



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

Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira

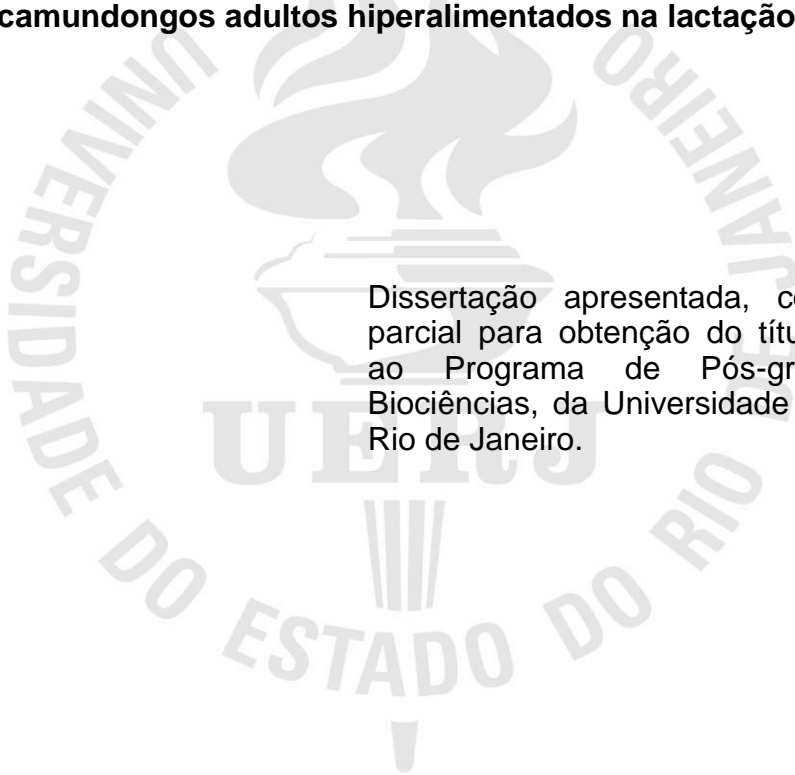
**Hemodinâmica cardíaca e o metabolismo energético mitocondrial
de camundongos adultos hiperalimentados na lactação**

Rio de Janeiro

2013

Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira

Hemodinâmica cardíaca e o metabolismo energético mitocondrial de camundongos adultos hiperalimentados na lactação



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

Orientador : Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Rio de Janeiro

2013

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

V657 Vieira, Anatalia Kutianski Gonzalez.

Hemodinâmica cardíaca e o metabolismo energético mitocondrial de camundongos adultos hiperalimentados na lactação / Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira. – 2013.

63f.

Orientador: Anibal Sanchez Moura.

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

1. Coração - Teses. 2. Isquemia – Teses. 3. Hiperfagia – Teses. 4. Obesidade- Teses. 5. Hemodinâmica – Teses. 6. Metabolismo energético. I. Moura, Anibal Sanchez. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-056.52

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

Assinatura

Data

Anatalia Kutianski Gonzalez Vieira

Hemodinâmica cardíaca e o metabolismo energético mitocondrial de camundongos adultos hiperalimentados na lactação

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

Aprovada em 4 de setembro de 2013.

Orientador:

Prof. Dr. Anibal Sanchez Moura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

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

Prof^a. Dra. Maria Luiza M. Barreto Chaves
Universidade de São Paulo

Prof^a. Dra. Rosana Salles da Costa
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à Deus e à minha mãe, a qual desde a minha infância sempre incentivou o meu aprendizado e escolhas possibilitando me tornou o que hoje sou. Sem estas bases eu não teria compreendido a importância do saber e do respeito ao próximo.

AGRADECIMENTOS

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

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

Às minhas amigas e amigos: Jéssica, Ana Beatriz, Kahena, Thiago Pereira, Sérgio Veras, e Lenne Magalhães.

Às minhas amigas Ana Mattos e Fabiana Neves por tudo que fizeram na minha caminhada científica, pela paciência, risadas, ajudas e conselhos.

Às minhas irmãs Bravo, Natalie Bravo e Simone Bravo pelas conversas, conselhos, risadas, choros e amizade maravilhosa e eterna.

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

Aos amigos da minha turma 2007/1: Andrea Ferreira, Camila Luna, Flávia Gombar, Genilza Oliveira, Juliana Oliveira, Luíza Lima, Thiago José e Thiago Martino.

Ao meu orientador da vida científica, e neste momento de mestrado, Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura que sempre acreditou e acredita no meu potencial e responsabilidade.

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

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

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

Fernando Pessoa

RESUMO

VIEIRA, Anatalia Kutianski Gonzalez. *Hemodinâmica cardíaca e o metabolismo energético mitocondrial de camundongos adultos hiperalimentados na lactação*. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

O desequilíbrio nutricional no início da vida leva ao desenvolvimento da obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares na idade adulta. Este estudo teve como objetivo analisar os efeitos a longo prazo da hiperalimentação na lactação por meio do modelo de redução da ninhada na hemodinâmica e bioenergética cardíaca. Vinte e quatro camundongos machos *Swiss* adultos foram divididos em dois grupos (controle e hiperalimentado) submetidos a duas condições (linha de base e isquemia/reperfusão) formando quatro grupos no total: grupo controle linha de base (GCLB), grupo controle isquemia/reperfusão (GCIR), grupo hiperalimentado linha de base (GHLB) e o grupo hiperalimentado isquemia/reperfusão (GHIR), todos com seis camundongos/grupo. As alterações cardíacas foram analisadas por meio da hemodinâmica cardíaca, da respiração mitocondrial e da biologia molecular. Os parâmetros hemodinâmicos analisados foram a velocidade de contração (Max dP/dt), a velocidade de relaxamento (Min dP/dt), o tempo de relaxamento cardíaco isovolumétrico (Tau) e os batimentos por minuto (BPM). A respiração mitocondrial foi avaliada por meio da razão do controle respiratório (RCR) na oxidação de carboidratos e ácidos gordos, e finalmente, a biologia molecular, através de proteínas-chave como a proteína quinase B (AKT), a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), a carnitina palmitoil transferase 1 (CPT-1), a proteína desacopladora 2 (UCP2), o 4-hidroxinonenal (4-HNE) e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). Os camundongos do GH desenvolveram maior peso corporal (30,95%, $P < 0,001$), gordura epididimal (68,64%, $P < 0,001$), gordura retroperitoneal (109,38%, $P < 0,01$) e glicemia de jejum (19,52%, $P < 0,05$) comparados aos do GC. Os parâmetros Max dP/dt e BPM apresentaram diminuição no GHIR quando comparado ao GHLB ($P < 0,001$ e $P < 0,05$). O parâmetro Min dP/dt apresentou-se reduzido no GCIR e GHIR quando comparado aos grupos GCLB e GCLB ($P < 0,05$; $P < 0,0001$ respectivamente). Camundongos do GHIR apresentaram redução do Tau quando comparado aos grupos GCIR e GHLB ($P < 0,0001$). Estes desequilíbrios na hemodinâmica cardíaca foram associados a função mitocondrial, uma vez que, o GHLB apresenta a RCR reduzida para oxidação de ácidos graxos e carboidratos ($P < 0,05$ e $P < 0,01$, respectivamente) e o GHIR apenas na oxidação dos ácidos graxos ($P < 0,01$). Além disso, o GHIR apresentou diversas alterações nas proteínas-chave do metabolismo energético cardíaco, como diminuição do conteúdo de AKT ($P < 0,05$) e aumento do conteúdo de CPT-1 ($P < 0,05$), 4-HNE ($P < 0,05$) e GAPDH ($P < 0,05$) quando comparado ao GCIR. Finalmente, a expressão do mRNA para CPT1, GAPDH e UCP2 foi aumentada no GHIR quando comparado aos GCIR ($P < 0,05$) e GHLB ($P < 0,05$). A expressão de mRNA para UCP2 e CPT-1 foi reduzida no GCIR quando comparado ao GCLB ($P < 0,01$ e $P < 0,05$, respectivamente). O estudo apresenta resultados consistentes, demonstrando efeitos deletérios sobre o metabolismo cardíaco adulto resultante de alterações nutricionais durante a lactação.

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

ABSTRACT

VIEIRA, Anatalia Kutianski Gonzalez. Cardiac hemodynamics and energetic metabolism of mitochondria in adult Swiss mice overnutrition during neonatal suckling period. 2013. 63f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Early life nutritional imbalance induces obesity, diabetes and cardiovascular diseases when animals become adults. This study aimed to study the long-term effects of postnatal overfeeding by litter size reduction on animal weight and heart energy homeostasis. Twenty-four adult male mice were divided into two groups (control and overfed) and studied under two conditions (baseline and ischemia/reperfusion) forming four groups in total: control group baseline (CGBL), control group ischemia/reperfusion (CGIR), obese group baseline (OGBL) and obese group ischemia/reperfusion (OGIR) all with 6 mice/group. Changes in heart were analyzed by cardiac hemodynamic, mitochondrial respiration and molecular biology. Hemodynamic parameters analyzed were speed of contraction (Max dP/dt), speed of relaxation (Min dP/dt), isovolumetric relaxation time (Tau) and beats per minute (BPM), mitochondrial respiration by respiratory control ratio (RCR) in carbohydrate and fatty acid oxidation and molecular biology by key proteins like protein kinase B (AKT), adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), carnitine palmitoyl transferase 1 (CPT1), uncoupling protein 2 (UCP2), 4-hydroxynonenal (4-HNE) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The OG developed higher body weight (30.95%, $P < 0.001$), epididymal fat (68.64%, $P < 0.001$), retroperitoneal fat (109.38%, $P < 0.01$) and fasting glucose (19.52%, $P < 0.05$) compared to the CG. The parameters Max dP/dt and BPM were significantly decreased in OGIR compared to OGBL ($P < 0.001$ and $P < 0.05$). Min dP/dt was significantly decreased in CGIR and OGIR compared to CGBL ($P < 0.05$) and OGBL ($P < 0.0001$) respectively. Tau was significantly decreased in OGIR compared to CGIR and OGBL ($P < 0.0001$). These impairments of cardiac hemodynamic were associated to mitochondrial uncoupling since OGBL presented decreased of RCR, in both carbohydrate and fatty acid oxidation ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) and OGIR only in fatty acid oxidation ($P < 0.01$). Moreover, OGIR showed higher alterations in key proteins of cardiac energetic metabolism with decreasing AKT content ($P < 0.05$) and increasing CPT1 ($p < 0.05$), 4-HNE ($P < 0.05$) and GAPDH contents ($P < 0.05$) when compared to CGIR. Finally, the expression of mRNA for CPT1, GAPDH and UCP2 was increased in OGIR compared to CGIR ($P < 0.05$) and OGBL ($P < 0.05$). The expression of mRNA for UCP2 and CPT1 was decreased in CGIR compared to CGBL ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). Finally, the study presents consistent results demonstrating deleterious effects on adult heart metabolism resulting from nutritional changes during lactation.

