



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

Daniela Caldas de Andrade

Análise das células-tronco cardíacas residentes e do potencial terapêutico de IGF-1 no coração em modelo experimental de obesidade

Rio de Janeiro
2018

Daniela Caldas de Andrade

Análise das células-tronco cardíacas residentes e do potencial terapêutico de IGF-1 no coração em modelo experimental de obesidade

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

Orientadora: Prof^a. Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques

Coorientadora: Prof^a. Dra. Laís de Carvalho

Rio de Janeiro

2018

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

A553 Andrade, Daniela Caldas de.

Análise das células-tronco cardíacas residentes e do potencial terapêutico de IGF-1 no coração em modelo experimental de obesidade / Daniela Caldas de Andrade. – 2018.
105 f.

Orientadora: Prof^a. Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques.
Coorientadora: Prof^a. Dra. Laís de Carvalho

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

1. Células-tronco – Teses. 2. Obesidade – Teses. 3. Adiposidade – Teses. 4. Sistema cardiovascular – Doenças – Teses. 5. Receptor IGF tipo 1. I. Marques, Erika Afonso Costa Cortez. II. Carvalho, Laís de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 602.9:611.018

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB/7 - 5302

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

Assinatura

Data

Daniela Caldas de Andrade

Análise das células-tronco cardíacas residentes e do potencial terapêutico de IGF-1 no coração em modelo experimental de obesidade

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

Aprovada em 30 de julho de 2018.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Erika Afonso Costa Cortez Marques (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a. Dra. Alessandra Alves Thole
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a Dra. Érica Patrícia Garcia de Souza
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof^a. Dra. Helene Santos Barbosa
Fundação Oswaldo Cruz

Prof^a Dr. Vinícius Novaes Rocha
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia, ao meu pai José Maria, minha mãe Elza e meu irmão Guilherme.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, pelo seu amor infinito, sem Ele não sou nada. Obrigada pelo alento nos momentos de sofrimento e aflição.

Aos meus pais, José Maria e Elza, meus maiores exemplos. Agradeço pelo incentivo e orientação, pelas orações e preocupação. Ao meu irmão, Guilherme, meu companheiro e cúmplice.

A Prof^a Dra. Erika A. C. Cortez, LPCT/DHE, minha orientadora no desenvolvimento desse projeto, agradeço pela paciência, apoio e dedicação. Agradeço, ainda, pela generosidade em partilhar o conhecimento, incentivo e por guiar meus passos nesse novo universo.

A Prof^a Dra. Laís de Carvalho, minha coorientadora e coordenadora do Laboratório de Pesquisa em Células-Tronco, do Departamento de Histologia e Embriologia (LPCT/DHE/UERJ), agradeço pela oportunidade, incentivo e confiança. Agradeço também pelos conselhos e pelo conhecimento tão generosamente ofertados que por certo serão de grande ajuda no meu futuro profissional e crescimento pessoal.

A Prof^a Dra. Simone Nunes de Carvalho, LPCT/DHE, agradeço por ser um modelo de profissional, pela paciência e dedicação. Agradeço por ter me ajudado e incentivado nos meus primeiros passos como futura cientista, ainda na iniciação científica.

A Prof^a Dra. Alessandra Alves Thole, LPCT/DHE, agradeço pelos momentos de descontração e aprendizado em cultura de células.

A Prof^a Dra. Ana Carolina Stumbo Machado, do LPCT/DHE, pelo apoio, cuidado e preocupação que demonstra e por transmitir seus conhecimentos de maneira tão generosa e terna.

A amiga Daphne Pinheiro, minha companheira de viagens, aventuras e do cafezinho da tarde! Agradeço imensamente pela amizade e pelos momentos de descontração. Obrigada por me escutar nos meus momentos de fraqueza e angústia. Seus conselhos são sempre muito valiosos. Te amo!

As amigas Camila Luna da Silva e Genilza Pereira de Oliveira, pela ajuda, compreensão e pelos momentos de descontração. Agradeço também pelos conselhos, amizade, confiança e cumplicidade.

Ao meus Plus tão amado, Isabelle Dias, Luana Leirós, Thiago Alves e Juliana Daú, obrigada pelas risadas, papos aleatórios e conselhos. Nossa mesa cativa do bar do Adão nos espera para mais comemorações ou um happy hour básico.

