literatura sejam devidos aos diferentes protocolos de tratamento e avaliações in vitro.

A enzima ácido graxo sintase (FAS) catalisa a síntese de ácidos graxos (AG) a partir de malonil-CoA. O Malonil-CoA entra em uma via catalisada pela FAS que culmina na formação de acilCoA, que é utilizado para a esterificação com glicerol-3-P, completando a biossíntese de TAG, que é finalmente incorporado à gotícula citoplasmática de gordura (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Sendo assim, o acúmulo de gordura no TAB é associado a um aumento na FAS, que além de catalisar a síntese de novo de ácidos graxos, regula a atividade lipogênica no tecido adiposo. Em concordância, o presente estudou demonstrou que os animais hiperalimentados, aos 120 dias, apresentam maior conteúdo de FAS no TAB. Entretanto, após a injeção de grelina os animais do controle apresentaram aumento do conteúdo da FAS, ao passo que no grupo hiperalimentado não foi observado modificações na FAS. Estudos relatam que a grelina eleva a expressão e a atividade de enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, tais como SCD1, ACC $\alpha$  e FAS (SANGIAO-ALVARELLOS *et al.*,

2009, BARAZZONI *et al.*, 2005, THEANDER-CARRILLO *et al.*, 2006), o que pode favorecer a aumento de peso e gordura visceral.

O transportador CD36 encontra-se presente em inúmeras membranas biológicas, onde atua como receptor de vários tipos de moléculas, tendo um papel de cooperar com o processo de captação das moléculas de ácidos graxos livres (AGL) (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Além disso, a CD36 é importante para a liberação de AG em resposta a estímulos lipolíticos (ZOU *et al.*, 2012) influenciando dessa forma o armazenamento e a mobilização de energia. Paralelamente, nossos resultados demonstram uma redução significativa no conteúdo da CD36 nos animais do grupo hiperalimentado, aos 21 e 120 dias. Estes resultados sugerem que existe uma menor capacidade dos adipócitos na translocação de AG nos grupos hiperalimentados, uma vez que estas proteínas estão diretamente ligadas ao transporte dos AG para a mitocôndria (TURNER *et al.*, 2014). Ademais, estudos demonstram que mutações no gene *cd36* em ratos espontaneamente hipertensos resultam em hiperlipidemia e resistência à insulina (PRAVENEK *et al.* 2001). Curiosamente, a injeção de grelina acilada ocasionou um aumento no conteúdo da CD36 em ambas as idades, 21 e 120 dias, no grupo hiperalimentado. Esses dados sugerem que, a grelina acilada promove um aumento na captação dos AGL para o citoplasma do adipócito. Um fato interessante demonstrado por Drover & Abumrad (2005) é a importância da captação dos AGL mediados pela CD36 na regulação dos níveis de fatores de transcrição como o PPAR $\gamma$ . Sendo assim, é necessário determinar se o aumento no conteúdo de CD36 e redução do PPAR $\gamma$  traduzem em diminuição da expressão de genes alvo de PPAR.

A mitocôndria é o principal local de produção de energia em células que consomem oxigênio para síntese de ATP por fosforilação oxidativa (FO) (SCHÖTTL *et al.*, 2015). No TAB as mitocôndrias são cruciais para o metabolismo energético e o equilíbrio energético do corpo. Como a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos é uma importante fonte de energia para as células adiposas (WILSON-FRITCH *et al.*, 2004), investigamos os efeitos da hiperalimentação e da administração de grelina acilada na respiração mitocondrial do TAB.

Estudos demonstram que a obesidade promove o aumento de AGL e hiperglicemia, o que favorece o aumento da produção de EROs que pode causar a disfunção mitocondrial no adipócito (KUSMINSKI, SCHERER 2012).

Em concordância com os resultados que demonstram alterações do metabolismo energético, nossos dados obtidos através da análise de respirometria de alta resolução demonstraram que os animais do grupo hiperalimentado apresentaram menor capacidade de oxidação dos substratos glutamato, malato, succinato e palmitoil-L-carnitina aos 21 dias.

Esses resultados corroboram com outros autores, que descrevem que em indivíduos obesos há uma redução da capacidade oxidativa mitocondrial do adipócito em comparação com os indivíduos não obesos (YIN, 2014). Além disso, os animais hiperalimentados apresentaram diminuição do RCR; relação entre taxa de respiração máxima estimulada por ADP (estado 3) e a taxa de respiração na ausência da fosforilação do ADP (estado 4); no protocolo com glutamato, malato, succinato, e aumento do RCR no protocolo com palmitoil-L-carnitina e malato, quando comparado com o grupo controle. Esses dados indicam uma disfunção mitocondrial (redução do acoplamento da fosforilação oxidativa) do TAB na utilização dos substratos energéticos, ao passo que, apesar da menor oxidação de palmitoil-L-carnitina e malato, o TAB dos animais jovens hiperalimentados apresenta um melhor acoplamento da fosforilação oxidativa. Esses dados demonstram que esses animais utilizam palmitoil-L-carnitina e malato como fonte preferencial para produção de energia, visto que, os animais jovens conseguem manter a produção de ATP.

Na idade adulta, os animais do grupo hiperalimentado não apresentaram diferença significativa na oxidação dos substratos energéticos. Contudo, esses animais apresentaram redução da capacidade oxidativa, como detectada pela diminuição do RCR e redução dos níveis de ATP nos adipócitos. Portanto, a redução da FO poderia representar um mecanismo adaptativo à sobrecarga de energia, hipertrofia de adipócitos e expansão do tecido adiposo, como sugerem SCHÖTTL e colaboradores (2015).

Ao avaliarmos os efeitos da injeção de grelina acilada sobre a oxidação dos substratos energéticos, os nossos dados demonstraram que a grelina promove um aumento da oxidação dos substratos glutamato, malato, succinato e palmitoil-L-carnitina e aumento nos níveis de ATP no TAB de animais jovens, hiperalimentados na lactação. Esses dados mostram pela primeira vez que, uma única dose de grelina é capaz de promover uma melhora na oxidação de substratos e aumentar os níveis de ATP nos adipócitos brancos de animais hiperalimentados.