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

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Esquema do modelo experimental dos grupos controle e hiperalimentados de 120 dias | 32 |
| Figura 2 – Esquema do protocolo de perfusão cardíaca em linha de base (LB) e isquemia/reperfusão (I/R) | 35 |
| Figura 3 – Separação de fases | 39 |
| Figura 4 – Parâmetros hemodinâmicos cardíacos dos animais controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 42 |
| Figura 5 – Razão do controle respiratório (RCR) de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado em ambas situações (linha de base e isquemia/reperfusão) aos 120 dias de vida | 44 |
| Figura 6 – O gráfico apresenta a razão AMPK/actina nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 45 |
| Figura 7 - O gráfico apresenta a razão pAMPK/AMPK nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 46 |
| Figura 8 – O gráfico apresenta o conteúdo total da proteína AKT nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 47 |
| Figura 9 – O gráfico apresenta a razão pAKT/AKT nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 48 |
| Figura 10– O gráfico apresenta o conteúdo total da proteína CPT1 nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 49 |
| Figura 11- O gráfico apresenta o conteúdo total da proteína GAPDH nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 50 |
| Figura 12– Expressão dos genes das enzimas CPT1 (A), UCP2 (B) e GAPDH (C) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida..... | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Peso corporal, gordura epididimal, gordura retroperitoneal, glicemia de jejum em camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 41 |
|--|----|

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------|---|
| 4-HNE | 4-hidroxinonenal |
| ADP | Adenosina difosfato |
| AKT | Proteína quinase B |
| AMPK | Proteína quinase ativada por AMP |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BPM | Batimentos por minuto |
| cDNA | Ácido desoxirribonucleico complementar |
| CPT 1 | Carnitina palmitoil Transferase |
| DEPC | Dietilpirocarbonato |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| FAD | Flavinamida adenina dinucleotídeo |
| GAPDH | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase |
| GC | Grupo controle |
| GCIR | Grupo controle isquemia/reperfusão |
| GGLB | Grupo controle linha de base |
| GH | Grupo hiperalimentado |
| GHIR | Grupo hiperalimentado isquemia/reperfusão |
| GHLB | Grupo hiperalimentado linha de base |
| GLUT4 | Transportador de glicose 4 |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IR | Isquemia e reperfusão |

| | |
|--------|--|
| LB | Linha de base |
| MPTP | Poros de permeabilidade mitocondrial |
| mRNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| mtDNA | DNA mitocondrial |
| NAD+ | Adenina dinucleotídeo |
| NHANES | National Health and Nutrition Examination Survey |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| Pi | Fosfato inorgânico |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-quinase |
| POF | Pesquisa de Orçamentos Familiares |
| RCR | Razão do controle respiratório |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| s | Segundos |
| TAM | Tecido adiposo marrom |
| Tau | Constante de tempo de relaxamento isovolumétrico |
| tRNA | Ácido ribonucleico transportador |
| UCPs | Proteínas desacopladoras |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|---|----|
| | INTRODUÇÃO | 14 |
| 1 | OBESIDADE | 15 |
| 1.1 | Nutrição e obesidade | 15 |
| 1.2 | Programação metabólica e obesidade | 16 |
| 1.3 | Modelo de hipernutrição na lactação | 18 |
| 1.4 | Bioenergética e disfunção mitocondrial na obesidade | 20 |
| 1.5 | Hemodinâmica cardíaca | 23 |
| 1.6 | Metabolismo energético cardíaco | 26 |
| 2 | OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 | Objetivo geral | 29 |
| 2.2 | Objetivos específicos | 29 |
| 2.2.1 | <u>Investigar o perfil biométrico dos grupos controle (GC) e hiperalimentado (GH) analisando os seguintes parâmetros</u> | 29 |
| 2.2.2 | <u>Investigar a hemodinâmica cardíaca de ambos os grupos em condições basais Linha de Base (LB) e Isquemia/Reperusão (IR) analisando os parâmetros</u> | 29 |
| 2.2.3 | <u>Investigar a biologia molecular relacionada à bioenergética cardíaca em condições basais Linha de Base (LB) e de Isquemia/Reperusão (IR)</u> | 30 |
| 2.2.4 | <u>Investigar o acoplamento mitocondrial através da razão de controle respiratório (RCR) determinada pela relação estado3/estado4 em ambos os grupos em condições basais Linha de Base (LB) e Isquemia/Reperusão (IR)</u> | 30 |
| 3 | MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 3.1 | Animais e modelo experimental | 31 |
| 3.2 | Análise do ganho de peso corporal dos animais durante o crescimento | 32 |
| 3.3 | Sacrifício | 33 |
| 3.4 | Crescimento naso-anal | 33 |
| 3.5 | Análise da glicemia de jejum | 33 |
| 3.6 | Hemodinâmica cardíaca – Langendorff | 34 |
| 3.7 | Respirometria cardíaca – Oroboros 2k | 36 |
| 3.7.1 | <u>Obtenção de fibras cardíacas permeabilizadas</u> | 36 |
| 3.7.2 | <u>Respirometria de alta resolução</u> | 36 |
| 3.8 | Western Blotting | 37 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.8.1 | <u>Preparo do tecido muscular cardíaco para Western Blotting</u> | 37 |
| 3.8.2 | <u>Análise por Western Blotting</u> | 37 |
| 3.9 | Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) | 38 |
| 3.9.1 | <u>Extração do RNA total</u> | 38 |
| 3.9.2 | <u>Retro Transcrição</u> | 40 |
| 3.10 | Análise estatística | 40 |
| 4 | RESULTADOS | 41 |
| 4.1 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre os parâmetros biométricos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 41 |
| 4.2 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a contratilidade cardíaca de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida | 42 |
| 4.3 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a respiração mitocondrial de fibras cardíacas de camundongos aos 120 dias de vida | 43 |
| 4.4 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da AMPK de camundongos aos 120 dias de vida | 44 |
| 4.5 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a fosforilação da AMPK de camundongos aos 120 dias de vida | 45 |
| 4.6 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da AKT de camundongos aos 120 dias de vida | 46 |
| 4.7 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a fosforilação da AKT de camundongos aos 120 dias de vida | 47 |
| 4.8 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da CPT1 | 48 |
| 4.9 | Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da GAPDH de camundongos aos 120 dias de vida | 49 |
| 4.10 | Expressões cardíacas de mRNAs para UCP2, CPT1 e GAPDH | 50 |
| 5 | DISCUSSÃO | 52 |
| | CONCLUSÃO | 57 |
| | REFERÊNCIAS | 58 |

INTRODUÇÃO

A obesidade é hoje um dos maiores problemas de saúde pública e considerada uma doença de ocorrência mundial, podendo ser gerada por fatores genéticos, hormonais, nutricionais, ambientais e socioculturais juntamente com os novos hábitos comportamentais das diferentes sociedades, como nutrição inadequada e falta de exercícios físicos com regularidade. Exemplos de enfermidades associadas à obesidade que podem estar presente independente da idade são: doenças cardiovasculares, pressão sanguínea elevada, dislipidemia, resistência à insulina e diabetes do tipo 2 .

Trabalhos demonstram que uma modificação no momento da janela crítica pode levar à um imprinting gerando consequências principalmente no vida adulta. Este trabalho teve como objetivo observar o desenvolvimento dos animais controles e hiperalimentados aos 120 dias de vida, através do modelo de redução da ninhada, desde as modificações do peso corporal até alterações na biologia molecular dos cardiomiócitos.

1 OBESIDADE

1.1 Nutrição e obesidade

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

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

sedentarismo, são as principais causas do aumento da obesidade no Brasil e nos demais países.

Acredita-se hoje que a obesidade estabelecida na idade adulta é um processo prospectivo com início na infância (OLIVEIRA, 2005). Ou seja, além do estilo de vida na infância, estudos sugerem que alterações nutricionais no ambiente intrauterino e pós-natal podem ser considerados vitais no desenvolvimento da obesidade, e também, no comprometimento de diferentes órgãos centrais e periféricos, levando a uma comorbidade associada ao ganho de peso e a síndrome metabólica (JAMES et al, 2006).

1.2 Programação metabólica e obesidade

O conceito de programação metabólica abrange basicamente o efeito prospectivo acima assinalado. Ou seja, programação metabólica define um processo no qual um estímulo ou insulto em um período crítico da vida, como no desenvolvimento fetal e/ou pós-natal, é capaz de gerar consequências duradouras ou permanentes ao longo da vida e na vida adulta em animais adultos (LUCAS, 1991). Por exemplo, McCance em 1962 demonstrou através de seus estudos pioneiros sobre programação metabólica em roedores, que por meio de um ajuste de ninhada, a quantidade de alimento consumida durante o período pós-natal gerava consequências em longo prazo sobre o crescimento (McCANCE, 1962). Desta forma, as hipóteses da —origem fetal das doenças no adulto, —programação fetal ou —resposta adaptativa precoce baseiam-se na observação de que mudanças ambientais no período pré-natal e/ou pós-natal podem alterar o desenvolvimento intrauterino, levando à obesidade e a complicações cardiovasculares e metabólicas na idade adulta (ARMITAGE et al., 2005). Ou seja, durante estes críticos períodos no início da vida, o organismo tem a capacidade de responder às situações ambientais tidas como inadequadas ao desenvolvimento normal.

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

al., 2006; HABBOUT et al., 2013; MARTINS et al., 2008; CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2009).

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

Em roedores o período de lactação tem sido descrito como um período importante ou —crítico ao desenvolvimento. A redução de ninhada (de 10-16 filhotes para 3-6 animais), ao aumentar a disponibilidade de leite por filhote, é capaz de determinar dislipidemia (HAHN, 1984), hiperinsulinemia (MARTINS et al., 2008), hiperleptinemia, aumento da massa corporal e adiposa, (SCHMIDT et al., 2001) em proles na idade adulta.

Desta forma, os processos acima estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de riscos à saúde dentre eles, as doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, obesidade, e também ao desequilíbrio no neurodesenvolvimento. Ao mesmo tempo, estudos sugerem que a persistência dos efeitos prospectivos de variações nutricionais na infância podem também ter como consequências modificações nos padrões de metilação do DNA em células específicas. Tais modificações por sua vez poderiam levar a alterações da expressão gênica em tecidos específicos. Além disso, sugere-se que a transmissão dessas alterações às células filhas ocorreria através de replicações (PATEL & SRINIVASAN, 2002).

1.3 Modelo de hipernutrição na lactação

Sabe-se que estímulos ambientais a nível físico, mental e/ou nutricional podem gerar modificações da expressão gênica na prole, alterações estas inapropriadas ou até mesmo deletérias predispostas a causar desordens metabólicas no organismo adulto (HABBOUT et al., 2013). Assim, o período pós-natal é considerado uma janela crítica, uma vez que, o organismo fica vulnerável a diversas modificações que podem ser definitivas na idade adulta.

O modelo de redução de ninhada, originalmente descrito por Plagemann e colaboradores (SCHMIDT et al., 2001; DÖRNER & PLAGEMANN, 1994; PLAGEMANN et al., 1992), pode ser resumidamente descrito pela redução da prole em 3 (três) animais no 3º dia de vida mantendo-a desta maneira até o final da lactação e do dia do sacrifício. A partir do 4º dia de vida, os animais que são assim mantidos tem acesso a uma maior disponibilidade de leite como resultado de um processo lactogênico programado para amamentar até 14 lactentes. Conforme demonstrado em resultados anteriores de nosso laboratório, esta maior oferta induz um maior consumo de leite pelo grupo hiperalimentado, além de maior quantidade de macronutrientes presentes no leite, como por exemplo, proteínas e triglicerídeos a partir do 10º dia de vida (CUNHA et al., 2009; MOREIRA et al., 2009).

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

Ainda, em relação ao modelo experimental de redução de ninhada, pode-se dizer que a instalação da obesidade e/ou sobrepeso está relacionada a maior propensão destes animais ao desenvolvimento de hipertensão, diabetes, hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia na idade adulta.

