



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Ana Barbosa Marcondes de Mattos

**Metabolismo energético de animais *knockout* para Acetil-CoA Carboxilase 2
(ACC2) específica de coração: ACC2 como gene alvo na hipertrofia
cardíaca induzida por obesidade**

Rio de Janeiro

2014

Ana Barbosa Marcondes de Mattos

**Metabolismo energético de animais *knockout* para Acetil-CoA Carboxilase 2 (ACC2)
específica de coração: ACC2 como gene alvo na hipertrofia cardíaca induzida por
obesidade**

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. Aníbal Sanchez Moura
Coorientadora: Prof.^a Dra. Érica Patrícia de Souza

Rio de Janeiro

2014

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

M444 Mattos, Ana Barbosa Marcondes de.

Metabolismo energético de animais Knockout induzido para Acetil-CoA Carboxilase 2 (ACC2) específica de coração fontes e potencial processo de fertilização no Atlântico Sul / Ana Barbosa Marcondes de Mattos. – 2014.
100 f.

Orientador: Aníbal Sanchez Moura.

Coorientador: Érica Patrícia de Souza.

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

1. Metabolismo energético – Teses. 2. Hipertrofia cardíaca. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Obesidade – Teses. 5. Camundongos Knockout. I. Moura, Aníbal Sanchez. II. Souza, Érica Patrícia de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV Título.

CDU 612.3

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

Assinatura

Data

Ana Barbosa Marcondes de Mattos

**Metabolismo energético de animais *knockout* para Acetil-CoA Carboxilase 2 (ACC2)
específica de coração: ACC2 como gene alvo na hipertrofia cardíaca induzida por
obesidade**

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 11 de dezembro de 2014.

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ
Coorientadora: Prof.^a Dra. Érica Patrícia de Souza
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Ângela de Castro Resende
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. Pedro Paulo da Silva Soares
Universidade Federal Fluminense

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

Rio de Janeiro

2014

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento do Departamento de Ciências Fisiológicas do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes na Universidade do Estado do Rio de Janeiro em conjunto com o Laboratório de Metabolismo energético e fisiologia mitocondrial, do Departamento de Anestesiologia da Universidade de Washington, sob a orientação do Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura e Profa. Dra Rong Tian na vigência dos auxílios concebidos pelo Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela fundação Carlos Chagas de amparo à pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Aníbal Sanchez Moura pela oportunidade, orientação e compreensão nos vários momentos de alegria e de dificuldades do período de doutorado.

À Profa. Rong Tian pela oportunidade, orientação e confiança durante o período de estágio sanduíche.

Às Profas. Erickas pela orientação, amizade e apoio.

À Profa. Angela Resende Castro pela atenção e revisão do trabalho

À coordenação da Pós-graduação em Biociências pela oportunidade concedida na realização desse trabalho e as agências CNPq, CAPES e FAPERJ que financiaram esse projeto.

À toda equipe da Coordenação da Pós-graduação em Biociências pela atenção, paciência e ajuda em vários momentos.

A todos os amigos e colegas dos Laboratórios de Fisiologia e Desenvolvimento, Farmacologia e Bioquímica que viveram comigo momentos muito importantes da minha vida pessoal e profissional.

Aos amigos e colegas do Laboratório do Centro de Metabolismo e Mitocôndria da Universidade de Washington.

Aos queridos amigos, em geral, que compreenderam os momentos de ausência.

À minha família que sempre me incentivou e acreditou nos meus sonhos.

À minha querida Vó Judith que me proporcionou conviver ao seu lado por quase três anos.

À Elizabeth Donnici pelo apoio e descobertas que me ajudou a fazer.

A todos que nessa caminhada me apoiaram e me estimularam de alguma forma, muito obrigada.

Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.

Friedrich Nietzsche

RESUMO

MATTOS, Ana Barbosa Marcondes de. **Metabolismo energético de animais *knockout* induzidos para Acetil-CoA Carboxilase 2 (ACC2) específica de coração:** ACC2 como gene alvo na hipertrofia cardíaca induzida por obesidade. 2014. 100 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

O aumento na oxidação de ácidos graxos (AG) e o acúmulo de lipídios são observados em muitas doenças crônicas como, por exemplo, Diabetes e Obesidade e estão fortemente associados à disfunção cardíaca. Neste sentido, o presente estudo foi realizado com o intuito de elucidar mecanismos que caracterizam a troca crônica de substrato energético preferencial em corações de camundongos obesos e determinar as consequências funcionais do aumento na oxidação AG simultaneamente ao desenvolvimento da obesidade. O objetivo foi testar a hipótese de que a deleção induzida da ACC2 no coração de camundongos com obesidade gerada por dieta hiperlipídica facilitaria a entrada de AG de cadeia longa na mitocôndria, levando a um aumento na oxidação de AG, e assim, restaurando o equilíbrio entre o suprimento e oxidação de lipídios no coração. Camundongos *knockout* induzidos para ACC2 no coração foram desenvolvidos para facilitar a entrada de AG de cadeia longa na mitocôndria. Uma dose total de 100mg/Kg de tamoxifeno dividida por 5 dias foi suficiente para deletar a proteína ACC2 e aumentar a oxidação de AG após 4 semanas do início da administração em animais ACC2 F/F-MerCreMer+, sem prejuízo na função cardíaca demonstrada por Ecocardiografia. Após a caracterização do modelo, uma dieta hiperlipídica (HFD) (60% das kcal derivadas da gordura do leite) foi utilizada por 12 semanas aumentando o suprimento de AG para o coração e desenvolvendo um quadro de obesidade, com aumento na massa corporal, conteúdo de tecido adiposo, níveis de AG não esterificados (NEFA) e intolerância à glicose nos animais controles (CONT) e *knockout* induzidos para ACC2 no coração (ICKO). Além disso, a dieta hiperlipídica resultou em um aumento na razão do peso do coração pelo comprimento da tíbia em relação aos animais CONT com dieta controle (CONT+CD), ICKO com dieta controle (ICKO+CD) e ICKO com dieta hiperlipídica (ICKO+HFD), caracterizando o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca nos animais CONT+HFD e um efeito protetor nos animais ICKO+HFD. Esses resultados foram combinados com uma redução nos níveis de mRNA para receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR- α) e para o Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma (PGC-1 α) nos animais CONT+HFD quando comparados ao grupo ICKO+HFD. Como esperado, a dieta hiperlipídica aumentou os níveis de mRNA para proteína desacopladora (UCP3) nos animais CONT e ICKO. Nenhum efeito sobre os níveis de mRNA para *Cluster of Differentiation 36* (CD36), superóxido dismutase (SOD2), *Bcl2-associated X protein* (Bax) ou Peptídeo Natriurético Cerebral (BNP) foi observado. Os níveis de mRNA para ANP estavam reduzidos nos animais CONT+HFD quando comparados aos animais CONT+CD e ICKO+CD. Estes resultados sugerem que um aumento na AG, resultante de uma inativação induzida e específica para ACC2 no coração se contrapõe a uma disponibilidade elevada de AG durante a dieta hiperlipídica, levando a um equilíbrio do metabolismo lipídico e protegendo contra a hipertrofia cardíaca.

Palavras-chave: Obesidade. Hipertrofia cardíaca. Ácidos Graxos. Acetil CoA Carboxilase 2.

ABSTRACT

MATTOS, Ana Barbosa Marcondes de. **Energy metabolism in inducible cardiac-specific Acetyl-CoA Carboxylase 2 (ACC2) knockout animals**: ACC2 as a target gene in Obesity-induced cardiac hypertrophy. 2014. 100 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2014.

Increased fatty acid (FA) oxidation and elevated lipid accumulation has been observed in many chronic diseases such as diabetes and obesity and they are closely associated with cardiac dysfunction. This study was undertaken to elucidate the mechanisms underlying the chronic substrate switch in obese adult hearts and to determine the functional consequences of increasing FA oxidation simultaneously with the development of obesity. We sought to test whether inducible cardiac-specific deletion of ACC2 in mice with diet induced obesity would facilitate long chain fatty acid (FA) entry into the mitochondria, leading to an increase in FA oxidation and ultimately restoring the balance between lipid supply and oxidation in the heart. Inducible cardiac-specific ACC2 knockout mice (ICKO) were used to facilitate long chain FA entry into the mitochondria. A high-fat diet was used to increase FA supply to the heart and to develop obesity in these mice. A total dose of 100mg/Kg of tamoxifen for 5 days was enough to delete ACC2 protein and to increase FA oxidation 4 weeks after the start of tamoxifen protocol in ACC2 F/F-MerCreMer⁺ without impairing the cardiac function as shown by Echocardiography measurements. Once the animal model was established, a high-fat diet (HFD) (60% das kcal derived by milk fat) was given for 12 weeks to increase AG supply to the heart developing a state of obesity with increased body weight, adipose tissue content, non sterified fatty acids levels (NEFA) and glucose intolerance in control (CONT) and inducible cardiac specific knockout mice for ACC2 (ICKO). Moreover, a high-fat diet resulted in increased heart weight to tibia length ratio in CONT mice when compared to CONT and ICKO mice fed with a control diet and ICKO in the same high-fat diet protocol, characterizing the development of cardiac hypertrophy in CONT+HFD and a protective effect in ICKO+HFD mice. These data were followed by a reduction in mRNA levels for PPAR- α and PGC-1 α in CONT+HFD animals when compared with ICKO+HFD. As expected, a high-fat diet increased mRNA levels for UCP3 in CONT e ICKO mice. No effect was observed for mRNA levels of CD36, SOD2, Bax and BNP. Differently, ANP mRNA levels were reduced in CONT+HFD when compared to CONT+CD. These data suggest that an increase in FA oxidation, resulting from ACC2 an inducible inactivation counteracted the elevated FA availability during HFD resulting in a balanced lipid metabolism and protect against cardiac hypertrophy.

Key Words: Obesity. Cardiac Hypertrophy. Fatty acids. Acetyl CoA Carboxylase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação das vias clássicas de metabolismo cardíaco	21
Figura 2 –	Representação da via de metabolismo de glicose no coração	23
Figura 3 –	Representação da via de metabolismo de ácidos graxos no coração	26
Figura 4 –	Estrutura do gene ACC2	35
Figura 5 –	Esquema de acasalamento para gerar o modelo animal <i>knockout</i> condicional específico para ACC2 no coração	37
Figura 6 –	Deleção da ACC2 como um meio de aumentar a oxidação de ácidos graxos	38
Figura 7 –	Desenho experimental do modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica com deleção induzida para ACC2 específica no coração de camundongos	39
Figura 8 –	Teste de tolerância à glicose.	41
Figura 9 –	Ecocardiografia Transtorácica em camundongo	43
Figura 10 –	Aparelho de perfusão de coração isolado Langendorff	44
Figura 11 –	Preparação do balão introduzido no ventrículo esquerdo	45
Figura 12 –	Protocolo de Perfusão do coração	45
Figura 13 –	Preparação da Solução com ácidos graxos marcados e não marcados ..	46
Figura 14 –	Preparação do extrato de tecido cardíaco para análise da oxidação de substrato por espectroscopia ^{13}C de ressonância magnética nuclear	47
Figura 15 –	Esquema de utilização de substratos marcados ^{13}C para o uso em espectroscopia e análise isotopométrica de ressonância magnética nuclear ^{13}C NMR	48
Figura 16 –	Utilização de substrato em corações de animais <i>knockout</i> induzidos para ACC2 no coração e controles	48
Figura 17 –	Western Blot da proteína ACC2 no coração de camundongos controles, <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e knockout para ACC2 desde o início da vida	51
Figura 18 –	Contribuição relativa de substratos para Acetil-CoA em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles	54

Figura 19 –	Peso corporal de camundongos knockout induzidos para ACC2 específica do coração e controles durante o período de 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	56
Figura 20 –	Tecido adiposo epididimal de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	57
Figura 21 –	Tecido adiposo retroperitoneal de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	57
Figura 22 –	Teste de tolerância à glicose em camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	59
Figura 23 –	Concentração de ácidos graxos não esterificados de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	60
Figura 24 –	Razão massa do coração pelo comprimento da tíbia de corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	61
Figura 25 –	Contribuição relativa de ácidos graxos para Acetil-coA em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	64
Figura 26 –	Contribuição relativa de glicose para Acetil-coA em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	
Figura 27 –	Contribuição relativa de substratos não marcados para Acetil-coA em camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	65
Figura 28 –	Expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, biogênese e função mitocondrial, em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	66
		67

Figura 29 –	Expressão gênica da enzima antioxidante SOD em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	69
Figura 30 –	Expressão gênica do gene pró-apoptótico BAX em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	69
Figura 31 –	Expressão gênica de genes relacionados com hipertrofia cardíaca em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Composição nutricional das dietas	40
Tabela 2 –	Função cardíaca <i>in vivo</i> de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos à administração de 20mg/kg/dia de tamoxifeno por 5 dias	52
Tabela 3 –	Função Cardíaca <i>ex vivo</i> de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos à administração de 20mg/kg/dia de tamoxifeno por 5 dias	54
Tabela 4 –	Função cardíaca <i>in vivo</i> de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	62
Tabela 5 -	Função cardíaca <i>ex vivo</i> de corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACC2	Acetil CoA Carboxilase 2
ACS	Acil-CoA sinthetase
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína kinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ATP	Adenosina trifosfato
BAX	<i>Bcl2-associated X protein</i>
BCA	<i>Abicinchoninic acid assay</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BNP	Peptídeo Natriurético Cerebral
CD36	<i>Cluster of Differentiation 36</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CPT1	Carnitina-Palmitoil Transferases I
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra- acético
EF	Fração de ejeção
ER	Receptor estrógeno
ERR α	Receptor alfa relacionado com receptor nuclear (ERR α)
FABPpm	Proteína de ligação da membrana plasmática
FAD	Dinucleotído de flavina e adenina
FATP	Proteína de transportadora de ácido graxo
FIDS	Quedas de indução livre
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FS	Fração de encurtamento
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLUT	Transportador de glicose
GTP	Guanosina trifosfato
GTT	Teste de tolerância à glicose
IRS1	Substrato do receptor de insulina 1

LPL	Lipoproteína lipase
LV Vol;d	Volume do ventrículo esquerdo durante a diástole
LV Vol;s	Volume do ventrículo esquerdo durante a sístole
LVAW;d	Parede do ventrículo esquerdo durante a diástole
LVAW;s	Parede anterior do ventrículo esquerdo durante a sístole
LVDEVP	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
LVID;d	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo durante a diástole
LVID;s	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo durante a sístole
LVPW;d	Parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole
LVPW;s	Parede posterior do ventrículo esquerdo durante a sístole
MCD	Malonil-CoA descarboxilase
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida adenina
NEFA	Ácidos graxos não esterificados
NMR	Ressonância magnética nuclear
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> reação em cadeia da polymerase
PDH	Piruvato desidrogenase
PDK4	Piruvato desidrogenase kinase-4
PFK	Fosfofrutoquinase
PFK1	Fosfofrutoquinase 1
PGC1a	Co-ativador-1 alfa do receptor ativado por proliferador do peroxissoma
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PPAR-a	Receptor ativado por proliferadores de peroxisoma alfa
PPARs	Receptor ativado por proliferadores de peroxisoma
PPREs	Elementos específicos de resposta (PPREs) localizados dentro de regiões promotoras
PUFA	Ácidos graxos polinsaturados
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPP	Duplo produto
RXR	Receptores retinóicos X
SFA	Ácidos graxos saturados

SOD2	Superóxido dismutase
SREBP1	Proteína 1 ligadora do elemento regulado por esteróis
TCA	Ciclo tricarboxílico
UCPs	Proteínas desacopladoras
VE	Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	34
1.1	Geral	34
1.2	Específicos	34
2	MATERIAL E MÉTODOS	35
2.1	Modelo animal knockout condicional específico para ACC2 no coração	35
2.2	Genotipagem	38
2.3	Modelo de obesidade induzida por Dieta Hiperlipídica	39
2.4	Massa Corporal	40
2.5	Massa de tecido adiposo	40
2.6	Teste de tolerância à glicose	41
2.7	Coleta de sangue	41
2.8	Massa do coração e razão massa coração/ comprimento da tíbia	42
2.9	Ecocardiografia transtorácica	42
2.10	Técnica de Perfusão de Coração Isolado Langendorff	43
2.11	Técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C	46
2.12	Técnica de quantificação de proteínas Western Blot	49
2.13	PCR quantitativo em tempo real	49
2.14	Análises estatísticas	50
3	RESULTADOS	51
3.1	Modelo de camundongo <i>knockout</i> induzido para ACC2 específica do coração	51
3.2	Função cardíaca <i>in vivo</i> de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração	52
3.3	Função cardíaca <i>ex vivo</i> em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração	53
3.4	Obesidade induzida por dieta hiperlipídica	54
3.5	Utilização de substratos energéticos em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração.....	55
3.6	Perfil metabólico de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2	

	específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica.....	58
3.7	Razão peso do coração pelo comprimento da tíbia do coração de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica.....	60
3.8	Função cardíaca <i>in vivo</i> de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica.....	61
3.9	Função Cardíaca <i>ex vivo</i> de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica.....	62
3.10	Utilização de substratos energéticos em corações de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica.....	63
3.11	Remodelamento metabólico a nível molecular de camundongos <i>knockout</i> induzidos para ACC2 específica do coração submetido à dieta hiperlipídica	66
4	DISCUSSÃO	71
	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o mundo tem enfrentado um grave problema de saúde pública com o elevado número de casos de obesidade e sobrepeso (de Andrade, Pereira e Sichieri, 2010; Finucane et al., 2011; Marra, dos Santos Barbosa e Sichieri, 2011). A obesidade é uma doença multi-sistêmica, caracterizada pelo excesso de massa corporal gorda em relação à massa magra, com consequências adversas importantes que reduzem significativamente a qualidade e expectativa de vida do indivíduo (Zheng, Tumin e Qian, 2013). Está relacionada às doenças metabólicas em geral, com especial importância no aumento do risco de desenvolvimento de diabetes e doenças cardiovasculares (Alpert, 2001; Eckel, Grundy e Zimmet., 2005; Murphy et al., 2006).

Em termos gerais, o ganho de massa corporal se dá em função de um desequilíbrio energético, com um excesso de energia, não compensado por um aumento no gasto calórico (balanço energético positivo) (Martinez, 2000; Webber, 2003; Nobre e Monteiro, 2003). Esse desequilíbrio pode ser ocasionado por fatores endógenos e/ou exógenos, sendo este último de grande interesse para a população visto que representa a causa da maior parte dos casos de obesidade, e seu crescimento se deve principalmente por mudanças de hábitos alimentares e de atividade física (Popkin, Gordan-Larsen, 2004).

A obesidade é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma epidemia global presente em países desenvolvidos e em desenvolvimento, que passaram ou estão passando pelo chamado processo de inversão epidemiológica. Esse processo se caracteriza pela superação das doenças infecto-contagiosas pelas doenças crônico-degenerativas, na qual a obesidade e doenças relacionadas estão inseridas (Popkin e Gordon-Larsen, 2004). Transformações significativas têm ocorrido nos padrões dietéticos e nutricionais das populações com uma transição nutricional definida por reduções na prevalência de desnutrição e maior ocorrência de sobrepeso e obesidade (Sichieri e Allan, 1996; Popkin, 2003; Ono, Guthold e Strong, 2005; de Bem Lignani et al., 2011). Os estudos epidemiológicos justificam o aumento na incidência da obesidade pelo rápido crescimento econômico das últimas décadas, com uma troca na força de trabalho baseada na agricultura para indústria e tecnologia, maior disponibilidade de alimentos, principalmente industrializados, redução do gasto calórico e aumento da ingestão de gordura e açúcar (Fogel e Costa, 1997; Nielsen, Siega-Riz, Popkin, 2002; Sichieri, 2002; Drewnowski e Specter, 2004; Sichieri et al., 2012; Pereira et al., 2014). O aumento da ingestão calórica pode ser

decorrente da quantidade de alimentos ingeridos ou de modificações de sua qualidade (Bray et al., 2002; Moussavi, Gavino e Receveur, 2008), resultando em um balanço energético positivo caracterizado pelo ganho de massa corporal gorda.

O efeito do aumento significativo de massa corporal gorda sobre a mortalidade é evidente em diferentes países, com culturas e níveis sócio-econômicos distintos. Nos Estados Unidos, país onde o problema se mostrou inicialmente mais alarmante, diferentes estudos foram realizados confirmando que as taxas mais baixas de morte estavam entre os indivíduos com menor índice de massa corporal. Enquanto que as taxas de mortalidade para doenças cardiovasculares estão substancialmente mais elevadas entre as pessoas com maior índice de massa corporal e obesidade abdominal (Olshansky et al., 2005; Reither, Hauser e Yang, 2009; Abdullah, Wolfe e Stoelwinder et al., 2011; Masters, Power e Link, 2013). Dados recentes da *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) de 2009–2010 mostram que mais de um terço dos adultos e quase 17% das crianças e adolescentes nos Estados Unidos são obesos. Essas informações, juntamente com estudos anteriores, levaram a uma corrida global para intervenções eficazes no combate da obesidade. No entanto, apesar dos esforços, o problema continua a crescer mesmo em populações que ainda apresentam problemas de déficit nutricional (Raymond, Leeder e Greenberg, 2006; Prentice 2006; Kelishadi, 2007; Andrade, Pereira e Sichirei, 2010; Ono, Guthold e Strong, 2010; Misra, Singhal e Khurana, 2010; Schmidt, et al., 2011; Capewell e Buchan, 2012; Popkin, Adair e Ng, 2012; Levy et al., 2012; Lins et al., 2013). É importante salientar que, tanto em países desenvolvidos e em desenvolvimento como o Brasil, o crescimento da obesidade parece ser mais expressivo entre indivíduos com menor renda familiar (Monteiro et al., 2004a, 2004b; Mendez, Monteiro Popkin, 2005; Barroso, Sichieri e Salles-Costa, 2012; Pan et al., 2013; Hernandez e Pressler, 2014; Dos Santos Barroso, 2014).

No Brasil, dados do Ministério da Saúde, obtidos através do sistema Vigitel (Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico), mostram que quase metade da população está acima do peso no Brasil. De acordo com esse estudo, o percentual de pessoas com sobrepeso aumentou de 42,7% em 2006 para 48,5% em 2011, enquanto que a taxa de obesidade aumentou de 11,4% para 15,8% no mesmo período. As taxas mais altas para sobrepeso foram observadas em homens de 15 a 45 anos (63%) e mulheres de 45 a 54 anos (55,9%). Enquanto que na faixa etária de 18 a 24 anos, 30% dos homens e 25% das mulheres estavam com sobrepeso.

O problema é extenso e vem crescendo em proporções importantes, alcançando as populações de crianças (Kelishadi, 2007) e adolescentes (Reilly et al., 2003; Kelishadi, 2007).

Neste sentido, estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais demonstram que uma maior disponibilidade de alimento no início da vida determina o desenvolvimento da obesidade (Moura, Sa e Costa, 2002; Lanigan e Singal, 2009; de Souza Rodrigues Cunha et al., 2009; Soares et al., 2012), com consequências adversas na fisiologia do coração (Plagemann et al., 1992; Dietz, 1998; Reilly et al., 2003; Pereira et al., 2006; Martins et al., 2008; Moreira et al., 2009).

A obesidade aumenta o risco para eventos cardíacos em diferentes formas, podendo ser mediada indiretamente através dos fatores de risco associados com a síndrome metabólica (Grundey, 2004). Neste sentido, o tecido adiposo uma vez expandido exige um maior débito cardíaco para suprir o aumento da área do tecido adiposo (Summers et al., 1996). Isso só é alcançado através do aumento no volume de ejeção do coração que, por sua vez, leva a uma dilatação da câmara ventricular esquerda que acomoda o retorno venoso aumentado (Vasan, 2003). Inicialmente há o desenvolvimento de uma hipertrofia excêntrica para que se mantenha o estresse normal da parede. Em longo prazo, esta sobrecarga contínua pode levar a uma hipertrofia cardíaca concêntrica associada a uma disfunção cardíaca (Woodiwiss et al., 2008). Por outro lado, a obesidade pode também causar efeitos diretos no coração com aumento no conteúdo de lipídios no miocárdio, caracterizando a condição de cardiomiopatia lipotóxica (Lopaschuk, Folmes e Stanly, 2007). Além disso, as células adiposas podem secretar moléculas ativas, como as adipocitocinas, que indiretamente levam a efeitos prejudiciais nas células do miocárdio (Turer et al., 2012; Park et al., 2012; Mattu e Randeva, 2013). Em ambos os casos, o acúmulo de lipídios em células não adiposas, como no caso o cardiomiócito, pode diretamente causar lipotoxicidade e disfunção celular, contribuindo para um quadro de hipertrofia cardíaca não relacionada com hipertensão e podendo posteriormente progredir para a insuficiência cardíaca.

A importância do problema pode ser confirmada por um estudo que acompanhou 5881 participantes, com idade média de 55 anos, por 14 anos, dos quais 496 desenvolveram insuficiência cardíaca (*Framingham Heart Study*). O risco de desenvolver insuficiência cardíaca foi de 5% para homens e 7% para mulheres para cada aumento de 1kg/m^2 no índice massa corporal (IMC). A razão hazard foi de 2,12 em mulheres (95% CI, 1.51-2.97) e 1,9 em homens (95% CI, 1.3-0.79) que eram obesos (Kenchiah et al., 2002). No entanto, os mecanismos para esses desarranjos metabólicos observados na obesidade, fortemente ligados ao desenvolvimento de hipertrofia e insuficiência cardíaca, ainda são pouco conhecidos.

Metabolismo energético do coração

O coração é um órgão dinâmico que funciona como uma bomba ininterrupta enviando sangue oxigenado para todos os órgãos e tecidos do organismo. Possui uma demanda energética que oscila no decorrer de um dia e precisa a todo o instante ser suprida pelo fornecimento energético à célula cardíaca. Nesse caso, o fluxo de substratos energéticos precisa ser contínuo, uma vez que o coração possui uma capacidade limitada para armazenamento de ácidos graxos e glicose (Huss e Kelly, 2004). Para isso, as células cardíacas possuem mecanismos sofisticados de sensibilização, transferência e utilização de energia que se adaptam as diferentes necessidades do organismo. Em condições normais ou patológicas, o metabolismo energético do coração utiliza-se deste sistema numa tentativa de manter o ajuste entre produção e consumo de energia, a fim de evitar um desequilíbrio energético do miocárdio (Lopachusk et al., 1994; Stanley, 1997; Taegtmeyer, 2000; Ashrafian et al., 2003; Ingwall e Weiss, 2004; Ventura-Clapier, Garnier e Veksler, 2004).

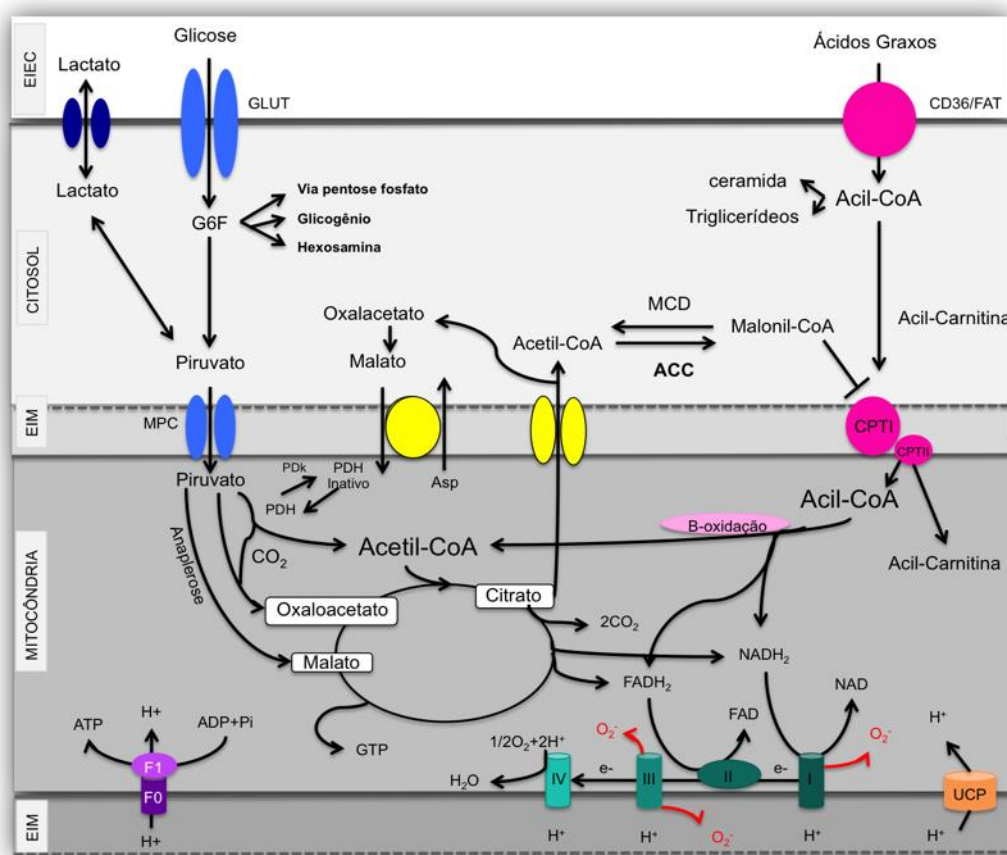
O miocárdio pode utilizar uma série de substratos energéticos, incluindo ácidos graxos, carboidratos, aminoácidos e cetonas. No entanto, tem como substrato preferencial os ácidos graxos (Opie, 1968). Estes substratos são metabolizados a dióxido de carbono (CO_2) e água, gerando, ao final, a moeda metabólica central de trifosfato de adenosina (ATP). Neste processo ocorre a transferência contínua de energia de uma molécula para outra sem que haja uma grande perda de energia em forma de calor (Lodish et al., 2000). E desta forma, o coração consegue manter uma contração rítmica constante com o ATP sendo gerado e consumido continuamente.