Aos 120 dias, a grelina acilada promoveu um aumento na oxidação de todos os substratos energéticos utilizados no estudo. Além disso, os animais controles também apresentaram aumento na oxidação do substrato palmitoil-L-carnitina. Embora a grelina promova um aumento na oxidação dos substratos, os animais do grupo controle apresentaram uma redução da capacidade da FO, observada pela diminuição do RCR, quando utilizado o palmitoil-L-carnitina, e menores níveis de ATP no TAB. No grupo hiperalimentado, a grelina parece promover um ajuste no RCR, ao passo que seus níveis se igualam ao grupo controle. Apesar dessas modificações, o efeito a curto prazo da grelina não elevou os níveis de ATP no TAB. Sugerimos, que o aumento na  $\beta$ -oxidação, no grupo controle e hiperalimentado, após a

injeção periférica de grelina pode ser um mecanismo compensatório devido o aumento da ação lipogênicos da grelina, como observado pelo aumento da FAS e CD36.

Sabe-se que os adipócitos podem apresentar um conteúdo mitocondrial reduzido, devido a idade, a obesidade e diabetes. Além disso, os adipócitos maduros que sofrem hipertrofia podem perder grande parte do seu potencial metabólico (CHOO *et al.*, 2006). Sendo assim, analisamos as proteínas mitocondriais, como CPT-1, PGC1 $\alpha$  e UCP2, envolvidas na captação de ácidos graxos, biogênese mitocondrial e desacoplamento da fosforilação oxidativa.

O presente estudo demonstrou que a hiperalimentação no início da vida promove redução do conteúdo proteico da CPT-1 aos 21 dias. A CPT-1 serve como enzima reguladora chave do controle das taxas de ácidos graxos pela mitocôndria. Porém, a atividade da CPT1 é fortemente inibida por malonil-CoA (KERNER, HOPPEL, 2002), o que ocasiona na redução da oxidação de ácidos graxos. Aos 120 dias, os animais hiperalimentados apresentaram aumento na expressão de CPT-1, sugerindo um mecanismo adaptativo na tentativa de aumentar a captação de ácidos graxos para a mitocôndria.

Paralelamente, demonstramos que a administração de grelina aumentou significativamente a expressão da CPT1 no TAB de animais jovens e adultos do grupo controle. Em contrapartida, outros autores não encontraram modificação da expressão e atividade da CPT1 no TAB após a injeção de grelina (BARAZZONI *et al.*, 2005; THEANDER-CARRILLO *et al.*, 2006; SANGIAO-ALVARELLOS *et al.*, 2009), sugerindo que modificações da oxidação de ácidos graxos nem sempre estão diretamente associados com alterações no conteúdo da CPT1.

A UCP2 pertence à família de carreadores mitocondriais e está envolvida na supressão da produção de EROS, através do desacoplamento da respiração mitocondrial (PECQUEUR *et al.*, 2008). Entretanto, estudos demonstram que o estresse oxidativo também pode induzir a expressão de UCP2. Particularmente, o aldeído 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE) pode ser um sinal biológico para induzir o desacoplamento através de UCP2 (ECHTAY *et al.*, 2003). O 4HNE é um produto abundante da peroxidação lipídica, derivado a partir da oxidação de fosfolipídios presentes na membrana interna da mitocôndria e apresenta grande poder nocivo ao tecido adiposo. A literatura descreve que esse aldeído encontra-se elevado no tecido adiposo epididimal de animais submetidos a uma dieta rica em gordura (PAGLIALUNGA *et al.*, 2015). Com base nesses estudos, avaliamos a expressão de UCP2 e 4HNE no TAB. Dados do presente estudo mostram que a hipernutrição no início da vida causa aumento do 4HNE, porém a UCP2 encontrou-se reduzida no TAB de animais jovens. Esses resultados sugerem

que, a hiperalimentação prejudica o papel protetor da UCP2 na supressão das EROS, as quais podem inibir diretamente o consumo oxigênio de pelos adipócitos, o que resulta em acúmulo de lipídios (revisado em KUSMINSKI & SCHERER, 2012). Além disso, estudos relatam que o 4-HNE pode interferir diretamente com a sinalização da insulina, causando redução na fosforilação do IRS-1 em adipócitos (DEMOZAY *et al.*, 2008). Observamos que camundongos adultos, hiperalimentados na lactação, não apresentam modificações no conteúdo protéico da UCP2 e no conteúdo do 4HNE no TAB, apesar de outros modelos de obesidade como dieta com alto teor de gordura e ob/ob observarem aumento da peroxidação lipídica no tecido adiposo epididimal (LONG *et al.*, 2013). Sugerimos que a inalteração desses dados, na idade adulta, seja um mecanismo adaptativo do processo de envelhecimento, visto que, nessa mesma idade não foi observado alteração na oxidação dos substratos energéticos como relatado anteriormente.

Ademais, avaliamos os efeitos da injeção de grelina sobre a UCP2 e o 4HNE em animais jovens e adultos. Em nosso estudo, observamos que a grelina aumenta a UCP2, enquanto que o 4HNE se mantém elevado mesmo após a injeção nos animais jovens do grupo hiperalimentado. Supondo que o 4HNE pode levar a ativação da UCP2 como um mecanismo para reduzir os danos causados pela peroxidação, nossos dados sugerem que a grelina promove um efeito protetor nos adipócitos através da UCP2, devido à capacidade dessa proteína de balancear o acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Na idade adulta, observamos que a grelina leva a redução nos níveis de 4HNE no TAB dos animais do grupo controle, porém não foi observado modificações no conteúdo da UCP2. Estudos descrevem que o 4HNE é metabolizado enzimaticamente em condições fisiológicas e, em níveis baixos, desempenham um importante papel como molécula de sinalização para estimular a expressão gênica e aumentar a capacidade antioxidante celular, de fato estudos relam que a grelina acilada pode melhorar a atividade de enzimas antioxidantes (ZWIRSKA-KORCZALA, 2007).