Especificamente no coração, as alterações nutricionais são capazes de causar modificações no processo celular de partição energética dos cardiomiócitos, ou seja, na fisiologia mitocondrial. Em decorrência deste processo, um novo padrão celular de produção e uso da energia é inaugurado. Assim, como resultado deste novo padrão, surgem modificações da hemodinâmica cardíaca e do metabolismo celular que à nível celular se retroalimentam. Isto é, se modifica a relação entre a demanda e uso de O₂ por adenosina trifosfato (ATP) produzido. Tal modificação na utilização celular de oxigênio gera por sua vez o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil) (VINCENT et al., 1999; LESNEFSKY et al., 2001; BHOPAL & RAFNSSON, 2009; SACK, 2006). Desta forma, o desequilíbrio provocado pela redução da atividade respiratória da mitocôndria associa-se à presença aumentada de espécies reativas de oxigênio (EROs) gerando a destruição oxidativa de proteínas, lipídios e DNA celulares (SHATTOCK & HADDOCK, 1995).

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

Estudos recentes com o modelo de hipernutrição na lactação têm demonstrado alterações significativas na bioenergética, hemodinâmica e estado redox dos cardiomiócitos de camundongos quando adultos. Por exemplo, Habbout e colaboradores (HABBOUT et al., 2013;) demonstraram recentemente que animais hiperalimentados durante a lactação por meio de redução de ninhada, apresentam alterações prematuras na expressão gênica cardíaca causando a longo prazo impactos nas funções cardiovasculares, assim como, no remodelamento cardíaco de camundongos adultos (HABBOUT et al., 2013). Estas funções cardiovasculares de animais hiperalimentados, parecem ser alteradas em virtude de modificações do fluxo coronariano, assim como, dos principais parâmetros hemodinâmicos, como velocidade sistólica (Max dP/dt), velocidade diastólica (Min dP/dt), fluxo coronário, frequência cardíaca e pressão do ventrículo esquerdo (HABBOUT et al., 2013).

Entretanto, até a presente data não estão descritas na literatura as consequências da hiperalimentação na lactação (120 dias de vida) na bioenergética mitocondrial e na biologia molecular (genes e proteínas) envolvidas diretamente na oxidação de carboidratos e ácidos graxos dos cardiomiócitos, em condições basais e de isquemia seguida de reperfusão.

1.4 Bioenergética e disfunção mitocondrial na obesidade

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

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

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

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

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

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

A disfunção mitocondrial ocorre, principalmente, por três processos diretamente relacionados, sendo eles o desacoplamento mitocondrial supracitado através de alterações da expressão de proteínas desacopladoras (UCPs), o aumento de espécies reativas de oxigênio via aumento de produtos da peroxidação lipídica, como o aldeído 4-hidroxinonenal (4-HNE), e as alterações das atividades enzimáticas, como as da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH).

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

A isquemia tem sido descrita como a principal causa de insuficiência cardíaca, de modo que, a isquemia e subsequente reperfusão, são descritos como processos geradores de um estado patofisiológico cardíaco altamente capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (BIENENGRAEBER et al., 2003). Neste contexto, estudos demonstram que a super expressão das proteínas desacopladoras (UCPs) diminui a produção de ROS, assim como, melhora a sobrevivência e contractilidade dos cardiomiócitos em condições de isquemia/reperfusão (HOERTER et al., 2004; BODYAK et al., 2007).

Segundo estudos com humanos e modelos animais, o aumento de espécies reativas de oxigênio encontra-se diretamente relacionado com a deficiência cardíaca, visto que, esse aumento foi observado nos quadros clínicos de insuficiência cardíaca congestiva e hipertrofia de cardiomiócitos (SAM et al., 2005),

que por sua vez, apresentavam o aumento da peroxidação lipídica, tido como um marcador de estresse oxidativo (NAKAMURA et al., 2005).

O principal produto da peroxidação lipídica, o aldeído insaturado 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), é formado pela ação peroxidativa de ácidos graxos ômega-6. A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre os lipídios insaturados das membranas celulares, gerando espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e induzindo a destruição de estruturas celulares, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e, em condição extrema, à morte celular programada (apoptose) (BARBER & BERNHEIM, 1967; RAY et al., 2012). Estudos com animais demonstram que a peroxidação lipídica altera a morfologia mitocondrial em virtude do excesso de formação de EROs e radicais superóxido, além de reduzir a produção de ATP e transcrição gênica de genes associados à insuficiência cardíaca (LASKOWSKI & RUSSELL, 2008).

O organismo apresenta mecanismos de defesa a possíveis danos que possam alterar a produção de energia pela mitocôndria. Especificamente, no coração, na situação de isquemia seguida de reperfusão, um possível mecanismo de sobrevivência celular dos cardiomiócitos se faz pela eliminação de mitocôndrias danificadas através dos lisossomos por autofagia, processo chamado de mitofagia (YOULE & NARENDRA, 2011). Este processo é induzido pela enzima GAPDH e iniciado pelo estresse oxidativo gerado em situação de isquemia/reperfusão (YOGALINGAM et al., 2013).

1.5 Hemodinâmica cardíaca

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

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

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

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

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

reperfusão é natural a observação da geração de danos ao tecido cardíaco no qual ocorre um aumento excessivo de EROs.

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

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

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

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

Estudo recente da literatura demonstrou que em corações isolados de camundongos ou ratos hiperalimentados na lactação, os parâmetros cardíacos basais encontram-se semelhantes àqueles dos animais controle. Mas, no entanto, após 30 minutos de isquemia seguida de reperfusão, a recuperação do rendimento cardíaco estava diminuída, e a quantidade total de lactato desidrogenase, um marcador de lesão celular liberado no efluente coronário durante o período de

reperfusão, foi encontrada significativamente elevada nos cardiomiócitos dos animais hiperalimentados (HABBOUT et al., 2012).

1.6 Metabolismo energético cardíaco

O funcionamento e resposta dos cardiomiócitos às condições fisiológicas aeróbica e anaeróbica, como por exemplo, a transição da isquemia para a reperfusão, envolvem proteínas responsivas as modificações fisiológicas celulares. A exemplo desses tipos de proteína se tem a AMPK, AKT e CPT1.

De maneira geral, as células apresentam mecanismos de proteção contra mudanças ambientais com a finalidade de manter a homeostase celular. Especificamente no coração, o estresse celular a partir do processo de isquemia gera a redução do fornecimento de energia (ATP). Deste modo, a AMPK é uma das principais proteínas recrutadas para controlar a demanda energética à sobrevivência dos cardiomiócitos (YOUNG, 2008). A AMPK é formada por um complexo de 3 subunidades, α , β e γ , sendo a isoforma α_2 a mais abundante nos cardiomiócitos e sensível as mudanças da concentração intracelular de AMP (KUDO et al., 1995).

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

Ao mesmo tempo, a AMPK atua como um sensor de estresse celular, ativada principalmente, por um aumento intracelular de adenosina monofosfato (AMP). Este aumento ocorre quando moléculas de adenosina difosfato (ADP) não são convertidas apenas em ATP, mas também em AMP, e portanto, sinalizando ineficiência na produção e utilização de energia na forma de ATP a partir dos

substratos energéticos. Entretanto, a molécula AMP é capaz de ativar a glicogênio fosforilase que por sua vez possibilita ao tecido cardíaco a obtenção de glicose a partir da quebra de moléculas de glicogênio (YOUNG, 2008; SALT et al., 1998).

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

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

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

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

Assim sendo, o coração é um órgão amplamente sensível a substratos energéticos e a ações hormonais. A insulina, por exemplo, é um hormônio com importante papel na hemodinâmica cardíaca e na cardioproteção, uma vez que, um desequilíbrio na cascata de sinalização celular da insulina e na captação de glicose via AKT e GLUT4 pode causar o desenvolvimento de insuficiência cardíaca em algumas condições patológicas como hipertensão e isquemia. Assim, em um quadro de resistência à insulina, o tecido cardíaco apresenta redução da flexibilidade metabólica do miocárdio apesar de utilizar a glicose como substrato energético preferencial para rápida conversão em ATP (YU et al., 2011; MARTINS et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da hiperalimentação na lactação na hemodinâmica cardíaca e na bioenergética mitocondrial na situação de Linha de base (LB) e Isquemia/Reperusão de camundongos *Swiss* machos adultos na idade adulta (120 dias de vida).

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Investigar o perfil biométrico dos grupos controle (GC) e hiperalimentado (GH) analisando os seguintes parâmetros:

- Peso corporal;
- Peso total da gordura visceral e retroperitoneal;
- Glicemia de jejum.

2.2.2 Investigar a hemodinâmica cardíaca de ambos os grupos em condições basais Linha de Base (LB) e Isquemia/Reperusão (IR) analisando os parâmetros:

- Max dP/dT (velocidade sistólica)
- Min dP/dT (velocidade diastólica)
- Tau (Tempo de relaxamento cardíaco isovolumétrico)
- BPM (Frequência cardíaca em batimentos por minuto)

2.2.3 Investigar a biologia molecular relacionada à bioenergética cardíaca em condições basais Linha de Base (LB) e de Isquemia/Reperusão (IR) analisando o:

- Conteúdo e/ou fosforilação das proteínas AKT, pAKT, AMPK, pAMPK, UCP2, CPT1, GAPDH por western blotting;
- Conteúdo do aldeído 4-HNE por western blotting;
- Expressão gênica das proteínas UCP2, CPT1 e GAPDH por PCR em tempo real.

2.2.4 Investigar o acoplamento mitocondrial através da razão de controle respiratório (RCR) determinada pela relação estado3/estado4 em ambos os grupos em condições basais Linha de Base (LB) e Isquemia/Reperusão (IR) analisando a:

- Oxidação de ácido graxos
- Oxidação de carboidratos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

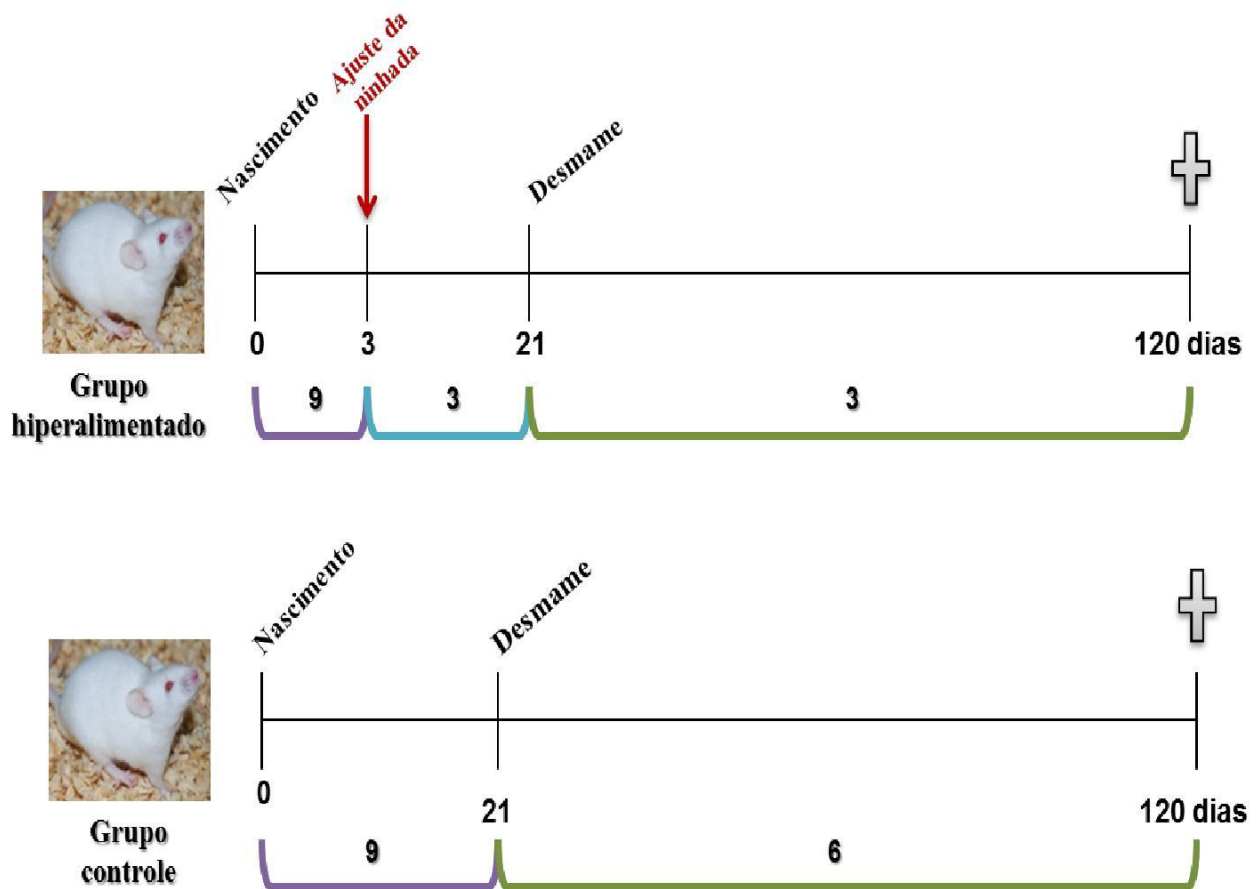
3.1 Animais e modelo experimental

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

Grupo controle (GC) - Ninhadas entre 9-12 filhotes amamentadas até o 21º dia (fim da lactação/desmame) de vida por lactantes alimentadas com ração comercial normal. No 21º dia um ajuste de ninhada é feito para 6 animais machos por caixa.