Aos alunos e ex-alunos do LPCT, meu muito obrigada pelo incentivo e pela ajuda durante o desenvolvimento desse projeto. Meu agradecimento especial para Bruna Fadel, Elisa Martinho, Filipe Jorge e Beatriz Coutinho, alunos de iniciação científica vinculados ao projeto, com o quais eu tive a honra de trabalhar, sorrir e chorar. Aprendi com cada um de vocês.

Aos funcionários e técnicos do DHE/ UERJ, especialmente João Roberto Perez, Ana Lúcia Rosa Nascimento, Alan Cesar Nunes de Moraes e Josefa da Silva Alves, pela simpatia e por me acolherem com carinho.

E por último, mas não menos importante, agradeço ao meu Tripé, Mariana Pitombo, Cristóvão Lanna e Bárbara Rangel. Amo vocês, obrigada por tudo!! Agradeço muito pelo dia que conheci vocês. Nossos encontros sempre me deixavam mais leve e energizada.

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

RESUMO

ANDRADE, Daniela Caldas de. *Análise das células-tronco cardíacas residentes e do potencial terapêutico de IGF-1 no coração em modelo experimental de obesidade.*

105 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade na obesidade. A presença de células progenitoras no miocárdio, incluindo as células-tronco cardíacas residentes (CTC; c-kit⁺Lin⁻) e as células progenitoras endoteliais (CPE; CD133⁺), tem sido sugerido como um possível mecanismo de regeneração cardíaca. Entretanto, apesar do avanço na compreensão dessas células, os mecanismos que regulam a sua sobrevivência em condições patológicas ainda não estão claros. Nosso grupo demonstrou recentemente que a obesidade está relacionada com danos às células-tronco de medula óssea. Além disso, a cardiomiopatia diabética está associada com diminuição do número e capacidade proliferativa das CTC. A administração de IGF-1 e HGF em modelo de infarto do miocárdio estimulou a resposta regenerativa de CTC, sem a necessidade do transplante de células, induzindo a migração, proliferação e diferenciação das CTC em células cardíacas e da microvasculatura. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar o potencial terapêutico do IGF-1 sobre as CTC em modelo de obesidade induzida por dieta Ocidental. Camundongos Swiss machos de 21 dias foram divididos em grupo controle (GC, N=8), alimentado com dieta padrão, e grupo obeso (GO, N=16), alimentado com dieta Ocidental, rica em gordura saturada e carboidratos simples, por 12 semanas. Parte dos animais do grupo obeso (N=8) recebeu uma injeção subcutânea diária de IGF-1 por sete dias consecutivos (GO+IGF-1). Animais obesos controles (N=8) receberam solução salina. Nossos dados demonstraram que o tratamento com IGF-1 nos camundongos obesos (GO+IGF1) contribuiu para a redução dos parâmetros biométricos analisados, da esteatose hepática e do índice de hipertrofia cardíaca, quando comparado ao GO. O tratamento também foi capaz de restaurar a matriz extracelular e reduzir a apoptose, reduzindo a área de fibrose cardíaca, o que foi corroborado pelo menor conteúdo de colágenos I e III, assim como, pela redução da razão Bax/Bcl2. O tratamento com IGF-1 reduziu o conteúdo de MMP-9 e TIMP-1 e elevou o conteúdo de MMP-13, contribuindo para o remodelamento favorável do parênquima cardíaco. O GO+IGF-1 também apresentou melhora do influxo de cálcio e acoplamento cardíaco, comprovada pelo aumento dos conteúdos de SERCA-2 e Conexina 43. Observamos, também, melhora do metabolismo energético cardíaco no GO+IGF-1 e aumento significativo do número de CTC, CPE e da formação de novos cardiomiócitos em relação ao GO. Além disso, foi observado aumento da razão pAKT/AKT. Os resultados sugerem que o IGF-1 tem efeito cardioprotetor relacionado à regulação positiva da via AKT, proporcionando a melhora do ambiente tecidual e, assim, garantindo a sobrevivência das CTC e CPE, bem como a formação de novos cardiomiócitos. Paralelamente, a ativação da via AKT tem ação direta sobre as CTC, ativando a sobrevivência e proliferação dessas células. As CTC ativadas, por sua vez, secretam uma série de fatores que agem de forma parácrina no tecido cardíaco, contribuindo para a recuperação morfofuncional do órgão e reversão da falência cardíaca.