O coativador 1 do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC1- $\alpha$ ) é uma família de coativadores transcricionais, que surgiram como reguladores centrais do metabolismo (AUSTIN, ST-PIERRE, 2012), exercendo um efeito positivo sobre a biogênese mitocondrial, a absorção de ácidos graxos, bem como sobre muitos outros processos metabólicos (HANDSCHIN & SPIEGELMAN, 2006). Alguns estudos demonstraram que a grelina poderia melhorar a biogênese mitocondrial e as atividades enzimáticas antioxidantes (ANDREWS *et al.*, 2010, ZWIRSKA-KORCZALA *et al.*, 2007). Entretanto, no presente estudo, a grelina não modificou o conteúdo de PGC1- $\alpha$  em nenhum dos grupos e idades

analisados. Sendo assim, a grelina melhora a capacidade oxidativa não parece ser dependente da PGC1- $\alpha$ .

O presente estudo contribui para a melhor compreensão das alterações nutricionais no início da vida, que levam a modificações hormonais que influenciam o metabolismo glicídico, metabolismo lipídico e predisõem as mitocôndrias do tecido adiposo ao estresse oxidativo, que também reduz a capacidade de oxidação dos substratos energéticos. Tais modificações, além de promoverem o ganho de peso perduram até a idade adulta.



## CONCLUSÃO

Nosso estudo fornece evidências de que a grelina acilada desenvolve uma dupla ação sobre a homeostase glicêmica, visto que, o aumento ou redução na tolerância a glicose e/ou insulina é modificada de acordo com a idade do animal, estado nutricional e nível plasmático glicêmico desses animais. Mostramos que uma única injeção de grelina acilada promove o aumento na oxidação dos substratos energéticos, melhora da sensibilidade à insulina e redução dos níveis de colesterol-total em animais hiperalimentados no início da vida. Estas observações reforçam que a grelina é um importante modulador do metabolismo energético do tecido adiposo branco.

## REFERÊNCIAS

- ANDRICH DE, CIANFLONE K, COMTOIS AS, LALONDE S, ST-PIERRE DH. The endocrine effects of acylated and des-acylated ghrelin. *Res Rep Endocr Disord*.v. 2012, n. 2, p. 31-40, May 2012
- ALFARADHI, M. Z., OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front genet*. v. 2, p. 1-13, Jun. 2011.
- ALONSO, V., FRIEDMAN, P. A. Minireview: ubiquitination-regulated G protein-coupled receptor signaling and trafficking. *Mol Endocrinol*. v. 27, n. 4, p. 558-572, Apr. 2013.
- ALVAREZ-CASTRO P, ISIDRO ML, GARCÍA-BUELA J, et al. Effect of acute ghrelin administration on glycaemia and insulin levels in obese patients. *Diabetes Obes Metab*. v.8, n. 5, p. 555-60, Sep. 2006
- ANDREWS, Z. B., ERION, D. M., BEILER, R., et al. Uncoupling protein-2 decreases the lipogenic actions of ghrelin. *Endocrinology*. v. 151, p. 2078-2086, 2010.
- ARNER, P. Differences in lipolysis between human subcutaneous and omental adipose tissues. *Ann Med*, v. 27, n. 4, p. 435-438, Aug. 1995.
- ATHERTON, H. J., GULSTON, M. K., BAILEY, N. J., et al. Metabolomics of the interaction between PPAR-alpha and age in the PPAR-alpha-null mouse. *Mol Syst Biol*. v.5, n. 259, p. 1-10, Apr. 2009.
- AUSTIN, S., ST-PIERRE, J. PGC1 $\alpha$  and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. *J Cell Sci*. v. 1, n. 125 (Pt 21), p. 4963-4971, Nov. 2012.
- AYDIN, S., SAHIN, I., OZKAN, Y., et al. Examination of the tissue ghrelin expression of rats with diet-induced obesity using radioimmunoassay and immunohistochemical methods. *Mol Cell Biochem*. v. 365, n.1-2, p.165-173, Jun. 2012.
- BARAZZONI, R., BOSUTTI, A., STEBEL, M., et al. Ghrelin regulates mitochondrial-lipid metabolism gene expression and tissue fat distribution in liver and skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 288, p. E228-E235, 2005.
- BARAZZONI, R., ZANETTI, M., CATTIN, M. R., et al. Ghrelin enhances in vivo skeletal muscle but not liver AKT signaling in rats. *Obesity*. v. 15, p. 2614-2623, Nov. 2007.
- BERNARDO, A. F., CORTEZ, E., NEVES, F. A., et al. Overnutrition during lactation leads to impairment in insulin signaling, up-regulation of GLUT1 and increased mitochondrial carbohydrate oxidation in heart of weaned mice. *J Nutr Biochem*. v. 29, p. 124-132, Mar. 2016.