Grupo hiperalimentado (GH) - Ninhadas entre 9-12 filhotes amamentadas até o 3º dia de vida por lactantes alimentadas com ração comercial normal. No 3º dia de vida a ninhada é reduzida para apenas 3 animais machos por caixa os quais permanecem em período de lactação até o 21º dia (fim da lactação/desmame) de vida como os animais do grupo controle.

Figura 1 - Esquema do modelo experimental dos grupos controle e hiperalimentados de 120 dias



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

Após o nascimento, a partir do terceiro dia de vida, os camundongos *Swiss* machos pertencentes aos grupos controle e hiperalimentado foram pesados até o dia do sacrifício (120 dias). As pesagens foram conduzidas da seguinte maneira: os animais foram pesados no 3º dia de vida (dia 4), no 10º dia de vida (dia 10) e no 21º dia de vida (dia 21). Após o final da lactação (21º dia de vida) os animais foram pesados no 30º dia de vida (dia 30) e a partir daí 30 dias até os 120 dias de vida.

3.3 Sacrifício

Aos 120 dias de vida, os filhotes machos de ambos os grupos foram sacrificados.

Os animais foram anestesiados com Avertin® (2,2,2-tribromoetanol, 2-metil 2-butanol) na concentração 0,02ml/g de peso corporal intraperitoneal e heparinizados 15 minutos antes (heparina 1500UI/Kg de peso corporal) para impedir a coagulação do sangue. Posteriormente, o coração foi retirado vivo (com batimentos cardíacos), colocado na solução de Krebs-Henseleit em placa de petri para iniciar a canulação da aorta conforme método Langendorff. Após a remoção do tecido cardíaco, foram coletadas, e posteriormente pesadas em balança eletrônica de precisão, as gorduras retroperitoneal e epididimal.

3.4 Crescimento naso-anal

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

3.5 Análise da glicemia de jejum

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

3.6 Hemodinâmica cardíaca – Langendorff

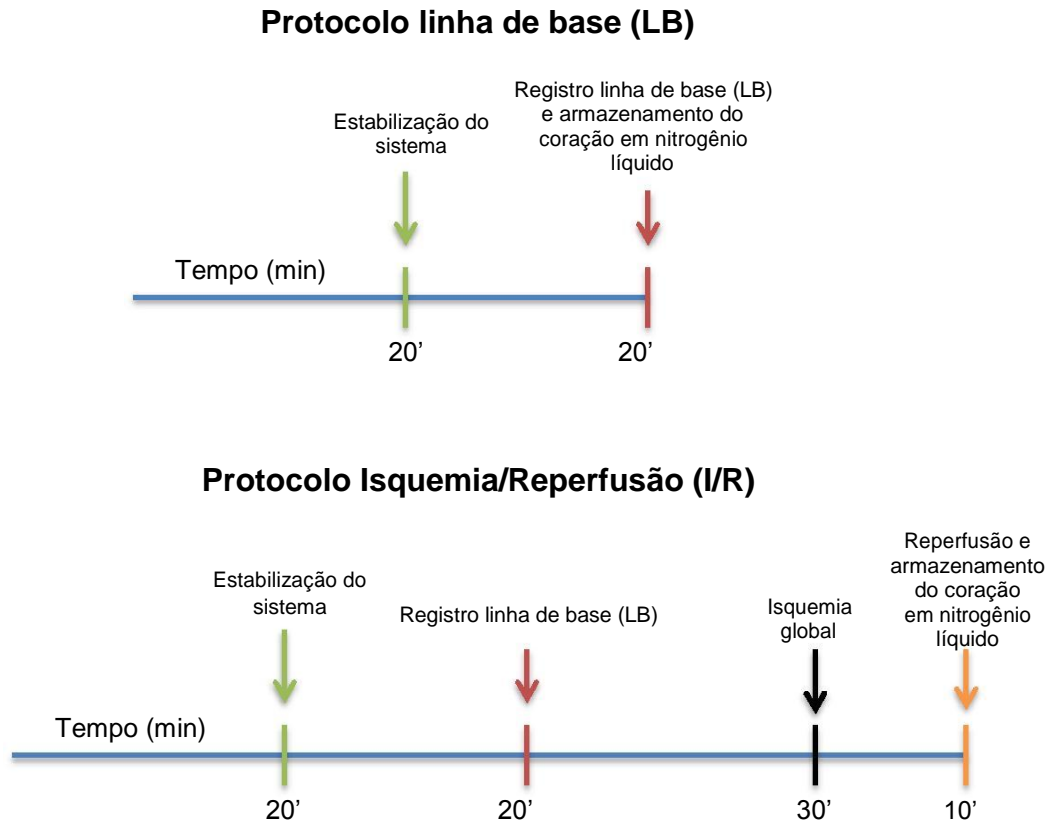
O coração dos camundongos Swiss machos com 120 dias de vida, dos grupos controle e hiperalimentado, foi rapidamente extraído da cavidade torácica e colocado em placa de petri contendo solução Krebs-Henseleit em temperatura ambiente. Posteriormente, foi feita a canulação da aorta torácica ascendente pela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

Cada coração foi posteriormente perfundido com solução de Krebs-Henseleit modificada (NaCl 118 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, NaHCO_3 25 mM, MgSO_4 1,2 mM, Na_2EDTA 0,5 mM, Glicose 10 mM e CaCl_2 3 mM, 4.4 piruvato e 0.77 ácido capróico), contendo mistura carbogênica (95% de O_2 e 5% de CO_2) e mantida à temperatura constante de 37°C (BROADLEY,1979). Ambos os grupos, controle e hiperalimentado, foram divididos em dois grupos sendo eles linha de base e isquemia/reperfusão. Assim, o estudo trabalhou com 4 grupos: grupo controle linha de base (GGLB), grupo controle isquemia/reperfusão (GCIR), grupo hiperalimentado linha de base (GHLB) e grupo hiperalimentado isquemia/reperfusão (GHIR). Os registros dos parâmetros hemodinâmicos tiveram duração de 20 minutos de linha base e/ou 20 minutos de linha de base, 30 minutos de isquemia global e 10 minutos de reperfusão (Figura 2).

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

Dentre os parâmetros hemodinâmicos oferecidos pelo programa Labchart 7.1 os principais foram analisados sendo eles a velocidade sistólica (Max dP/dt), velocidade diastólica (Min dP/dt), constante de tempo de relaxamento isovolumétrico (Tau) e batimentos por minuto (BPM - frequência cardíaca).

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



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

3.7 Respirometria cardíaca – Oroboros 2k

3.7.1 Obtenção de fibras cardíacas permeabilizadas

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

3.7.2 Respirometria de alta resolução

Após a permeabilização, as fibras foram pesadas em balança analítica e 2 a 3 mg de tecido foram adicionados à câmara do oxígrafo OROBOROS® Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) contendo 2ml de MIRO5 a 37°C. Todas as análises foram realizadas em concentrações de oxigênio superiores a 400 nmol O₂.ml⁻¹. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de O₂.s⁻¹.mg de peso úmido⁻¹. O estudo foi realizado com dois grupos de substratos independentes em cada câmara: (câmara A, em mM) glutamato 10, malato 2 e succinato 10, para a análise dos complexos I e II da cadeia respiratória e (câmara B,

em mM) palmitoil-carnitina 0.02 e malato 2, para a análise da oxidação de ácidos graxos. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: taxa respiratória basal, ante da adição de adenosina difosfato (ADP), estado 2; taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM), estado 3 e taxa respiratória na ausência de fosforilação de ADP, após a adição de oligomicina (2 µg/ml), estado 4. Para examinar a integridade mitocondrial através de todas as preparações, a respiração foi mensurada em presença de 10µM de citocromo c.

3.8 Western Blotting

3.8.1 Preparo do tecido muscular cardíaco para Western Blotting

Os ventrículos esquerdo (VEs) dos corações foram isolados e 100mg foi cortado e homogeneizado em gelo com um sonicador (Wheaton, EUA) durante 15 segundos num tampão contendo 20 mM de Tris HCl, 5 mM de EDTA, 10 mM de fluoreto de sódio, 1 M de sódio pirofosfato, 2 mM ortovanadato de sódio, 1%NP40 e 0,1% SDS adicionado de coquetel de inibidor de protease Complete EDTA-free em comprimido (Roche Diagnostics, Califórnia, EUA). Os homogenatos foram centrifugados a 400 x g durante 15 min a 4 °C. Os pellets foram descartados e os sobrenadantes congelados a -70 °C.

3.8.2 Análise por Western Blotting

O conteúdo total de proteínas/aldeído no extrato celular cardíaco do ventrículo esquerdo dos camundongos controle e hiperalimentado foi determinado através do método BCA (BCATM Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Rockford, U.S.A). O conteúdo da carnitina palmitoil transferase 1 (CPT1 – Sc-98834, Santa Cruz Biotechnology, USA), da proteína desacopladora 2 (UCP2 – Sc-6525, Santa Cruz Biotechnology, USA), da actina (Sigma), da AMP-proteína quinase (AMPK - #2532S,

Cell Signaling Technology), da AMP-proteína quinase fosforilada (pAMPK - #4188X, Cell Signaling Technology), da proteína quinase B (AKT – sc-8312, Santa Cruz Biotechnology, USA), da proteína quinase B fosforilada (pAKT – sc-7985 – R, Santa Cruz Biotechnology, USA), do aldeído 4-hidroxinonenal (4-HNE – ab46545, Abcam, USA) e da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH, sc-32233, Santa Cruz Biotechnology, USA) foram detectados por Imunoblotting.

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

Após separação por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membranas PVDF (Hybond P, Amersham Biosciences, UK Limited), bloqueadas com TBS-Tween (1% de Tween 20) contendo 5% de leite em pó desnatado durante 1 hora e incubadas com os anticorpos apropriados overnight. Posteriormente, as membranas PVDF foram então incubadas com anticorpos secundários conjugados com biotina adequadas anti-rabbit, anti-goat ou anti-mouse (SC-2040, SC-2042, SC-2039 - 1:2000 ou 1:3000 ou 1:5000, Santa Cruz Biotechnology), seguido por 1h de incubação com estreptavidina peroxidase conjugada (1:2000 ou 1:3000, ou 1:5000, Invitrogen, Camarillo, EUA). A imunorreatividade foi visualizada por quimioluminescência aumentada (ECL-Plus, Amersham Biosciences ou Thermo Scientific), e subseqüentemente quantificados por densitometria utilizando o software Image J[®] (NIH, Bethesda, MD, EUA).