O ATP possui ligações de alta energia que uma vez hidrolizadas geram uma grande variação negativa de energia livre. É através do rompimento destas ligações que o ATP é convertido a adenosina difosfato (ADP) ou adenosina monofosfato (AMP), liberando, assim, a energia necessária para as reações dependentes de energia. A maior parte da energia metabólica é suprida por reações de oxidação-redução (redox) localizadas no interior da mitocôndria. Porém, dependendo do substrato, o processo de metabolização se inicia no citoplasma através da via glicolítica. Nesse caso, a glicose e o lactato são convertidos a piruvato para que então sejam oxidados no interior da mitocôndria (Ingwall, 2002).

As mitocôndrias são essenciais para o metabolismo aeróbio e têm como principal função oxidar combustíveis metabólicos e conservar energia livre sintetizando ATP. O processo consiste em transportar os combustíveis, principalmente piruvato e ácidos graxos,

para o interior da matriz mitocondrial onde serão oxidados para gerar o CO_2 e as coenzimas de nucleotídeos reduzidos NADH e FADH_2 (Figura 1). Para que isso ocorra, o metabolismo energético cardíaco envolve 3 estágios de reações catabólicas: o processo de formação de acetil-CoA do metabolismo de substrato (glicose, ácidos graxos e lactato); oxidação do grupo acetil no ciclo subsequente de ácido tricarboxílico (TCA); e forforilação oxidativa mitocondrial (Carley, Taegtmeyer, Lewandowski, 2014).

Figura 1 - Representação das vias clássicas de metabolismo cardíaco



Legenda: ACC indica acetil-CoA carboxilase; CPT, carnitina palmitoiltransferase; FAT, transportador de ácidos graxos; G-6-F, glicose 6-fosfato; GLUT, transportador de glicose; EIM, espaço intermembrana mitocondrial; EEC, espaço extracelular; MCD, malonil-CoA decarboxilase; MPC, carreador mitocondrial de piruvato; PDH, piruvato desidrogenase; e PDK, piruvato desidrogenase quinase.

Nota: Os substratos são transportados através da membrana extracelular para dentro do citosol e são metabolizados em diferentes vias. Para oxidação, os metabólitos intermediários (piruvato ou acil-coenzima A (CoA)) são transportados através da membrana mitocondrial interna por transportadores de membrana específicos. Uma vez dentro da mitocôndria, os substratos são oxidados (β -oxidação) ou carboxilados (anaplerose) e transferidos para dentro do ciclo de krebs para geração de equivalentes reduzidos (NADH_2 ; FADH) e GTP. Os equivalentes reduzidos são usados pela cadeia transportadora de elétrons para gerar gradiente de prótons, que é usado para a produção de ATP.

Fonte: adaptado de Doenst et al., 2013.

Formação de Acetil-CoA através do metabolismo de glicose

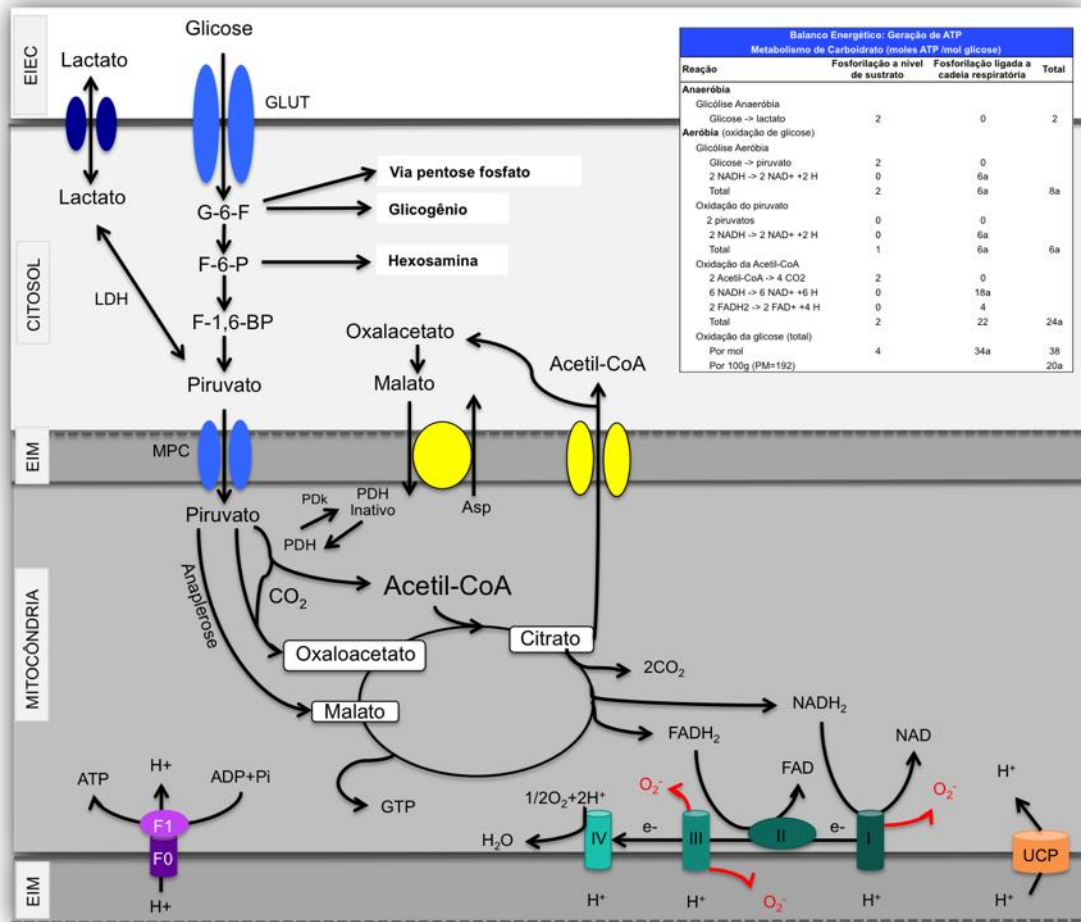
O metabolismo de glicose no coração é regulado através de várias etapas, incluindo a captação, glicólise, e descarboxilação do piruvato. A captação de glicose via difusão facilitada, depende do gradiente de glicose transmembrana e do conteúdo de transportadores especializados no transporte de glicose para o interior da célula, os transportadores sarcolemas de glicose (GLUT1 e GLUT4) (James, 1989; Bell et al., 1990). O GLUT1 tem como característica não depender da insulina para realização de sua atividade, representando, desta forma, a captação de glicose basal. Em contra partida, o GLUT4, é o transportador dominante de glicose, no coração adulto, e requer a presença de insulina para que ocorra a translocação do compartimento intracelular para a membrana sarcolemal (Zorzano et al., 1997; Abel, 2004).

Para que essa translocação ocorra, a insulina estimula uma cascata de reações bioquímicas que consiste nas vias de sinalização da glicose. A insulina, ao se ligar ao seu receptor, ativa uma cascata de fosforilações proteicas $IRS1 > PI3K > AKT$, respectivamente, até que o GLUT4 receba este estímulo e ocorra a sua translocação para a membrana da célula (Russell et al., 1998). A glicose uma vez no interior do cardiomiócito é quebrada através da glicólise, que constitui uma sequência de reações químicas tendo como produto final o piruvato. Inicialmente, a glicose é fosforilada pela enzima hexoquinase formando-se a glicose-6-fosfato, que passa então por uma isomerização e forma a frutose-6-fosfato (Figura 2). A frutose-6-fosfato é fosforilada, produzindo frutose-1,6-bisfosfato através da fosfofrutoquinase (PFK1), consistindo, assim, uma etapa limitante no controle da via glicolítica (Depre, Rider e Hude, 1998). A PFK1 pode ser inibida por pH baixo, altas concentrações de citrato intracelular, ou ATP e ativada por ADP, AMP, fosfato e fructose 2,6 bifosfato (Kammermeies et al., 1982, Tian and Igwall, 1996). Em resumo, a via glicolítica converte glucose-6-fosfato e NAD^+ em piruvato e $NADH^+$ e gera 2 ATP por molécula de glucose. O NADH e o piruvato formados na glicólise são transportados para dentro da matriz mitocondrial para produzir CO_2 e NAD^+ e completar o processo de glicólise oxidativa aeróbia ou convertido a lactato e NAD^+ no citosol (glicólise não oxidativa) (Stanley, Recchia and Lopaschuk, 2005).

Após a glicólise, o piruvato gerado pode ser carboxilado a oxaloacetato e malato, reduzido a lactato, ou descarboxilado a acetil-CoA. Este último sendo o destino mais importante do piruvato, onde é transportado para mitocôndria e descarboxilado a acetil-CoA

através do complexo enzimático piruvato desidrogenase (PDH) (Patell e Roche 1990). A acetil-CoA então entra no ciclo de ácido tricarboxílico e é eventualmente quebrada em água e CO_2 para a geração de ATP (Stanley, Recchia and Lopaschuk, 2005).

Figura 2 - Representação da via de metabolismo de glicose no coração



Legenda: G-6-F, glicose 6-fosfato; F-6-F, frutose 6-fosfato; F-1,6-BF, frutose 1,6 bifosfato; GLUT, transportador de glicose; EIM, espaço intermembrana mitocondrial; EEC, espaço extracelular; MPC, carreador mitocondrial de piruvato; PDH, piruvato desidrogenase; e PDK, piruvato desidrogenase quinase.

Fonte: adaptado de Doenst et al., 2013.

Formação de Acetil-CoA através do metabolismo dos ácidos graxos

A maior parte da Acetil-CoA gerada em um coração bem perfundido, vem da β -oxidação de ácidos graxos seguida da oxidação de piruvato derivado da glicólise e oxidação

de lactato (Wisneski et al., 1985; Gertz et al., 1988; Stanley, Lopaschuk e McCormack, 1997). Os ácidos graxos uma vez na circulação estão sob a forma de ácidos graxos ligados a albumina e lipoproteínas ricas em triglicerídeos e quilomicrons (Van der Vusse, Van Bilsen, Glatz, 2000). Para a liberação dos ácidos graxos, as lipoproteínas precisam ser hidrolisadas em sítios de ligação na superfície luminal e células coronárias endoteliais através da enzima lipoproteína lipase produzida nos cardiomiócitos (Augustus et al., 2006; Dallinga-Thie et al., 2010).

Os ácidos graxos, uma vez liberados, precisam, em sua maior parte, ser transportados para dentro da célula através de transportadores de ácidos graxos que se encontram na superfície celular (Su e Abumrad, 2009; Goldberg, Eckel, Abumrad, 2009). Os três tipos conhecidos de transportadores de ácidos graxos são: *Cluster of Differentiation 36* (CD36), proteína transportadora de AG (FATP), e proteína de ligação da membrana plasmática (FABPpm) (Luiken et al., 1999). No entanto, no coração o mais predominante e conhecido em termos de função é o transportador CD36. Sua habilidade em translocar entre endossomos intracelulares e a membrana plasmática das células faz com que tenha uma função importante na captação de ácidos graxos nas células musculares cardíacas. O mecanismo exato que induz a translocação de CD36/FAT ainda é pouco conhecido. No entanto, sugere-se que a ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK) e o status energético da célula, estimulação da proteína quinase C (PKC) e o cálcio podem ter funções importantes neste processo de translocação (Holloway et al., 2008).

Uma vez dentro da célula, os ácidos graxos precisam ser esterificados em acil-CoA para serem transferidos para a oxidação no interior da mitocôndria ou para síntese intracelular de triglicerídeos (Figura 3). Esse processo é catalisado pela enzima acil-CoA sintase (Schaffer, 2002; Ellis et al., 2011). Cerca de 70-90% dos ácidos graxos esterificados, que entram no cardiomiócito, em condições normais, são oxidados para geração de ATP, enquanto que 10-30% são convertidos em triglicerídeos (Stanley, Recchia e Lopaschuk, 2005).

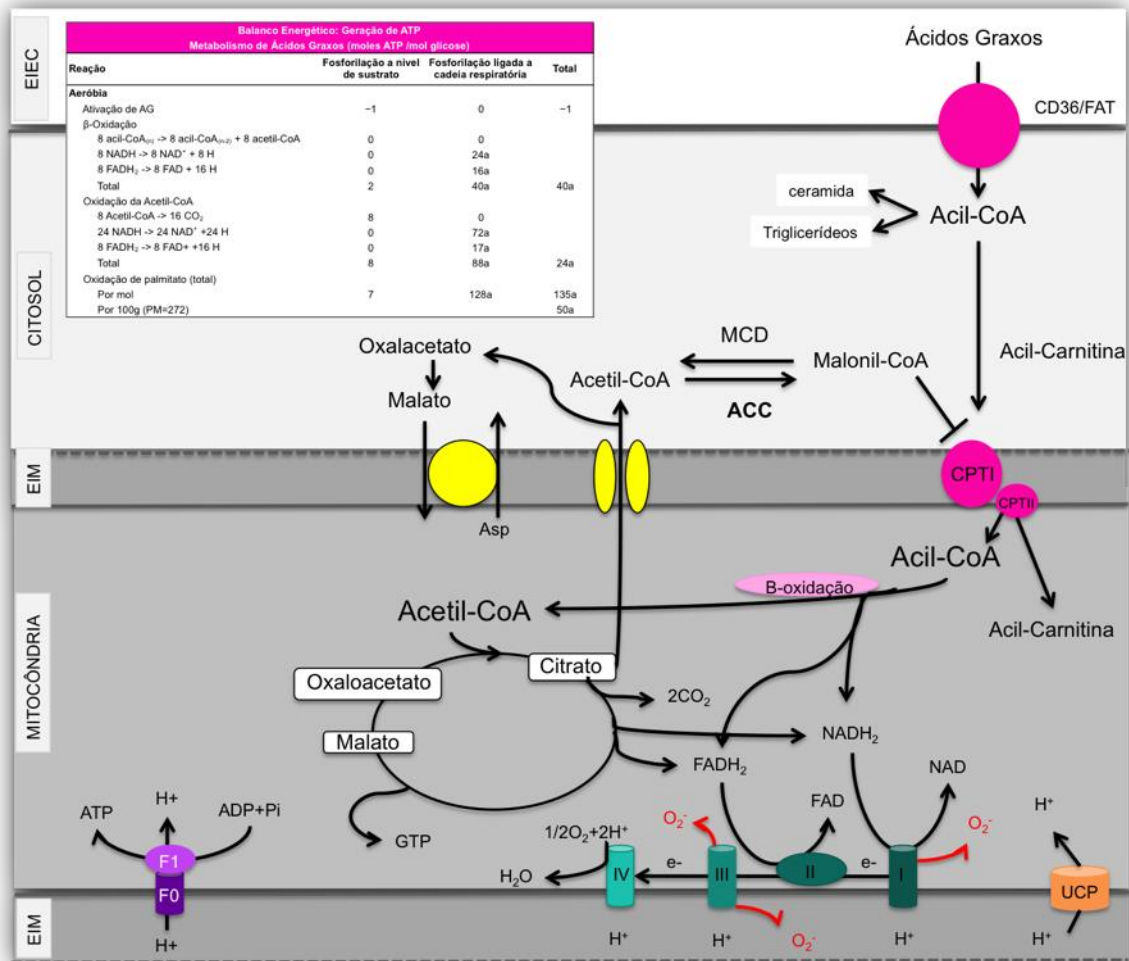
Os ácidos graxos de cadeia longa só podem ser transportados para dentro da mitocôndria na forma de acil-carnitina. Para isso a célula conta com um sistema de transferência para atravessar a membrana mitocondrial interna até a matriz mitocondrial através da enzima Carnitina Palmitoiltransferase I (CPT1). A CPT1 catalisa a transferência do grupo Acil da Coenzima A para carnitina para formar a palmitoilcarnitina. A aciltranslocase, então transporta a Acil Carnitina através da membrana mitocondrial interna, onde é novamente convertida em carnitina livre. Finalmente, a carnitina formada é transferida de volta para dentro do citosol para completar o ciclo e a Acil-CoA formada está pronta para β -

oxidação gerar acetil-CoA dentro da mitocôndria (Kerner e Hoppel, 2000).

A atividade da CPT-1 é regulada *in vivo* pelos níveis de malonil-CoA, que têm como papel inibir sua atividade. A malonil-CoA é produzida por carboxilação da acetil-CoA pela Acetil-CoA carboxilase (ACC) (Ruderman et al., 1999). No coração e músculo esquelético a isoforma da ACC predominante é a ACC2, enquanto que ACC1 é mais expressa no fígado e tecido adiposo. A ACC2 está associada à mitocôndria, provavelmente na parte externa da membrana (Abu-Elheiga et al., 2003) e pode ser regulada por dieta, hormônios e outros sinais metabólicos, como por exemplo, a AMPK. Enquanto que a degradação do malonil-CoA é regulada pela atividade da malonil-CoA descarboxilase (MCD), que converte malonil-CoA de volta a acetil-CoA e CO₂ no citosol e mitocôndria (Dyck et al., 2004; Hamilton e Saggerson, 2000; Saha et al., 2000). Nesse caso, uma redução dos níveis de malonil-CoA, através de uma inativação da ACC2 leva a uma liberação da CPT1, facilitando, assim, a entrada dos ácidos graxos de cadeia longa para a mitocôndria (Abu-Elheiga et al., 2007; Choi et al., 2007; Olson et al., 2010; Kolwicz et al., 2012;).

No interior da mitocôndria, ocorre a β -oxidação dos ácidos graxos em um processo de reações em sequência, que a cada ciclo libera 1 NADH, 1 FADH₂, e 1 acetil-CoA através do encurtamento de 2 carbonos da acil-CoA. O acil-CoA encurtado entra novamente na próxima volta da β -oxidação até que o acil-CoA seja totalmente convertido em Acetil-CoA. Esse processo é composto por 4 reações, com enzimas específicas para cada passo. O primeiro passo é catalizado pela desidrogenase acil-CoA, seguida pela 2-enoil-CoA hidratase, e então 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase. O passo final é catalizado pela 3-ketoacil-CoA tiolase, que regenera acil-CoA para outra volta de β -oxidação e libera acetil-CoA para o ciclo do ácido cítrico. A repetição do ciclo permite a conversão total de um ácido graxo de cadeia longa para acetil-CoA (Bartlett e Eaton, 2004; Houten e Wanders, 2010).

Figura 3 - Representação da via de metabolismo de ácidos graxos no coração



Legenda: ACC indica acetil-CoA carboxilase; CPT, carnitina palmitoiltransferase; CD36/FAT, transportador de ácidos graxos; EIM, espaço intermembrana mitocondrial; EEC, espaço extracelular; MCD, malonil-CoA descarboxilase.

Fonte: adaptado de Doenst et al., 2013.

O Ciclo de Ácido Tricarboxílico

Após a formação de acetil-CoA derivada do catabolismo de glicose ou ácidos graxos, o próximo passo consiste na oxidação do grupo acetil no ciclo de ácido tricarboxílico. A oxidação do grupo acetil da acetil-CoA para CO₂ é acompanhada da produção de equivalentes reduzidos, NADH e FADH₂, que podem ser re-oxidados na cadeia transportadora de elétrons e acoplados a síntese de ATP (Figura 1). Em cada ciclo de ácido tricarboxílico, o grupo acetil da acetil-CoA combina-se com oxaloacetato para gerar um citrato de 6 carbonos. Após isomerização, o isocitrato resultante é oxidado e descarboxilado a succinil-CoA. Depois de

duas etapas de oxidação e uma de hidratação, através dos intermediários de succinato, fumarato e malato, o succinil-CoA é novamente convertido a oxaloacetato para a próxima volta do ciclo. Ao final de uma volta, um grupo acetil gera 2CO_2 , 3 NADH, 1 FADH_2 e um grupo fosfato de alta energia como trifosfato de guanosina (GTP). Através da transferência da ligação de alta energia do GTP para ADP, um ATP é gerado (Opie, 1968). E, desta forma todo NADH e FADH_2 gerado é usado dentro da cadeia respiratória para a produção de mais ATP através da fosforilação oxidativa.

Fosforilação Oxidativa Mitocondrial

A fosforilação oxidativa é uma via que incorpora a transferência de elétrons de doadores de elétrons, tais como NADH e FADH_2 , a receptores de elétrons, como no caso o oxigênio, através de uma série de reações de óxido-reduções coletivamente denominadas Cadeia Transportadora de Elétrons (Figura 1). A energia liberada na cadeia transportadora de elétrons é usada para bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana para criar um gradiente de prótons e um potencial elétrico na membrana mitocondrial interna. Essa energia armazenada permite que os prótons exportados passem de volta para a matriz mitocondrial via ATP sintase, que transfere ADP para ATP em uma reação de fosforilação (Saraste, 1999).

O sistema de transporte de elétrons completo está localizado na membrana mitocondrial interna e consiste de vários complexos proteicos. Os elétrons são dirigidos na cadeia de transporte de elétrons por várias flavoproteínas. Destas, quatro são as espécies principais, incluindo o complexo I, que contém mononucleotídeo de flavina (FMN) e três que incluem flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Todas estas vias reduzem a pequena e lipofílica molécula de ubiquinona (Q ou coenzima Q10), no início da via comum de transporte de elétrons, consistindo de Q, complexo III, citocromo c e complexo IV. Os prótons são bombeados da matriz para dentro do espaço intermembrana pelos complexos I, III e IV. O oxigênio (O_2) receptor final de elétrons no final da cadeia é reduzido em duas moléculas de água pela transferência de quatro elétrons a partir do complexo IV. A eficiência da fosforilação oxidativa é medida dividindo-se a quantidade de fosfato incorporado ao ADP pela quantidade de oxigênio atômico reduzido. Um átomo de oxigênio é reduzido por dois elétrons. Para cada par de elétrons transportados através dos complexos I, III e IV, um número

suficiente de prótons é bombeado por cada complexo para a síntese de aproximadamente uma molécula de ATP (Baynes e Dominiczak, 2011). E assim, a oxidação dos substratos energéticos e uso de oxigênio (oxidação/respiração) estão acoplados para a síntese de ATP (fosforilação).

Durante todo esse processo de produção de ATP via fosforilação oxidativa há também a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando NAD e FADH₂ reagem com o oxigênio. Essas espécies reativas de oxigênio são constantemente geradas no citosol e mitocôndria das células cardíacas durante processos fisiológicos, e em níveis baixos possuem papel importante em vias de sinalização intracelular. No entanto, quando as EROs são produzidas em excesso podem desencadear o estresse oxidativo (Seddon, Looi e Shah, 2007). O estresse oxidativo é caracterizado por um desequilíbrio entre defesas antioxidantes e a produção de EROs, podendo causar danos celulares importantes que contribuem para o desencadeamento da cardiomiopatia diabética (Lorenzo et al., 2013).

O excesso de EROs pode afetar o DNA mitocondrial, mediar a abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) através da peroxidação da membrana lipídica, estimulando uma maior permeabilidade da membrana interna, liberação de cálcio, e depleção de ATP (Hori e Nishida, 2009; Anderson et al., 2009). Para conter a produção demasiada de EROs o coração conta também com um sistema de desacoplamento mitocondrial, através das proteínas desacopladoras UCPs. Estas proteínas permitem a redução do gradiente de próton, reduzindo a assim produção de ATP, e portanto, aliviando a sobrecarga, no entanto, fazendo com que o coração trabalhe de forma menos eficiente (Lorenzo et al., 2013).

Interações entre metabolismo de glicose e ácidos graxos

Desde 1963, quando Randle (Randle et al., 1963) demonstrou que a utilização de ácido graxo como substrato energético prejudica a captação de glicose basal e é estimulada por insulina, sabe-se da existência de uma interação entre a utilização dos dois substratos. O acúmulo de ácidos graxos prejudica a captação de glicose através da inibição do substrato de receptor de insulina e proteína quinase B (Grundleger e Thenen, 1982; Itani et al., 2000) além de aumentar os níveis de acil-CoA, diacilglicerol e ceramidas que, por sua vez, irão ativar a cascata de serina quinase (Kim et al., 2004). Além disso, ativa o receptor alfa ativado por

proliferadores de peroxissoma (PPAR- α) que, por sua vez, promove a expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos e da piruvato desidrogenase quinase-4 (PDK4) que inibe a piruvato desidrogenase (PDH) e o fluxo de piruvato (Wu et al., 1998). Da mesma forma, o aumento nas razões de acetil-CoA para CoA e NADH para NAD⁺, causado pelas altas taxas de oxidação de ácidos graxos, também ativam a PDK4 e assim levam a uma inativação da PDH (Bowker-kinley et al., 1998; Holness e Sugden, 2003); e causam o acúmulo de citrato no citosol que subsequentemente inibe a fosfofrutoquinase (PFK) e glicólise (Garland, Randle, Newsholme, 1963, Newsholme e Randle, 1964). Por outro lado, a inibição da oxidação de ácidos graxos através da elevação dos níveis de Malonil-CoA, ou utilizando inibidores farmacológicos, favorecem a oxidação de glicose (Bandyopadhyay et al., 2006).

Essa troca, apesar de essencial para garantir a geração contínua de ATP para manter a função cardíaca, pode se tornar prejudicial podendo reduzir a capacidade mitocondrial para síntese de ATP (Young, McNulty e Taegtmeyer, 2002). A oxidação completa de ácido graxo rende mais ATP que a oxidação de glicose ou lactato, pois possui mais ligações entre carbonos. Nesse caso, os ácidos graxos produzem mais energia, a um custo maior de oxigênio. Em casos de fornecimento limitado de oxigênio, um estímulo para uma maior oxidação de glicose serviria para sustentar por um curto período a produção de ATP. No entanto, o efeito prolongado de inabilidade de oxidar ácidos graxos poderia prejudicar a produção de ATP e função contrátil durante o aumento da demanda energética (Lopaschuk et al., 2000; Watanabe et al., 2000; Gelinas et al., 2008; Luptak et al., 2005). Com base nisso, estudos recentes mostram que a diminuição na oxidação de ácidos graxos prejudica a eficiência de produção de ATP no coração hipertrófico (Rupp e Jacob, 1992; Exil et al., 2003; Sorokina et al., 2007; Cox et al., 2009; Ellis et al., 2011).

Alterações do metabolismo energético cardíaco na obesidade

A produção de ATP no coração depende de um equilíbrio entre o uso de ácidos graxos e glicose como substratos energéticos. No entanto, o desenvolvimento da obesidade e diabetes é marcado por aumentos excessivos na disponibilidade de ácidos graxos demonstrados por níveis altos de ácidos graxos livres e triglicerídeos circulantes (Lopaschuk, Folmes e Stanley, 2007). Esse aumento na oferta de ácidos graxos faz com que o coração dê preferência ainda

mais aos ácidos graxos como substrato energético, levando a um quadro de favorecimento a oxidação de ácidos graxos à custa, ou não, de uma redução no metabolismo de glicose, com o objetivo de conter o excesso disponível e evitar o acúmulo de lipídios dentro do miocárdio (Zhou et al., 2000).

No entanto, os diferentes estudos mostram que apesar de haver esse aumento na oxidação de ácidos graxos, ele não parece suficiente ou adequado, levando a um quadro frequente de esteatose cardíaca que pode levar a produção de intermediários lipotóxicos, como as ceramidas e acilcarnitinas. Em conjunto esses eventos favorecem o estresse oxidativo e apoptose, e danos na mitocôndria com um posterior comprometimento na produção de ATP e, portanto, da função contrátil cardíaca (Zhang e Ren, 2011).

Os mecanismos relacionados ao acúmulo de lipídios e ao desenvolvimento da cardiomiopatia ainda não estão bem definidos na literatura. Inicialmente foram utilizados modelos animais de obesidade e resistência à insulina como ratos Zucker (Wang e Unger, 2005), e camundongos deficientes para receptor de leptina ob/ob (Barouch et al., 2003) e insulina db/db. Estes estudos demonstraram uma forte ligação entre o acúmulo de lipídios neutros no cardiomiócito e disfunção ventricular associada à hipertrofia cardíaca (Finck et al., 2003; McGarry e Dobbins, 1999; Schaffer, 2003; Stanley, Recchia e Lopaschuk, 2005; Unger, 2002; Zhou et al., 2000) e confirmam a relação da insuficiência cardíaca como sendo uma das maiores causas de mortalidade na população obesa e/ou diabética (Brand, Abbott e Kannel, 1989; Stamler et al., 1993; Kanchaiah et al., 2002).