- BIZZARRI, C., RIGAMONTI, A. E., LUCE, A., *et al.* Children with Prader-Willi syndrome exhibit more evident meal-induced responses in plasma ghrelin and peptide YY levels than obese and lean children. *Eur J Endocrinol.* v. 162, n. 3, p. 499-505, Mar. 2010.
- BOEHM, B.O., CLAUDI-BOEHM, S. The metabolic syndrome. *Scand J Clin Lab Invest. Suppl.* v. 240, p. 3-13, 2005.
- BOURNAT, J. C., BROWN, C. W. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* v. 17, p. 446-452, 2010.
- BRANDÃO, P. P., GARCIA-SOUZA, E. P., NEVES, F. A., *et al.* Hormônios reguladores do apetite em mulheres obesas com e sem compulsão alimentar. *Rev Nutr Campinas.* v. 24, n. 5, p. 667-677, Out. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Vigitel Brasil 2014: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Gestão Estratégica e Participativa. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- BROGLIO, F., ARVAT, E., BENSO, A., *et al.* Ghrelin, a natural GH secretagogue produced by the stomach, induces hyperglycemia and reduces insulin secretion in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 86, n. 10, p. 5083-5086, Oct. 2001.
- BRUCE, A. *et al.* Conversão de energia: Mitocondrial. In: BRUCE, A. *et al.* Biologia molecular da célula. 5ªed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 14, p. 653-684.
- CARDOSO, A. R., QUELICONI, B. B., KOWALTOWSKI, A. J. Mitochondrial ion transport pathways: role in metabolic diseases. *Biochim Biophys Acta.* v. 1797, p. 832-838, Jun-Jul. 2010.
- CARROLL, N. V., LONGLEY, R. W., ROE, J. H. The determination of glycogen in liver and muscle by use of anthrone reagent. *J Biol Chem.* v. 220, n. 2, p. 583-5936, Jun. 1956.
- CASTANEDA, T. R., TONG, J., DATTA, R., *et al.* Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Front Neuroendocrinol.* v. 31, n. 1, p. 44-60, Jan. 2010.
- CEDIKOVA, M., KRIPNEROVÁ, M., DVORAKOVA, J., *et al.* Mitochondria in White, Brown, and Beige Adipocytes. *Stem Cells Int.* v. 2016, n. 6067349, p. 1-11, Mar. 2016.
- CHACKO, S. K., HAYMOND, M. W., SUN, Y., *et al.* Effect of ghrelin on glucose regulation in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 302, p. E1055-E1062, 2012.
- CHEN, C., WU, D., CLARKE, I. J. Signal transduction systems employed by synthetic GH-releasing peptides in somatotrophs. *J Endocrinol.* v. 148, n. 3, p. 381-386, Mar. 1996.
- CHINETTI, G., FRUCHART, J.C., STAELS, B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res.* v. 49, p. 497-505, 2000.

- CHOO, H. J., KIM, J. H., KWON, O. B., *et al.* Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia*. v. 49, p. 784-791, Apr. 2006.
- COLLDEN, G., BALLAND, E., PARKASH, J., *et al.* Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab*. v. 4, n. 1, p. 15-24, Oct. 2014.
- CONCEIÇÃO, E. P., FRANCO, J. G., OLIVEIRA, E., *et al.* Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance. *J Nutr Biochem*. v. 24, n. 1, p. 81-87, Jan. 2013.
- CONCEIÇÃO, E. P., MOURA, E. G., CARVALHO, J. C., *et al.* Early redox imbalance is associated with liver dysfunction at weaning in overfed rats. *J Physiol*. v. 1, n. 593, p. 4799-4811, Nov. 2015.
- COWLEY, M. A., SMITH, R. G., DIANO, S., *et al.* The distribution and mechanism of action of ghrelin in the CNS demonstrates a novel hypothalamic circuit regulating energy homeostasis. *Neuron*. v. 37, n. 4, p. 649-661, Feb. 2003.
- CRUZ, M. L., GORAN, M.I. The metabolic syndrome in children and adolescents. *Curr Diab Rep*. v. 4, n. 1, p. 53-62, Feb. 2004.
- CUMMINGS, D. E., PURNELL, J. Q., FRAYO, R. S., *et al.* A Preprandial Rise in Plasma Ghrelin Levels Suggests a Role in Meal Initiation in Humans. *Diabetes*, v. 50, p. 1714-1719, Aug. 2001.
- CUNHA, A. C., PEREIRA, R. O., PEREIRA, M. J., *et al.* Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem*. v. 20, n. 6, p. 435-442, Jun. 2009.
- DAMASO, A. Etiologia da obesidade. *Medsa*. Rio de Janeiro, 2003.
- DAVAL, M., DIOT-DUPUY, F., BAZIN, R., *et al.* Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J Biol Chem*. v. 280, n. 26, p. 25250-25257, Jul. 2005.
- DAVAL, M., FOUFELLE, F., FERRÉ, P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol*. v. 574, n. Pt 1, p. 55-62, Jul. 2006.
- DAVIDOWA, H., PLAGEMANN, A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. *Neuroreport*. v. 18, n. 5, p. 521-524, Mar. 2007.
- DAVIES, J. S., KOTOKORPI, P., ECCLES, S. R., *et al.* Ghrelin induces abdominal obesity via GHS-R-dependent lipid retention. *Mol Endocrinol*. v. 23, n. 6, p. 914-924, Jun. 2009.
- DE ALMEIDA, D. L., FABRÍCIO, G. S., TROMBINI, A. B., *et al.* Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. *Cell Physiol Biochem*. v. 32, n. 6, p. 1621-1630, 2013.

DE PAUW, A., TEJERINA, S., RAES, M., *et al.* Mitochondrial (dys)function in adipocyte (de)differentiation and systemic metabolic alterations. *Am J Pathol.* v. 175, p. 927-939, Sep. 2009.

DELHANTY, P. J., SUN, Y., VISSER, J. A., *et al.* Unacylated ghrelin rapidly modulates lipogenic and insulin signaling pathway gene expression in metabolically active tissues of GHSR deleted mice. *PLoS One.* v. 5, n. 7:e11749, p. 1-11, Jul. 2010.

DEMOZAY, D., MAS, J. C., ROCCHI, S., *et al.* FALDH reverses the deleterious action of oxidative stress induced by lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal on insulin signaling in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetes.* v. 57, n. 5, p. 1216-1226, May. 2008.

DESPRES, J. P., LEMIEUX, I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature.* v. 444, n. 7121, p. 881-887, Dec. 2006.

DROVER, V. A., ABUMRAD, N. A. CD36-dependent fatty acid uptake regulates expression of peroxisome proliferator activated receptors. *Biochem Soc Trans.* v. 33, n. 1, p. 311-3155, Feb. 2005.

DZAMKO, N. L., STEINBERG, G. R. AMPK-dependent hormonal regulation of whole-body energy metabolism. *Acta Physiol.* v. 196, n. 1, p. 115-127, May. 2009.

ECHTAY, K. S., ESTEVES, T. C., PAKAY, J.L., *et al.* A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling. *EMBO J.* v. 22, n. 16, p. 4103-4110, Aug. 2003.

EGUCHI, R., CHEIK, N. C., OYAMA, L. M., *et al.* Efeitos do Exercício Crônico Sobre a Concentração Circulante da Leptina e Grelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta. *Rev Bras Med Esporte.* v. 14, n. 3, p. 182-187, Mai/Jun. 2008.