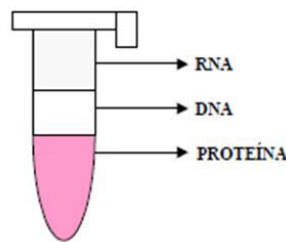
3.9 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR)

3.9.1 Extração do RNA total

Para análise da expressão gênica do das enzimas CPT1 e GAPDH, e da proteína UCP2, fragmentos de tecido cardíaco foram homogeneizados com 1ml de

Trizol™ (Life Technologies), conforme protocolo do fabricante. O homogenato foi transferido para um microtubo e deixado à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 µl de clorofórmio, misturando-se vigorosamente por cerca de 15 segundos e, novamente, deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 3 minutos. O homogenato foi centrifugado a 12.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos, para separação de fases (Figura 3).

Figura 3 - Separação de fases



A fase aquosa sobrenadante foi cuidadosamente transferida para outro microtubo. Em seguida, foram acrescentados e misturados 500 µl de isopropanol, deixando-se em repouso por 10 minutos, à temperatura ambiente. Nova precipitação foi, então, realizada a 12.000 rpm, a 4°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o *pellet* resultante foi ressuscitado em 1 ml de etanol a 75%. Após 5 minutos de centrifugação a 9.500 rpm, a 4°C, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente no interior do fluxo laminar. Posteriormente, o *pellet* foi ressuscitado em 50 µl de água DEPC (dietilpirocarbonato) e incubado a 60°C, por 10 minutos, para melhor dissolução do RNA.

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

3.9.2 RetroTranscrição (RT)

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas utilizando Taq-Man Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) com volume de reação de 25 μ L. Todas as reações foram realizadas em triplicatas com controle negativo. As reações de PCR foram realizadas utilizando o sistema de detecção ABI Prism 7500 (Applied Biosystems) nas seguintes condições de amplificação: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. A quantificação relativa de cDNA foi obtida pelo software do sistema 7500, que utiliza o método comparativo ($\Delta\Delta$ CT). Primers e sondas específicas para TaqMan CPT1, UCP2 e actina foram obtidos a partir do catálogo de expressão gênica ABI TaqMan (Foster City, CA, EUA). Este ensaio (kit) contém uma mistura de reação mix 20x, de detecção de junções éxon-éxon otimizado para se obter ~ 100% de eficiência.

3.10 **Análise estatística**

Todos os dados estão representados como a média \pm SEM. Os dados foram analisados com o programa estatístico GraphPad Prism 5.

O teste one-way ANOVA com pós-teste de Bonferroni foi utilizado para avaliar a significância estatística das diferenças entre os grupos para a hemodinâmica cardíaca e respirometria mitocondrial.

O teste t de student foi utilizado para analisar os dados de Western Blotting, a fim de determinar as diferenças entre as condições de linha de base e de isquemia/reperfusão, para os grupos controle e hiperalimentado. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

4 RESULTADOS

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

Camundongos do GH apresentaram diferenças significativas nos parâmetros biométricos analisados a partir do 10^o dia de vida até o dia do sacrifício (120 dias). O grupo hiperalimentado apresentou aumento do peso corporal (30.95%, $P < 0.001$), da gordura epididimal (68.64%, $P < 0.001$), da gordura retroperitoneal (109.38%, $P < 0.01$) e da glicemia de jejum (19.52%, $P < 0.05$) quando comparado ao grupo controle (tabela 1).

Tabela 1 – Peso corporal, gordura epididimal, gordura retroperitoneal, glicemia de jejum em camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias

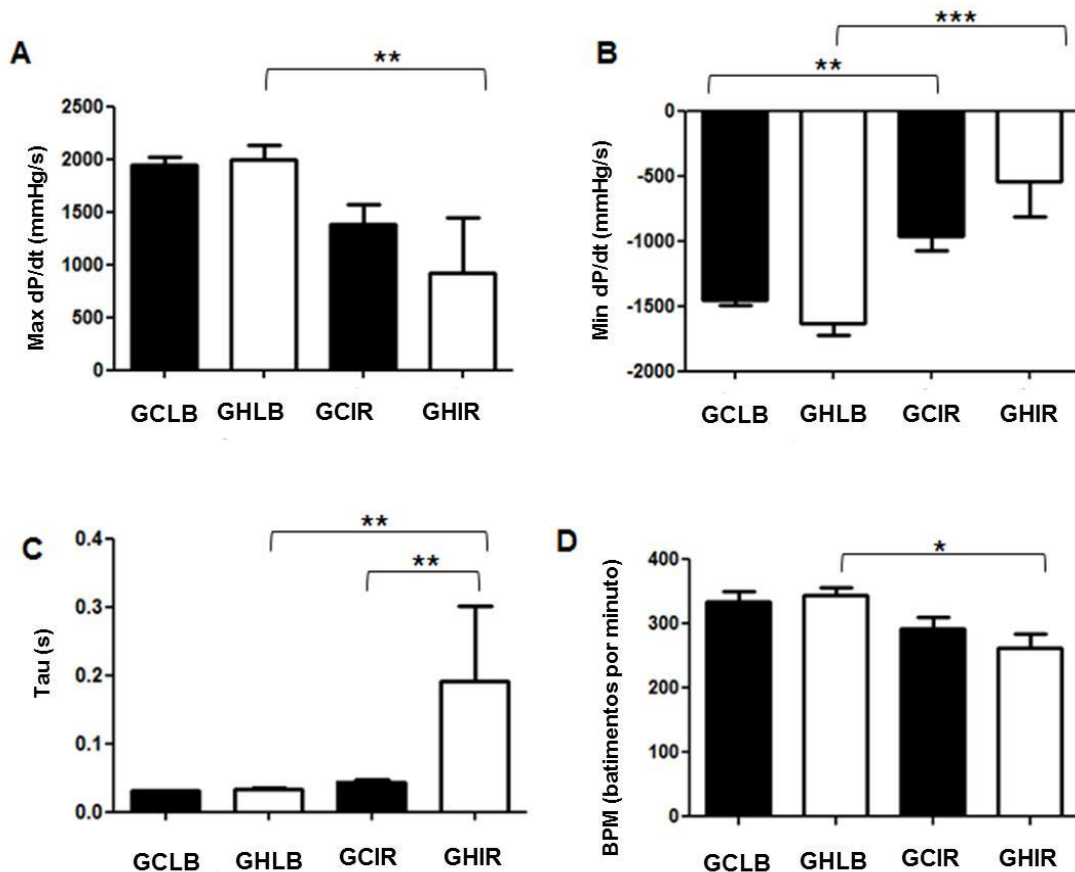
| | Peso corporal (g) | Gordura Epididimal (g) | Gordura retroperitoneal (g) | Glicemia de jejum (mg/dL) |
|-----------|-------------------|------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| GC | 44.97 ±1.081 | 1.199±0.076 | 0.7159±0.070 | 144.4±12.36 |
| GH | 58.89±1.383[***] | 2.022±0.186[***] | 1.499±0.190[**] | 172.6±7.004[*] |

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

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

Os resultados mostram que o GHIR apresenta diminuição significativa dos parâmetros hemodinâmicos, tais como, velocidade de contração (Max dP/dt) e frequência cardíaca (BPM) quando comparado ao GHLB ($P < 0.001$ e $P < 0.05$) (Fig. 4A e 4D). Os grupos GCLB e GCIR não apresentaram diferenças significativas nestes parâmetros. O GCIR apresentou a velocidade de relaxamento (Min dP/dt) reduzida significativamente quando comparado ao GCLB ($P < 0.05$), e no GHIR quando comparado ao GHLB ($P < 0.0001$) (Fig. 4B). Finalmente, o parâmetro tempo de relaxamento cardíaco (Tau) apresentou-se diminuído no GHIR quando comparado ao GCIR e GHLB ($P < 0.0001$) (Fig. 4C).

Figura 4 - Parâmetros hemodinâmicos cardíacos dos animais controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida

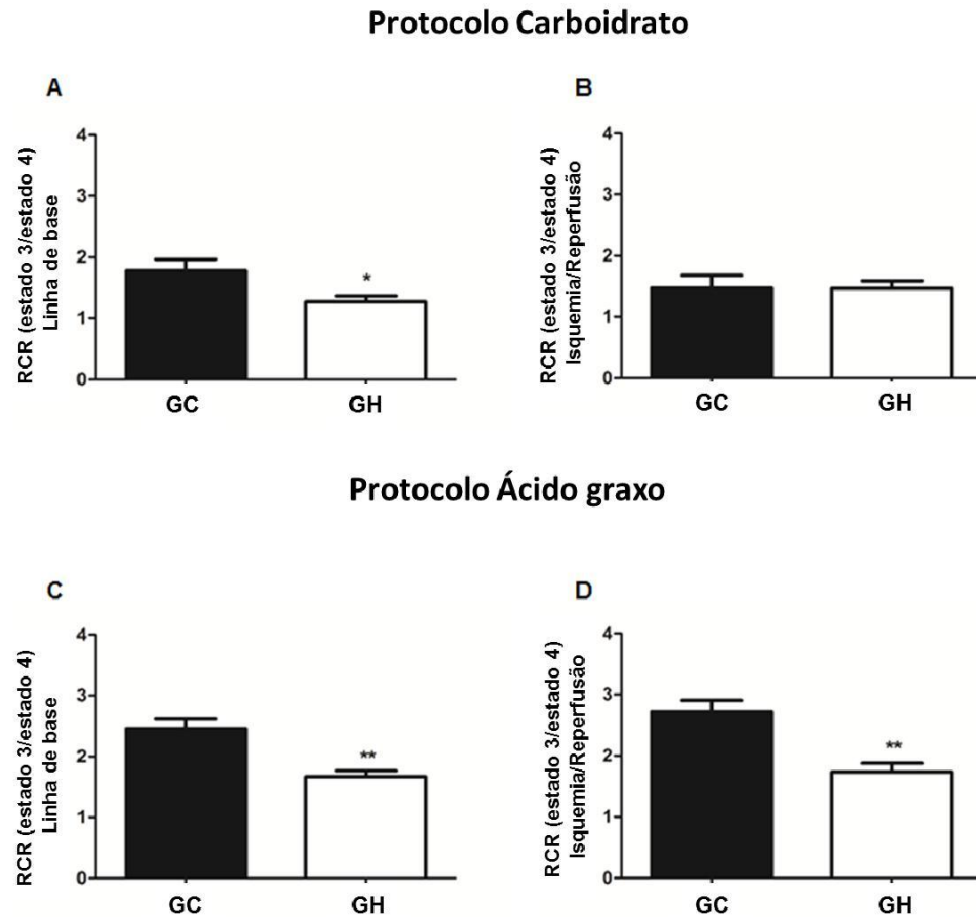


Legenda: Max dp/dt (velocidade sistólica– mmHg/s) **(A)**, Min dp/dt (velocidade diastólica - mmHg/s) **(B)**, Tau (tempo de relaxamento cardíaco isovolumétrico – s) **(C)** and BPM (batimentos por minuto) **(D)**. Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.0001$, quando comparado ao grupo controle. N=12 animais/grupo

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

Os resultados demonstram que o GHLB apresenta desacoplamento mitocondrial por meio da alteração da razão do controle respiratório mitocondrial (RCR) a qual se apresenta reduzida quando comparada a dos animais do GCLB para oxidação de carboidrato e ácido graxo ($P < 0.05$ e $P < 0.01$, respectivamente) (Fig. 5A e 5C). Entretanto, em situação pós-isquêmica, o GHIR apresentou o acoplamento mitocondrial diminuído apenas para oxidação de ácido graxo ($P < 0.01$) (Fig. 5D).