Da mesma forma, imagens de ressonância magnética mostram uma correlação positiva entre os níveis de triacilglicerol no miocárdio e anormalidades ventriculares diastólicas (McGavock et al., 2007; O'Connor et al., 2009; Ng et al., 2010; Rijzewijk et al., 2009). Essa associação entre o acúmulo de triacilglicerol no cardiomiócito, o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca e disfunção ventricular caracteriza o termo cardiomiopatia lipotóxica (Denton e Randle, 1967; Rizza, Crass, Ship, 1971; Murthy e Shipp, 1977; Paulson e Crass, 1982; Chiu et al., 2001; Szczepaniak et al., 2003; Finck et al., 2002; 2003; Son et al., 2007; O'Connor et al., 2009; Goldberg, Trent e Schulze, 2012).

Entretanto, estudos em humanos e em animais mostram que um desarranjo metabólico precede o desenvolvimento da disfunção sistólica e diastólica ventricular característica da cardiomiopatia lipotóxica (McGavock et al., 2007; Bugger e Abel, 2009). É provável que haja alterações na estrutura cardíaca anteriores a um prejuízo da função e esse seria um momento chave importante para uma manipulação em termos de metabolismo. Com base nisso, há uma busca por mecanismos anteriores às alterações na função cardíaca.

Dentre os mecanismos conhecidos que contribuem para esse quadro característico de aumento na oxidação de AG estão: entrega de AG, diminuição na sensibilidade insulínica, e ativação transcripcional como a rede de sinalização PPAR- α /PGC1 bem conhecida por sua função regulatória do uso de substratos no miocárdio (Luiken et al., 2001; Coort et al., 2004; Finck et al., 2007; Barger et al. 2000; Carley, Taegtmeyer e Lewandowski, 2014). Inicialmente, a maior oferta de ácidos graxos leva a uma captação aumentada de ácidos graxos pela célula cardíaca. Isso é demonstrado tanto por modelos animais como por estudos em humanos com obesidade e/ou diabetes. Isso pode se dar em parte por um aumento na captação de ácidos graxos através de transportadores de ácidos graxos FAT/CD36 localizados na membrana plasmática como demonstrado por diferentes modelos animais de obesidade (Luiken et al., 2001; Coort et al., 2004; Chen et al., 1996). Essa condição se confirma por estudos de tomografia por emissão de pósitrons utilizando palmitado ^{11}C como marcador demonstrando um aumento na captação de ácidos graxos em humanos com obesidade e diabetes (Herrero et al., 2006; Peterson et al., 2012). Além disso, o excesso de lipídios pode desencadear alterações na sinalização insulínica do miocárdio, contribuindo de modo independente para uma redução no metabolismo de glicose e aumento reflexo no metabolismo de ácidos graxos (Young, McNulty e Taegtmeyer, 2002). Da mesma forma, o aumento no metabolismo de ácido graxo por si só leva a uma inibição alostérica do metabolismo de glicose através da inibição da glicólise no citosol e da piruvato desidrogenase na mitocôndria (fenômeno de Randle). Nesse caso, o aumento na oxidação de ácidos graxos seria anterior à instalação da resistência à insulina, contribuindo, portanto, para uma degradação do metabolismo de glicose (Young et al., 2001; Carroll et al., 2005, Buchanan et al., 2005). Essa incapacidade de usar corretamente a glicose, seja na presença ou não de um quadro de resistência à insulina, força o coração a depender dos ácidos graxos para suprir sua demanda energética, provocando assim um ciclo vicioso de captação, oxidação e acúmulo de lipídios (Zhan e Ren et al., 2011).

Da mesma forma, esses ácidos graxos podem modificar diretamente a expressão de enzimas do metabolismo de ácidos graxos na medida em que eles podem servir como ligantes endógenos para a família de receptores nucleares PPAR (Buchanan et al., 2005; Francis, Annicotte e Auwx, 2003; Gilde et al. 2003; Murray et al., 2005). Os fatores transcripcionais mais conhecidos que regulam a oxidação de ácidos graxos no coração são o PPAR- α e o fator coativador transcripcional PGC-1 α . O PPAR- α é a isoforma mais expressa em tecidos com alta atividade metabólica como é o caso do coração (Huss e Kelly, 2004, Dressel et al., 2003). Uma vez ativados, através de altas concentrações de ácidos graxos no meio intracelular, eles

formam complexos com receptores retinóicos X (RXR) e se ligam a elementos específicos de resposta (PPREs) localizados dentro de regiões promotoras de uma série de genes alvos que codificam proteínas envolvidas no controle do metabolismo de ácidos graxos (Finck, 2004; Finck e Kelly, 2002). O PPAR- α promove a expressão de genes relacionados com a captação e ligação de ácidos graxos (lipoproteína lipase (LPL), (CD36), esterificação de ácidos graxos (acil-CoA sintetase (ACS)), e oxidação de ácidos graxos (CPT1, acil CoA oxidase, desidrogenase de cadeia longa acil-CoA e desidrogenase de cadeia super longa) (Finck et al., 2002; Abel, Litwin e Sweeney, 2008). Além disso, ele pode aumentar expressão da piruvato desidrogenase quinase, reduzindo por outro lado a oxidação de glicose (Huang et al., 2002).

Neste sentido, diferentes estudos em animais geneticamente modificados para deleção ou superexpressão de PPAR- α confirmam sua atuação como regulador primário de todas as etapas do metabolismo de ácidos graxos (Lee et al., 1995; Aoyama et al., 1998; Watanabe et al., 2000; Barbieri et al., 2012). Assim, faz-se importante uma modulação adequada da atividade de PPAR- α , uma vez que expressões reduzidas ou aumentadas estão relacionadas a prejuízos no metabolismo de ácidos graxos (Young et al., 2002).

Em condições como a obesidade e a diabetes, o receptor nuclear PPAR- α encontra-se ativado em um momento inicial, contribuindo para esse aumento na captação, esterificação e oxidação de ácidos graxos. Porém, essa ativação não é mantida com a permanência de uma sobrecarga pressórica e/ou exposição prolongada à hiperglicemia e/ou hiperlipidemia (Finck, 2007). Desta forma, sugere-se que capacidade de oxidação de ácidos graxos no coração se torne limitada e/ou deficiente após um período prolongado de sobrecarga, e que isso tenha relação com a atividade de PPAR- α .

Outro gene importante envolvido no metabolismo de ácidos graxos é o co-ativador transcricional PGC-1 α que modula a atividade de vários fatores transcricionais que podem aumentar a expressão de proteínas envolvidas na β -oxidação, ciclo TCA, e cadeia transportadora de elétrons (Liu e Lin, 2011; Luptak et al., 2005; Leone et al., 2005; Lin et al., 2005; Lai et al., 2008). O PGC-1 α regula positivamente o complexo PPAR/RXR (Vega, Huss e Kelly, 2000; Berger e Moller, 2002). E uma vez ligado a PPRE, o complexo PPAR/RXR/PGC1 aumenta a taxa de oxidação de ácidos graxos e PDK4 (Huang et al., 2002; Lehman e Kelly, 2002a; 2002b; Gilde et al., 2003; Harris, Huang e Wu, 2001). Ele também pode interagir com o receptor alfa relacionado com receptor nuclear (ERR α) e este se liga a PPRE para aumentar a expressão de genes regulados por PPAR- α relacionados com aumento na captação, acúmulo e oxidação de ácidos graxos (Lehman et al., 2000).

A hipernutrição crônica e a obesidade parecem atuar na via de sinalização PPAR-

a/PGC1, resultando em alterações na expressão genica de proteínas que controlam a β -oxidação, incluindo CPT1, FATP1, FACS1, CD36, UCP2, e UCP3 (Finck et al., 2002; Abel, Litwin e Sweeney, 2008). Desta forma, sugere-se que que vários mecanismos estejam envolvidos neste tentativa de aumento na oxidação de ácidos graxos e que muito ainda precisa ser esclarecido sobre o metabolismo de lipídios em corações obesos e diabéticos. Evidências sugerem que o aumento na taxa de oxidação de ácidos graxos pode não ser suficiente ou adequado para evitar o acúmulo de metabólitos lipídicos intracelulares e, portanto, o desenvolvimento da cardiomiopatia lipotóxica (Unger et al., 2001; Young et al., 2002).

Dentre as possíveis explicações está uma disfunção mitocondrial através de uma limitação nos componentes da fosforização oxidativa que resultaria em um aumento na produção de superóxido, que por sua vez poderia desacoplar a mitocôndria e reduzir a eficiência de produção de ATP, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da cardiomiopatia lipotóxica. Neste sentido, nosso laboratório e outros demonstraram que diferentes modelos de obesidade aumentam o consumo de oxigênio pela mitocôndria com uma posterior redução na produção de ATP, indicando um desacoplamento mitocondrial (Boudina et al., 2005; Boudina e Abel, 2006; Neves et al., 2013). Acredita-se que isso ocorra em parte pela entrada de equivalentes reduzidos vindos da β -oxidação para a cadeia transportadora de elétrons que se encontra prejudicada (Boudina e Abel, 2007). Nesse caso pode ocorrer o desacoplamento mediado pela produção excessiva de EROs, podendo este ser um mecanismo adaptativo para reduzir o potencial de membrana e o excesso de EROs. No coração diabético esse mecanismo limitador da produção de EROs é observado com o aumento na expressão de proteínas desacopladoras mitocondriais (UCP), especialmente a UCP3, no entanto, ele pode levar a um comprometimento na produção de ATP e consequente ineficiência cardíaca. Por outro lado, a superexpressão de proteínas desintoxicantes de EROs (metalotioneína, catalase, superóxido dismutase(SOD)) pode melhorar a função mitocondrial e cardiomiopatia induzida pela diabetes (Filippo et al., 2006; Shen et al., 2006; Vassort e Turan, 2010).

Com base nisso, diferentes estratégias estão sendo testadas para o entendimento e restauração do metabolismo energético na obesidade e diabetes tendo como alvo uma utilização mais eficiente de substratos pelo miocárdio, com isso prevenindo o acúmulo de produtos tóxicos lipídicos e não lipídicos e, assim, contendo o desenvolvimento de hipertrofia e insuficiência cardíaca.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral:

Investigar a expressão gênica e efeitos funcionais da ativação da oxidação de ácidos graxos aguda em camundongos adultos durante estágio inicial e final da obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

1.2 Objetivos Específicos:

Investigar se 20mg/kg/day de injeção intraperitoneal de tamoxifeno por 3 e 5 dias deleta o gene ACC2 no coração adulto de camundongo.

Investigar se a deleção induzida específica da ACC2 no coração adulto leva a um aumento na oxidação de ácidos graxos sem afetar a função cardíaca.

Determinar os efeitos do aumento na oxidação de ácidos graxos no desenvolvimento da disfunção cardíaca induzida por dieta hiperlipídica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Modelo animal knockout condicional específico para ACC2 no coração

Para desenvolver o modelo animal knockout induzido para ACC2 no coração utilizamos uma tecnologia Cre-Lox. A metodologia básica do sistema consiste em cruzamentos de camundongos que carregam um gene com sítios *loxP* cercando um *exon* (camundongo *floxed* ou *flox/flox*) com camundongos que carregam um transgene Cre (Camundongo Cre). As sequências *loxP* são sítios de reconhecimento para a recombinação Cre promover a perda da função do gene desejado (Figura 4).

Figura 4 – Estrutura do gene ACC2



Nota: O alelo *floxed* ACC2 tem sítios P *lox* posicionados ao redor do sítio de ligação da biotina e o exon logo acima para que a atividade Cre delete o sítio de ligação da biotina e produza uma mudança no padrão de tradução da proteína. O camundongo homozigoto *floxed* para ACC2 foi gerado em um *background* misto de C57BL6/129.

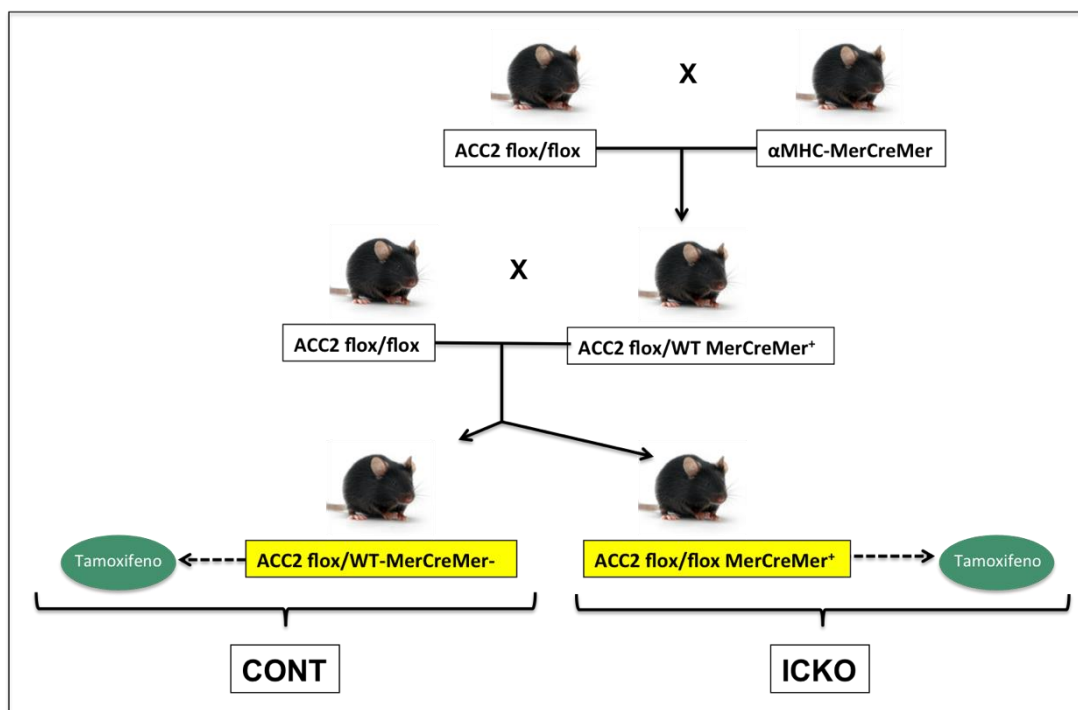
Fonte: Kolwicz, 2012.

No entanto, para o modelo *knockout* específico do coração, induzido por tamoxifeno, que permite um controle temporal da translocação da Cre no cardiomiócito, há a necessidade de uma fusão da Cre recombinase a um receptor estrógeno modificado (Mer), expresso sob o controle de um promotor de cadeia pesada α -miosina (α MHC). O tamoxifeno é um ligante do receptor estrógeno e induz então a translocação nuclear do Cre, resultando na recombinação sítio-específica das sequências *loxP* (Doetschman e Azhar, 2012). Desta forma, em nosso estudo especificamente, camundongos homozigotos ACC2 *flox/flox* (ACC2^{fl/fl}) foram acasalados com α -MHC MerCreMer para produzir camundongos heterozigotos (ACC2^{fl/WT}). Camundongos ACC2^{fl/WT} que eram positivos para MerCreMer foram acasalados novamente com ACC2^{fl/fl} para produzir dois tipos diferentes de genótipos:

ACC2fl/fl -MerCreMer⁺ e ACC2fl/WT- MerCreMer⁻. Os animais negativos para MerCreMer foram utilizados como controle e os positivos para MerCreMer como animais experimentais (Figura 5). Nestes últimos o tamoxifeno uma vez injetado se liga ao receptor estrógeno fusionado a proteína Cre desencadeando o processo de deleção acima descrito. Nesse caso, a atividade Cre pode ser finamente controlada no espaço e no tempo, permitindo criar um modelo animal com alterações genéticas específicas do coração sob um controle temporal externo.

A razão para utilização de uma estratégia de recombinação induzida por tamoxifeno foi a possibilidade de determinar as consequências agudas da perda da ACC2 no coração do camundongo adulto, evitar possíveis mecanismos compensatórios associados à deleção durante o desenvolvimento, e assegurar a deleção da ACC2 durante o desenvolvimento da obesidade induzida por dieta hiperlipídica. A eficiência da recombinação depende da dose de tamoxifeno utilizada e como ela se distribue no tempo. Por conta disso e da possibilidade de efeitos tóxicos da expressão de Cre, nós testamos diferentes doses baseadas em protocolos já publicados com doses em torno de 20 a 100mg/kg de massa corporal (Kotabashi et al., 2009; Hall et al., 2011; Bersel et al., 2013). O tamoxifeno (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK, # T5648) foi dissolvido em etanol (100% a uma concentração de 100mg/ml e diluído em óleo de amendoim (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK, #P2144) a 10mg/ml (Nakamura et al., 2006). A solução de tamoxifeno foi injetada por via intraperitoneal (20 mg/kg) uma vez ao dia, no mesmo horário, por 3 ou 5 dias consecutivos (Sohal et al., 2001; Hougen et al., 2010) nos camundongos ACC2fl/fl -MerCreMer⁺ (referenciados como camundongos ICKO após deleção da proteína). O mesmo procedimento foi realizado para os camundongos controles ACC2fl/WT- MerCreMer⁻ (CONT) para que fossem expostos as mesmas condições. Os animais foram injetados a partir da oitava semana de vida juntamente ao início do protocolo de dieta hiperlipídica ou controle. Uma biópsia da calda de cada camundongo foi utilizada para realizar genotipagem e, assim, confirmar o genótipo para cada camundongo utilizado.

Figura 5 - Esquema de acasalamento para gerar o modelo animal *knockout* induzido específico para ACC2 no coração



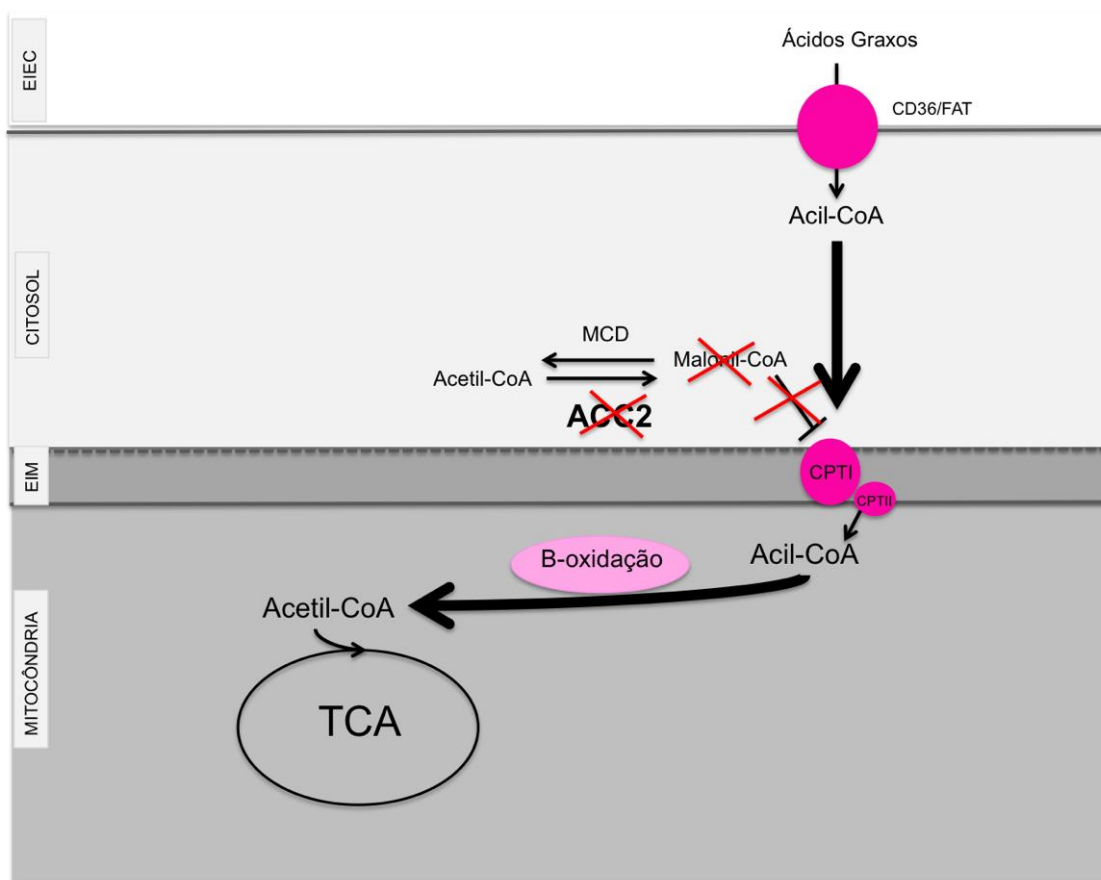
Legenda: CONT, animais controles; ICKO animais *knockout* induzidos

Nota: Camundongos homozigotos (ACC2fl/fl) foram acasalados com α-MHC MerCreMer para produzir camundongos heterozigotos (ACC2fl/WT). Camundongos ACC2fl/WT que eram positivos para MerCreMer foram acasalados novamente com ACC2fl/fl para produzir dois tipos diferentes de genótipos: ACC2fl/fl -MerCreMer+ e ACC2fl/WT- MerCreMer-.

Fonte: A autora, 2014.

O objetivo de criar um modelo animal deficiente para ACC2 foi aumentar a oxidação de ácidos graxos através da atenuação da inibição da CPT1 pela Malonil-CoA. A ACC2 catalisa a síntese de Malonil-CoA que inibe a CPT1 e, portanto, a entrada de ácidos graxos de cadeia longa para dentro da mitocôndria (Figura 6). Camundongos ACC2fl/WT- MerCreMer- pareados por idade foram usados como controle (Figura 6). Foram utilizados camundongos adultos alocados sob condições controladas (23°C, 12h/12h ciclo claro-escuro), recebendo ração e água *ad libitum*. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animal da Universidade de Washington.

Figura 6 - Deleção da ACC2 como um meio de aumentar a oxidação de ácidos graxos.



Legenda: ACC2, acetil-CoA carboxilase 2; ACS, acil-CoA sintase; CPT I, carnitina palmitoil transferase 1; CPT II, carnitina palmitoil transferase II; MCD, malonil-CoA decarboxilase; TCA: Ciclo de ácido tricarboxílico.

Nota: A CPTI facilita a entrada da acil-CoA para dentro da membrana mitocondrial interna. A entrada de Acil-CoA através da CPTI pode ser fortemente inibida por altas concentrações de malonil-CoA intracelular, que por sua vez é produzida pela carboxilação da acetil CoA via enzima ACC2. Portanto, a deleção da ACC2 seria um alvo chave para remover essa inibição.

Fonte: adaptado de Kolwicz et al., 2012.

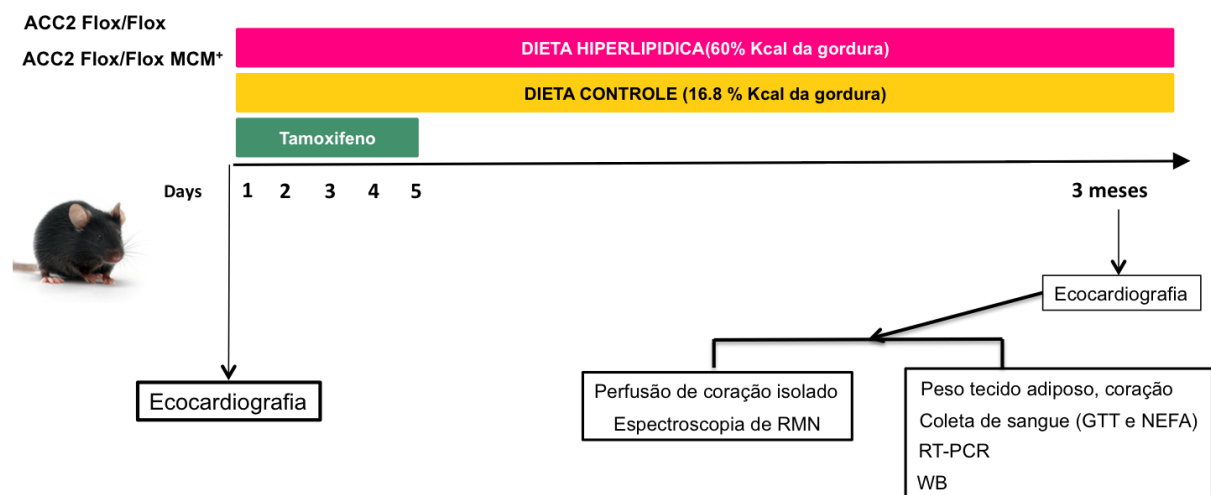
2.2 Genotipagem

Todos os camundongos foram genotipados a partir da extração de DNA genômico por meio de biópsia da cauda dos animais. A genotipagem foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (*PCR-polymerase chain reaction*) com termociclador utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a detecção da proteína flox/flox e MerCreMer.

2.3 Modelo de obesidade induzida por Dieta Hiperlipídica

A escolha da dieta utilizada foi baseada nos efeitos deletérios demonstrados de Russo et al., 2012 no tecido cardíaco. O protocolo consistia de alimentação *ad libitum* (a partir da oitava semana de vida) por 12 semanas de dieta hiperlipídica ou dieta controle (Figura 7). A dieta utilizada foi uma dieta hiperlipídica baseada na gordura do leite (60% das calorias derivadas de gordura) (TD. 09766; Harlan Teklad, Madison, WI, USA). A gordura utilizada na dieta foi a gordura anidra do leite, também conhecida como óleo de manteiga anidra. Essa substância consiste em 99.8% de gordura sem carboidratos detectáveis, inclusive lactose. A composição calórica da dieta consistia de: 18.4% de kcal de proteína, 21.3% de kcal de carboidrato, e 60.3% de kcal de gordura. A composição calórica da dieta controle (TD. 120455; Harlan Teklad, Madison, WI, USA) consistia de: 22.3% das kcal de proteína, 60.9% das kcal de carboidrato de baixo índice glicêmico, e 16.8% de kcal de gordura (Tabelas 1).

Figura 7 - Desenho experimental do modelo de obesidade induzida por Dieta Hiperlipídica com deleção induzida para ACC2 específica no coração de camundongos.



Fonte: A autora, 2014.

Tabela 1 - Composição nutricional das dietas

	CD	HFD
	(g/Kg)	(g/Kg)
Caseína	210	265
L-cistina	3	4
Amido de milho (alto teor de amilose)	500	–
Sucrose	39,14	90
Maltodextrina	100	160
Gordura anidra do leite	20	310
Banha	20	–
Óleo de soja	20	30
Celulose	20	65,5
Mistura de minerais AIN-93G-MX (94046)	35	48
Mistura de vitaminas AIN-93-VX (94047)	15	21
Fosfato de cálcio, dibásico	–	3,4
Birtartrato de colina	2,75	3
Antioxidante TBHQ	0,01	–
Corante	0,1	0,1

Nota: Dieta controle (CD) com 16,8% das calorias derivadas de gordura (40% ácidos graxos saturados (SFA); 35% ácidos graxos monoinsaturados (MUFA); 25% ácidos graxos polinsaturados (PUFA) e hiperlipídica (HFD) com 60,3% das calorias derivadas de gordura (60,8% SFA; 30,6% MUFA; 9,6% PUFA).

Fonte: Harlan Tekland Diet

2.4 Massa Corporal

Os animais foram pesados uma vez por semana, no mesmo horário, durante as 12 semanas de tratamento com a dieta hiperlipídica ou controle.

2.5 Massa de tecido adiposo

Após as 12 semanas de dieta, os animais foram sacrificados e os tecidos adiposos dos depósitos epididimal e retroperitoneal foram pesados em balança de precisão, para estimativa de adiposidade central.

2.6 Teste de tolerância à glicose

O teste de tolerância à glicose foi realizado nos animais após 6 horas de jejum. A glicose foi injetada por via intraperitoneal (1mg/g de massa corporal), e as amostras de sangue foram obtidas pela veia da cauda antes e 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose (Figura 8). A glicose sanguínea foi determinada utilizando glicosímetro (Lifescan Johnson & Johnson, Milpitas, Ca). Os valores de glicose foram expressos em mg/dl.

Figura 8 - Preparação do teste de tolerância à glicose



Fonte: A autora, 2014.

2.7 Coleta de sangue

Ao final das 12 semanas de dieta, os animais foram anestesiados com pentobarbital (0,02ml/g) e submetidos a coleta de sangue pelo plexo retro-orbital. O sangue foi coletado com pipetas *pasteur*, transferido para eppendorff de 500ul, centrifugado a 3000rpm, em três séries de 15 minutos, e novamente transferidos para tubos eppendorff a cada nova centrifugação e o soro congelado e armazenado a -80°C. A quantificação de ácidos graxos não esterificados foi realizada posteriormente através de kits comercial específico com os valores de ácidos graxos não esterificados sendo expressos em mmol/L.