FIDALGO, M., FALCÃO-TEBAS, F., BENTO-SANTOS, A., *et al.* Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate–low physical training. *Br J Nutr.* v. 109, n. 3, p. 449-456, Feb. 2013.

FISCHER-POSOVSZKY, P., WABITSCH, M., HOCHBERG, Z. Endocrinology of adipose tissue – an update. *Horm Metab Res.* v. 39, n. 5, p. 314-321, May. 2007.

FONSECA-ALANIZ, M. H., TAKADA, J., LIMA, F. B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 50, n. 2, p. 216-229, Abr. 2006.

FONSECA-ALANIZ, M. H., TAKADA, J., LIMA, F. B. O tecido adiposo como órgão endócrino: da teoria à prática. *J Pediatr.* v. 83, Suppl 5, p.192-203, 2007.

GARCIA-SOUZA, E. P., DA SILVA, S. V., FÉLIX, G. B., *et al.* Maternal protein restriction during early lactation induces GLUT4 translocation and mTOR/Akt activation in adipocytes of adult rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 295, n. 3, p. E626-E636, Sep. 2008.

GAUNA, C., DELHANTY, P. J., VAN AKEN, M. O., *et al.* Unacylated ghrelin is active on the INS-1E rat insulinoma cell line independently of the growth hormone secretagogue

receptor type 1a and the corticotropin releasing factor 2 receptor. *Mol Cell Endocrinol.* v. 7, n. 251, p. 103-11, Jun. 2006.

GELIEBTER, A., GLUCK, M. E., HASHIM, S. A. Plasma ghrelin concentrations are lower in binge-eating disorder. *J Nutr.* v. 135, n. 5, p.1326-1330, May. 2005.

GLOY, V. L., LUTZ, T. A., LANGHANS, W., *et al.* Basal plasma levels of insulin, leptin, ghrelin, and amylin do not signal adiposity in rats recovering from forced overweight. *Endocrinology.* v. 151, n. 9, p.4280-4288, Sep. 2010

GLUCKMAN, P. D., HANSON, M. A. Developmental plasticity and human disease: research directions. *J Intern Med.* v. 261, n. 5, p. 461-471, May. 2007.

GOLDBERG, D. W., LEITAO, S. A. T., GODFREY, M. H., *et al.* Ghrelin and leptin modulate the feeding behaviour of the hawksbill turtle *Eretmochelys imbricata* during nesting season. *Conserv Physiol.* v. 1:cot016, p. 1-13, Jul. 2013.

GOLDSTEIN, J. L., ZHAO, T., LI, R. L., *et al.* Surviving Starvation: Essential Role of the Ghrelin-Growth Hormone Axis Cold Spring Harb. *Symp Quant Biol.* v. 76, p. 121-127, 2011.

GOOSSENS, G. H. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav.* v. 94, n. 2, p. 206-218, May. 2008.

GROVE, K. L., COWLEY, M. A. Is ghrelin a signal for the development of metabolic systems? *J Clin Invest.* v. 115, n. 12, p. 3393-3397, Dec. 2005.

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

HANDSCHIN, C., SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev.* v. 27, n. 7, p. 728-735, Dec. 2006.

HEIMAN, M. L., WITCHER, D. R. Ghrelin in Obesity. *Metab Syndr Relat Disord.* v. 4, n. 1, p. 37-42, 2006.

HEPPNER, K. M., PIECHOWSKI, C. L., MÜLLER, A., *et al.* Both acyl and des-acyl ghrelin regulate adiposity and glucose metabolism via CNS ghrelin receptors. *Diabetes.* v. 63, p. 122-131, Jan. 2014.

HILLIER, T. A., PEDULA, K. L., SCHMIDT, M. M., *et al.* Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care.* v. 30, n. 9, p. 2287-2292, Sep. 2007.

HINNEY, A., HOCH, A., GELLER, F., *et al.* Ghrelin gene: identification of missense variants and a frameshift mutation in extremely obese children and adolescents and healthy normal weight students. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 87, n. 6, p. 2716-2719, Jun. 2002.

- HOLMAN, G. D., KASUGA, M. From receptor to transporter: insulin signalling to glucose transport. *Diabetologia*. v. 40, n. 9, p. 991-1003, Sep. 1997.
- HOSODA, H., KOJIMA, M., KANGAWA, K. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance. *Mol Interv*. v. 2, n. 8, p. 494-503, Dec. 2002.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa de Orçamentos Familiares 1974-1975 (POF). Rio de Janeiro: IBGE, 1976.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF). Rio de Janeiro: IBGE, 2010.
- IMAMURA, T., VOLLENWEIDER, P., EGAWA, K., *et al.* G Alpha-q/11 Protein Plays a Key Role in Insulin-Induced Glucose Transport in 3T3-L1 Adipocytes. *Mol Cell Biol*. v. 19, p. 6765-6774, Oct. 1999.
- JENSEN, M. D. Health consequences of fat distribution. *Horm Res*. v. 48, Suppl 5, p. 88-92, 1997.
- JOHANNSEN, D. L.; RAVUSSIN, E. The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol*. v. 9, p. 780-786, 2009.
- KAHN, B. B., FLIER, J. S. Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*. v. 106, n. 4, p. 473-481, Aug. 2000.
- KERNER, J., HOPPEL, C. L. Fatty acid import into mitochondria. *Biochim Biophys Acta*. v. 1486, n. 1, p. 1-17, Jun. 2000.
- KERNER, J., HOPPEL, C. L. Radiochemical malonyl-CoA decarboxylase assay: activity and subcellular distribution in heart and skeletal muscle. *Anal Biochem*. v. 306, n. 2, p. 283-9, Jul. 2002.
- KERSHAW, E. E., FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab*. v. 89, n. 6, p. 2548-2256, Jun. 2004.
- KERSTEN, S., DESVERGNE, B., WAHLI, W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. v. 405, n. 6785, p. 421-424, May. 2000.
- KIM, M. S., YOON, C. Y., JANG, P. G., *et al.* The mitogenic and antiapoptotic actions of ghrelin in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol*. v. 18, n. 9, p. 2291-2301, Sep. 2004.
- KIRCHNER, H., GUTIERREZ, J. A., SOLENBERG, P. J., *et al.* GOAT links dietary lipids with the endocrine control of energy balance. *Nat Med*. v. 15, n. 7, p. 741-745, Jul. 2009.
- KOHNO, D., GAO, H. Z., MUROYA, S., *et al.* Ghrelin directly interacts with neuropeptide-Y-containing neurons in the rat arcuate nucleus: Ca<sup>2+</sup> signaling via protein kinase A and N-type channel-dependent mechanisms and cross-talk with leptin and orexin. *Diabetes*. v. 52, n. 4, p. 948-956, Apr. 2003.