Palavras-chave: Obesidade, Células-Tronco Cardíacas Residentes, Células Progenitoras Endoteliais, Fibrose Cardíaca, Metabolismo Energético, IGF-1

ABSTRACT

ANDRADE, Daniela Caldas de. *Analysis of cardiac resident stem cells and therapeutic potential of IGF-1 in the heart in experimental model of obesity*. 105 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Cardiovascular diseases are the leading cause of mortality in obesity. Progenitor cells presence in myocardium, including cardiac residents stem cells (CSC; c-kit⁺ Lin⁻) and endothelial progenitor cells (EPC; CD133⁺), has been suggested as a possible cardiac regeneration mechanism. However, despite the advance in understanding these cells, the mechanisms that regulate its survival in pathological conditions are not yet clear. Our group recently demonstrated that obesity is related to bone marrow stem cells damage. In addition, diabetic cardiomyopathy is associated with decreased CSC number and proliferative capacity. IGF-1 and HGF administration in myocardial infarction a model stimulated regenerative response of CSC, without the need for cell transplantation by inducing migration, proliferation and differentiation of CSC into cardiac and microvasculature cells. Therefore, this work aimed to study the therapeutic potential of IGF-1 on CSC in a Western diet-induced obesity model. 21 days old *Swiss* male mice were divided into control group (CG, N = 8), fed with standard diet, and obese group (OG, N = 16), fed with Western diet, high in saturated fat and simple carbohydrates, for 12 weeks. Part of the obese group animal (N = 8) received a daily subcutaneous injection of IGF-1 for seven consecutive days (OG + IGF-1). Control obese animals (N = 8) received saline. Our data demonstrated that IGF-1 treatment in obese mice (OG + IGF1) contributed to decrease of analyzed biometric parameters, reduced hepatic steatosis and cardiac hypertrophy when compared to OG. Treatment was also able to restore extracellular matrix and reduce apoptosis, reducing cardiac fibrosis area, which was corroborated by the lower content of collagens I and III, as well as the reduction of Bax / Bcl2 ratio. Treatment with IGF-1 reduced MMP-9 and TIMP-1 content and increased MMP-13 content, contributing to the favorable remodeling of cardiac parenchyma. OG + IGF-1 also showed improvement of calcium influx and cardiac coupling, evidenced by increased SERCA-2 and Connexin 43 contents. We also observed cardiac energetic metabolism improvement in OG + IGF-1 and a significant increase in the number of CSC, EPC and new cardiomyocytes formation compared to OG. These results suggest that IGF-1 has cardioprotective effect related to AKT pathway upregulation, providing tissue environment improvement and, thus, ensuring CSC and EPC survival, as well new cardiomyocytes formation. In parallel, AKT pathway activation has direct action on CSC, activating the survival and proliferation of these cells. Activated CSC, in turn, secrete several factors that act in a paracrine way in the cardiac tissue, contributing to morphofunctional recovery of the organ and cardiac failure rescue.

Keywords: Obesity; Cardiac Resident Stem Cells, Endothelial Progenitor Cells, Cardiac Fibrosis, Energetic Metabolism, IGF-1

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1	Mapa da obesidade mundial	17
Gráfico 1	Evolução de indicadores na população adulta com mais de 20 anos de idade	18
Gráfico 2	Evolução de indicadores na população de 10 a 19 anos de idade, por sexo – Brasil	18
Figura 2	Relação da disfunção do tecido adiposo e desenvolvimento de doenças cardiovasculares	21
Figura 3	Processo fisiopatológico da obesidade no coração	25
Figura 4	Terapia celular em cardiomiopatias: tipos celulares	27
Figura 5	Mecanismo proposto na regeneração cardíaca	31
Figura 6	Esquema representativo da presença de células-tronco cardíacas residentes em nichos entre os cardiomiócitos	33
Figura 7	Via de sinalização do IGF-1	39
Figura 8	Distribuição geográfica de ensaios clínicos utilizando IGF-1 recombinante.....	41
Tabela 1	Condições patológicas em estudo clínico utilizando IGF-1 recombinante.....	42
Figura 9	Desenho experimental.....	46
Quadro 1	Concentração dos anticorpos primários.....	54
Gráfico 3	Evolução consumo calórico (Kcal) de camundongos <i>Swiss</i> submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO).....	56
Gráfico 4	Evolução consumo em gramas de ração de camundongos <i>Swiss</i> submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO)..	57
Gráfico 5	Evolução da massa corporal de camundongos <i>Swiss</i>	58
Gráfico 6	Massa corporal final.....	58
Tabela 2	Massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, glicemia em jejum, gordura epididimal e gordura retroperitoneal de camundongos tratados e não tratados com IGF-1.....	59