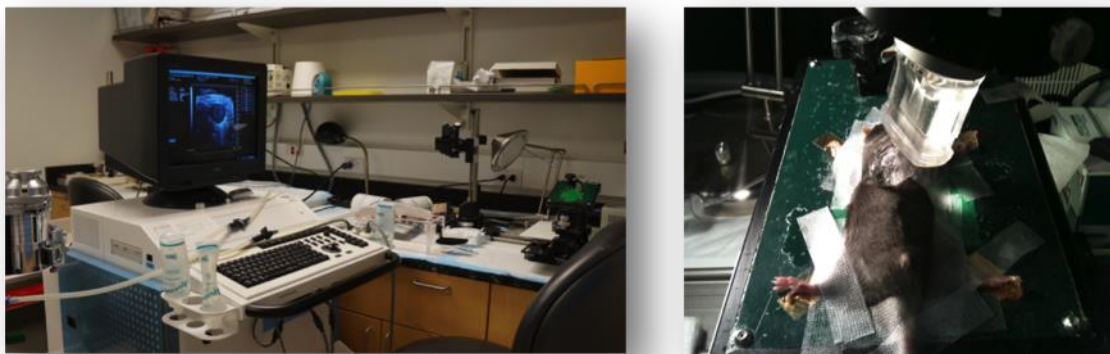
2.8 Massa do coração e razão massa coração / comprimento da tíbia

O comprimento da tíbia (CL) e o massa do coração (MC) foram mensurados após o protocolo de dieta de 12 semanas (20 semanas de idade). Os corações foram rapidamente coletados e secos, e pesados em balança de alta precisão. A massa do coração foi normalizado pelo comprimento da tíbia para que fossem avaliadas mudanças de crescimento hipertrófico. Os valores foram expressos em mg/mm.

2.9 Ecocardiografia transtorácica

A Ecocardiografia Transtorácica oferece um método não invasivo para avaliação da função cardíaca em camundongos (Gardin et al., 1995; Tanaka et al., 1996). Antes dos estudos de imagem, os camundongos foram anestesiados (2% isoflurano misturado com 0.5L/min 100% O₂) na câmara de indução por um período de 1 min. O animal levemente anestesiado foi, então, imobilizado em posição supina na placa aquecida que mantinha a temperatura constante normal e conectava o animal ao sistema de Ecocardiograma e anestesia para manter um nível de anestesia constante e viável durante todo o procedimento (Figura 9). O nível de anestesia foi controlado para a manutenção da frequência cardíaca a aproximadamente 550 ± 50 bpm batidas por minuto (bpm). Foi utilizado o modo M de Ecocardiografia, que fornecia imagens de 1-D dimensão, para a obtenção de medidas das dimensões cardíacas e contratilidade. Uma série de imagens foi armazenada para avaliação posterior da função ventricular esquerda. O nível de anestesia, temperatura corporal e frequência cardíaca foram padronizados entre os animais para facilitar as comparações entre os diferentes grupos e genótipos de camundongos quando utilizado o modo-M de Ecocardiografia. O aparelho de Ecocardiografia Transtorácica utilizado foi o Sistema de Imagem de alta resolução (visualSonics, Toronto) e um probe de 30mHz. Os animais foram avaliados, antes e após 4, 8 e 12 semanas no protocolo de dieta.

Figura 9 - Ecocardiografia Transtorácica em camundongo.

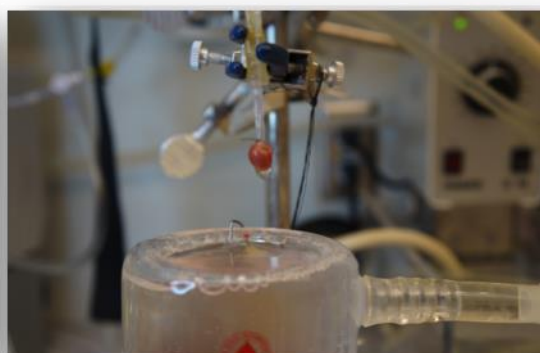
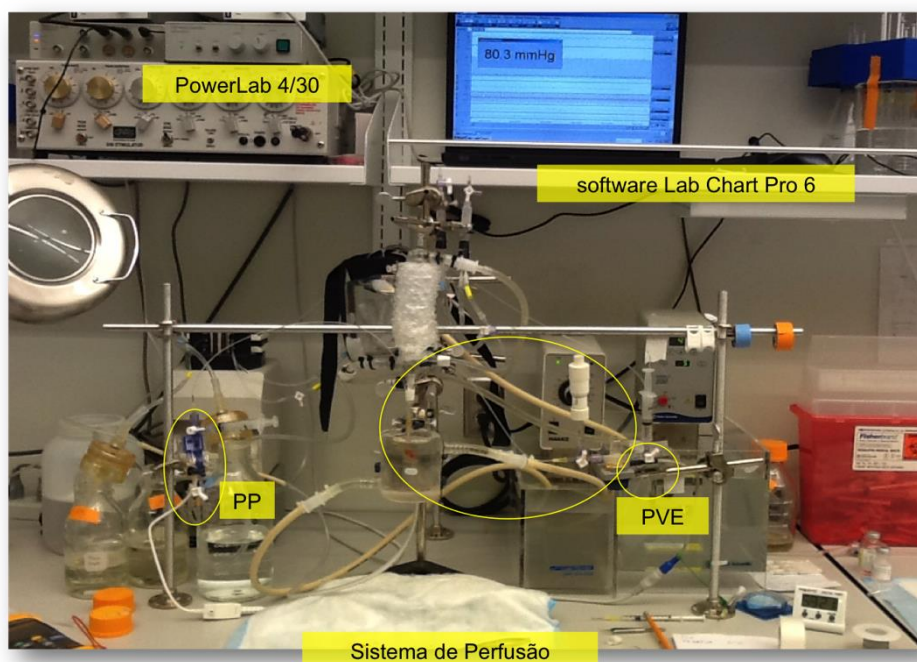


Fonte: A autora, 2014.

2.10 Técnica de Perfusão de Coração Isolado Langendorff

Após 12 semanas no protocolo de dieta, os animais foram heparinizados (20U.I) e anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital (0,02ml/g). Estes animais, uma vez anestesiados, foram submetidos a uma toracotomia com excisão do coração e transferência para uma placa com solução de Krebs-Henseleit gelada para imediata canulação da artéria aorta e perfusão do coração. Esse coração, uma vez acoplado ao sistema de perfusão isolado Langendorff, foi perfundido retrogradamente, forçando o fechamento da válvula aórtica, e assim, direcionando o fluido de perfusão para dentro do óstio coronário. O sistema de perfusão consiste em um sistema de perfusão acoplado a um sistema de aquisição de dados (Power Lab 4/30) e um software para análise dos dados (Lab Chart Pro 6). A pressão de perfusão e a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo são monitoradas através de transdutores de pressão acoplados ao sistema de aquisição de dados (Figura 10).

Figura 10 - Aparelho de perfusão de coração isolado Langendorff.



Fonte: A autora, 2014.

Para a avaliação da função cardíaca foi introduzido um balão desinflado feito com saco plástico no ventrículo esquerdo através da válvula mitral (Figura 11). Este balão foi conectado a tubos preenchidos com água seguido do transdutor de pressão para avaliação da atividade ventricular registrada através do software Lab Chart Pro 6. Esse sistema de registro permite análise em tempo real de vários parâmetros de função cardíaca durante todo o protocolo experimental. Além disso, medidas de contratilidade e relaxamento podem ser estimadas.

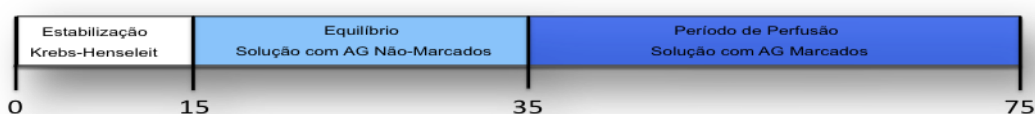
Figura 11 - Preparação do balão introduzido no ventrículo esquerdo



Fonte: A autora, 2014.

Todos os corações foram perfundidos com solução de Krebs-Henseleit modificada composta por (em mmol/L): NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 5.3, CaCl₂ 2, MgSO₄ 1.2, EDTA 0.5, glicose 5.5, lactato 1.2, e insulina 50 μ U/mL, equilibrado com 95% O₂ e 5% CO₂ (pH 7.4). O protocolo de perfusão consistiu em 15 minutos com a solução anteriormente descrita, seguida pela mesma solução com a adição de ácidos graxos de cadeia longa não marcados 0.4mmol/L (ligados a 1.2% de albumina) para adaptação inicial do coração à solução com ácidos graxos por 20 minutos. Depois do período de adaptação, os corações foram perfundidos por 40 minutos com a mesma solução, porém com ácidos graxos e glicose marcados ¹³C para a determinação da utilização de substratos energéticos (Malloy, Sherrey, Jeffrey, 1988; Malloy, Sherrey, Jeffrey, 1990) a uma pressão de perfusão de 80mm Hg em um protocolo de linha de base (Figura 12). Ao final do experimento, o coração foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido para posterior extração.

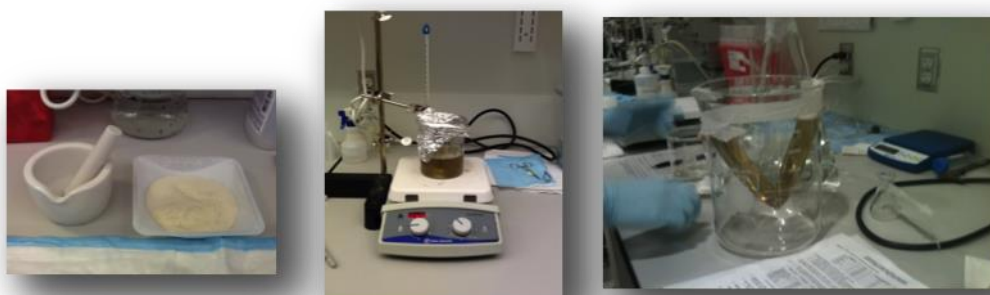
Figure 12 - Protocolo de Perfusão do coração



Fonte: A autora, 2014.

A composição da solução de perfusão foi baseada na literatura (Previs, Cline, Shulman, 1999) assim como em medidas das concentrações de substratos plasmáticos nesses camundongos. Diferente de muitos estudos nos quais somente a glicose e os ácidos graxos são ofertados, o fornecimento dos substratos mais importantes permite a análise da seleção de substratos sob uma condição fisiológica relevante. E os resultados obtidos fornecem avaliações realistas da relação entre a utilização de glicose e ácidos graxos. A preparação de ácidos graxos (Cambridge Isotope Laboratorie, MA) consiste dos seguintes ácidos graxos: palmítico (46%), palmitoleico (12%), oleico (25,5%), e linoleico (16,5%). Baseado em estudos preliminares, 1,2% e 3% de albumina no perfusato são suficientes para manter esses ácidos graxos em solução na concentração de 0.4 e 1.2mM respectivamente (Figura 13).

Figura 13 - Preparação da Solução com ácidos graxos marcados e não marcados



Fonte: A autora, 2014.

2.11 Técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C

Ao final do protocolo de perfusão com ácidos graxos marcados, os corações foram congelados através do pinçamento do coração com uma pinça de alumínio (*Wollenberger tongs*) que foi pré-resfriada em nitrogênio líquido. Mais adiante, os tecidos congelados foram extraídos utilizando ácido perclórico a 3% e neutralizados em KOH. Os extratos neutralizados foram então liofilizados e dissolvidos em 300ul de D_2O e transferidos para um tubo específico para ressonância magnética nuclear de 3mm para análise da oxidação de substrato por

espectroscopia ^{13}C de ressonância magnética nuclear (^{13}C NMR) (Figura 14). As razões foram então referenciadas e normalizadas pela área de pico do padrão interno (dioxane).

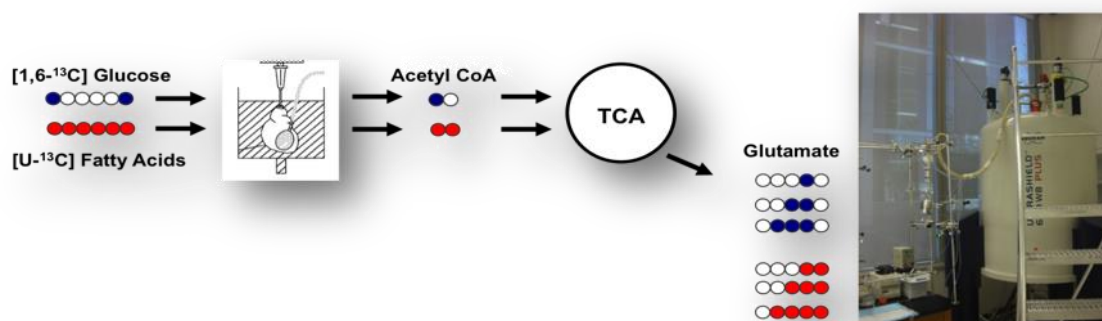
Figura 14 - Preparação do extrato de tecido cardíaco para análise da oxidação de substrato por espectroscopia ^{13}C de ressonância magnética nuclear



Fonte: A autora, 2014.

O espectra do desacoplamento do próton ^{13}C NMR de extratos teciduais foram obtidos usando Espectômetro Varian Inova 400 (9.4T) (Figura 15). Os dados foram coletados usando um pulso de 60° com 3.2s de atraso, e uma largura de varredura de 10,000Hz e 16K pontos de dados. O espectra foi gerado por transformação Fourier seguindo a multiplicação das quedas indução livre (FIDs) por uma função exponencial, que resultou em uma linha de amplificação de 1Hz. Os carbonos C3 e C4 do glutamato foram quantificados utilizando Bayesian Analysis do time-domain data (software fornecido por G.L. Bretthorst, Washington University, St. Louis, MO).

Figura 15 - Esquema de utilização de substratos marcados ^{13}C para o uso em espectroscopia e análise isotopométrica de ressonância magnética nuclear ^{13}C NMR.

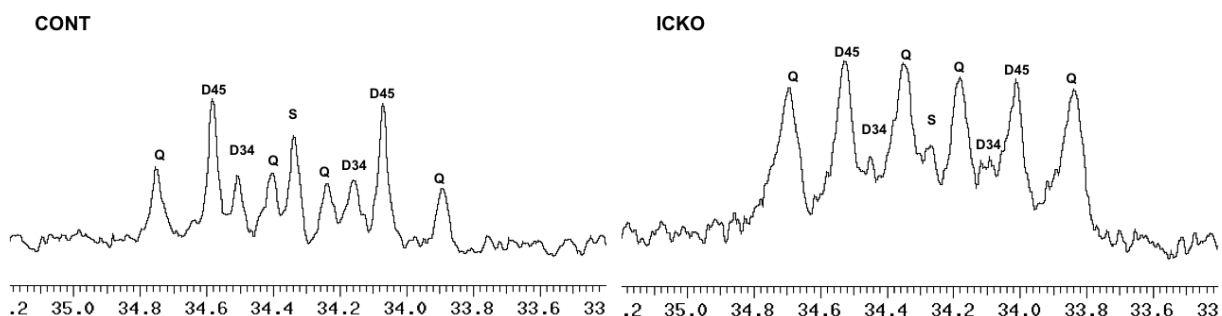


Nota: Para determinar a contribuição relativa de ácidos graxos e glicose à oxidação, os corações foram perfundidos com uma mistura de ácidos graxos $[U-^{13}\text{C}]$ e glicose $[U-^{13}\text{C}]$ marcados. Estes substratos foram convertidos em $[1,2-^{13}\text{C}]$ e $[1,6-^{13}\text{C}]$ acetil-CoA, respectivamente. Uma vez que a acetil-CoA entra no ciclo tricarboxílico (TCA) e alcança o estágio estacionário, os carbonos marcados aparecem em várias posições no glutamato.

Fonte: Kolwilcz, 2012.

A contribuição de cada substrato marcado ($[U-^{13}\text{C}]$ ácidos graxos e $[1,6-^{13}\text{C}]$ glicose) e dos substratos exógenos e endógenos não marcados para o metabolismo oxidativo foi determinada através modelamento dos fluxos cíclicos de TCA usando as áreas de picos de C3 e C4 ^{13}C isótopos de glutamato (Figuras 16). Para realizar esta análise foi utilizado o software TCACALC da UT Southwestern Medical Center (Malloy, Serry e Jeffrey, 1990).

Figura 16 - Utilização de substrato em corações de animais knockout condicional para ACC2 (ICKO) no coração e controles



Legenda: CONT, animais controles; ICKO, animais knockout induzidos.

Nota: Espectra representativo do C4 do glutamato de corações ICKO e CONT. Contribuições de ácidos graxos estão representadas pelos picos Q e D45.

Fonte: A autora, 2014.

2.12 Técnica de quantificação de proteínas Western Blot

Os tecidos foram homogeneizados em tampão de lise e incubados por 30 minutos no gelo. O cálculo da concentração de proteínas foi realizado pelo método de Lowry. As amostras contendo 20µg de proteína foram submetidas a eletroforese em gel Mini-PROTEAN TGX Precast 4-15% (Bio-Rad Laboratories, USA). Em seguida, foi realizada a transferência para membrana de PVDF por 2 horas. A membrana foi então bloqueada com uma solução Tween-TBS contendo leite desnatado 5% por 1 hora, seguida da incubação a 4°C de 24 horas com anticorpo primário específico para ACC (1:5000) ou GPDH (1:40000) (Cell Signaling Technology, USA). As membranas foram então lavadas com Tween-TBST e novamente incubadas com anticorpo secundário anti rabbit (1:40000) e anti-mouse (1:20000) respectivamente. As proteínas imunorreativas foram visualizadas pelo método ECL (ChemiLucent™ ECL Detection, Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha), através do sinal de quimiluminescência.

2.13 PCR quantitativo em tempo real

O RNA total foi isolado do tecido congelado do ventrículo esquerdo utilizando um kit de RNase (Qiagen). A sintase reversa *Omniscript reverse synthase* e hexonuclotídeos randomizados foram usados para a síntese de cDNA de acordo com o manual do fabricante. O PCR em tempo real foi realizado utilizando-se SYBR green (Bio-Rad) com as sequências de primers seguintes: ANP *forward* (F), 5'-ATT GACAGGATTGGAGCCCAGAGT-3'; ANP *reverse* 5'-TGACACACCACAAGGGCTT AGGAT-3'; BNP (F), 5'-GCCAGTCTCCAGAGCAATTCA-3'; BNP (R), 5'-GGGCCAT TTCCTCCGACTT-3'; CD36 (F), 5'-ACTGGTGGATGGTTTCCTAGCCTT-3'; CD36 (R), 5'-TTTCTCGCCAACTCCCAGGTACAA-3'; PGC1a (F), 5'-AGCCGTGACCACT GACAACGAG-3'; PGC1a (R) 5'-GCTGCATGGTTCTGAGTGCTAAG-3'; PPARα (F), 5'-GCGTACGGCAATGGCTTTATCACA-3'; PPARα (R) 5'-GCAGCCACAAACAGGG AAATG-3' TCA; UCP3 (F), 5'-TGCTGAGATGGTGACCTACGA-3'; UCP3 (R) 5'-CC AAAGGCAGAGACAAAGTGA-3'; SOD (F), 5'-CACTGTGGCTGAGCTGTTGT-3'; SOD (R) 5'-CCAAGCAATTCAAG CCTCT-3'; 18S RNA (F), 5'-GTAACCCGTTGAA

CCCCATT-3'; 18S RNA (R), 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'. Os resultados dos níveis de mRNA foram normalizados para 18S RNA e representados como *fold-change* sobre o controle.

2.14 Análise Estatística

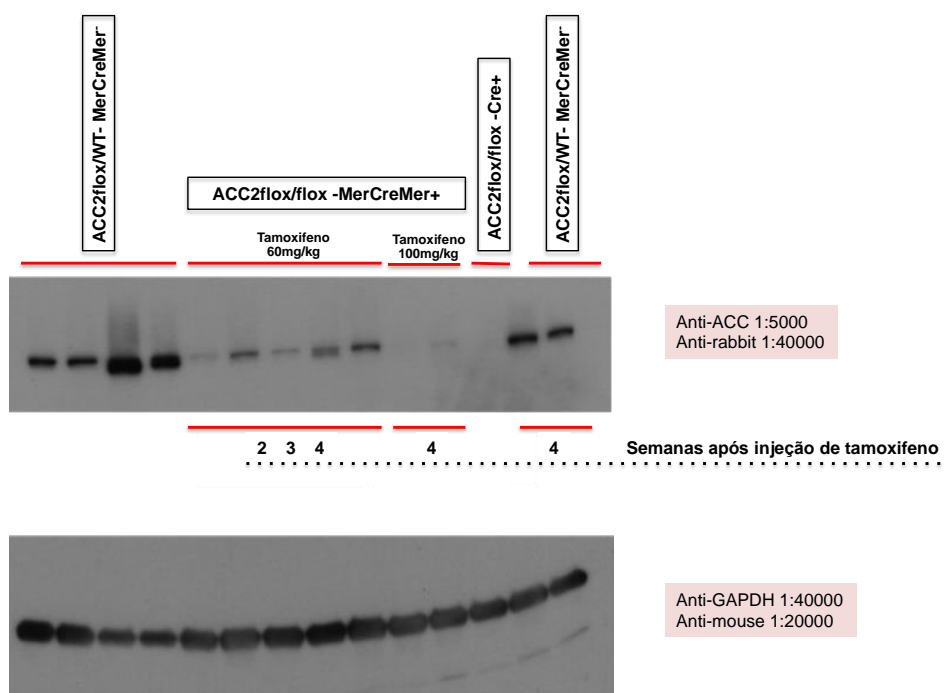
Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média sendo considerado um nível de significância de 0,05. Para comparações entre 2 grupos foi utilizado teste-t de student. Para comparações entre múltiplos grupos ANOVA One-way com teste de post hoc Tukey para análise em único tempo. ANOVA Two Way para comparações com dois fatores com teste de post hoc Tukey. Para comparações com valores com distribuição não normal foram utilizados o teste Mann-Whitney para comparações entre 2 grupos e o teste Kruskal Wallis seguido do método Dunn's para comparações entre múltiplos grupos. As análises foram realizadas com GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3 RESULTADOS

3.1 Modelo de camundongo *knockout* induzido para ACC2 específica do coração

A deleção induzida e específica da ACC2 no coração foi inicialmente testada através da injeção de tamoxifeno (20mg/kg/dia) em camundongos ACC2 Flox/Flox-MerCreMer⁺ por 3 dias. A dose total utilizada foi, portanto, de 60mg/kg. Essa dose, apesar de diminuir a quantidade de proteína observada pela técnica de Western Blot, não foi suficiente para ocasionar a extinção da ACC2 no coração após 2, 3 ou 4 semanas do início das injeções. A administração de tamoxifeno por 5 dias, com uma dose total de 100mg/Kg, foi suficiente para deletar a proteína ACC2 após 4 semanas do início das injeções em níveis comparáveis ao modelo de camundongo *knockout* para ACC2 desde o nascimento ACC2flox/flox -Cre⁺ (Figura.17).

Figura 17 - Western Blot da proteína ACC2 no coração



Legenda: Western Blot da proteína ACC2 no coração de camundongos controles (ACC2flox/WT-MerCreMer⁻), *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração (ACC2flox/flox-MerCreMer⁺) e *knockout* para ACC2 desde o início da vida (ACC2flox/flox-Cre⁺).

Fonte: A autora, 2014.

3.2 Função cardíaca *in vivo* de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração

A função cardíaca foi avaliada através do método de Ecocardiografia 4 semanas após o início da administração de tamoxifeno. Uma dose de tamoxifeno de 20mg/kg/dia por 5 dias não causou disfunção cardíaca como demonstrando pelos valores da tabela 1 para parede posterior do ventrículo esquerdo durante a sístole (LVPW;s), diâmetro interno do ventrículo esquerdo durante a diástole (LVID;d), parede posterior do ventrículo esquerdo durante a diástole (LVPW;d), diâmetro interno do ventrículo esquerdo durante a sístole (LVID;s); parede anterior do ventrículo esquerdo durante a diástole (LVAW;d), parede anterior do ventrículo esquerdo durante a sístole (LVAW;s), volume do ventrículo esquerdo durante a diástole (LV Vol;d), volume do ventrículo esquerdo durante a sístole (LV Vol;s), fração de ejeção (%EF), fração de encurtamento (%FS), massa do ventrículo esquerdo 4 semanas após o início do protocolo de tamoxifeno (Tabela 2).

Tabela 2 - Função cardíaca *in vivo* de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos à administração de 20mg/kg/dia de tamoxifeno por 5 dias.

	CONT	ICKO
LVPW;s (mm)	1,09 ± 0,04	0,97 ± 0,07
LVID;d (mm)	2,71 ± 0,11	2,77 ± 0,08
LVPW;d (mm)	0,86 ± 0,03	0,73 ± 0,05
LVID;s (mm)	1,67 ± 0,07	1,68 ± 0,05
LVAW;d (mm)	0,69 ± 0,03	0,75 ± 0,01
LVAW;s (mm)	1,03 ± 0,03	1,07 ± 0,07
LV Vol;d (mm)	27,81 ± 2,67	29,12 ± 1,98
LV Vol;s (mm)	8,31 ± 0,86	8,23 ± 0,66
EF (%)	70,12 ± 0,97	71,45 ± 3,13
FS (%)	38,25 ± 0,73	39,36 ± 2,62
massa VE (mg)	61,60 ± 2,69	58,98 ± 2,69
massa VE corrigida (mg)	49,28 ± 2,15	47,18 ± 3,173

Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. Foram utilizados 4 animais no grupo CONT e 7 animais no grupo ICKO.

Fonte: A autora, 2014.

3.3 Função cardíaca *ex vivo* em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração

A função contrátil isovolumétrica cardíaca *ex vivo* foi avaliada em corações de camundongos knockout induzidos para ACC2 específica do coração utilizando o protocolo de perfusão retrograda do coração Langendorff. Como demonstrado na tabela abaixo, a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (LVDevP) não foi diferente entre os grupos em uma pressão diastólica final fixa de 8-10mm Hg. Além disso, não houve mudanças nos parâmetros de frequência cardíaca (FC), duplo produto (RPP), contratilidade (Máx dP/dt), velocidade de relaxamento (Mín dP/dt), constante de relaxamento (tau) e índice de contratilidade (Tabela 3). Esses resultados sustentam o que já foi verificado anteriormente pela avaliação *in vivo* com a técnica de Ecocardiografia. Nesse caso, a deleção da ACC2 não afetou a função cardíaca basal.

Tabela 3 - Função Cardíaca *ex vivo* de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos à administração de 20mg/kg/dia de tamoxifeno por 5 dias.

	CONT	ICKO
LVDevP (mmHg)	119,0 ± 7,56	120,1 ± 9,37
RPP (mmHg*bpm)	47627 ± 3697	46659 ± 2131
FC (bpm)	370,3 ± 17,50	369,7 ± 23,57
Máx dP/dt (mmHg/s)	4303 ± 210,4	4112 ± 303,9
Mín dP/dt (mmHg/s)	3200 ± 86,00	3214 ± 97,6
tau (s)	0,03 ± 0,008	0,03 ± 0,006
índice de contratilidade	87,49 ± 9,70	85,01 ± 8,99

Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais knockout em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

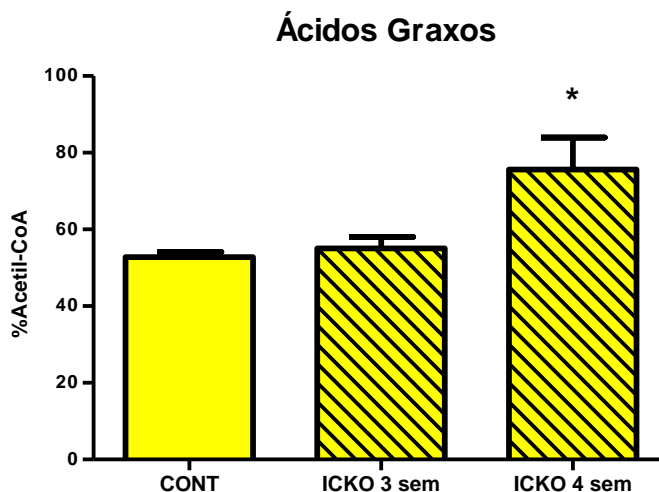
Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. Foram utilizados de 4 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

3.4 Utilização de substratos energéticos em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração

A análise isotopométrica do espectra do carbono C3 e C4 do glutamato fornece como informação a contribuição relativa de cada substrato para oxidação de acetil-CoA no ciclo tricarboxílico de ácido cítrico. A contribuição relativa dos ácidos graxos para acetil-CoA foi de aproximadamente $75,67 \pm 8,2\%$ nos corações de camundongos *knockout* condicionais para ACC2 e aproximadamente $52,75 \pm 1,3\%$ nos animais controles quatro semanas após o início das injeções de tamoxifeno ($p < 0,05$) (Figura 18). Esses resultados mostram que a oxidação de ácidos graxos foi aumentada em camundongos *knockout* induzidos para ACC2 somente depois de quatro semanas após o início do protocolo de tamoxifeno, coincidindo, portanto, com o período de extinção da ACC2 no coração demonstrado anteriormente pela técnica de Western Blot (Figura 18).