KOJIMA, M., HOSODA, H., DATE, Y., *et al.* Ghrelin is a growth hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*. v. 402, p. 656-660, 1999.

KOLA, B., HUBINA, E., TUCCI, S. A., *et al.* Cannabinoids and ghrelin have both central and peripheral metabolic and cardiac effects via AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*. v. 280, n. 26, p. 25196-25201, Jul. 2005.

KORBONITS, M., GOLDSTONE, A. P., GUEORGUIEV, M., *et al.* Ghrelin--a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*. v. 25, n. 1, p. 27-68, Apr. 2004.

KOWALTOWSKI, A. J., DE SOUZA-PINTO, N. C., CASTILHO, R. F., *et al.* Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. v. 47, p. 333-343, Aug. 2009.

KUSMINSKI, C. M., SCHERER, P. E. Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab*. v. 23, p. 435-443, Sep. 2012.

LACERDA-MIRANDA, G., SOARES, V. M., VIEIRA, A. K., *et al.* Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice. *Peptides*. v. 35, n. 1, p. 65-73, May. 2012.

LEHRKE, M., LAZAR, M. A. The many faces of PPARgamma. *Cell*. v. 16, n. 123(6), p. 993-999, Dec. 2005.

LILLYCROP, K. A., BURDGE, G. C. Epigenetic changes in early life and future risk of obesity. *Int J Obes (Lond)*. v. 35, n. 1, p. 72-83, Jan. 2011.

LIM, C. T., KOLA, B., GROSSMAN, A., *et al.* The expression of ghrelin O-acyltransferase (GOAT) in human tissues. *Endocrine Journal*. v. 58, n. 8, p. 707-710, 2011.

LIM, C. T., KOLA, B., KORBONITS, M. AMPK as a mediator of hormonal signalling. *J Mol Endocrinol*. v. 44, n. 2, p. 87-97, Feb. 2010.

LISBOA, P. C., OLIVEIRA, E., FAGUNDES, A.T. S., *et al.* Postnatal Low Protein Diet Programs Leptin Signaling in the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid Axis and Pituitary TSH Response to Leptin in Adult Male Rats. *Horm Metab Res*. v. 44, p. 114-122, 2012.

LIU, J., LIN, H., CHENG, P., *et al.* Effects of ghrelin on the proliferation and differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. v. 29, n. 2, p. 227-230, Apr. 2009.

LONG, E. K., OLSON, D. M., BERNLOHR, D.A. High-fat diet induces changes in adipose tissue trans-4-oxo-2-nonenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal levels in a depot-specific manner. *Free Radic Biol Med*. v. 63, p. 390-398, Oct. 2013.

LOPEZ, M., LAGE, R., SAHA, A. K., *et al.* Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin. *Cell Metab*. v. 7, n. 5, p. 389-399, May. 2008.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp*. v. 156, n. 50-5, p. 38-50, 1991.



- MARTINS, M. R., VIEIRA, A. K., DE SOUZA, E. P., *et al.* Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult *Swiss* mice. *J Endocrinol.* v. 198, n. 3, p. 591-598, Sep. 2008.
- MCFARLAND, R., TURNBULL, D. M. Batteries not included: diagnosis and management of mitochondrial disease. *J Intern Med.* v. 265, p. 210-228, Feb. 2009.
- MEDINA-GÓMEZ, G. Mitochondria and endocrine function of adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* v. 26, p. 791-804, 2012.
- MERKEL, M., ECKEL, R. H., GOLDBERG, I. J. Lipoprotein lipase: genetics, lipid uptake, and regulation. *J Lipid Res.* v. 43, n. 12, p. 1997-2006, Dec. 2002.
- MITTELMAN, S. D., VAN CITTERS, G. W., KIRKMAN, E. L., *et al.* Extreme insulin resistance of the central adipose depot in vivo. *Diabetes.* v. 51, n. 3, p. 755-761, Mar. 2002.
- MOREIRA, A. S., TEIXEIRA TEIXEIRA, M., OSSO, F., *et al.* Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* v. 19, p. 805-810, 2009.
- MOURA, A. S., CALDEIRA FILHO, J. S., DE FREITAS MATHIAS, P. C, *et al.* Insulin secretion impairment and insulin sensitivity improvement in adult rats undernourished during early lactation. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* v. 96, n. 2, p. 179-192, May. 1997.
- MUOIO, D. M., NEWGARD, C. B. Obesity-related derangements in metabolic regulation. *Annu Rev Biochem.* v. 75, p. 367-401, 2006.
- MURATA, M., OKIMURA, Y., IIDA, K., *et al.* Ghrelin modulates the downstream molecules of insulin signaling in hepatoma cells. *J Biol Chem.* v. 277, p. 5667-5674, 2002.
- NISHIKAWA, T., KUKIDOME, D., SONODA, K., *et al.* Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract.* v. 77, Suppl. 1, p. S161-S164, 2007.
- OTTO, B., TSCHOP, M., HELDWEIN, W., *et al.* Endogenous and exogenous glucocorticoids decrease plasma ghrelin in humans. *Eur J Endocrinol.* v. 151, p. 113-117, 2004.
- OTTO, B. E, CHOBOT A. Role of ghrelin and leptin in the regulation of carbohydrate metabolism. Part I. Ghrelin. *Postepy Hig Med Dosw.* V. 66. p. 795-798, Oct. 2012
- PAGLIALUNGA, S., LUDZKI, A., ROOT-MCCAIG, J., *et al.* In adipose tissue, increased mitochondrial emission of reactive oxygen species is important for short-term high-fat diet-induced insulin resistance in mice. *Diabetologia.* v. 58, n. 5, p. 1071-1080, May. 2015.
- PATEL, A. D., STANLEY, S. A., MURPHY, K. G., *et al.* Ghrelin stimulates insulin-induced glucose uptake in adipocytes. *Regul Pept.* v. 134, n. 1, p.17-22, Mar. 2006.
- PECQUEUR, C., BUI, T., GELLY, C., *et al.* Uncoupling protein-2controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization. *FASEB J.* v. 22, p. 9-18, 2008.