Figura 5 – Razão do controle respiratório (RCR) de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado em ambas situações (linha de base e isquemia/reperfusão) aos 120 dias de vida.

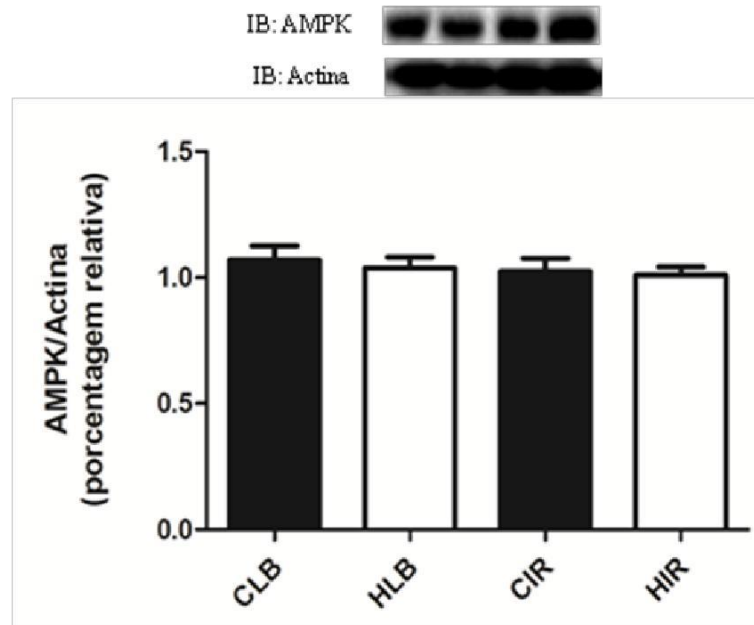


Legenda: Protocolo oxidação de carboidrato (A,B) e oxidação de ácido graxo (C, D). Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais em $\text{pmol de O}_2 \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{mg peso úmido}^{-1}$ * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.4 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da AMPK de camundongos aos 120 dias de vida

Os corações dos animais dos grupos controle e hiperalimentado não apresentaram diferença significativa para o conteúdo da proteína AMPK. (Fig.6).

Figura 6 - O gráfico apresenta a razão AMPK/actina nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.

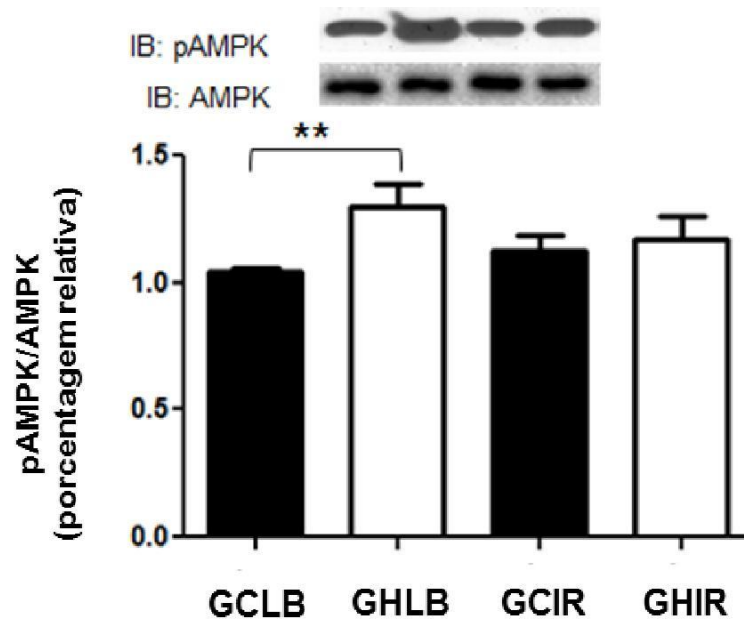


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais. N=6-7 animais / grupo. (Fig.6)

4.5 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a fosforilação da AMPK de camundongos aos 120 dias de vida

Os corações dos animais do grupo hiperalimentado apresentam um aumento significativo da fosforilação da AMPK através da razão pAMPK/AMPK apenas na situação linha da base quando comparado ao grupo controle linha de base (CGLB) ($p < 0.05$) (Fig.7).

Figura 7 - O gráfico apresenta a razão pAMPK/AMPK nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.

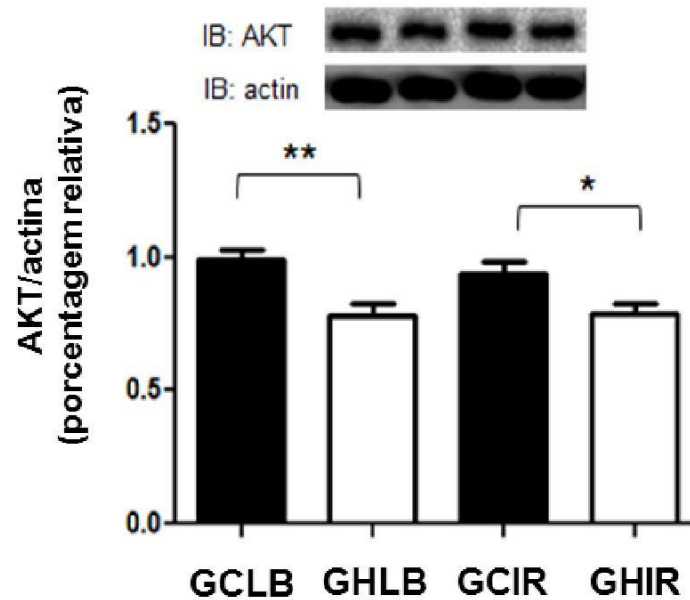


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.6 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da AKT de camundongos aos 120 dias de vida

Os corações dos animais dos grupos GHLB e GHIR apresentam aumento do conteúdo da proteína AKT quando comparados aos grupos GCLB ($P < 0.01$) e GCIR ($P < 0.05$), respectivamente (Fig. 8).

Figura 8 - O gráfico apresenta o conteúdo total da proteína AKT nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.

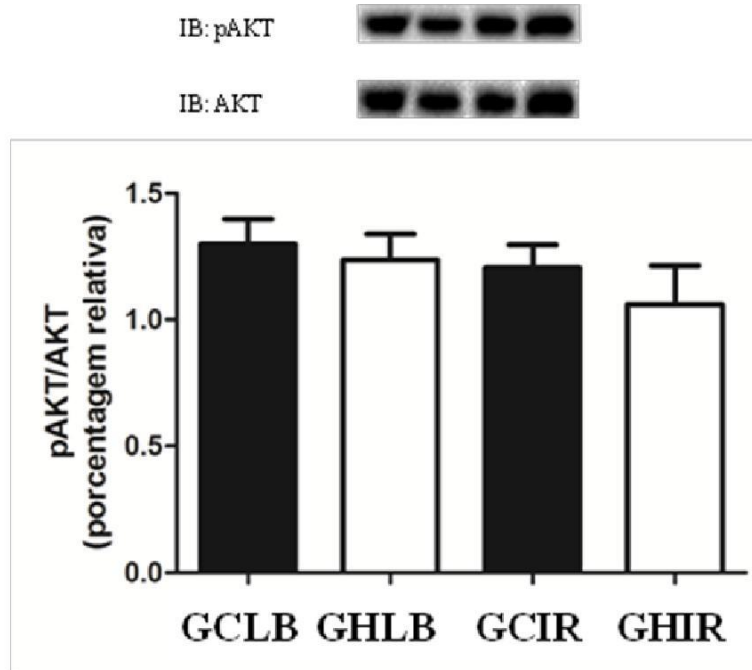


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.7 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre a fosforilação da AKT de camundongos aos 120 dias de vida

Os corações dos animais dos grupos controle e hiperalimentado não apresentaram diferença significativa para a fosforilação da proteína AKT. (Fig.9)

Figura 9 - O gráfico apresenta a razão pAKT/AKT nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.

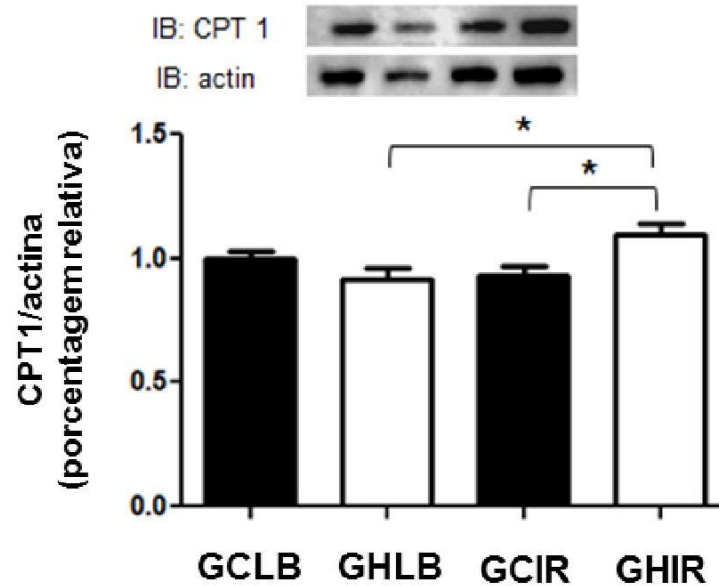


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais N=6-7 animais / grupo.

4.8 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da CPT1 de camundongos aos 120 dias de vida

Os corações dos animais do GHIR apresentam aumento do conteúdo de CPT1 quando comparados aos dos grupos GHLB ($P < 0.05$) e GCIR ($P < 0.05$) (Fig.10).

Figura 10 - O gráfico apresenta o conteúdo total da proteína CPT1 nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.

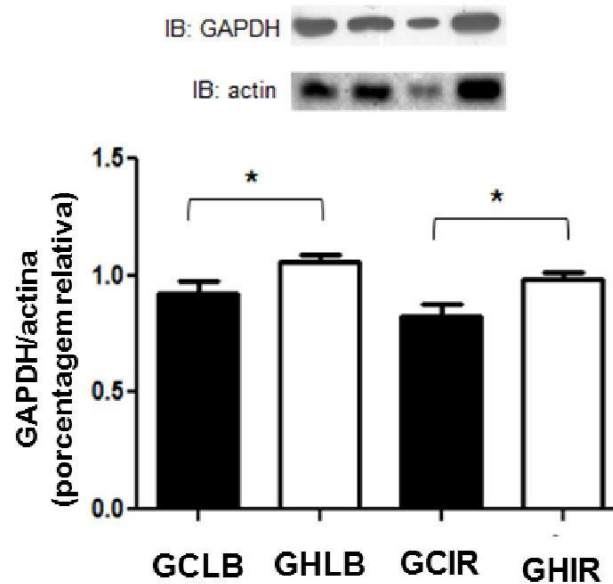


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.9 Efeito da hiperalimentação na lactação sobre o conteúdo da GAPDH de camundongos aos 120 dias de vida

Os corações de camundongos hiperalimentados apresentam aumento da GAPDH em ambas as situações, linha de base e isquemia/reperfusão, quando comparados aos grupos GCLB ($P=0.05$) e GCIR ($P < 0.05$), respectivamente (Fig.11).

Figura 11 - O gráfico apresenta o conteúdo total da proteína GAPDH nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.