Figura 18 - Contribuição relativa de ácidos graxos para Acetil-CoA em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles.



Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ vs CONT. Foram utilizados de 2-3 animais por grupo.

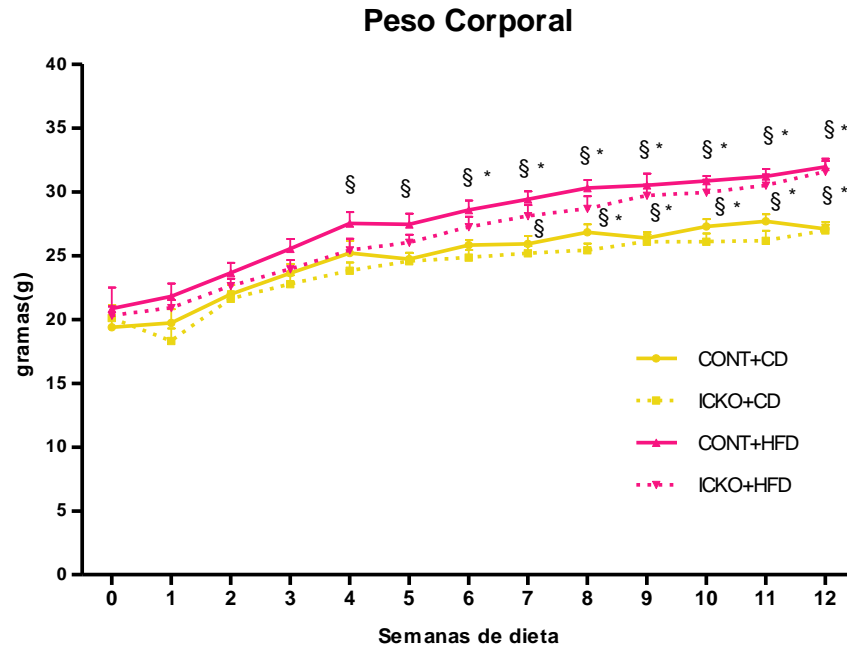
Fonte: A autora, 2014.

3.5 Obesidade induzida por dieta hiperlipídica

A média do peso corporal dos animais no início do protocolo de dieta foi de $20 \pm 0,5$ g. Após a distribuição randomizada destes animais entre os diferentes grupos de dieta, o peso corporal foi acompanhado semanalmente por 12 semanas seguidas. A partir da 7ª semana no protocolo de dieta, os animais submetidos à dieta hiperlipídica, CONT+HFD e ICKO+HFD, começaram a apresentar diferenças significativas no peso corporal quando comparados aos animais em dieta controle, CONT+CD e ICKO+CD ($28,1 \pm 0,8$ g e $29,4 \pm 0,6$ g vs. $25,9 \pm 0,6$ g e $25,1 \pm 0,5$ g; $p < 0,05$). Ao final do protocolo de 12 semanas de dieta a diferença atingiu valores máximos para os grupos CONT+HFD e ICKO+HFD quando comparados aos animais CONT+CD e ICKO+CD ($31,9,1 \pm 0,6$ g e $31,5 \pm 0,6$ g vs. $27,1 \pm 0,3$ g e $26,9 \pm 0,6$ g; $p < 0,05$).

Não houve diferença significativa no peso corporal relacionada com a presença ou ausência da ACC2 no coração (Figura 19). O mesmo foi observado em relação à quantidade de tecido adiposo epididimal (Figura 20) e retroperitoneal (Figura 21) com aumento significativo nos dois depósitos de gordura em ambos os grupos submetidos à dieta hiperlipídica, CONT+HFD e ICKO+HFD quando comparados aos grupos em dieta controle, CONT+CD e ICKO+CD ($1,832 \pm 0,3$ g e $2,465 \pm 0,19$ g vs. $0,511 \pm 0,03$ g e $0,712 \pm 0,09$ g; $p < 0,0001$). Estes resultados sugerem que os camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles responderam de forma similar à dieta hiperlipídica, e ambos desenvolveram obesidade em um grau leve esperado pelo período de exposição à dieta.

Figura 19 - Peso corporal de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles durante o período de 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

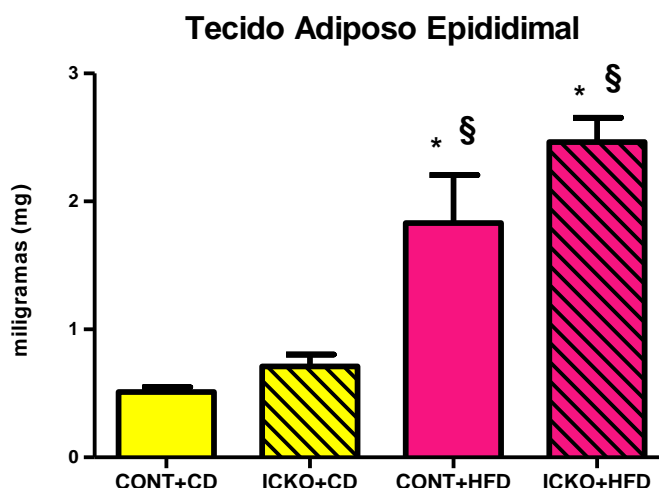


Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. * $p < 0.05$ vs CONT+CD. § $p < 0.05$ vs ICKO+CD. Foram utilizados de 6 a 9 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

Figura 20 - Tecido adiposo epididimal de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

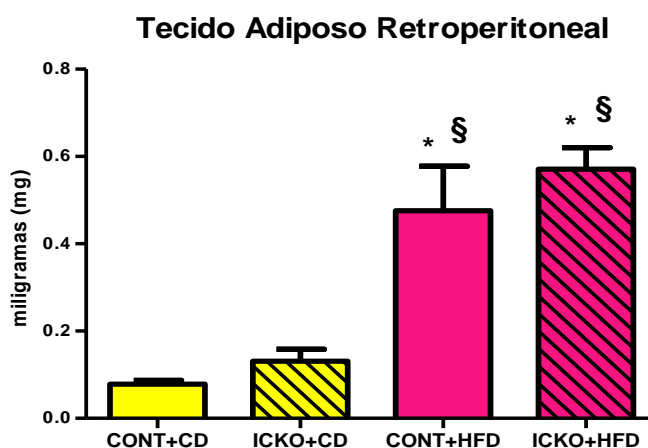


Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. * $p < 0.05$ vs CONT+CD. § $p < 0.05$ vs ICKO+CD. Foram utilizados de 5 a 12 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

Figura 21 - Tecido adiposo retroperitoneal de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.



Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

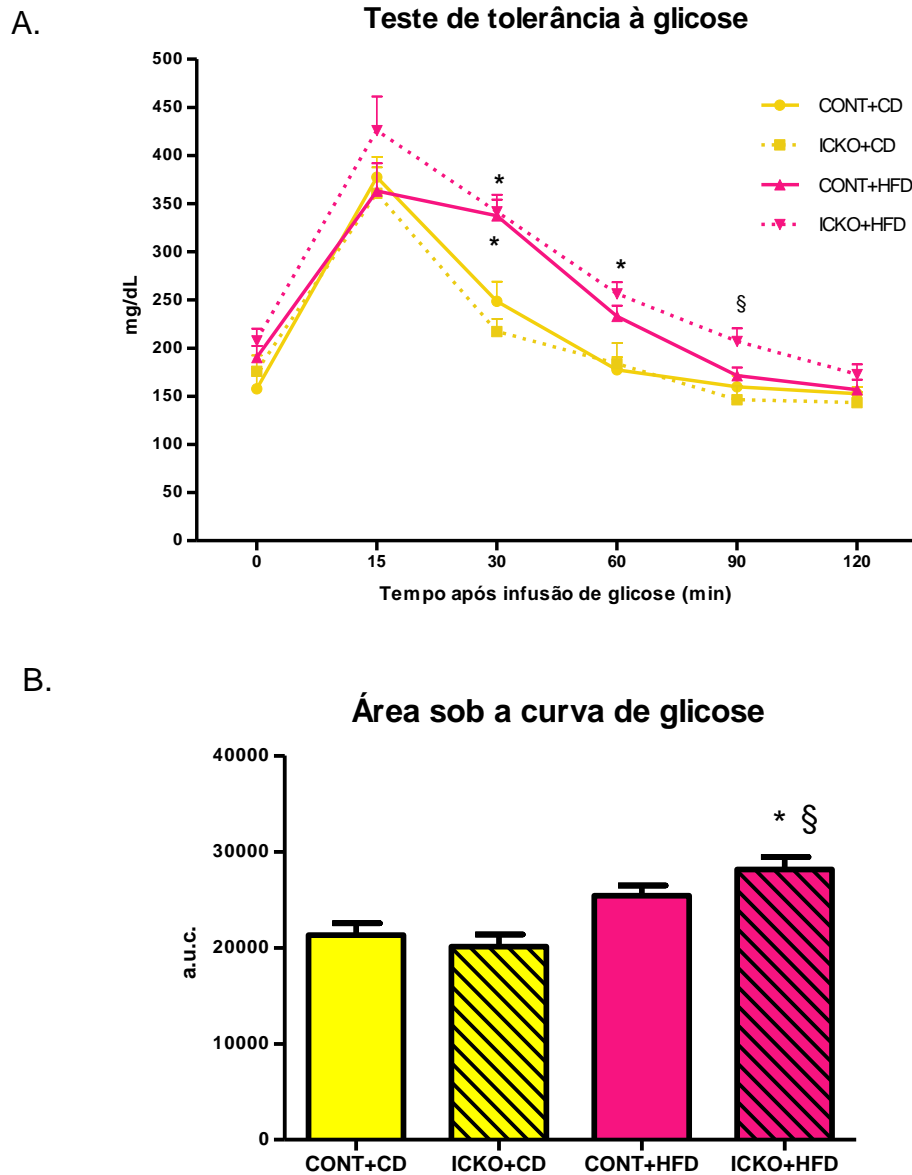
Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. * $p < 0.05$ vs CONT+CD. Foram utilizados de 5 a 12 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

3.6 Perfil metabólico de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica

Após o período de 12 semanas em dieta hiperlipídica ou controle, parte dos animais foram submetidos a jejum de 6 horas para a realização do teste de tolerância à glicose, e outros animais foram diretamente sacrificados e o sangue coletado para a realização de análises bioquímicas. Como esperado, foi observada uma clara intolerância à glicose nos animais que desenvolveram obesidade, independente do genótipo (Figura 22A). O teste de tolerância à glicose mostrou um aumento no tempo de queda das concentrações de glicose plasmática 30 minutos após a infusão de glicose para os grupos em dieta hiperlipídica CONT+HFD e ICKO+HFD quando comparados aos grupos CONT+CD e ICKO+CD (341,8±17,42 mg/dL e 337,4±16,7 mg/dL vs 248,8±20,27 mg/dL e 217,3±13,23 mg/dL; $p<0,05$). Quando avaliada a área sob a curva de glicose (Figura 22B) o grupo ICKO+HFD demonstrou uma maior área sob a curva quando comparado aos grupos em dieta controle, CONT+CD e ICKO+CD (28160±1290a.u.c. vs 21310±1243a.u.c e 20110±1282a.u.c; $p<0,05$), enquanto que o grupo CONT+HFD mostrou uma área maior somente quando comparado ao grupo ICKO+CD (25410±1079a.u.c. vs 21310±1243a.u.c; $p<0,05$). Em relação aos ácidos graxos livres (Figura 23) todos os grupos, ICKO+CD, CONT+HFD e ICKO+HFD apresentaram concentrações mais elevadas do que o grupo CONT+CD (0,2769±0,018mmol/L e 0,2142±0,025mmol/L e 0,2210±0,020mmol/L vs 0,1241±0,016mmol/L; $p<0,05$).

Figura 22 - Teste de tolerância à glicose em camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

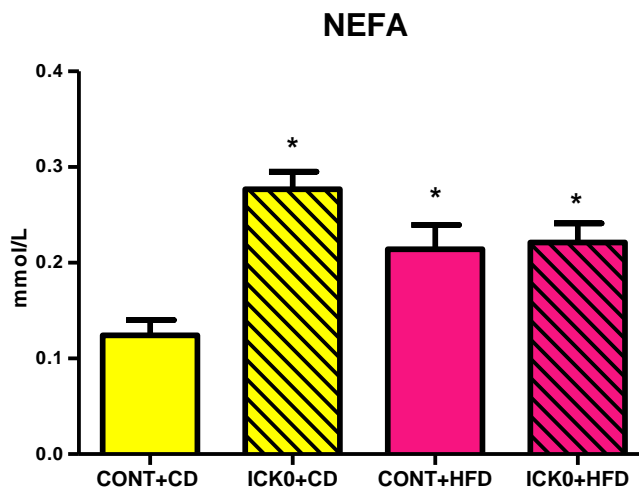


Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD. A. Teste de tolerância à glicose. B. Área sob a curva de glicose.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. * $p < 0.05$ vs CONT+CD. § $p < 0.05$ vs ICKO+CD. Foram utilizados de 5 a 9 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

Figura 23 - Concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (NEFA) em camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.



Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

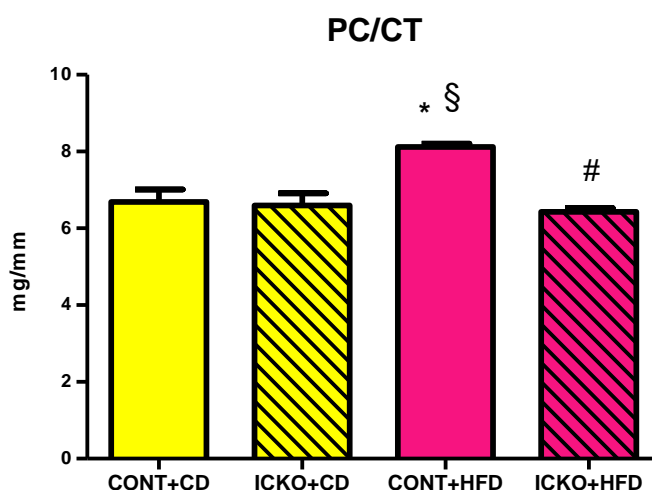
Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. * $p < 0.05$ vs CONT+CD. Foram utilizados de 4 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

3.7 Razão peso do coração pelo comprimento da tíbia de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica

Após as 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle os camundongos foram sacrificados e o coração removido para pesagem em balança de precisão. Os resultados demonstram que ao final de 12 semanas de dieta hiperlipídica houve um aumento na razão do massa do coração pelo comprimento da tíbia como demonstrado na Fig. 24 no grupo CONT+HFD quando comparado com os grupos CONT+CD, ICKO+CD e ICKO+HFD ($8,12 \pm 0,3$ mg/mm vs $6,68 \pm 0,3$ mg/mm e $6,60 \pm 0,3$ mg/mm e $6,43 \pm 0,1$ mg/mm; $p < 0,05$). Este resultado sugere, portanto, que a ingestão de dieta hiperlipídica por 12 semanas foi capaz de aumentar o peso do coração e que isso seria um sinal evidente de desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. O mesmo não aconteceu com os animais desprovidos de ACC2 no coração que não desenvolveram esse aumento na massa do coração quando submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica.

Figura 24 - Razão massa do coração pelo comprimento da tíbia de corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.



Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. #p<0.05 vs ICKO+CD. #p<0.05 vs CONT+HFD. §p<0.05 vs ICKO+CD. Foram utilizados de 4 a 7 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

3.8 Função cardíaca *in vivo* de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica

A função cardíaca foi avaliada através do método de Ecocardiografia após 12 semanas de dieta hiperlipídica e controle. O período de dieta utilizado não foi suficiente para demonstrar uma diferença significativa entre os grupos com a metodologia utilizada (Tabela 4).

Tabela 4 - Função cardíaca *in vivo* de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

	CONT+CD	ICKO+CD	CONT+HFD	ICKO+HFD
LVPW;s (mm)	1,19 ± 0,08	1,21 ± 0,05	1,42 ± 0,07	1,22 ± 0,09
LVID;d (mm)	3,08 ± 0,05	3,18 ± 0,10	3,16 ± 0,08	3,17 ± 0,10
LVPW;d (mm)	0,80 ± 0,04	0,88 ± 0,03	0,95 ± 0,07	0,87 ± 0,06
LVID;s (mm)	1,80 ± 0,05	1,87 ± 0,12	1,81 ± 0,09	1,78 ± 0,06
LVAW;d (mm)	0,94 ± 0,06	0,83 ± 0,04	0,93 ± 0,05	0,81 ± 0,05
LVAW;s (mm)	1,42 ± 0,07	1,33 ± 0,03	1,37 ± 0,04	1,38 ± 0,05
LV Vol;d (mm)	37,4 ± 1,6	40,8 ± 3,3	40,15 ± 2,7	40,4 ± 3,1
LV Vol;s (mm)	9,8 ± 0,7	11,4 ± 1,8	10,19 ± 5,4	9,7 ± 0,8
EF (%)	73,6 ± 1,2	72,96 ± 2,6	74,9 ± 2,1	76,09 ± 1,15
FS (%)	41,56 ± 1,1	41,2 ± 2,3	42,7 ± 1,8	43,83 ± 1,01
massa VE (mg)	88,33 ± 6,60	90,66 ± 4,53	103,4 ± 8,65	87,67 ± 6,04
massa VE corrigida (mg)	70,66 ± 5,2	72,53 ± 3,6	82,71 ± 6,9	70,08 ± 5,9

Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. Foram utilizados de 4 a 7 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

3.9 Função Cardíaca *ex vivo* de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica

A função cardíaca *ex vivo* foi avaliada durante a perfusão dos corações no sistema de perfusão retrógrada Langendorff, avaliando-se parâmetros hemodinâmicos a uma pressão de perfusão de 80 mmHg. Como demonstrado pela Tabela 5, a função contrátil isovolumétrica foi similar nos camundongos controles e *knockout* induzidos para ACC2 submetidos ou não a dieta hiperlipídica por 12 semanas.

Tabela 5 - A função cardíaca *ex vivo* de corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

	CONT+CD	ICKO+CD	CONT+HFD	ICKO+HFD
LVDevP (mmHg)	101,4 ± 7,17	105,7 ± 6,28	114 ± 9,41	120,8 ± 8,66
RPP (mmHg*bpm)	37430 ± 2555	37600 ± 1868	42090 ± 4443	43180 ± 5169
FC (bpm)	381,1 ± 14,88	344,1 ± 22,4	350,9 ± 14,74	354,9 ± 22,07
Máx dP/dt (mmHg/s)	4107 ± 217,3	4206 ± 268,4	5114 ± 353,9	4712 ± 513,5
Mín dP/dt (mmHg/s)	3005 ± 76,88	3135 ± 84,26	4028 ± 171,6	3841 ± 626,4
tau (s)	0,03 ± 0,007	0,04 ± 0,005	0,06 ± 0,001	0,05 ± 0,01
índice de contratilidade	84,69 ± 8,99	78,09 ± 10,88	85,01 ± 9,04	79,56 ± 8,68

Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. Foram utilizados de 3 a 4 animais por grupo.

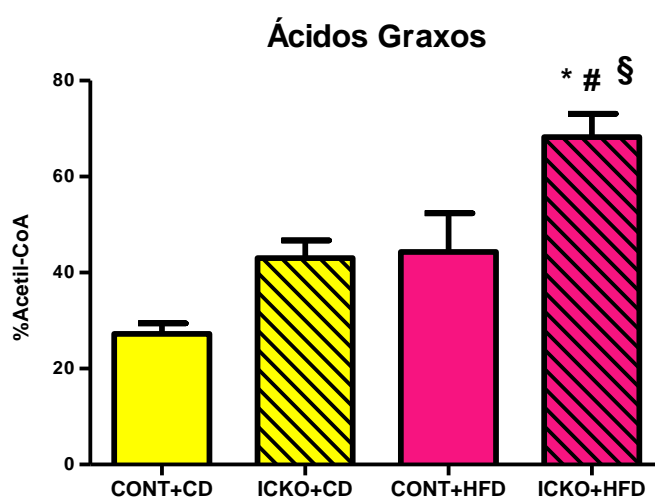
Fonte: A autora, 2014.

3.10 Utilização de substratos energéticos em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração submetidos à dieta hiperlipídica

Ao final das 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle, os corações foram isolados e perfundidos com solução marcada e posteriormente submetidos à análise de Espectroscopia ^{13}C NMR. A análise isotopométrica do espectra do carbono C3 e C4 do glutamato demonstrou que a contribuição dos ácidos graxos para acetil-CoA foi de aproximadamente 27,25±2,17% nos corações de camundongos controles com dieta controle, 44,33±8,00% nos corações de camundongos controles submetidos à dieta hiperlipídica, 43,00±3,67% nos corações de camundongos *knockout* condicionais para ACC2 específica do coração em dieta controle e 68,25±4,87% nos corações de camundongos *knockout* condicionais para ACC2 específica do coração em dieta hiperlipídica (Figura 25). Esses resultados demonstram um efeito da dieta e do genótipo na oxidação de ácidos graxos com um aumento importante e significativo ($p<0,05$) quando a dieta hiperlipídica foi combinada à deleção da ACC2 no coração. A contribuição de glicose foi a mesma para os grupos em dieta controle, CONT+CD e ICKO+CD, e no grupo CONT+HFD e significativamente menor no grupo ICKO+HFD (21,50±1,93% e 20,00±3,83% e 20,67±4,70% vs 7,25±0,1%; $p<0,05$) (Figura 26). Em relação

aos substratos não marcados, tanto os grupos em dieta hiperlipídica, CONT+HFD e ICKO+HFD, como o grupo ICKO+CD apresentaram uma menor contribuição de ácidos graxos não marcados quando comparados aos animais CONT+CD ($33,67 \pm 3,48\%$ e $23,25 \pm 3,19\%$ e $35,75 \pm 4,30\%$ vs $50,75 \pm 2,39\%$; $p < 0,05$) (Figura 27).

Figura 25 - Contribuição relativa de ácidos graxos para Acetil-CoA em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

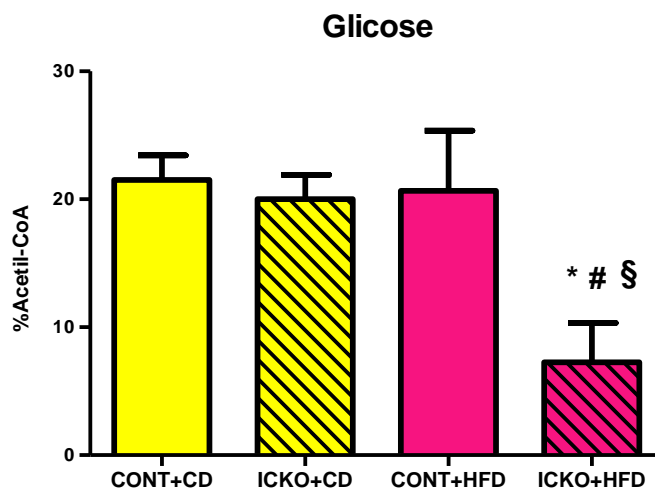


Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. * $p < 0,05$ vs CONT+CD. # $p < 0,05$ vs CONT+HFD. § $p < 0,05$ vs ICKO+CD. Foram utilizados de 3 a 4 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

Figura 26 - Contribuição relativa de glicose para Acetil-CoA em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

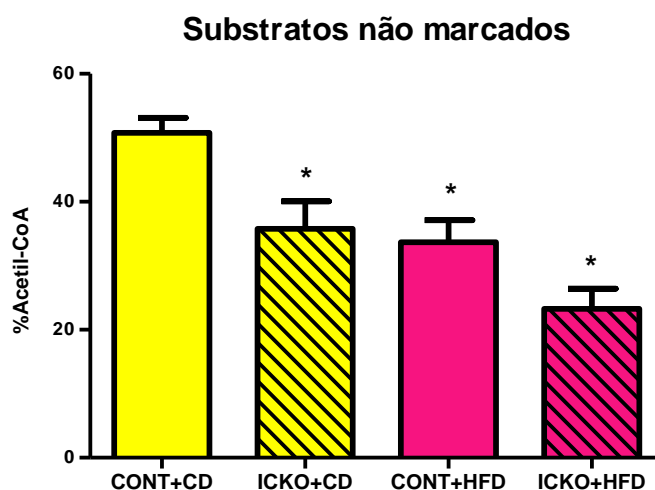


Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. *p<0.05 vs CONT+CD. #p<0.05 vs CONT+HFD. §p<0.05 vs ICKO+CD. Foram utilizados de 3 a 4 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

Figura 27 - Contribuição relativa de substratos não marcados para Acetil-CoA em camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.



Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

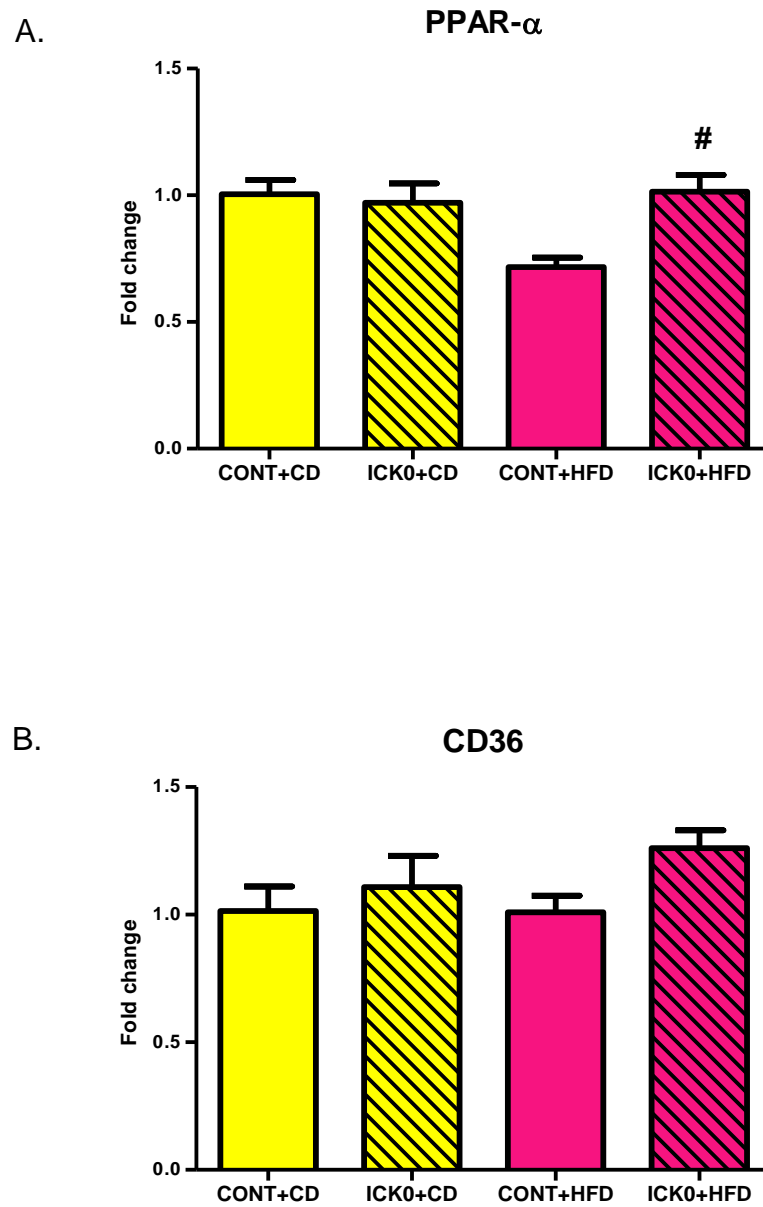
Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. *p<0.05 vs CONT+CD. Foram utilizados de 3 a 4 animais por grupo.