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

PLAGEMANN, A., HARDER, T., BRUNN, M., *et al.* Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol.* v. 587, n. Pt 20, p. 4963-4976, Oct. 2009.

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

PLAGEMANN, A., ROEPKE, K., HARDER, T., *et al.* Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med.* v. 38, p. 393-400, 2010.

PRAVENEC, M., LANDA, V., ZIDEK, V., *et al.* Transgenic rescue of defective Cd36 ameliorates insulin resistance in spontaneously hypertensive rats. *Nat Genet.* v. 27, n. 2, p. 156-158, Feb. 2001.

PUIGSERVER, P., SPIEGELMAN, B. M. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC1alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocr Rev.* v. 24, p. 78-90, Feb. 2003.

QUEIROZ, J. C. F., ALONSO-VALE, M. I. C., CURI, R., *et al.* Controle da adipogênese por ácidos graxos. *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 53, n. 5, p. 582-594, Jul. 2009.

RADAELLI, T., VARASTEHPOUR, A., CATALANO, P., *et al.* Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes,* v. 52, p. 2951-2958, 2003.

REILLY JM, THOMPSON MP. Dietary fatty acids Up-regulate the expression of UCP2 in 3T3-L1 preadipocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* V. 277, n. 3, p. 541-5, Nov. 2000

REIMER, M. K., PACINI, G., AHRÉN, B. Dose-dependent inhibition by ghrelin of insulin secretion in the mouse. *Endocrinology.* v. 144, p. 916-921, 2003.

RODRIGUE-WAY A, CARON V, BILODEAU S., *et al.* Scavenger receptor CD36 mediates inhibition of cholesterol synthesis via activation of the PPAR $\gamma$ /PGC-1 $\alpha$  pathway and Insig1/2 expression in hepatocytes. *FASEB J.* v. 28, n.4, p. 1910-23, Apr. 2014

RODRIGUES, A. L., DE MOURA, E. G., PASSOS, M. C., *et al.* Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol.* v. 587, n. 11, p. 2647-2661, Jun. 2009.

RODRIGUES, A. L., DE MOURA, E. G., PASSOS, M. C., *et al.* Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. *J Nutr Biochem.* v. 22, n. 2, p. 109-117, Feb. 2011.

- RODRIGUES, A. L., DE SOUZA, E. P., DA SILVA, S. V., *et al.* Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol.* v. 195, n. 3, p. 485-494, Dec. 2007.
- RODRÍGUEZ, A., GÓMEZ-AMBROSI, J., CATALÁN, V., *et al.* Acylated and desacyl ghrelin stimulate lipid accumulation in human visceral adipocytes. *Int J Obes (Lond).* v. 33, n. 5, p. 541-552, May. 2009.
- ROGGE, M. M. The Role of Impaired Mitochondrial Lipid Oxidation in Obesity. *Biol Res Nurs.* v. 10, n. 4, p. 356-373, Apr. 2009.
- ROLFE, D. F.; BRAND, M. D. The physiological significance of mitochondrial proton leak in animal cells and tissues. *Biosci Rep.* v. 17, p. 9-16, 1997.
- ROMERO, A., KIRCHNER, H., HEPPNER, K., *et al.* Goat: the master switch for the ghrelin system? *Europ J Endocrinol.* v. 163, p. 1-8, 2010.
- ROUSSET, S. *et al.* The biology of mitochondrial uncoupling proteins. *Diabetes.* v. 53, n. suppl 1, p. S130–S135, Feb. 2004.
- RUTTER, G. A., DA SILVA XAVIER, G., LECLERC, I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *Biochem J.* v. 375, n. Pt 1, p.1-16, Oct. 2003.
- SALTIEL, A. R., KAHN, C. R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* v. 414, n. 6865, p. 799-806, Dec. 2001.
- SAMUELSSON, A. M., MATTHEWS, P. A., ARGENTON, M., *et al.* Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension.* v. 51, p. 383-392, 2008.
- SANGIAO-ALVARELLOS, S., VÁZQUEZ, M. J., VARELA, L., *et al.* Central ghrelin regulates peripheral lipid metabolism in a growth hormone-independent fashion. *Endocrinology.* v. 150, p. 4562-4574, 2009.
- SANTOMAURO, J. A. C., UGOLINI, M. R., SANTOMAURO, A. T., *et al.* Metformina e AMPK: Um Antigo Fármaco e Uma Nova Enzima no Contexto da Síndrome Metabólica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* v. 52, n. 1, p. 120-125, Feb. 2008.
- SCERIF, M., GOLDSTONE, A. P., KORBONITS, M. Ghrelin in obesity and endocrine diseases. *Mol Cell Endocrinol.* v. 340, n. 1, p. 15-25, Jun. 2011.
- SCHÖTTL, T., KAPPLER, L., FROMME, T., *et al.* Limited OXPHOS capacity in white adipocytes is a hallmark of obesity in laboratory mice irrespective of the glucose tolerance status. *Mol Metab.* v. 15, n. 4, p. 631-642, Jul. 2015.
- SHANKAR, K., KANG, P., HARRELL, A., *et al.* Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology.* v. 151, p. 2577-2589, 2010.