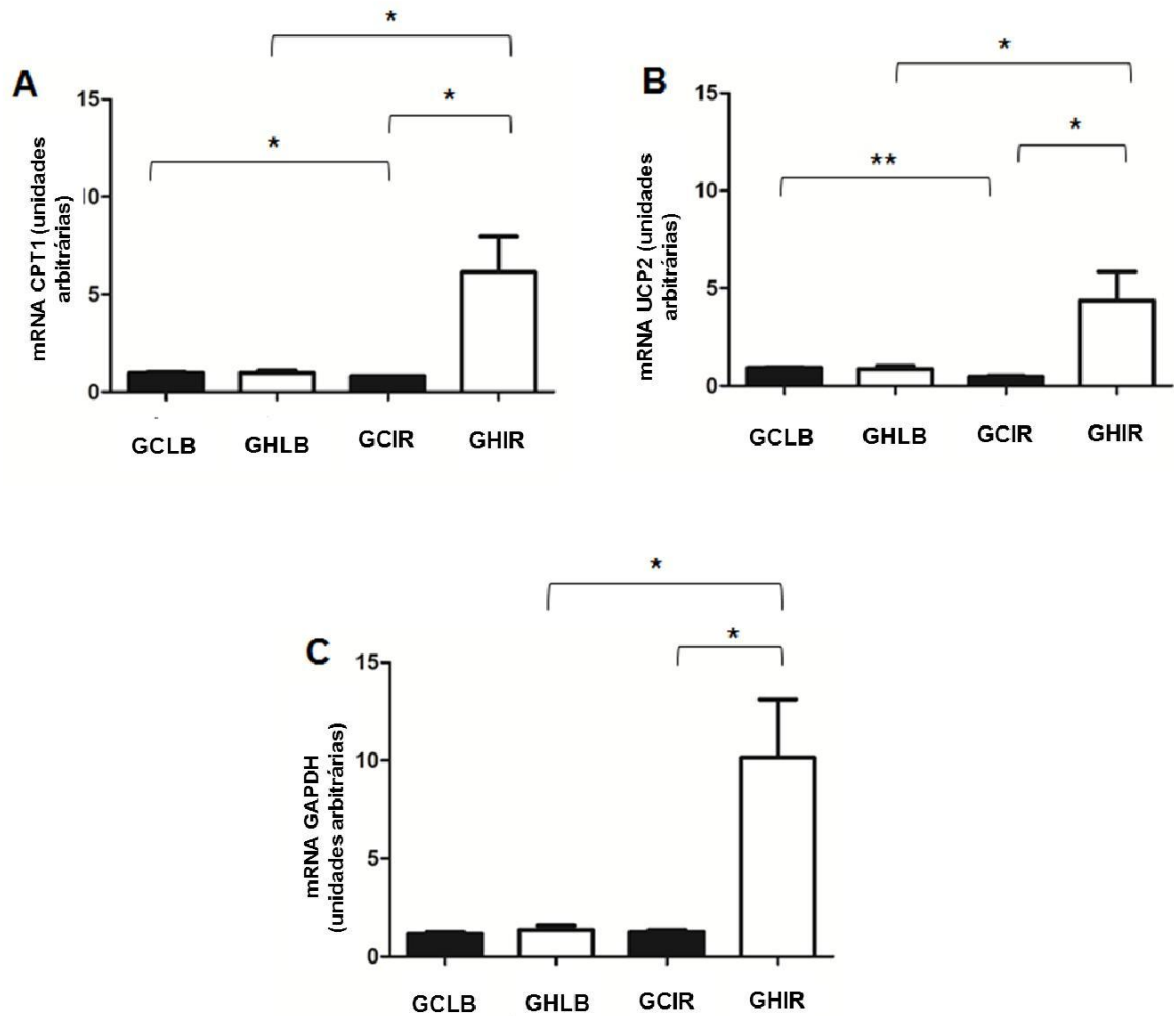


Legenda: Os valores representam média \pm EPM de cada grupo de animais * $P < 0.05$ quando comparado ao grupo controle. N=6-7 animais / grupo.

4.10 Expressões cardíacas de mRNAs para UCP2, CPT1 e GAPDH

A expressão cardíaca do mRNA para CPT1, GAPDH e UCP2 apresenta aumento significativo no GHIR quando comparado ao GCIR ($p < 0.05$) e GHLB ($p < 0.05$). De modo surpreendente, a expressão cardíaca dos mRNAs para UCP2 e CPT1 se apresenta reduzida no GCIR quando comparada ao GCLB ($P < 0.01$ e $P < 0.05$, respectivamente) (Fig. 12).

Figura 12 - Expressão dos genes das enzimas CPT1 (A), UCP2 (B) e GAPDH (C) nos cardiomiócitos de camundongos dos grupos controle e hiperalimentado aos 120 dias de vida.



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

5 DISCUSSÃO

Os resultados demonstram que, camundongos submetidos a hiperalimentação exclusivamente durante o período de , desenvolvem na idade adulta (120 dias) sobrepeso acompanhado do aumento das gorduras epididimal e retroperitoneal, assim como, de distúrbios fisiológicos e moleculares. Estes resultados confirmam a eficiência desta metodologia de redução de ninhada em estudo de programação metabólica e desenvolvimento de obesidade, o qual foi recentemente revisado por Habbout e colaboradores.

Estes resultados validam o modelo experimental em que a hiperalimentação induzida por redução de ninhada, e consequente aumento de disponibilidade de leite, é capaz de determinar sobrepeso em camundongos do início da vida (10 dias de vida) até a idade adulta (120 dias).

A maior disponibilidade de leite materno induzida pela redução de ninhada durante o período de lactação é capaz de desenvolver, como observado por Plagemann (PLAGEMANN et al., 1992), o mau funcionamento de vias metabólicas reguladoras, provocando o desenvolvimento de algumas doenças ao longo da vida. Por exemplo, o aumento de apetite, devido à elevada disponibilidade de nutrientes induz profundas alterações no ajuste hormônio-metabolismo, o que resulta, entre outras doenças, na obesidade na vida adulta.

O surpreendente aspecto deste modelo é a consequência sobre o desenvolvimento de modificações fisiológicas a longo prazo. Mudanças nutricionais durante o início da vida são capazes de induzir efeitos tardios na idade adulta em camundongos, independente da alimentação pós desmame (BRAND & ESTEVES, 2005; GNAIGER, 2009; LACERDA-MIRANDA et al., 2012; MARTINS et al., 2008). Deste modo, o modelo representa uma alternativa para aqueles que utilizam modelos experimentais em estudos de nutrição, tais como os que dependem da modificação genética ou induções por meio de dietas específicas (HABBOUT et al., 2013).

Neste trabalho, uma atenção especial foi dedicada às mudanças observadas em camundongos hiperalimentados, tais como: alterações na hemodinâmica cardíaca, na razão do controle respiratório mitocondrial e na biologia molecular de algumas proteínas chave envolvidas na regulação do metabolismo energético. A

atenção se deve ao fato de estudos anteriores sugerirem que, em diferentes tecidos, como o coração, os adipócitos e ilhotas pancreáticas (BRAND & ESTEVES, 2005; LACERDA-MIRANDA et al., 2012; MARTINS et al., 2008), as consequências da obesidade geradas pelo método de redução de ninhada têm características diferentes e riscos potenciais. Especificamente no coração, fortes associações têm sido estabelecidas entre a obesidade, a hemodinâmica cardíaca e o aumento do estresse oxidativo.

Portanto, a fim de estudar as implicações da hiperalimentação no desempenho cardiovascular, foi estudado primeiramente os principais parâmetros hemodinâmicos como Max dP/dt (velocidade sistólica), Min dP/dt (velocidade diastólica), Tau (tempo de relaxamento isovolumétrico) e BPM (batimentos por minuto). Basicamente, foi observado que camundongos hiperalimentados na lactação apresentam modificações na funcionalidade dos cardiomiócitos por meio da diminuição da Max dP/dt, Min dP/dt e BPM no GHIR quando comparado ao GHLB, e do aumento do Tau no GHIR comparado ao GHLB e ao GCIR. Ao mesmo tempo, animais do GC não apresentam tais modificações. Esses dados iniciais sugerem que as injúrias causadas pela isquemia e reperfusão são capazes de alterar o metabolismo dos cardiomiócitos de camundongos hiperalimentados comparadas à hemodinâmica de camundongos do grupo controle que apresentou diferença significativa apenas da Min dP/dt.

Resultados semelhantes foram recentemente publicados por outros autores, suportando a hipótese de que camundongos obesos, em virtude da hiperalimentação na lactação, são incapazes de suportar as injúrias causadas pela isquemia, principalmente devido ao aumento do estresse oxidativo e dano mitocondrial na idade adulta (VINCENT et al., 1999; HABBOUT et al., 2012; WANG et al., 2013).

Assim, uma vez que as mitocôndrias são organelas centrais responsáveis pela regulação da produção de energia e morte celular programada (HONDA et al., 2005), posteriormente, este estudo objetivou investigar o acoplamento mitocondrial na oxidação dos nutrientes mitocondriais (carboidrato e ácidos graxos) e na produção de ATP através da RCR, a fim de observar a relação entre as alterações da hemodinâmica cardíacas do GHIR e a insuficiência respiratória mitocondrial. Observamos que o GH apresenta redução da RCR na linha de base (oxidação de ácido graxo e carboidrato) e na situação de isquemia/reperfusão (apenas na

oxidação de ácidos graxos). Neste conjunto de experimentos e análises, mostramos que a hiperalimentação na lactação é capaz de modificar a razão do controle respiratório (RCR) obtida pela razão estado3 (estimulação ADP) /estado4 (ADP limitado). Estes resultados sugerem que camundongos obesos apresentam deficiência da função mitocondrial por desacoplamento, fato este diretamente associado à capacidade de contração dos cardiomiócitos.

A razão do controle respiratório é altamente correlacionada com o desacoplamento mitocondrial e a via de sinalização de proteínas desacopladoras, proteínas estas consideradas importantes por alguns autores pelo fato de serem negligenciadas na fisiologia dos cardiomiócitos.

Por exemplo, a proteína desacopladora UCP2, é reconhecida como funcional à emissão de espécies reativas de oxigênio (EROs mitocondrial) via feedback negativo (KARL et al., 2008). Assim sendo, nosso estudo observou um aumento da expressão do mRNA da UCP2 no GHIR comparado ao GHLB e GCIR corroborando com a associação da UCP2 ao desacoplamento mitocondrial cardíaco em situação de reperfusão. Neste caso, a elevada expressão do mRNA de UCP2 sugere o aumento de estresse oxidativo nos cardiomiócitos do GH.

A proteína quinase B (AKT) tem sido descrita como proteína chave na sinalização de sobrevivência celular, uma vez que, o complexo PI3K-AKT-eNOS resulta em uma modulação metabólica e proteção cardiovascular. Este papel pode estar associado aos complexos eventos de proteção cardiovascular, principalmente, por meio de ações anti-apoptóticas, anti-inflamatórias e anti-estresse oxidativo (QIUJUN et al., 2011; WANG et al., 2013). Considerando que neste estudo o GH, em ambas as situações, linha de base e isquemia/reperfusão apresentou diminuição da razão AKT/actina, os dados sugerem que os corações de camundongos hiperalimentados na lactação são mais suscetíveis à danos nos cardiomiócitos em condições basais e de reperfusão por meio de alterações na via de sinalização da AKT. Além disso, a proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK), a qual é uma proteína ativada em resposta a uma situação de estresse celular via aumento intracelular de AMP (TISDALE, 2001), não apresentou diferenças entre os grupos controle e experimental, mas a razão pAMPK/AMPK em situação de linha de base apresenta-se diferença no GHLB comparado ao GCLB.

Os resultados da AMPK, juntamente com a não diferença da RCR na oxidação de carboidrato no GHIR comparado ao GCIR sugerem que, o coração de

camundongos obesos pós isquêmicos, utiliza principalmente carboidrato (glicose) como substrato energético ao invés de ácido graxo na idade adulta, corroborando com os resultados de Marsin et al (2000).