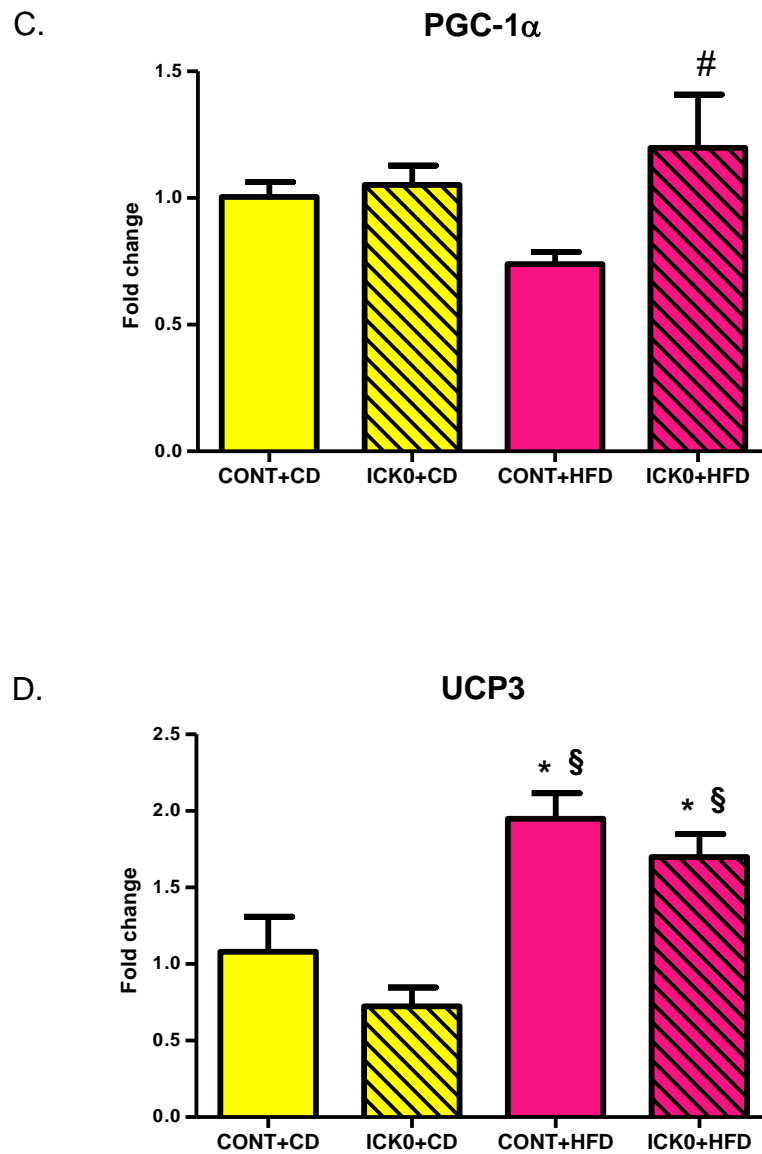
Fonte: A autora, 2014.

3.11 Remodelamento metabólico a nível molecular de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração submetido à dieta hiperlipídica

Para determinar os mecanismos moleculares responsáveis pelas mudanças na preferência de substratos causada por alterações em longo prazo de substratos disponíveis para o coração, uma sequência de genes que têm função importante na utilização de substratos, função mitocondrial e estresse oxidativo pelo coração foram avaliados após as 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle. O receptor peroxissomo proliferador-ativado α (PPAR- α), que é considerado um importante controlador transcripcional do metabolismo de ácidos graxos, apresentou-se diminuído no grupo CONT+HFD quando comparado ao grupo ICKO+HFD ($0,71 \pm 0,03$ vs. $1,0 \pm 0,06$; $p < 0,05$) (Figura 28A). Outro gene alvo do PPAR- α , o transportador de ácido graxo CD36, não se mostrou diferente entre nenhum dos grupos estudados com dieta hiperlipídica ou controle (Figura 28B). O mesmo ocorreu com o regulador positivo de biogênese e respiração mitocondrial (PGC1) com uma aparente diminuição, porém não significativa ($p = 0,06$), no grupo CONT+HFD quando comparado com os grupos CONT+CD, ICKO+CD e ICKO+HFD demais grupos ($0,73 \pm 0,04$ vs. $1,00 \pm 0,06$ e $1,05 \pm 0,07$ e $1,19 \pm 0,2$) (Figura 28C). Como esperado, os níveis da proteína desacopladora UCP3 estavam aumentados nos grupos submetidos à dieta hiperlipídica, CONT+HFD e ICKO+HFD, quando comparados ao grupo CONT+CD e ICKO+CD ($1,94 \pm 0,16$ e $1,69 \pm 0,15$ vs. $1,08 \pm 0,06$ e $0,72 \pm 0,12$) (Figura 28D). A enzima anti-oxidante SOD2 estava aumentada somente no grupo ICKO+CD quando comparado com CONT+HFD ($1,18 \pm 0,05$ vs. $0,86 \pm 0,03$) (Figura 29). A expressão gênica de Bax, que é um marcador para apoptose, também não foi diferente entre os grupos estudados (Figura 30). Em relação aos genes relacionados com hipertrofia cardíaca, os níveis de BNP não apresentaram diferenças entre os grupos comparados, (Figura 31A) enquanto que a expressão gênica do ANP estava reduzida no grupo CONT+HFD quando comparado ao grupo CONT+CD ($0,71 \pm 0,06$ vs. $1,00 \pm 0,04$). O mesmo ocorreu quando comparou-se os grupo em dieta hiperlipídica, CONT+HFD e ICKO+HFD, com ICKO+CD ($0,71 \pm 0,06$ e $0,79 \pm 0,06$ vs. $1,08 \pm 0,05$) (Figura 31B).

Figura 28 - Expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, biogênese e função mitocondrial, em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle



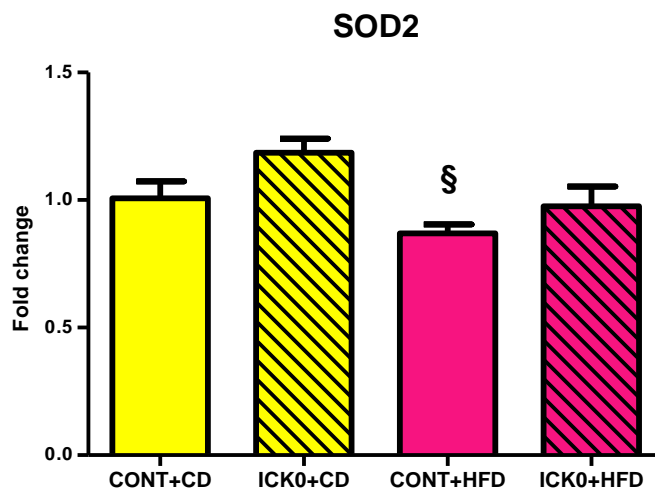


Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD. A. Níveis de expressão gênica mRNA do fator transcripcional PPAR- α . B. Níveis de expressão gênica mRNA do transportador de ácidos graxos CD36. C. Níveis de expressão gênica mRNA do PGC1. D. Níveis de expressão gênica mRNA da UCP3.

Nota: Os dados foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0.05$ vs CONT+CD. § $p < 0.05$ vs ICKO+CD. Foram utilizados de 4 a 6 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014

Figura 29 - Expressão gênica da enzima antioxidante SOD em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

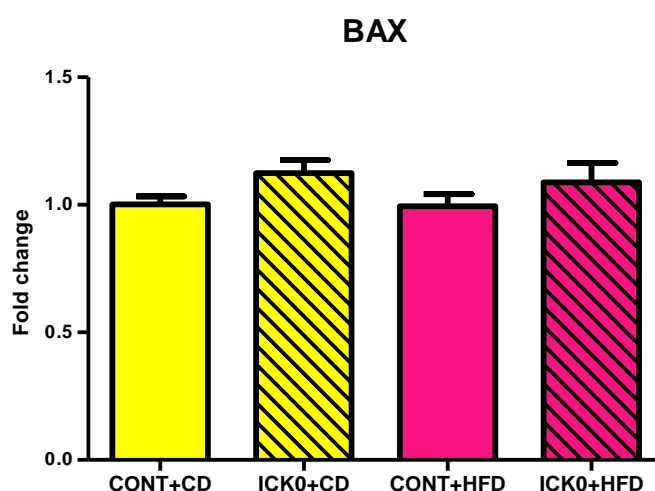


Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. Foram utilizados de 4 a 6 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014

Figura 30 - Expressão gênica do gene pró-apoptótico BAX em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle



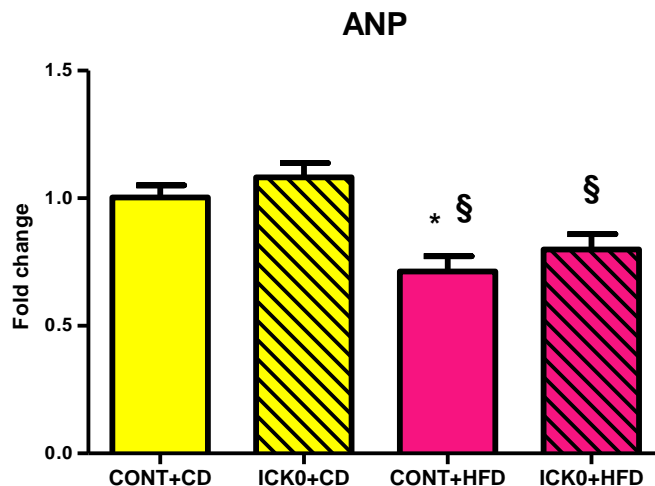
Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais *knockout* em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais *knockout* em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD.

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. §p<0.05 vs ICKO+CD. Foram utilizados de 4 a 6 animais por grupo.

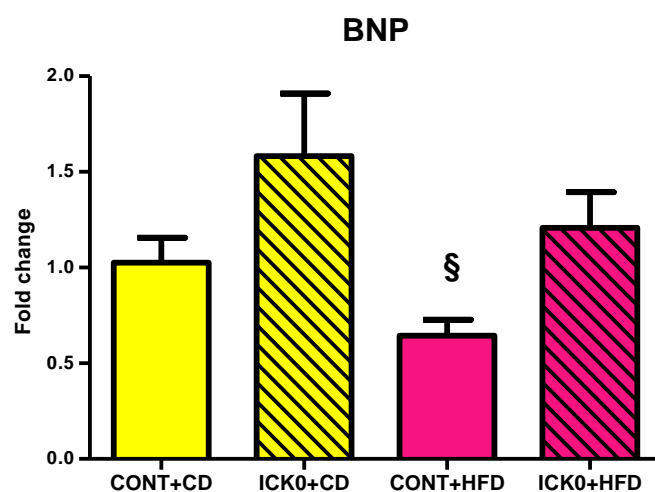
Fonte: A autora, 2014

Figura 31 - Expressão gênica de genes relacionados com hipertrofia cardíaca em corações de camundongos *knockout* induzidos para ACC2 específica do coração e controles submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica ou controle.

A.



B.



Legenda: animais controles em dieta controle, CONT_CD; animais knockout em dieta controle, ICKO+CD; animais controles em dieta hiperlipídica, CONT+HFD; animais knockout em dieta hiperlipídica, ICKO+HFD. A. Níveis de expressão gênica mRNA do peptídeo natriurético atrial (ANP). B. Níveis de expressão gênica mRNA do peptídeo natriurético cerebral (BNP).

Nota: Os dados foram expressos como média±EPM. *p<0.05 vs CONT+CD. §p<0.05 vs ICKO+CD. Foram utilizados de 4 a 6 animais por grupo.

Fonte: A autora, 2014.

4 DISCUSSÃO

A obesidade afeta o sistema cardiovascular diretamente através de alterações no metabolismo energético do coração. Estudos recentes em modelos animais e humanos indicam que o excesso calórico crônico leva a um acúmulo de lipídios no cardiomiócito, aumento nas taxas de oxidação de ácidos graxos e, posteriormente, pode desencadear uma disfunção respiratória mitocondrial e cardiomiopatia lipotóxica. Com base nessas informações, a questão principal do trabalho foi responder se a incompatibilidade entre o fornecimento e a oxidação lipídica seria o mecanismo chave da lipotoxicidade cardíaca, com consequente desenvolvimento de hipertrofia e insuficiência cardíaca em condições de obesidade. As mudanças no metabolismo energético ocorrem anteriormente ao desenvolvimento da cardiomiopatia (Aasum et al., 2003; Buchanan et al., 2005), e dependem da severidade do método utilizado para induzir obesidade e diabetes e precisão de métodos para avaliação da função cardíaca. É possível que haja alterações na estrutura cardíaca anteriormente a um prejuízo da função, e esse seria um momento chave importante para uma manipulação em termos de metabolismo.

O modelo de deleção gênica induzida é um modelo que permite o controle temporal e espacial da expressão de uma mutação gênica pré-determinada. Tem como vantagens sobre os outros sistemas de deleção, o fato de ultrapassar os limites de letalidade embrionária e mecanismos compensatórios observados em modelos tradicionais *knockout* desde o início da vida (Koitabashi et al. 2009). No entanto, apesar de ser um sistema sofisticado, ele é de difícil manuseio e exige o estabelecimento de um ponto ótimo entre a dose de tamoxifeno utilizada e o grau de deleção da proteína de interesse, sem que ocorram prejuízos para a função cardíaca (Jaisser, 2000).

Com base na literatura, realizamos uma série de testes, com diferentes doses e tempos de tratamento, para que fosse caracterizada a menor dose necessária para a deleção significativa da proteína com seu efeito funcional evidente. Nossos resultados demonstraram que uma dose de 100mg/kg administrada no decorrer de 5 dias foi capaz de remover significativamente a proteína ACC2, com um aumento significativo na oxidação de ácidos graxos no coração após 4 semanas do início da primeira injeção de tamoxifeno, e sem que houvesse prejuízos na função cardíaca. O mesmo não ocorreu com uma dose mais baixa de 60mg/kg dividida em 3 dias de administração. O efeito de deleção na proteína não foi tão expressivo e não foi observado efeito funcional de aumento na oxidação de ácidos graxos.

Esses achados corroboram com diferentes estudos que utilizaram a técnica de knockout induzida específica para o coração e que mostram a necessidade de uma dose ótima para que haja deleção significativa da proteína, sem que haja um comprometimento na função cardíaca (Jaisser et al., 2000; Koitabashi et al. 2009).

Em relação ao grau de estímulo para o aumento da oxidação de ácidos graxos, a diferença na oxidação de ácidos graxos entre os animais *knockout* induzidos e controles foi similar a demonstrada por Kolwicz et al (2012) que, por sua vez, utilizaram um modelo de deleção da ACC2 específica do coração desde o início da vida. Em ambos os modelos, o aumento na oxidação de ácidos graxos não trouxe nenhum prejuízo para a função cardíaca, contrariando a idéia de que a oxidação aumentada de ácidos graxos seria a causadora da cardiomiopatia lipotóxica. Juntos, nossos resultados mostram que o coração é capaz de sustentar aumentos crônicos na oxidação de ácidos graxos quando o fornecimento destes substratos é mantido, e que o equilíbrio entre o fornecimento e oxidação seria o fator mais importante para que se mantenha uma função cardíaca normal.

Por muito tempo acreditou-se que altas taxas de oxidação de ácidos graxos seriam prejudiciais em todas as situações, como é de fato no dano de reperfusão cardíaca. No entanto, nunca foi demonstrada uma ligação direta entre o aumento na oxidação de ácidos graxos e a insuficiência cardíaca. Além disso, estudos recentes sugerem que uma dieta hiperlipídica poderia proteger contra o desenvolvimento da insuficiência cardíaca em modelos de ratos (Okere et al., 2006; Rennison et al., 2007; Chess et al., 2009), o que coincide com dados em que pacientes obesos com insuficiência cardíaca apresentam mortalidade reduzida (Kalantar-Zadeh et al., 2004; Oreopoulos et al., 2008). Essas observações contradizem a idéia sobre o aumento na oxidação de ácidos graxos como sendo prejudicial, e causador da insuficiência cardíaca relacionada a obesidade. A associação negativa, quando presente, vem de um excesso na captação de ácidos graxos ultrapassando a capacidade de oxidação, como observado por estudos que propuseram um aumento na oxidação de ácidos graxos através da estimulação do fator transcripcional PPAR- α (Finck et al., 2002; 2007; Park et al., 2005). O estímulo crônico do PPAR- α no coração mostrou efeitos deletérios, devido a forte estimulação paralela de captação de ácidos graxos excedendo a capacidade de oxidação e levando o animal a ser considerado um modelo animal para cardiomiopatia lipotóxica (Finck et al., 2002). De modo diferente, quando os camundongos MHC-PPAR- α foram acasalados com camundongos deficientes para CD36 (MHC-PPAR- α /CD36-/-), este efeito deletério de aumento na oxidação de ácidos graxos se extinguiu. A deficiência para CD36 contrabalanceou o efeito da estimulação do PPAR- α em nível de captação, e assim, preveniu o acúmulo de

triglicerídeos no miócito e disfunção cardíaca após uma dieta hiperlipídica (Yang et al., 2007), no entanto, não conseguiu prevenir uma hipertrofia cardíaca.

Com base nesses achados, a escolha da ACC2 como alvo potencial na prevenção da hipertrofia cardíaca induzida por obesidade poderia, de modo diferente do modelo anterior, aumentar a oxidação de ácidos graxos diretamente a nível mitocondrial. O objetivo foi justamente promover um aumento, suficiente e completo (Goldberg, Trent e Schulze et al., 2012), na oxidação de ácidos graxos sem que houvessem alterações na captação de ácidos graxos ou aumento na oxidação de glicose, uma vez que essas alterações apesar de prevenirem a disfunção ventricular, não preveniram a hipertrofia cardíaca.

Uma vez caracterizado o modelo, os animais foram submetidos a uma dieta hipercalórica e hiperlipídica com 60% das calorias derivadas da gordura do leite ou uma dieta controle normocalórica e normolipídica com apenas 16,8% das calorias derivadas da gordura. A dieta escolhida foi adotada por seus efeitos deletérios rápidos na função cardíaca, com um fenótipo mais severo para cardiomiopatia diabética do que a dieta com banha, como demonstrado por um estudo publicado recentemente por Russo et al. (2012). Os animais selvagens C57BL/6J que foram submetidos à dieta hiperlipídica derivada do leite desenvolveram hiperglicemia e resistência à insulina em um período de apenas 8 semanas. Enquanto que os animais alimentados com dieta à base de banha não desenvolveram rapidamente esses mesmos defeitos metabólicos. A dieta tenta replicar o perfil lipídico observado em diabéticos do tipo 2 que possuem maior conteúdo de triglicerídeos de baixo número de carbono e ligação dupla quando comparado com triglicerídeos de alto número de carbono e dupla ligação (Rhee et al., 2011). Nesse caso, o leite como fonte de gordura tem como característica os altos níveis de gordura saturada e baixos níveis de gordura insaturada.

Além disso, estudos epidemiológicos e experimentais mostram que o consumo de gordura derivada do leite está associado à resistência à insulina e síndrome metabólica (Wenk, 2005; Wopereis et al., 2009; Zhao et al., 2009). O mesmo foi demonstrado no presente estudo com um aumento significativo na massa corporal, conteúdo de tecido adiposo e ácido graxos não esterificados (NEFA) de animais submetidos a 12 semanas de dieta hiperlipídica. O fato de apresentar ou não ACC2 não modificou os resultados, demonstrando assim, que todos os animais responderam de modo similar aos efeitos da dieta hiperlipídica, e ambos desenvolveram obesidade. E contrapondo-se ao modelo de deleção total de ACC2 que são resistentes à obesidade induzida por dieta e mostram sensibilidade insulínica melhorada (Abu-Elheiga et al., 2003; Choi et al., 2007). A ausência da ACC2 somente no coração não influenciou na resposta do teste de tolerância à glicose, mostrando que os animais *knockout*

induzidos desenvolveram uma intolerância à glicose similar aos animais controles submetidos à mesma dieta.

Nesse quadro de concentrações aumentadas de ácidos graxos circulantes e provável resistência à insulina, há uma importação maior de ácidos graxos para o miocárdio, que ultrapassa a maior capacidade do miócito resistente à insulina em oxidar ácidos graxos (Paulson e Crass, 1982). Nesse momento se inicia o estágio de acúmulo de lipídio no cardiomiócito na forma de triacilglicerol e outras espécies lipídicas, contribuindo para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e, posteriormente, disfunção ventricular (Paulson e Crass, 1982; Chiu et al., 2001; Fink et al., 2002; 2003; Szczepaniak et al., 2003; O'Connor et al., 2009; Goldberg, Trent e Schulze, 2012). Assim, acreditamos que os animais controles após 12 semanas de dieta hiperlipídica desenvolveriam um quadro inicial de cardiomiopatia lipotóxica e que a ausência da ACC2 no coração poderia, em algum nível, prevenir essa condição mesmo desenvolvendo um padrão similar de obesidade sistêmica.

Essas observações colocam a ACC2 como um alvo bastante atrativo para o tratamento da obesidade (Harwood, 2005; Tong e Harwood, 2006), porém além de uma dificuldade no desenvolvimento de medicamentos inibidores para ACC2 existe a preocupação de que a estimulação da oxidação de ácidos graxos seja prejudicial ao coração por razões discutidas anteriormente. Estudos demonstraram que o aumento na oxidação de ácidos graxos em corações de camundongos db/db estão associados com uma baixa eficiência de O₂ em corações isolados e desacoplamento da respiração mitocondrial em fibras musculares permeabilizadas (Boudina et al., 2007). O mesmo foi confirmado por nosso laboratório em um modelo de hiperalimentação durante a lactação e obesidade induzida por dieta hiperlipídica (Neves et al., 2013). No entanto, é importante ressaltar que o aumento na oxidação de ácidos graxos nem sempre é suficiente e esta oxidação pode estar sendo incompleta (Koves et al., 2005; Goldberg, Trent e Schulze, 2012), com os ácidos graxos sendo parcialmente degradados, e formando assim metabólitos tóxicos para a célula.

Diante disso, nossos resultados demonstram que uma dieta hiperlipídica por 12 semanas aumenta a oxidação de ácidos graxos de modo similar ao observado nos animais knockout induzidos para ACC2, sem uma redução significativa da oxidação de glicose. De modo diferente, quando esses animais com deleção induzida da ACC2 no coração foram submetidos à dieta hiperlipídica esse efeito de aumento na oxidação de ácidos graxos foi ainda mais expressivo, levando também a uma redução significativa da oxidação de glicose, como observado nos modelos de camundongos nulos para ACC2 (Abu-Elheiga., 2001; Choi

et al., 2007; Essop et al., 2008) e com deleção específica no coração desde o início da vida (Kolwicz et al., 2012).

Como resposta a questão sobre o aumento na oxidação de ácidos graxos como sendo prejudicial, a função cardíaca foi avaliada *in vivo* através da técnica de ecocardiografia no momento anterior ao início das injeções de tamoxifeno e 4 semanas depois deste procedimento, momento correspondente ao efeito do aumento na oxidação de ácidos graxos. Nenhuma, diferença foi encontrada nos valores de fração de ejeção, fração de encurtamento, massa ventricular esquerda, LVPW;d, LVPW;s, LVID;d, LVID;s para os animais knockout condicionais quando comparados aos animais controles. O mesmo foi confirmado pelos resultados da função cardíaca *ex vivo* avaliada durante a perfusão dos corações no sistema de perfusão retrograda langendorff. Confirmando, portanto, que não houve efeitos negativos sobre a função cardíaca após a indução da deleção da proteína ACC2 através do regime de tamoxifeno, assim como a extinção da ACC2 não ocasionou alterações funcionais e/ou estruturais do coração.

De maneira diferente, quando os animais foram submetidos ao protocolo de dieta hiperlipídica, os animais também não apresentaram alterações funcionais significativas como demonstrado pelos resultados de ecocardiografia, no entanto, apresentaram um aumento significativo na massa ventricular esquerda quando esse coração foi submetido à pesagem após o sacrifício. Neste sentido, a correlação entre a estimativa da massa ventricular esquerda e o peso do coração avaliado por necrópsia após cirurgia de constrição da aorta transversa já é bem conhecida (Collins et al., 2001).

Esse resultado sugere o desenvolvimento de uma leve hipertrofia cardíaca nos animais controles submetidos a um protocolo de 12 semanas de dieta hiperlipídica. De fato, evidências sugerem que a gordura do leite, e seu constituinte principal podem promover hipertrofia e disfunção cardíaca (Riquelme, 2011). Isso é confirmado por estudos epidemiológicos que avaliaram o padrão alimentar de indivíduos e constataram que o alto consumo de alimentos derivados do leite estava associado positivamente com a incidência de insuficiência cardíaca e mortalidade por doença cardiovascular (Yamagishi, Nettleton e Folsom, 2008; Warensjo et al., 2008; Liu et al., 2009; Cunha et al., 2009). O mesmo foi observado por Russo et al (2013) que submeteram os animais à dieta hiperlipídica por 15 semanas e 18 semanas e os mesmos desenvolveram hipertrofia cardíaca confirmada também pela avaliação de ecocardiografia e área de secção transversal do cardiomiócito.

A técnica de ecocardiografia é considerada padrão ouro para avaliação da função e estrutura do coração, no entanto, pequenas alterações iniciais na estrutura, sem

comprometimento de função são de difícil detecção pelo método (Feigenbaum, 1994). Dentre os fatores que merecem maior cuidado de avaliação são as medidas de espessura da parede do ventrículo que podem ser bastante variáveis como demonstrado por Yang et al (1999). Assim, o aumento evidente na massa do coração, juntamente com os resultados mesmo não significativos de ecocardiografia, nos dão sustentação para sugerir o desenvolvimento inicial de uma hipertrofia cardíaca após 12 semanas de dieta hiperlipídica.

De modo interessante, os corações com ausência da ACC2 apresentaram características estruturais e funcionais similares aos animais em dieta controle, sugerindo, portanto, que a deleção da ACC2 durante o desenvolvimento da obesidade foi capaz de conter o desenvolvimento de uma hipertrofia cardíaca inicial associada à obesidade induzida por dieta hiperlipídica, baseada na gordura do leite. Esses resultados são consistentes com o que foi observado por Kolwicz et al (2012) por meio de indução de hipertrofia e insuficiência cardíaca por constrição da aorta transversa (TAC). De maneira diferente, quando Finck et al (2002) apostaram em um aumento na oxidação de ácidos graxos através de uma superexpressão de PPAR- α , houve um aumento concomitante do gene CD36, levando a efeitos deletérios importantes devido a forte estimulação de captação de ácidos graxos que provavelmente excede a capacidade de oxidação. Numa tentativa de evitar estes efeitos, os mesmos animais PPAR- α -/- foram acasalados com animais nulos para CD36, o que preveniu a disfunção ventricular observada pela ativação de PPAR- α , no entanto, não teve efeito sobre a hipertrofia cardíaca induzida por dieta hiperlipídica (Yang et al., 2007). Vale ressaltar que esses animais desenvolveram um padrão de utilização energética com preferência pela glicose. Nesse caso, o metabolismo energético do coração trocou seu substrato preferencial de ácidos graxos para glicose (Stanley et al., 2005; Nebauer, 2007), o que a curto prazo pode ser um mecanismo adaptativo. No entanto, em longo prazo, a geração de energia derivada da glicose não seria suficiente para sustentar a atividade ininterrupta do coração, assim como não contribuiria para o *clearance* dos ácidos graxos disponíveis. Diferente do que foi observado em nossos animais e por Kolwicz et al (2012), que tiveram um aumento muito expressivo na oxidação de ácidos graxos à custa de uma redução da oxidação de glicose. Esses resultados sugerem que os desarranjos metabólicos observados na cardiomiopatia lipotóxica tem origem na combinação inapropriada de abastecimento e oxidação de lipídios mais do que um simples aumento na oxidação de ácidos graxos.

Assim, em condições em que há um maior abastecimento de ácidos graxos para coração, como no caso da obesidade e diabetes, a melhor estratégia não seria reduzir a entrada de ácidos graxos para o interior da célula, mas sim direcionar esses ácidos graxos para uma

metabolização completa e eficiente que gere o mínimo de sobrecarga possível. É provável que o acúmulo de triglicerídeos não seja a causa da lipotoxicidade, mas sim um sinal de um metabolismo anormal de ácidos graxos. Neste sentido, diferentes estudos sugerem que a partição dos ácidos graxos para *pools* de triglicerídeos poderia prevenir os efeitos tóxicos de intermediários lipídicos tóxicos (Haemmerle et al., 2006; Schenk et al., 2007; O'Donnell et al., 2008).

A hipertrofia cardíaca é resultado de uma sobrecarga de trabalho no coração e está relacionada a uma série de condições patológicas que vão desde hipertensão, doença vascular, infarto do miocárdio, e cardiomiopatia lipotóxica (Levy et al., 1990; Lorell e Carabello, 2000). Dados clínicos mostram que a obesidade e a diabetes aumentam significativamente o risco para insuficiência cardíaca mesmo na ausência de doença vascular isquêmica e hipertensão (Alpert e Hashimi, 1993; Duflo et al., 1995). Os mecanismos básicos poderiam ser captação aumentada de lipídio ou função oxidativa mitocondrial prejudicada, levando a um acúmulo de triglicerídeos e espécies tóxicas lipídicas, como as ceramidas, que causam a perda de miócito por apoptose, indução de iNOS, e sinalização pró-apoptótica (Sparagna et al., 2000; Unger e Orci, 2001) ou o acúmulo de lipídios em tecidos não adiposos alterando a expressão gênica e causando respostas inflamatórias sistêmicas (Sharma et al., 2004; Szczepaniak et al., 2007). Consistente com esses achados, o modelo de dieta hiperlipídica com base na gordura do leite induziu hipertrofia e cardiomiopatia que foram relacionadas com aumento de autofagia através da espécie específica de ceramida isoforma CerS (Russo et al., 2012). Com base nisso, nós verificamos a expressão gênica de Bax, que é um indicador de apoptose, em nossos animais. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos estudados, indicando que 12 semanas de dieta hiperlipídica não foram suficientes para ativar mecanismos pró-apoptóticos no tecido cardíaco.