- SHIMBARA, T., MONDAL, M. S., KAWAGOE, T., *et al.* Central administration of ghrelin preferentially enhances fat ingestion. *Neurosci Lett.* v. 369, n. 1, p. 75-9, Oct. 2004.
- SOARES, V. M., GARCIA-SOUZA, E. P., LACERDA-MIRANDA, G., *et al.* Early life overfeeding decreases acylated ghrelin circulating levels and upregulates GHSR1a signaling pathway in white adipose tissue of obese young mice. *Regul Pept.* v. 174, p. 6-11, Feb. 2012.
- SPALDING, K. L., ARNER, E., WESTERMARK, P.O., *et al.* Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* v. 453, n. 7196, p.783-787, Jun. 2008.
- SUGII, S., OLSON, P., SEARS, D. D., *et al.* PPARgamma activation in adipocytes is sufficient for systemic insulin sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 106, n. 52, p. 22504-22509, Dec. 2009.
- SUN, Y., AHMED, S., SMITH, R. G. Deletion of ghrelin impairs neither growth nor appetite. *Mol Cell Biol.* v. 23, n. 22, p. 7973-7981, Nov. 2003.
- SUN, Y., ASNICAR, M., SAHA, P. K., *et al.* Ablation of ghrelin improves the diabetic but not obese phenotype of ob/ob mice. *Cell Metab.* v. 3, n. 5, p. 379-386, May. 2006.
- THEANDER-CARRILLO, C., WIEDMER, P., CETTOUR-ROSE, P., *et al.* Ghrelin action in the brain controls adipocyte metabolism. *J Clin Invest.* v. 116, n. 7, p. 1983-1993, Jul. 2006.
- THOMPSON, N. M., GILL, D. A., DAVIES, R., *et al.* Ghrelin and des-octanoyl ghrelin promote adipogenesis directly in vivo by a mechanism independent of the type 1a growth hormone secretagogue receptor. *Endocrinology.* v. 145, n. 1, p. 234-242, Jan. 2004.
- TODA, C., DIANO, S. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* v. 28, n. 5, p. 757-764, Oct. 2014.
- TOSHINAI, K., MONDAL, M. S., SHIMBARA, T., *et al.* Ghrelin stimulates growth hormone secretion and food intake in aged rats. *Mech Ageing Dev.* v. 128, n. 2, p. 182-186, Feb. 2007.
- TREVENZOLI, I. H., PINHEIRO, C. R., CONCEIÇÃO, E. P., *et al.* Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology, catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 298, n. 5, p. E941-E949, May. 2010.
- TSCHOP, M., SMILEY, D. L., HEIMAN, M. L. Ghrelin induces adiposity in rodents. *Nature.* v. 407, n. 6806, p. 908-913, Oct. 2000.
- TSCHOP, M., WEYER, C., TATARANNI, P. A., *et al.* Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity. *Diabetes.* v. 50, n. 4, p.707-709, Apr. 2001.
- TSUBONE, T., MASAKI, T., KATSURAGI, I., *et al.* Ghrelin regulates adiposity in white adipose tissue and UCP1 mRNA expression in brown adipose tissue in mice. *Regul Pept.* v. 130, p. 97-103, 2005.

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

URAKAWA, H., KATSUKI, A., SUMIDA, Y., *et al.* Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 88, p. 4673-4676, 2003.

VESTERGAARD, E. T., DJURHUUS, C. B., GJEDSTED, J., *et al.* Acute effects of ghrelin administration on glucose and lipid metabolism. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 93, n. 2, p. 438-444, Feb. 2008.

VIEIRA, A. K., SOARES, V. M., BERNARDO, A. F., *et al.* Overnourishment during lactation induces metabolic and haemodynamic heart impairment during adulthood. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* v. 25, n. 11, p. 1062-1069, Nov. 2015.

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

WILSON-FRITCH, L., NICOLORO, S., CHOUINARD, M., *et al.* Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest.* v. 114, n. 9, p. 1281-1289, Nov. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Childhood overweight and obesity Disponível em: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/childhood/en/>>. Acesso em: Agosto 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: Agosto 2016.

WORTLEY, K. E., ANDERSON, K. D., GARCIA, K., *et al.* Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v. 101, n. 21, p. 8227-8232, May. 2004.

WORTLEY, K. E., DEL RINCON, J. P., MURRAY, J. D., *et al.* Absence of ghrelin protects against early-onset obesity. *J Clin Invest.* v. 115, n. 12, p. 3573-3578, Dec. 2005.

WREN, A. M., SMALL, C. J., WARD, H.L., *et al.* The novel hypothalamic peptide ghrelin stimulates food intake and growth hormone secretion. *Endocrinology.* v. 141, p. 4325-4328, 2000.

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

YAMAUCHI, T., KAMON, J., WAKI, H., *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nat Med.* v. 7, n. 8, p. 941-946, Aug. 2001.

YAN, X., ZHU, M. J., XU, W., *et al.* Up-regulation of Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling is associated with enhanced adipogenesis and insulin resistance in fetal skeletal muscle of obese sheep at late gestation. *Endocrinology.* v. 151, n. 1, p. 380-387, Jan. 2010.

YIN, X., LANZA, I. R., SWAIN, J. M., *et al.* Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *J Clin Endocrinol Metab.* v. 99, n. 2, p. E209-E216, Feb. 2014.

ZIGMAN, J. M., JONES, J. E., LEE, C. E., *et al.* ELMQUIST J.K. Expression of ghrelin receptor mRNA in the rat and the mouse brain. *J Comp Neurol.* v. 494, n. 3, p. 528-548, Jan. 2006.

ZIGMAN, J. M., NAKANO, Y., COPPARI, R., *et al.* Mice lacking ghrelin receptors resist the development of diet-induced obesity. *J Clin Invest.* v. 115, n. 12, p. 3564-3572, Dec. 2005.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* v. 372, n. 6505, p. 425-432, Dec. 1994.

ZHOU D, SAMOVSKI D, OKUNADE AL, STAHL PD, ABUMRAD NA, SU X. *FASEB J.* v. 26, n. 11, p. 4733–4742. Nov. 2012

ZWIRSKA-KORCZALA, K., ADAMCZYK-SOWA, M., SOWA, P., *et al.* Role of leptin, ghrelin, angiotensin ii and orexins in 3t3 l1 preadipocyte cells proliferation and oxidative metabolism. *Am J Physiol Pharmacol.* v. 58, p. 53-64, 2007.