Paradoxalmente, o conteúdo e a expressão de mRNA da proteína CPT1 foram encontrados aumentados na situação pós isquêmica no GH e diminuídos no GC na mesma situação. Sugere-se que, os cardiomiócitos de camundongos obesos acometidos pelas injúrias pós-isquêmica apresentam o aumento da expressão da CPT1 como um processo compensatório de consumo energético, entretanto, a principal via de obtenção de energia é a oxidação de carboidratos.

Finalmente, outra causa proposta para as alterações da hemodinâmica cardíaca de camundongos hiperalimentados na lactação é o estresse oxidativo cardíaco na idade adulta decorrente da programação metabólica no início da vida. De modo a estudar esse processo a enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi estudada.

A enzima glicolítica GAPDH está envolvida em outros diferentes processos celulares como o reparo de DNA (TISDALE, 2001), a exportação do tRNA (TRISTAN et al., 2011), a fusão membranar (TISDALE, 2001), a dinâmica do citoesqueleto (KUMAGAI & SAKAI, 1983) e a morte celular (HABBOUT et al., 2013). Especificamente na mitocôndria, a GAPDH tem sido descrita elevada em condições de estresse celular, levando a diminuição do potencial da membrana interna mitocondrial e extravasamento de proteínas pro-apoptóticas (TARZE et al., 2007). Nossos resultados demonstram que o conteúdo e expressão do mRNA da GAPDH se encontram elevados no GHLB e GHIR sugerindo que o coração de camundongos hiperalimentados na lactação podem apresentar alterações no reparo do DNA, na exportação do tRNA, na fusão de membrana, na dinâmica do citoesqueleto e/ou na morte celular independente da condição energética (linha de base e isquemia/reperfusão).

Em síntese, nossos estudos demonstraram, pela primeira vez, que o mau funcionamento da hemodinâmica cardíaca em condições basais e pós-isquêmicas em camundongos hiperalimentados na lactação está diretamente relacionado ao desacoplamento mitocondrial, ao aumento do estresse oxidativo e a proteção a essas condições através das vias de sinalização do aldeído 4-HNE e das proteínas UCP2 e AKT. Além disso, pode-se dizer que a diminuição da capacidade cardíaca

também está relacionada com o aumento de proteínas pro-apoptóticas como a GAPDH.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e apresentados, podemos concluir que a indução da obesidade pelo método de redução de ninhada, e consequente aumento da disponibilidade de leite materno gera consequências prejudiciais a longo prazo, uma vez que, este trabalho demonstrou que na idade adulta os animais hiperalimentados apresentaram alterações significativas na hemodinâmica cardíaca em virtude de modificações na respiração mitocondrial via redução da razão do controle respiratório (RCR).

A hiperalimentação também é capaz de induzir alterações nas cascatas de sinalização e expressão gênica de proteínas chave tais como CPT1, UCP2, AKT, AMPK e GAPDH considerados essenciais para o funcionamento basal e pós-isquêmico do metabolismo energético cardíaco.

REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, G; ZWEIER, JL; FLAHERTY JT. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.*, v. 23, p. 1359–74. 1991.
- ARMITAGE, JA; TAYLOR, PD; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol.*, v. 565 (Pt 1), p. 3–8. 2005.
- BARBER, AA; BERNHEIM, F. Lipid peroxidation: Its measurement, occurrence and significance in animal tissues. *Adv. Gerontol. Res.*, v. 2, p. 355-403. 1967.
- BAYNE K. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. *American Physiological Society. Physiologist.*, v. 39, n.199, p.208–11, 1996.
- BHOPAL, RS; RAFNSSON, SB. Could mitochondrial efficiency explain the susceptibility to adiposity, metabolic syndrome, diabetes and cardiovascular diseases in South Asian populations? *Int J Epidemiol.*, v. 38, n.4, p.1072-81. 2009.
- BIENENGRAEBER, M; OZCAN, C; TERZIC, A. Stable transfection of UCP1 confers resistance to hypoxia/reoxygenation in a heart-derived cell line. *J Mol Cell Cardiol.* v.35, p.861–865.2003.
- BODYAK, N et al. Uncoupling Protein-2 Modulates Cell Viability in Adult Rat Cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v.293, n.1, p.H829-35. 2007.
- BRAND, MD; ESTEVES, TC. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab.*, v. 2, n.2, p. 85-93. 2005.
- BROADLEY,KJ. The Langendorff heart preparation—Reappraisal of its role as a research and teaching model for coronary vasoactive drugs. *Journal of Pharmacological Methods.*, v.2, p.143-156. 1979.
- CONCEIÇÃO, EP et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance. *J Nutr Biochem.*, v.24, n.1, p.81-7. 2013.
- CORTESE, JD; VOGLINO, AL; HACKENBROCK, CR. Ionic strength of the intermembrane space of intact mitochondria as estimated with fluorescein-BSA delivered by low pH fusion. *J Cell Biol.*, v.113, n.6, p.1331-40.1991.
- CUNHA, AC et al. Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion—the role of GLUT-2. *J Nutr Biochem.*, v.20, p.435–42. 2009.
- DIAZ, F; MORAES, CT. Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium.*, v.44, p. 24–35. 2008.

DÖRNER, G; PLAGEMANN, A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res.*, v.26, p.213–21.1994.

DU TOIT, EF et al. Myocardial susceptibility to ischemic-reperfusion injury in a prediabetic model of dietary-induced obesity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, v.294, n.5, p.H2336-43. 2008.

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

HABBOUT, A et al. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie.*, v.94, p.117–24. 2012.

HABBOUT, A et al. Postnatal overfeeding causes early shifts in gene expression in the heart and long-term alterations in cardiometabolic and oxidative parameters. *PLoS one.*, v.8, n.2, p.e56981.2013.

HABBOUT, A et al. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *J Nutr.*, v. 143, n.5, p.553-62. 2013.

HAHN, P. Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. *J Nutr.*, v.114, n.7, p.1231-4. 1984.

HALESTRAP, AP; CLARKE, SJ; JAVADOV, SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res.*, v.61, n.3, p.372-85. 2004.

HOERTER, J et al. Mitochondrial uncoupling protein 1 expressed in the heart of transgenic mice protects against ischemic-reperfusion damage. *Circulation.*, v.110, p.528–533. 2004.

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

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

ISHIDA, Y et al. Left ventricular filling dynamics: influence of left ventricular relaxation and left atrial pressure. *Circulation.*, v.74, p.187-196. 1986.

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

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

KUDO, N et al. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP-activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.*, v.270, n.29, p.17513-20.1995.

KUMAGAI H, SAKAI H. A porcine brain protein (35 K protein) which bundles microtubules and its identification as glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *J Biochem.*, v.93, n.5, p.1259-1269. 1983.

LACERDA-MIRANDA, G et al. Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice. *Peptides.*, v.35, n.1, p.65-73. 2012.

Laskowski, KR; Russell, RR. Uncoupling Proteins in Heart Failure. *Curr Heart Fail Rep.*, v.5, n.2, p. 75–79. 2008.

Lesnefsky, EJ et al. Mitochondrial dysfunction in cardiac disease: ischemia--reperfusion, aging, and heart failure. *J Mol Cell Cardiol.*, v.33, n.6, p.1065-89. 2001.

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

LIMA, NS et al. Developmental plasticity of endocrine disorders in obesity model primed by early weaning in dams. *Horm Metab Res.*, v.45, n.1, p.22-30. 2013.

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

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

MARSIN, AS. Phosphorylation and activation of heart PFK-2 by AMPK has a role in the stimulation of glycolysis during ischaemia. *Curr Biol.*, v.10, p.1247-1255. 2000.

MARTINS, MR et al. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *J Endocrinol.*, v.198, p.591–8. 2008.

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

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

MONTEIRO, P et al. Mitocôndrias: que papel na isquemia, Reperusão e morte celular?. *Rev Port Cardiol.*, v.22, p.233-254. 2003.

MOREIRA, AS et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*, v.19, n.11, p.805-10. 2009.

- MORRISON, JA et al. Metabolic syndrome in childhood predicts adult metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus 25 to 30 years later. *J Pediatr.*, v.152, p.201–6. 2008.
- NAKAMURA, K et al. Relationship between oxidative stress and systolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J Card Fail.*, v.11, p.117–123. 2005.
- OGDEN, CL et al. The Epidemiology of Obesity. *Gastroenterology.* v.132, n.6, p. 2087-2102. 2007.
- OLIVEIRA, LPM. Alimentação complementar nos primeiros dois anos de vida. *Revista de Nutrição.* Campinas. v. 18, n.4, p. 459-469. 2005.
- OZANNE, SE; HALES, CN. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc.*, v.58, n.3, p.615-9.1999.
- PATEL, MS; Srinivasan, M. Metabolic programming: causes and consequences. *J Biol Chem.*, v.277, n.3, p.1629-32. 2002.
- PEREIRA, RO et al. Overfeeding during lactation modulates insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. *Regul Pept.*, v.136, p.117–21. 2006.
- PLAGEMANN, A et al. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. *Exp Clin Endocrinol.*, v.99, n.3, p.154-8. 1992.
- Yu, Q; Gao, F; Ma, XL. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.*, v.89, n.3, p.516-524. 2011.
- RAY, PD; HUANG, BW; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal.*, v.24, n.5, p.981-90. 2012.
- SACK MN. Mitochondrial depolarization and the role of uncoupling proteins in ischemia tolerance. *Cardiovascular Research.*, v.72, p.210–219. 2006.
- SALT, I et al. AMP-activated protein kinase: greater AMP dependence, and preferential nuclear localization, of complexes containing the alpha2 isoform. *J Biochem.* v.334, p.177–187. 1998.
- SAM, F et al. Increased reactive oxygen species production and functional alterations in antioxidant enzymes in human failing myocardium. *J Card Fail.*, v.11, p.473–480. 2005.
- SCHMIDT I, et al. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v.25, n.8, p.1168-74. 2001.

SHATTOCK, MJ; HADDOCK, PS. Oxidant stress and the heart: modulation of ion transport mechanisms during ischemia and reperfusion. *Immunopharmacology of Free Radical Species*. 1995.

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

STETTLER, N et al. Weight gain in the first week of life and overweight in adulthood: a cohort study of European American subjects fed infant formula. *Circulation*. v.111, p.1897–903. 2005.

TARZE, A et al. GAPDH, a novel regulator of the pro-apoptotic mitochondrial membrane permeabilization. *Oncogene*. v.26, n.18, p.2606-2620. 2007.

TISDALE, EJ. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J Biol Chem.*, v.26, p.2480-2486. 2001.

TRISTAN, C et al. The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. *Cell Signal.*, v.23, n.2, p.317-323. 2011.

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

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

VINCENT, HK et al. Overweight and sudden death: increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch Intern Med.*, v.147, p.1725 ± 1728. 1987.

VINCENT, HK et al. Mechanism for obesity-induced increase in myocardial lipid peroxidation. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v.25, n.3, p.378-88. 2001.

VINCENT, HK et al. Obesity is associated with increased myocardial oxidative stress. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v.23, p.67–74. 1999.

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

WANG, CH et al. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: Implication in the pathophysiology of aging. v.238, n.5, p.450-60. 2013.

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

YOGALINGAM, G et al. Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Phosphorylation by Protein Kinase C δ (PKC δ) Inhibits Mitochondria Elimination by

Lysosomal-like Structures following Ischemia and Reoxygenation-induced Injury. *J Biol Chem.*, v. 288, n.26, p.18947-60. 2013.

YOULE, RJ; NARENDRA, DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v.12, p. 9-14. 2011.

YOUNG, LH et al. Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation.* v.95, p.415– 422. 1997.

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

YU, Q; GAO, F; MA, XL. Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res.*, v.89, n.3, p.516-24. 2011.