Em nível celular, a hipertrofia cardíaca é caracterizada por um aumento no tamanho da célula e síntese protéica e reativação da programação genética fetal (Chien et al., 1993; Komuro e Yazaki, 1993; Sadoshima e Izumo, 1997). Nesse caso, a modificação na expressão de ANP e BNP é altamente correlacionadas a hipertrofia e insuficiência cardíaca (Langenickel et al., 2000; Luchner et al., 1998). No entanto, na obesidade, e quando se tem alteração no metabolismo lipídico cardíaco, observa-se uma produção reduzida de ANP e BNP nos ventrículos em condições de hipertrofia cardíaca com ou sem prejuízo de função. Esse efeito contrário de redução na ANP foi associado a um acúmulo lipídico intracelular (Bartels et al., 2010). Desta forma, nossos resultados confirmam essa redução de ANP nos animais CONT submetidos a dieta hiperlipídica quando comparados aos animais CONT em dieta Controle. E,

assim, enfatizam que a preservação da estrutura cardíaca, através da manipulação da ACC2, provavelmente se deu por uma contenção no acúmulo de lipídios dentro do miocárdio.

Em relação à expressão de genes envolvidos na utilização de substratos energéticos, um padrão equivalente ao demonstrado na hipertrofia cardíaca foi observado nos animais controles submetidos à dieta hiperlipídica por 12 semanas. Nossos resultados demonstram uma redução na expressão gênica do regulador central da oxidação de ácidos graxos PPAR- α após 12 semanas de dieta hiperlipídica nos animais CONT quando comparados aos ICKO. Neste sentido, os estudos mostram que com o progresso da Diabetes um estresse adicional é imposto ao coração e adaptações prejudiciais metabólicas ocorrem. Nesse caso, após um aumento (*upregulation*) inicial de PPAR- α , uma queda subsequente ocorre na expressão de PPAR- α , limitando assim a capacidade de oxidação do coração (Taegtmeyer et al., 2004). O mesmo foi observado em modelos animais de hipertrofia e insuficiência cardíaca, com uma redução não apenas no PPAR- α como também do regulador central da biogênese mitocondrial PGC1 α (Barger et al., 2000; Lehman e Kelly, 2002a; 2002b; Arany et al., 2006; Akki, Smith e Seymour, 2008), sugerindo que a desativação do complexo PPAR/PGC-1 α no coração insuficiente coincide com o remodelamento metabólico.

Por outro lado, nem todos os estudos foram capazes de detectar um declínio em fatores regulatórios como o PGC1 α mesmo em condições de insuficiência cardíaca instalada (Lionetti et al., 2005). Os animais *knockout* induzidos para ACC2 no coração não apresentaram essa redução na expressão gênica de PPAR- α e PGC1 α , sugerindo, portanto, que a prevenção da hipertrofia cardíaca observada nesses animais teria relação com a manutenção dos níveis de PPAR- α e PGC-1 α . Corroborando esses achados, um estudo realizado em porcos demonstrou que a utilização de um agonista para PPAR- α desacelerou a progressão de uma disfunção ventricular esquerda induzida por taquicardia, porém os efeitos sobre a oxidação de ácidos graxos não foi avaliada (Brigadeau et al., 2007). A idéia é que a ausência de PPAR- α leva a uma incapacidade do coração em compensar sua atividade para o aumento na carga de trabalho, predispondo o coração a momentos de privação energética (Campbell et al., 2002; Luptak, 2005). Consistente com esses resultados, corações hipertróficos com prejuízo na oxidação de ácidos graxos e deficiência energética apresentam redução nos níveis do fator transcripcional PPAR- α (Finck, 2007). Além disso, os camundongos nulos para PPAR- α exibem expressão aumentada do transportador de glicose GLUT4, aumento na captação e dependência de glicose para produção de ATP (Campbell et al., 2002; Panagia et al., 2005). Por outro lado, os animais que superexpressam PPAR- α , quando submetidos à dieta hiperlipídica desenvolveram um padrão característico de

cardiomiopatia lipotóxica. O mesmo ocorre em estudos que utilizaram agonistas para PPAR- α demonstrando que é possível prevenir a redução na oxidação de ácidos graxos observada na insuficiência cardíaca, porém sem melhora da função cardíaca prejudicada pela insuficiência cardíaca em cães e ratos (Morgan et al., 2006; Labinsky et al., 2007).

Nesse caso, podemos, mais uma vez, concluir que um aumento na oxidação de ácidos graxos, concomitante a uma redução na oxidação de glicose, via inativação da ACC2, teve efeito positivo sobre o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca através de uma ativação, suficiente e não exagerada, do PPAR- α . Desta forma, o que ocorreu em nível de expressão gênica relacionado à utilização de substratos energéticos no modelo proposto, foi diferente ao que se verificou no primeiro modelo animal geneticamente modificado para aumento na oxidação de ácidos graxos através da superexpressão de PPAR- α (Finck et al., 2002). Em contra partida, a expressão da proteína desacopladora mitocondrial predominante no tecido cardíaco, UCP3 após 12 semanas de dieta hiperlipídica foi similar ao demonstrado no modelo de superexpressão de PPAR- α . O mesmo ocorreu com os animais que não expressavam a ACC2, o que mostra uma não modificação no desacoplamento mitocondrial induzido por efeito da ausência da ACC2. Consistente com esses resultados, diferentes estudos mostram que os níveis de expressão gênica para UCP3 estão sistematicamente aumentados quando associados a qualquer aumento originado via lipólise no tecido adiposo (jejum ou exercício) ou da dieta (dieta hiperlipídica) (Brun et al., 1999; Chou et al., 2001; Schrauwen et al., 2002).

E apesar de várias evidências apontarem para o PPAR- α como o principal agente na indução da UCP3 em resposta aos ácidos graxos, em nossos animais submetidos à dieta hiperlipídica essa associação não foi positiva, apontando para um possível mecanismo ainda não conhecido em termos de ativação positiva ou negativa da UCP3. Uma possibilidade é que esse aumento na UCP3 nos animais controles submetidos à dieta hiperlipídica estaria mais relacionado a um aumento mais expressivo das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Boudina et al., 2007). O aumento no estresse oxidativo é reconhecido como um importante mediador no contexto das doenças cardiovasculares (Dhalla et al., 2000; Schnabel et al., 2007). Evidências recentes sustentam importantes funções fisiopatológicas de vias de sinalização redox-sensíveis no processo central da hipertrofia cardíaca (Seddon et al., 2007; Takimoto et al., 2007; Maulik et al., 2012).

Acredita-se que o excesso de lipídios e ácidos graxos, através de acil-CoAs de cadeia longa, resultam em níveis aumentados de ceramidas, que por sua vez podem induzir o acúmulo de ROS, indução de óxido nítrico-sintase induzida (iNOS) e apoptose (Unger e Orci, 2001). Isso é confirmado pela estimulação de fatores pró- apoptóticos membros da família

Bcl-2. Por outro lado, os efeitos tóxicos do acúmulo de ROS sob condições fisiológicas, podem ser prevenidos por enzimas como superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHPx), e catalase assim como outros antioxidantes não enzimáticos (Tsutsui, 2011). Pensando nisso, nós avaliamos a expressão gênica da enzima antioxidante SOD e do marcador de apoptose Bax e não encontramos diferenças entre os grupos estudados, sugerindo, portanto, que os efeitos de 12 semanas de dieta hiperlipídica promoveram um quadro leve de hipertrofia cardíaca, consistente com um não comprometimento visível da função cardíaca.

Esses resultados fortalecem a idéia de que o aumento na oxidação de ácidos graxos no coração não é prejudicial e pode ser benéfico, em circunstâncias de desequilíbrio no metabolismo como é o caso da obesidade e diabetes. No entanto, os mecanismos para essa preservação da flexibilidade metabólica induzida pela inativação da ACC2 ainda precisam ser mais bem esclarecidos. Nossos resultados sugerem que a deleção da ACC2 modifica o remodelamento metabólico na hipertrofia cardíaca através de uma comunicação entre mitocôndria e núcleo. E demonstram que o eixo ACC2-Malonil-CoA-mCPT1 seria alvo viável na modulação de ácidos graxos e equilíbrio metabólico do coração em condições em que se tem uma desconexão entre o fluxo de ácido cítrico tricarboxílico e a β -oxidação, como no caso da obesidade.

CONCLUSÕES

Com os resultados apresentados podemos concluir que aumentos na oxidação de ácidos graxos podem ser alcançados em corações de camundongos adultos através da deleção induzida da ACC2 no coração, sem a presença de qualquer efeito adverso na função cardíaca a curto e longo prazo. O modelo animal *knockout* induzido para ACC2 específica do coração requer aproximadamente 4 semanas após o início das injeções de tamoxifeno para que se remova a proteína ACC2. Essa informação nos permitiu desenhar o estudo no qual a oxidação de ácidos graxos pode ser aumentada em um período de tempo específico durante o desenvolvimento concomitante de obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Os resultados deste estudo demonstraram que um aumento na oxidação de ácidos graxos, resultante da inativação da ACC2, se contrapôs a disponibilidade aumentada de ácidos graxos durante a dieta hiperlipídica, resultando em um equilíbrio do metabolismo de lipídio e protegendo o coração contra a hipertrofia cardíaca. É a primeira vez que se investiga se a restauração da oxidação de ácidos graxos a nível mitocondrial permite a otimização do metabolismo energético na obesidade. Desta forma, o camundongo *knockout* induzido específico do coração mostrou-se uma ferramenta valiosa, fornecendo um conhecimento importante sobre o mecanismo de desenvolvimento e prevenção da hipertrofia cardíaca relacionada com a obesidade.

REFERÊNCIAS

- AASUM, E.; HAFSTAD, A. D.; LARSEN, T. S. Changes in substrate metabolism in isolated mouse hearts following ischemia-reperfusion. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 249, n. 1-2, p. 97-103, 2003.
- ABDULLAH, A. et al. The number of years lived with obesity and the risk of all-cause and cause-specific mortality. **Int. J. Epidemiol.**, v. 40, n. 4, p. 985-96, 2011.
- ABEL, A. Insulin signaling in heart muscle: lessons from genetically engineered mouse models. **Curr. Hypertens. Rep.**, v. 6, n. 6, p. 416-23, 2004.
- ABEL, E. D.; LITWIN, S. E. Cardiac remodeling. **Physiol. Rev.**, v. 88, n. 2, p. 389-419, 2007.
- ABEL, E. D.; LITWIN, S. E.; SWEENEY, G. Cardiac remodeling in obesity. **Physiol. Rev.**, v. 88, n. 2, p. 389-419, 2008.
- ABU-ELHEIGA, L. A. et al. Acetyl-CoA carboxylase 2 mutant mice are protected against obesity and diabetes induced by high-fat□high-carbohydrate diets. **PNAS**, v. 100, n. 18, p. 10207-10212, 2003.
- AKKI, A.; SMITH, K.; SEYMOUR, A.M. Compensated cardiac hypertrophy is characterised by a decline in palmitate oxidation. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 311, n. 1-2, p. 215-24, 2008.
- ALLARD, M. F. et al. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. **Am. J. Physiol.**, v. 267, p. H742-750, 1994.
- ALPERT, M. A. Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. **Am. J. Med. Sci.**, v. 321, n. 4, p. 225-236, 2001.
- ALPERT, M. A.; Hashimi, M. W. Obesity and the heart. **Am. J. Med. Sci.**, v. 306, n. 2, p. 117-23, 1993.
- ANDERSON, E. J. et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **J. Clin. Invest.**, v. 119, p. 573-581, 2009.
- ANDERSON, E. J. et al. Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 54, n. 20, p. 1891-8, 2009.
- ANDRADE, R.G.; PEREIRA, R. A.; SICHIERI, R. Ten-year increase in the prevalence of obesity and reduction in fat intake in Brazilian women aged 35 years and older. **J. Epidemiol. Community Health**, v.64, n. 3, p. 252-4, 2010.

AOYAMA, T. et al. Altered Constitutive Expression of Fatty Acid-metabolizing Enzymes in Mice Lacking the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α (PPAR α). **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 5678-5684, 1998.

ARANY, Z. et al. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR- coactivator 1. **PNAS**, v. 103, p. 10086-10091, 2006.

Ashrafian, H. et al. Hypertrophic cardiomyopathy: a paradigm for myocardial energy depletion. **Trends Genet.**, v. 19, n. 5, p. 263-8, 2003.

AUGUSTUS, A. S. et al. Loss of Lipoprotein Lipase-derived Fatty Acids Leads to Increased Cardiac Glucose Metabolism and Heart Dysfunction. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 8716-8723, 2006.

AUGUSTUS, A. S. et al. Loss of lipoprotein lipase-derived fatty acids leads to increased cardiac glucose metabolism and heart dysfunction. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 8716-8723, 2006.

BANDYOPADHYAY, G. K. et al. Increased Malonyl-CoA Levels in Muscle From Obese and Type 2 Diabetic Subjects Lead to Decreased Fatty Acid Oxidation and Increased Lipogenesis; Thiazolidinedione Treatment Reverses These Defects. **Diabetes**, v. 55, p. 2277-2285, 2006.

BANKE, N.H., et al. Preferential oxidation of triacylglyceride- derived fatty acids in heart is augmented by the nuclear receptor PPAR α . **Circ. Res.**, v. 107, p. 233–241, 2010.

BARBIERI, M. et al. Effects of PPARs agonists on cardiac metabolism in littermate and cardiomyocyte-specific PPAR- γ -knockout (CM-PGKO) mice. **PLoS One**, v. 7, n. 4, p. e35999, 2012.

BARGER, P. M. et al. Deactivation of peroxisome proliferator-activated receptor- α during cardiac hypertrophy growth. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 12, p. 1723-30, 2000.

BARGER, P. M.; KELLY, D.P. PPAR signaling in the control of cardiac energy metabolism. **Trends Cardiovasc. Med.**, v. 10, p. 238-245, 2000.

BAROUCH, L. A. et al. Disruption of leptin signaling contributes to cardiac hypertrophy independently of body weight in mice. **Circulation**, v. 108, p. 754–759, 2003.

BARROSO, G. S.; SICHIERI, R. SALLES-COSTA, R. Relationship of socio-economic factors and parental eating habits with children's food intake in a population-based study in a metropolitan area of Brazil. **Public Health Nutr.**, v. 17, n. 01, p. 156-161, 2012.

BARTLETT, K.; EATON, S. Mitochondrial β -oxidation. **Eur. J. of Biochem.**, v. 271, n. 3, p. 462-469, 2004.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. Bioquímica Médica. 3 edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

BELL, G. et al. Molecular biology of mammalian glucose transporters. **Diabetes Care**, v. 13, p. 198-206, 1990.

BERGER, J. MOLLER, D. E. The mechanisms of action of PPARs. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 409-35, 2002.

BERSELL, K. et al. Moderate and high amounts of tamoxifen in a-MHC-MerCreMer mice induce a DNA damage response, leading to heart failure and death. **Dis. Model. Mech.**, v. 6, n. 6, p.1459-1469, 2013.

BORRADAILE, N. M. et al. Disruption of endoplasmic reticulum structure and integrity in lipotoxic cell death. **J. Lipid Res.**, v. 47, p. 2726–2737, 2006.

BOUDINA, S. et al. Mitochondrial Energetics in the Heart in Obesity-Related Diabetes: Direct Evidence for Increased Uncoupled Respiration and Activation of Uncoupling Proteins. **Diabetes**, v. 56, p. 2457-2466, 2007.

BOUDINA, S. et al. Reduced Mitochondrial Oxidative Capacity and Increased Mitochondrial Uncoupling Impair Myocardial Energetics in Obesity. **Circulation**, v. 112, p. 2686-2695, 2005.

BOUDINA, S.; ABEL, D. Diabetic Cardiomyopathy Revisited. **Circulation**, v. 115, p. 3213-3223, 2007.

BOUDINA, S.; ABEL, E. D. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. **Physiology**, v. 21, p. 250-8, 2006.

BOWKER-KINLEY, M. M. et al. Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. **Biochem. J.**, v. 329, n. 1, p. 191-6, 1998.

BRAND, F. N.; ABBOTT, R. D.; Kannel, W. B. Diabetes, Intermittent Claudication, and Risk of Cardiovascular Events: The Framingham Study. **Diabetes**, v. 38, p. 504-509, 1989.

BRAY, G. A. et al. A 9-mo randomized clinical trial comparing fat-substituted and fat-reduced diets in healthy obese men: the Ole Study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 928-934, 2002.

BRIGADEAU, F. et al. The PPARalpha activator fenofibrate slows down the progression of the left ventricular dysfunction in porcine tachycardia-induced cardiomyopathy. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 49, n. 6, p. 408-15, 2007.

BRUN, S. et al. Activators of Peroxisome Proliferator- Activated Receptor- Induce the Expression of the Uncoupling Protein-3 Gene in Skeletal Muscle A Potential Mechanism for the Lipid Intake–Dependent Activation of Uncoupling Protein-3 Gene Expression at Birth. **Diabetes**, v. 48, p. 1217-1222, 1999.

BUCHANAN, J. et al. Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5341-9, 2005.

BUGGER, H.; ABEL, D. Rodent models of diabetic cardiomyopathy. **Dis. Model. Mech.**, v. 2, p. 454-466, 2009.

CAMPBELL, F. M. et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the control of cardiac malonyl-CoA levels: reduced fatty acid oxidation rates and increased glucose oxidation rates in the hearts of mice lacking PPARalpha are associated with higher concentrations of malonyl-CoA and reduced expression of malonyl-CoA decarboxylase. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 4098-4103, 2002.

CAPEWELL, S.; BUCHAN, I. Why have sustained increases in obesity and type 2 diabetes not offset declines in cardiovascular mortality over recent decades in Western countries? **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 22, n. 4, p. 307-11, 2012.

CARLEY, A. N.; TAEGTMEYER, H.; LEWANDOWSKI, D. Matrix Revisited: Mechanisms Linking Energy Substrate Metabolism to the Function of the Heart. **Circ. Res.**, v. 114, p. 717-729, 2014.

CARROL, R. et al. Metabolic effects of insulin on cardiomyocytes from control and diabetic *db/db* mouse hearts. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288, p. E900-E906, 2005.

CHEN, H. et al. Evidence that the diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in *db/db* mice. **Cell**, v. 84, p. 491-495, 1996.

CHESS, D. J. et al. A high-fat diet increases adiposity but maintains mitochondrial oxidative enzymes without affecting development of heart failure with pressure overload. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 297, p. H1585-H1593, 2009.

CHIEN K. R. et al. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 55, p. 77-95, 1993.

CHIU, H. C. et al. A novel mouse model of lipotoxic cardiomyopathy. **J. Clin.**, v. 107, n. 7, p. 813-22, 2001.

CHOI, C. S. et al. Continuous fat oxidation in acetyl-CoA carboxylase 2 knockout mice increases total energy expenditure, reduces fat mass, and improves insulin sensitivity. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p. 16480-16485, 2007.

CHOU, C. J. et al. High-Fat Diet Feeding Elevates Skeletal Muscle Uncoupling Protein 3 Levels But Not Its Activity in Rats. **Obes. Res.**, v. 9, p. 313-319, 2001.

COLLINS, K. A. et al. Accuracy of echocardiographic estimates of left ventricular mass in mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 280, n. 5, p. H1954-62, 2001.

COORT, S. L. M. Enhanced Sarcolemmal FAT/CD36 Content and Triacylglycerol Storage in Cardiac Myocytes From Obese Zucker Rats. **Diabetes**, v. 53, p. 1655- 1663, 2004.

COX, K. B., et al. Wood Cardiac hypertrophy in mice with long-chain acyl-CoA dehydrogenase or very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. **Lab. Invest.**, v. 89, p. 1348-1354, 2009.

CUNHA A. C. S., et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion the role of GLUT-2. **J. of Nutr. Biochem.**, v. 20, p. 435-442, 2009.

DALLINGA-THIE, G. M., et al. The metabolism of triglyceride-rich lipoproteins revisited: new players, new insight. **Atherosclerosis**, v. 211, p. 1-8, 2010.

DE ANDRADE, R. G.; PEREIRA, R. A.; SICHIERI, R. Ten-Year Increase in the Prevalence of Obesity and Reduction of Fat Intake in Brazilian Women 35 Years and Older. **J. Epidemiol. Community Health**, v. 64, n. 3, p. 252-4, 2010.

DE BEM LIGNANI, J. et al. Changes in food consumption among the Programa Bolsa Familia participant families in Brazil. **Public Health Nutr.**, v. 14, n. 5, p. 785-92, 2011.

DENTON, R. M. RANDLE, P. J. Concentrations of glycerides and phospholipids in rat heart and gastrocnemius muscles. Effects of alloxan-diabetes and perfusion. **Biochem. J.**, v. 104, n. 2, p. 416-22, 1967.

DEPRE, C.; RIDER, M. H.; HUE, L. Mechanisms of control of heart glycolysis. **Eur. J. Biochem.**, v. 258, n. 2, p. 277-90, 1998.

DHALLA, N. S. et al. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. **Cardiovasc. Res.**, v. 47, p. 446-456, 2000.

DIETZ, W. H. Health consequences of obesity in youth: childhood predictors of adult disease. **Pediatrics**, v. 101, n. 2, p. 518-25, 1998.

DOETSCHMAN, T.; AZHAR, M. Cardiac-Specific Inducible and Conditional Gene Targeting in Mice. **Circ. Res.**, v. 110, n. 11, p. 1-29, 2012.

DOS SANTOS BARROSO, G. et al. Relationship of socio-economic factors and parental eating habits with children's food intake in a population-based study in a metropolitan area of Brazil. **Public Health Nutr.**, v. 17, n. 1, p. 156-61, 2014.

DRESSEL, U. et al. The peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 17, p. 2477-2493, 2003.

DREWNOWSKI, A.; SPECTER, S. E. Poverty and obesity: the role of energy density and energy costs. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, n. 1, p. 6-16, 2004.

DUFLOU, J. et al. Sudden death as a result of heart disease in morbid obesity. **Am. Heart J.**, v. 130, n. 2, p. 306-13, 1995.

DUNCAN, J. G. et al. Insulin-Resistant Heart Exhibits a Mitochondrial Biogenic Response Driven by the Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α /PGC-1 Gene Regulatory Pathway. **Circulation**, v. 115, p. 909-917, 2007.

DYCK, J. R. B. et al. Malonyl Coenzyme A Decarboxylase Inhibition Protects the Ischemic Heart by Inhibiting Fatty Acid Oxidation and Stimulating Glucose Oxidation. **Circ. Res.**, v. 94, p. e78-e84, 2004.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, v. 365, n. 9468, p. 1415-28, 2005.

ELLIS, J. M. et al. Mouse Cardiac Acyl Coenzyme A Synthetase 1 Deficiency Impairs Fatty Acid Oxidation and Induces Cardiac Hypertrophy. **Mol. Cell. Biol.**, v. 31, p. 1252-1262, 2011.

ESSOP, M. F., et al. Reduced heart size and increased myocardial fuel substrate oxidation in ACC2 mutant mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 295, n. 1, p. H256-65, 2008.

EXIL, V. J. et al. Very-long-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency in mice. **Circ. Res.**, v. 93, p. 448–455, 2003.

FEIGENBAUM, H. A digital echocardiographic laboratory. **J. Am. Soc. Echocardiogr.**, v. 7, n. 1, p. 105-6, 1994.

FILIPPO, C. D. et al. Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics, **Cardiovasc. Drug. Rev.**, v. 24, n. 2, p. 77-87, 2006.

FINCK, B. N. et al. A critical role for PPAR α -mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: Modulation by dietary fat content. **PNAS**, v. 100, p. 1226-1231, 2003.

Finck, B. N. et al. The cardiac phenotype induced by PPAR α overexpression mimics that caused by diabetes mellitus. **J. Clin. Invest.**, v.109, n. 1, p.121-30, 2002.

FINCK, B. N. The PPAR regulatory system in cardiac physiology and disease. **Cardiovasc. Res.**, v. 73, p. 269-277, 2007.

FINCK, B. N. The role of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha pathway in pathological remodeling of the diabetic heart. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 7, n. 4, p. 391-6, 2004.

FINCK, B. N.; KELLY, D. P. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α) signaling in the gene regulatory control of energy metabolism in the normal and diseased heart. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v. 34, n. 10, p. 1249-57, 2002.

FINUCANE, M. M. et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9·1 million participants. **Lancet**, v. 12, n.377, p. 557-67, 2011.

FOGEL, R. W.; COSTA, D. L. A theory of technophysic evolution, with some implications for forecasting population, health care, and pension costs. **Demography**, v. 34, p. 49–66, 1997.

FRANCIS, G. A.; ANNICOTTE, J. S.; AUWERX, J. PPAR agonists in the treatment of atherosclerosis. **Current Opin. Pharmacol.**, v. 3, n. 2, p. 186-91, 2003.

GARDIN, M. et al. Echocardiographic Assessment of Left Ventricular Mass and Systolic Function in Mice. **Circ. Res.**, v. 76, p. 907-914, 1995.

GARLAND, P. B.; RANDLE, P. J.; NEWSHOLME, E. A. Citrate As An Intermediary In The Inhibition Of Phosphofructokinase In Rat Heart Muscle By Fatty Acids, Ketone Bodies, Pyruvate, Diabetes, And Starvation. **Nature**, v. 200, p. 169-70, 1963.

GELINAS, R. et al. Alterations in carbohydrate metabolism and its regulation in PPAR null mouse hearts. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 294: p. H1571-H1580, 2008.

GERTZ, E. W. et al. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. **J. Clin. Invest.**, v. 82, n. 6, p. 2017-25, 1988.

GILDE, A. J. et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR) α and PPAR β/δ , but not PPAR γ , Modulate the Expression of Genes Involved in Cardiac Lipid Metabolism. **Circ. Res.**, v. 92, p. 518-524, 2003.

GOLDBERG, I. J.; ECKEL, R. H.; ABUMRAD, N. A. Regulation of fatty acid uptake into tissues: lipoprotein lipase- and CD36-mediated pathways. **J. Lipid Res.**, v. 50, p. S86-S90, 2009.

GOLDBERG, I. J.; TRENT, C. M.; SCHULZE, P. C. Lipid metabolism and toxicity in the heart. **Cell Metab.**, v. 15, n. 6, p. 805-12, 2012.

GRUNDLEGER, M. L.; THENEN, S. W. Decreased Insulin Binding, Glucose Transport, and Glucose Metabolism in Soleus Muscle of Rats Fed a High Fat Diet. **Diabetes**, v. 31, p. 232-237, 1982.

GRUNDY, S. M. What is the contribution of obesity to the metabolic syndrome? **Endocrinol. Metab Clin. North. Am.**, v. 33, n. 2, p. 267-82, 2004.

HAEMMERLE, G. et al. Defective lipolysis and altered energy metabolism in mice lacking adipose triglyceride lipase. **Science**, v. 312, p. 734-737, 2006.

HALL, M. E. Systolic dysfunction in cardiac-specific ligand-inducible MerCreMer transgenic mice. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 301, p. H253-H260, 2011.

HAMILTON, C; SAGGERSON, E. D. Malonyl-CoA metabolism in cardiac myocytes. **Biochem. J.**, v. 350, n. 1, p. 61-7, 2000.

HARRIS, R. A.; HUANG, B.; WU, P. Control of pyruvate dehydrogenase kinase gene expression. **Adv. Enzyme Regul.**, v. 41, p. 269-88, 2001.

HARWOOD, H. J., Treating the metabolic syndrome: acetyl-CoA carboxylase inhibition. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 9, p. 267-281, 2005.

HERNANDEZ, D. C.; PRESSLER, E. Accumulation of childhood poverty on young adult overweight or obese status: race/ethnicity and gender disparities. **J. Epidemiol. Community Health**, v. 68, p. 478-484, 2014.

HERRERO, P. et al. Assessment of myocardial fatty acid metabolism with 1-¹¹C-palmitate and kinetic modeling: Testing the limits. **J. Nucl. Med.**, v. 47, p. 252P, 2006.

HOLLOWAY, G. P. et al. In obese rat muscle transport of palmitate is increased and is channeled to triacylglycerol storage despite an increase in mitochondrial palmitate oxidation. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 296, p. E738–E747, 2009.

HOLNESS, M. J.; SUGDEN, M. C. Regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity by reversible phosphorylation. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 31, n. 6, p. 1143-51, 2003.

HORI, M.; NISHIDA, K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. **Cardiovasc. Res.**, v. 81, n. 3, p. 457-64, 2009.

HOUGEN, K. et al. Cre-loxP DNA recombination is possible with only minimal unspecific transcriptional changes and without cardiomyopathy in Tg(alphaMHC-MerCreMer) mice. **Am. J. Physiol.**, v. 299, p. H1671–H1678, 2010.

HOUTEN, S. M.; WANDERS, R. J. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. **J. Inherit. Metab. Dis.**, v. 33, n. 5, p. 469-77, 2010.

HUANG, B. et al. Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase Expression by Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- Ligands, Glucocorticoids, and Insulin. **Diabetes**, v. 51, p. 276-283, 2002.

HUSS, J. M.; KELLY, D. P. Nuclear Receptor Signaling and Cardiac Energetics. **Circ. Res.**, v. 95, p. 568-578, 2004.

INGWALL, J. S. ATP and the Heart. Kluwer Academic Publishers. Boston, 2002.

INGWALL, J. S. WEISS, R. G. Is the Failing Heart Energy Starved? On Using Chemical Energy to Support Cardiac Function. **Circ. Res.**, v. 95, p. 135-145, 2004.

ITANI, S. I. et al. Involvement of protein kinase C in human skeletal muscle insulin resistance and obesity. **Diabetes**, v. 49, p. 1353-1358, 2000.

JAGASIA, D. et al. Effect of Non–Insulin-Dependent Diabetes Mellitus on Myocardial Insulin Responsiveness in Patients With Ischemic Heart Disease. **Circulation**, v. 103, p. 1734-1739, 2001.

JAISSER, F. Inducible Gene Expression and Gene Modification in Transgenic Mice. **J Am. Soc. Nephrol.**, v. 11, p. S95–S100, 2000.

JAMES, D. E.; STRUBE, M.; MUECKLER, M. Molecular cloning and characterization of an insulin regulatable glucose transporter. **Nature**, v. 338, p. 83-87, 1989.

KALANTAR-ZADEH, K. et al. Reverse Epidemiology of Conventional Cardiovascular Risk Factors in Patients With Chronic Heart Failure. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 43, p. 1439-44.

KAMMERMEIER, H. et al. Free Energy Change of ATP hydrolysis early hypoxic failure of the myocardium. **J. Mol. Cell Cardiol.**, v. 14, n. 5, p. 267-77, 1982.

KELISHADI, R. Childhood overweight, obesity, and the metabolic syndrome in developing countries. **Epidemiol. Rev.**, v. 29, p. 62-76, 2007.

KENCHAIAN, S. et al. Obesity and the risk of heart failure. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, n. 5, 305-13, 2002.

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

KIM, J. K. et al. Inactivation of fatty acid transport protein 1 prevents fat-induced insulin resistance in skeletal muscle. **J Clin Invest.**, v. 113, n. 5, p. 756–763, 2004.

KOITABASHI, N. et al. Avoidance of Transient Cardiomyopathy in Cardiomyocyte-Targeted Tamoxifen-Induced MerCreMer Gene Deletion Models. **Circ. Res.**, v. 105, n. 1, p. 12-15, 2009.

KOLWICZ, S. et al. Cardiac-Specific Deletion of Acetyl CoA Carboxylase 2 Prevents Metabolic Remodeling During Pressure-Overload Hypertrophy. **Circ. Res.**, v. 111, p. 728-738, 2012.

KOMURO, I.; YAZAKI, Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 55, p. 55-75, 1993.

KOVES, T.R. et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. **Cell Metab.**, v. 7, p. 45–56, 2008.

KUO, T. H. et al. Defective Oxidative Metabolism of Heart Mitochondria from Genetically Diabetic Mice. **Diabetes**, v. 32, p. 781-787, 1983.

LABINSKYY, V. et al. Chronic activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α with fenofibrate prevents alterations in cardiac metabolic phenotype without changing the onset of decompensation in pacing-induced heart failure. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 321, n. 1, p. 165-71, 2007.

LAI, L. et al. Transcriptional coactivators PGC-1 and PGC-1 β control overlapping programs required for perinatal maturation of the heart. **Genes & Dev.**, v. 22, p. 1948-1961, 2008.

LANGENICKEL, T. et al. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 278, p. H1500-H1506, 2000.

LEE, S. S. Targeted disruption of the α isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, p. 3012-3022, 1995.

LEHMAN, J. J. et al. PPAR coactivator-1 (PGC1) promotes cardiac mitochondrial biogenesis. **J. Clin. Invest.**, v. 106, p.847-856, 2000.

LEHMAN, J. J.; Kelly, D. P. Gene regulatory mechanisms governing energy metabolism during cardiac hypertrophic growth. **Heart Fail. Rev.**, v. 7, n. 2, p. 175-85, 2002.

LEHMAN, J. J.; KELLY, D. P. Transcriptional activation of energy metabolic switches in the developing and hypertrophied heart. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, n. 4, p. 339-45, 2002.

LEONE, T. C. et al. PGC-1 α Deficiency Causes Multi-System Energy Metabolic Derangements: Muscle Dysfunction, Abnormal Weight Control and Hepatic Steatosis. **PLoS Biol.**, v. 3, n. 4, p. e101, 2005.

LEVY, D. et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, n. 22, p. 1561-6, 1990.

LEVY, R. B. et al. Distribuição regional e socioeconômica da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil em 2008-2009. **Rev. Saúde Pública**, v. 46, p. 06-15, 2012.

LIN, J.; HANDSCHIN, C.; SPIEGELMAN, B. M. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. **Cell Metab.**, v. 1, n. 6, p. 361-370.

LINS, A. P. M. et al. Alimentação saudável, escolaridade e excesso de peso entre mulheres de baixa renda. **Ciênc. Saúde Colet.**, v. 18, p. 357-366, 2013.

LIONETTI, V. et al. Carnitine palmitoyl transferase-I inhibition prevents ventricular remodeling and delays decompensation in pacing-induced heart failure. **Cardiovasc. Res.**, v. 66, p. 274-281, 2005.

LIU L. et al. Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 1679-1689, 2007.

LIU, L., et al. Dietary pattern, the metabolic syndrome, and left ventricular mass and systolic function: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 90, n. 2, p. 362-368, 2009.

LIU, C.; LIN, J. D. PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism. **Acta Biochim. Biophys. Sin.**, v. 43, p. 248-257, 2011.

LODISH, H. et al. Molecular Cell Biology. 3rd edition. New York: Freeman; 2000.

LOPASCHUK, G. D. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. **Biochim. Biophys Acta**, v.1213, n. 3, p. 263-76, 1994.

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

LOPASCHUK, G. Regulation of carbohydrate metabolism in ischemia and reperfusion. **Am. Heart. J.**, v. 139, n. 2, p. S115-9, 2000.

LORELL, B. H.; CARABELLO, B. A. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. **Circulation**, v. 102, n. 4, p. 117-23, 2000.

- LORENZO, O. et al. Alteration of Energy Substrates and ROS Production in Diabetic Cardiomyopathy. **Mediators Inflamm.**, v. 461967, p. 11, 2013
- LUCHNER, A. et al. Differential atrial and ventricular expression of myocardial BNP during evolution of heart failure. **Am. J. Physiol.**, v. 274, n. 5, p. H1684-9, 1998.
- LUIKEN, J. J. et al. Cellular fatty acid transport in heart and skeletal muscle as facilitated by proteins. **Lipids**, v. 34, p. S169-75, 1999.
- LUIKEN, J. J. et al. Increased Rates of Fatty Acid Uptake and Plasmalemmal Fatty Acid Transporters in Obese Zucker Rats. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 40567-40573, 2001.
- LUPTAK, I. et al. Decreased contractile and metabolic reserve in peroxisome proliferator-activated receptor- α -null hearts can be rescued by increasing glucose transport and utilization. **Circulation**, v. 112, n. 5, p. 2339-46, 2005.
- MÄKI, M. T. et al. Fatty acid uptake is preserved in chronically dysfunctional but viable myocardium. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 273, p. H2473-H2480, 1997.
- MALLOY, C. R.; SHERRY, A. D.; JEFFREY F. M. Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ^{13}C NMR spectroscopy. **J. Biol. Chem.**, v. 263, p. 6964-6971, 1988.
- MALLOY, C. R.; SHERRY, A. D.; JEFFREY, F. M. Analysis of tricarboxylic acid cycle of the heart using ^{13}C isotope isomers. **Am. J. Physiol.**, v. 259, p. H987-995, 1990.
- MARRA, C.; DOS SANTOS BARBOSA, F.; SICHIERI, R. Changes of Body Mass Index among Young Men in Brazil over Two Decades. **Ann. Nutr. Metab.**, v. 59, p. 79-83, 2011.
- MARTINEZ, J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 59, n. 3, p. 337-45, 2000.
- MARTINS, M. R. et al. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. **J. Endocrinol.**, v. 198, p. 591-598, 2008.
- MASTERS, R. K.; POWERS, D. A.; LINK, B. G. Obesity and US Mortality Risk Over the Adult Life Course. **Am. J. Epidemiol.**, v. 177, p. 431-442, 2013.
- MATTU, H. S.; RANDEVA, H. S. Role of adipokines in cardiovascular disease. **J. Endocrinol.**, v. 216, p. T17-T36, 2013.
- MAULIK, S. K.; KUMAR, S. oxidative stress and cardiac hypertrophy: a review. **Toxicol. Mech. Methods.**, v. 22, n. 5, p. 359-66, 2012.
- MCGARRY, J. D., DOBBINS, R. L. Fatty acids, lipotoxicity and insulin secretion. **Diabetologia**, v. 42, n. 2, p. 128-38, 1999.
- MCGAVOCK, J. M. et al. Cardiac Steatosis in Diabetes Mellitus: A ^1H -Magnetic Resonance Spectroscopy Study. **Circulation**, v. 116, p. 1170-1175, 2007.

MENDEZ, M. A.; MONTEIRO, C. A.; POPKIN, B. M. Overweight exceeds underweight among women in most developing countries. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81: 714-721, 2005.

MISRA, A.; SINGHAL, N.; KHURANA, L. Obesity, the metabolic syndrome, and type 2 diabetes in developing countries: role of dietary fats and oils. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 29, n. 3, p. 289S-301S, 2010.

MONTEIRO, C. A. et al. Obesity and inequities in health in the developing world. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 28, n. 9, p. 1181-6, 2004.

MONTEIRO, C. A. et al. Socioeconomic status and obesity in adult populations of developing countries: a review. **Bull World Health Organ**, v. 82, n. 12, p. 940-6, 2004.

MOREIRA, A. S. B. et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. **NMCD. Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, v. 19, p. 805-810, 2009.

MORGAN, E. E. et al. Effects of chronic activation of peroxisome proliferator-activated receptor- α or high-fat feeding in a rat infarct model of heart failure. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 290, p. H1899-1904, 2006.

MOURA, A. S. et al. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of the offspring when adults. The role of insulin and leptin. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 617-622, 2002.

MOUSSAVI, N.; GAVINO, V.; RECEVEUR, O. Is obesity related to the type of dietary fatty acids? An ecological study. **Public Health Nutr.**, v. 11, n. 11, p. 1149-55, 2008.

MURPHY, N. F. et al. Long-term cardiovascular consequences of obesity: 20-year follow-up of more than 15,000 middle-aged men and women (the Renfrew Paisley study). **Eur. Heart J.**, v. 27, n. 1, p. 96-106, 2006.

MURRAY, A. J. et al., Plasma free fatty acids and peroxisome proliferator-activated receptor α in the control of myocardial uncoupling protein levels. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3496-502, 2005.

MURTHY, V. K.; SHIPP, J. C. Accumulation of Myocardial Triglycerides in Ketotic Diabetes: Evidence for Increased Biosynthesis. **Diabetes**, v. 26, p. 222- 229, 1977.

NAKAMURA, E.; NGUYEN. M. T.; MACKEM, S. Kinetics of Tamoxifen-regulated Cre activity in mice using a cartilage- specific CreERT to assay temporal activity windows along the proximo-dis- tal limb skeleton. **Dev Dyn**, v. 235, p. 2603-2612, 2006.

NASCIMBEN L. et al. Mechanisms for increased glycolysis in the hypertrophied rat heart. **Hypertension**, v. 44, n. 5, p. 662-7, 2004.

NEUBAUER, S. The Failing Heart — An Engine Out of Fuel. **N. Engl. J. Med.**, v. 356, p. 1140-1151, 2007.

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

NEWSHOLME, E. A.; RANDLE, P. J. Regulation of glucose uptake by muscle. 7. Effects of fatty acids, ketone bodies and pyruvate, and of alloxan-diabetes, starvation, hypophysectomy and adrenalectomy, on the concentrations of hexose phosphates, nucleotides and inorganic phosphate in perfused rat heart. **Biochem. J.**, v. 93, n. 3, p. 641-51, 1964.

NG, A. C. et al. Findings from left ventricular strain and strain rate imaging in asymptomatic patients with type 2 diabetes mellitus. **Am. J. Cardiol.**, v. 104, p. 1398–1401, 2009.

NIELSEN, S. J.; SIEGA-RIZ, A. M.; POPKIN, B. M. Trends in energy intake in US between 1977 and 1996: Similar shifts seen across age groups. **Obes. Res.**, v. 10, p. 370-378, 2002.

NOBRE, L. N., MONTEIRO, J. B. Dietetic determinants on food intake and effects in body weight regulation. **Arch. Latinoam. Nutr.**, v. 53, p. 243-250, 2003.

O'DONNELL, J. M. et al. The absence of endogenous lipid oxidation in early stage heart failure exposes limits in lipid storage and turnover. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, v. 44, p. 315-322, 2008.

O'CONNOR, R. D., et al. Understanding heart failure through the HF-ACTION baseline characteristics. **Am. Heart J.**, v.158, n. 4, p. S1-5, 2009.

O'CONNOR, R. D. et al. Intramyocardial triglyceride quantification by magnetic resonance spectroscopy: In vivo and ex vivo correlation in human subjects. **Magn. Reson. Med.**, v. 65, p. 1234-1238, 2011.

OKERE, I. C. et al. Low Carbohydrate/High-Fat Diet Attenuates Cardiac Hypertrophy, Remodeling, and Altered Gene Expression in Hypertension. **Hypertension**, v. 48, p. 1116-1123, 2006.

OLSHANSKY, S. J. Projecting the future of U.S. health and longevity. **Health Aff.**, v. 24, p.86–89, 2005.

OLSON, D. P. et al. Gene knockout of *Acc2* has little effect on body weight, fat mass, or food intake, **PNAS**, v. 107, p. 7598-7603, 2010.

ONO, T.; GUTHOLD, R.; STRONG, K. WHO Global comparable estimates infobase. Geneva: World Health Organization, 2005. <http://infobase.who.int>

OPIE, L. H. Metabolism of the heart in health and disease. **I. Am. Heart J.**, v. 76, n. 5, p. 685-98, 1968.

OREOPOULOS, A. Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. **Am. Heart J.**, v. 156, n. 1, p.13-22, 2008.

PAN, L. et al. Incidence of Obesity Among Young US Children Living in Low-Income Families, 2008–2011. **Pediatrics**, v. 132, p. 1006-1013, 2013.

PANAGIA, M. et al. PPAR-alpha activation required for decreased glucose uptake and increased susceptibility to injury during ischemia. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 288, n. 6, p. H2677-83, 2005.

PARK, S.Y. et al. Unraveling the temporal pattern of diet-induced insulin resistance in individual organs and cardiac dysfunction in C57BL/6 mice. **Diabetes**, v. 54, p. 3530–3540, 2005.

PATEL, M. S.; ROCHE, T. E. Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes. **FASEB J.**, v. 4, n. 14, p. 3224-33, 1990.

PAULSON, D. J.; CRASS, M. F. Endogenous triacylglycerol metabolism in diabetic heart. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 242, p. H1084-H1094, 1982.

PEREIRA, R. A. et al. Sources of excessive saturated fat, trans fat and sugar consumption in Brazil: an analysis of the first Brazilian nationwide individual dietary survey. **Public Health Nutr**, v. 17, n. 1, p. 113-21, 2014.

PEREIRA, R. et al. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signalling cascade in rats heart's. **Regul. Pept.**, v. 136, p. 117-121, 2006.

PETERSON, L. R. et al. Sex and type 2 diabetes: obesity-independent effects on left ventricular substrate metabolism and relaxation in humans. **Obesity**, v. 20, n. 4, p. 802-10, 2012.

PLAGEMANN, A. et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Exp. Clin. Endocrinol.**, v. 99, p. 154–158, 1992.

POPKIN, B. M. Dynamics of the nutrition transition and its implications for the developing world. **Forum Nutr.**, v. 56, p. 262-4, 2003.

POPKIN, B. M.; ADAIR, L. S.; NG, S. W. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. **Molecular Cell Biology**, v. 70, n. 4, p. 256, 2012.

POPKIN, B. M.; GORDON-LARSEN, P. The nutrition transition: worldwide obesity dynamics and their determinants. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 28, n. 3, p. S2-9, 2004.

PRENTICE, A. M. The emerging epidemic of obesity in developing countries. **Int. J. Epidemiol.**, v. 35, p. 93-99, 2006.

PREVIS, S. F.; CLINE, G. W.; AND SHULMAN, G. I. A critical evaluation of mass isotopomer distribution analysis of gluconeogenesis in vivo. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 277, p. E154 - E160, 1999.

RANDLE, P. J. et al. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. **Lancet**, v. 1, n. 7285, p. 785-9, 1963.

RAYMOND, S. U.; LEEDER, S.; GREENBERG, H. M. Obesity and cardiovascular disease in developing countries: a growing problem and an economic threat. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.**, v. 9, n. 2, p. 111-6, 2006.

REILLY, J. J. et al. Health consequences of obesity. **Arch. Dis. Child.**, v. 88: 748-752, 2003.

REITHER, E. N.; HAUSER, R. M.; YANG, Y. Do birth cohorts matter? Age-period-cohort analyses of the obesity epidemic in the United States. **Soc. Sci. Med.**, v. 69, n. 10, p. 1439-48, 2009.

RENNISON, J. H. et al. High-fat diet postinfarction enhances mitochondrial function and does not exacerbate left ventricular dysfunction. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 292, p. H1498–H1506, 2007.

RHEE, E. P. Lipid profiling identifies a triacylglycerol signature of insulin resistance and improves diabetes prediction in humans. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 4, p.1402-1411, 2011.

RIJZEWIJK, L.J. et al. Altered myocardial substrate metabolism and decreased diastolic function in nonischemic human diabetic cardiomyopathy: studies with cardiac positron emission tomography and magnetic resonance imaging. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 54, p. 1524–1532, 2009.

RIQUELME, C. A., et al. Fatty acids identified in the Burmese python promote beneficial cardiac growth. **Science**, v. 334, n. 6055, p. 528–531, 2011.

RIZZA, R. A.; CRASS, M. F.; SHIP, J. C. Effect of insulin treatment in vivo on heart glycerides and glycogen of alloxan-diabetic rats. **Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 539-43, 1971.

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

RUPP, H.; JACOB, R. Metabolically-modulated growth and phenotype of the rat heart. **Eur. Heart J.**, v. 13, p. 56-61, 1992.

RUSSELL, R. R. et al. Additive Effects of Hyperinsulinemia and Ischemia on Myocardial GLUT1 and GLUT4 Translocation In Vivo. **Circulation**, v. 98, p. 2180-2186, 1998.

RUSSO, S. B. et al. Ceramide synthase 5 mediates lipid-induced autophagy and hypertrophy in cardiomyocytes. **J. Clin. Invest.**, v. 122, n.11, p. 3919–3930, 2012.

SADOSHIMA, J.; IZUMO, S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 59, p. 551-71, 1997.

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

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. **Science**, v. 283, p. 1488-1493, 1999.

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

SCHAFFER, J. E. Lipotoxicity: when tissues overeat. **Curr. Opin. in Lipidol.**, v.14, p. 281–287, 2003

SCHENK, S., HOROWITZ, J.F. Acute exercise increases triglyceride synthesis in skeletal muscle and prevents fatty acid-induced insulin resistance. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p.1690-1698, 2007.

SCHMIDT, M. et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. **Lancet**, v. 4, n. 377, p. 1949-61, 2011.

SCHNABEL, R.; KUMAR, S. Oxidative stress in cardiovascular disease: successful translation from bench to bedside? **Circulation**, v.116, n. 12, p. 1338-40, 2007.

SCHRAUWEN, P. et al. Etomoxir-induced increase in UCP3 supports a role of uncoupling protein 3 as a mitochondrial fatty acid anion exporter. **FASEB J.**, v. 16, n. 12, p. 1688-90, 2002.

SEDDON M, SHAH AM, CASADEI B. Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. **Cardiovasc. Res.**, v. 75, p. 315–326, 2007.

SEDDON, M.; LOOI, Y. H.; SHAH, A. M. Oxidative stress and redox signalling in cardiac hypertrophy and heart failure. **Heart**, v. 93, n. 8, p.903-907, 2007.

SHARMA, S. et al. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. **FASEB J.**, v. 18, p. 1692-1700, 2004.

SHARMA, U. C. et al. Galectin-3 Marks Activated Macrophages in Failure-Prone Hypertrophied Hearts and Contributes to Cardiac Dysfunction. **Circulation**, v. 110, p. 3121-3128, 2004.

SHEN, X. et al. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy. **Diabetes**, v. 55, n. 3, p. 798-805, 2006.

SICHERI, R. Dietary patterns and their associations with obesity in the Brazilian city of Rio de Janeiro. **Obes. Res.**, v. 10, p. 42–48, 2002.

SICHERI, R. et al. Water and sugar-sweetened beverage consumption and changes in BMI among Brazilian fourth graders after 1-year follow-up. **Public Health Nutrition**, v. 1, p. 1-5, 2012.

SICHERI, R.; ALLAN, V. L. Avaliação do estado nutricional de adolescentes brasileiros através do índice de massa corporal. **J. de Pediatr.**, v. 72, n. 2, p. 80-84, 1996.

SOARES, V. M. 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, 2012.

SOHAL, D. S. et al. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. **Circ. Res.**, v. 89, n. 1, p. 20-5, 2001.

SON, N.H. et al. Cardiomyocyte expression of PPARgamma leads to cardiac dysfunction in mice. **J. Clin. Invest.**, v.117, p. 2791–2801, 2007.

SOROKINA, N. et al. Recruitment of Compensatory Pathways to Sustain Oxidative Flux With Reduced Carnitine Palmitoyltransferase I Activity Characterizes Inefficiency in Energy Metabolism in Hypertrophied Hearts. **Circulation**, v. 115, p. 2033-2041, 2007.

SPARAGNA, G. C. et al. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 279, n. 5, p. H2124-32, 2000.

Stamler, J. Epidemic obesity in the United States. **Arch. Intern. Med.**, v. 153, n. 9, p. 1040-4, 1993.

STANLEY, W. C.; LOPASCHUK, G. D., MCCORMACK, J. G. M. Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. **Cardiovasc. Res.**, v. 34, p. 25-33, 1997.

STANLEY, W. C.; RECCHIA, F. A.; LOPASCHUK, G. D. Myocardial Substrate Metabolism in the Normal and Failing Heart. **Physiol. Rev**, v. 85, p. 1093-1129, 2005.

SU, X.; ABUMRAD, N. A. Cellular fatty acid uptake: a pathway under construction. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 20, n. 2, p. 72-7, 2009.

SUMMERS, L. K. et al. Subcutaneous abdominal adipose tissue blood flow: variation within and between subjects and relationship to obesity. *Clin. Sci.*, v. 91, n. 6, p. 679-83, 1996.

SZCZEPANIAK, L. S. et al. Forgotten but Not Gone: The Rediscovery of Fatty Heart, the Most Common Unrecognized Disease in America. **Circ. Res.**, v. 101, p. 759-767, 2007.

TAEGLMEYER, H. et al. Linking gene expression to function: metabolic flexibility in the normal and diseased heart. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1015, p. 202-13, 2004.

TAEGLMEYER, H. Metabolism--the lost child of cardiology. **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 36, n. 4, p. 1386-8, 2000.

TAKIMOTO, E.; KASS, D. A. Role of oxidative stress in cardiac hypertrophy and remodeling. **Hypertension**, v. 49, n. 2, p. 241-8, 2007.

TANAKA, N. et al. Transthoracic Echocardiography in Models of Cardiac Disease in the Mouse. **Circulation**, v. 94, p. 1109-1117, 1996.

TIAN, R.; INGWALL, J. S. Energetic basis for reduced contractile reserve in isolated rat heart. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 270, p. H1207-H1216, 1996.

TSUTSUI, H.; KINUGAWA, S.; MATSUSHIMA, S. Oxidative stress and heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 301, p. H2181–H2190, 2011.

TONG, A. T.; HARDWOOD, J. Acetyl-coenzyme A carboxylases: versatile targets for drug discovery. **J. Cell. Biochem.**, v. 99, n. 6, p. 1476-88, 2006.

TURER, A. T. T. et al. Adipose Tissue Biology and Cardiomyopathy: Translational Implications. **Circ. Res.**, v. 111, p. 1565-1577, 2012.

UNGER, R. H.; Orci, L. Diseases of liporegulation: new perspective on obesity and related disorders. **Faseb J.**, v. 15, n. 2, p. 312-21, 2001.

UTRIAINEN, T. et al. Insulin resistance characterizes glucose uptake in skeletal muscle but not in the heart in NIDDM. **Diabetologia**, v. 41, n. 5, p. 555-9, 1998.

VAN DER VUSSE, G. J.; VAN BILSEN, M., GLATZ, J. F.C. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. **Cardiovasc. Res.**, v. 45, p. 279-293, 2000.

VASAN. R. S. Cardiac function and obesity. **Heart**, v. 89, p. 1127-1129, 2003.

VASSORT, G. Protective role of antioxidants in diabetes-induced cardiac dysfunction, *Cardiovasc. Toxicol.*, v. 10, n. 2, p. 73-86, 2010.

VEGA, R. B.; HUSS, J. M.; KELLY, D. P. The Coactivator PGC-1 Cooperates with Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α in Transcriptional Control of Nuclear Genes Encoding Mitochondrial Fatty Acid Oxidation Enzymes. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 1868-1876, 2000.

VENTURA-CLAPIER, R.; GARNIER, A.; VEKSLER, V. Energy metabolism in heart failure. **J. Physiol.**, v. 555, p. 1-13, 2004.

VERNAT, J. E. et al. Very-Long-Chain Acyl-Coenzyme A Dehydrogenase Deficiency in Mice. **Circ. Res.**, v. 93 p. 448-455, 2003.

Vigitel Brasil 2011: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

WANG, M; UNGER, R. H. Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 288, p. E216-E221, 2005.

WARENSJO, E. et al. Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 88, n. 1, p. 203-9, 2008.

WATANABE, K. et al. Constitutive Regulation of Cardiac Fatty Acid Metabolism through Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Associated with Age-dependent Cardiac Toxicity. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 22293-22299, 2000.

WEBBER, J. Energy balance in obesity. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 62, n. 2, p. 539-43, 2003.

WENK, M. R. The emerging field of lipidomics. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 4, n. 7, p. 594-610.

WISNESKI, J. A. et al. Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. **J. Clin. Invest.**, v. 76, n. 5, p. 1819-27, 1985.

WOODIWISS, A. J. et al. Obesity Promotes Left Ventricular Concentric Rather Than Eccentric Geometric Remodeling and Hypertrophy Independent of Blood Pressure. **Am. J. Hypertens.**, v. 21, p. 1144-1151, 2008.

WOPEREIS, S., et al. Metabolic profiling of the response to an oral glucose tolerance test detects subtle metabolic changes. **PLoS One.**, v. 4, n. 2, p. e4525, 2009

WU, P. et al. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. **Biochem. J.**, v. 329, p. 197-201, 1998.

YAMAGISHI, K. et al. Plasma fatty acid composition and incident heart failure in middle-aged adults the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Am. Heart J.**, v. 156, n. 5, p. 965-974, 2009.

YANG, J. et al. CD36 deficiency rescues lipotoxic cardiomyopathy. **Circ. Res.**, v. 100, n. 8, p. 1208-17, 2007.

YANG, X. P. et al. Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. **Am. J. of Physiol.**, v. 277, p. H1967-1974, 1999.

YOUNG, M. E. et al. Impaired Long-Chain Fatty Acid Oxidation and Contractile Dysfunction in Obese Zucker Rat Heart. **Diabetes**, v. 51, n. 8, p. 2587-95, 2002

YOUNG, M. E. et al. Reactivation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Is Associated with Contractile Dysfunction in Hypertrophied Rat Heart. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 44390-44395, 2001.

YOUNG, M. E.; MCNULTY, P; TAEGTMEYER, H. Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part II: Potential Mechanisms. **Circulation**, v. 105, p. 1861-1870, 2002.

ZHANG, J. et al. Effect of Left Ventricular Hypertrophy Secondary to Chronic Pressure Overload on Transmural Myocardial 2-Deoxyglucose Uptake: A ^{31}P NMR Spectroscopic Study. **Circulation**, v. 92: p. 1274-1283, 1995.

ZHANG, Y.; REN, J. Role of Cardiac Steatosis and Lipotoxicity in Obesity Cardiomyopathy. **Hypertension**. v. 57:p. 148-150, 2011.

ZHENG, H.; TUMIN, D.; QIAN, Z. Obesity and Mortality Risk: New Findings From Body Mass Index Trajectories. **Am. J. Epidemiol.**, v. 178, p.1591-1599, 2013.

ZHOU, Y. et al. Lipotoxic heart disease in obese rats: Implications for human obesity. **PNAS**, v. 97, p. 1784-1789, 2000.

ZORZANO, A. et al. Regulation of glucose transport, and glucose transporters expression and trafficking in the heart: studies in cardiac myocytes. **Am. J. Cardiol.**, v. 80, n. 3A, p. 65A-76A, 1997.