Gráfico 7	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose e área sob a curva.	60
Gráfico 8	Dosagem de Insulina.....	61
Gráfico 9	Índice Homa IR.....	61
Gráfico 10	Estimativa da esteatose hepática.....	62
Figura 10	Análise qualitativa e quantitativa da esteatose hepática.....	63
Gráfico 11	Estimativa da hipertrofia cardíaca mensurada através da razão entre o ventrículo esquerdo (VE) (g) e o comprimento da tibia (mm).....	64
Gráfico 12	Estimativa da hipertrofia cardíaca mensurada através da razão entre massa do ventrículo esquerdo (VE) (g) e massa corporal (g).....	65
Figura 11	Análise qualitativa e quantitativa da fibrose cardíaca.....	66
Figura 12	Quantificação do conteúdo das proteínas colágeno I e III.....	67
Figura 13	Quantificação do conteúdo de metaloproteinase 9 e 13 e o inibidor específico de metaloproteinase 1.....	68
Figura 14	Quantificação da apoptose no coração de camundongos.....	69
Figura 15	Quantificação do conteúdo SERCA-2 e Conexina 43.....	70
Figura 16	Respirometria de alta-resolução.....	72
Figura 17	Quantificação do conteúdo UCP-2, PGC-1 α e CPT-1.....	74
Figura 18	Análise do conteúdo de células-tronco cardíacas residentes e células progenitoras endoteliais.....	76
Figura 19	Análise por citometria de fluxo do conteúdo de c-kit e CD133	77
Figura 20	Quantificação de células progenitoras cardíacas	78
Figura 21	Quantificação da ativação da via AKT no coração de camundongos	79

LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina Trifosfato
AKT	Proteína quinase
C-kit	Proteína tirosina-kinase KIT
CPE	Célula progenitora endotelial
CT	Células-tronco
CTC	Células-tronco cardíacas residentes
CTE	Células-tronco embrionárias
CTH	Células-tronco hematopoiéticas
CTM	Células-tronco mesenquimais
CMMO	Células mononucleares de medula óssea
DVC	Doenças cardiovasculares
DNMT's	DNA metiltransferases
EGTA	Ácido tetracético de etileno-glicol
EPM	Erro padrão médio
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto
FOX	Fosforilação oxidativa
GATA4	Fator de transcrição GATA4
GH	Hormônio do crescimento
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGFBP	Proteína ligante de IGF
IGF-1R	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
IPS	Células-tronco pluripotentes induzidas
IRS	Substrato receptor de insulina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular

MMPs	Metaloproteinases de matriz
Mef2	Fator potencializador de miócitos 2
Mfn2	Mitofusina - 2
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
Nkx 2.5	Proteína Homeobox
OMS	Organização Mundial de Saúde
OXPÓS	Fosforilação Oxidativa
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PI3K	Fosfatidilinositol 3 quinase
PGC-1 α	Proliferadores de peroxissoma gama
POF	Pesquisa de orçamentos familiares
RCR	Razão do controle respiratório
Sca-1	Antígeno 1 de células-tronco
Shc	Substrato homólogo ao colágeno
TIMPs	Inibidor específico de metaloproteinase tecidual
UCP	Proteína desacopladora
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
VIGITEL	Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1.	OBESIDADE	16
1.1.	Obesidade e doenças cardiovasculares	19
2.	TERAPIA CELULAR E O CORAÇÃO	26
3.	CÉLULAS-TRONCO CARDÍACAS RESIDENTES	32
3.1.	Coração: órgão terminalmente diferenciado?	32
3.2.	Terapia celular e as células-tronco cardíacas residentes	33
4.	FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA (IGF-1)	37
5.	JUSTICATIVA	43
6.	OBJETIVO	44
6.1.	Objetivo geral	44
6.2.	Objetivos específicos	44
7.	METODOLOGIA	45
7.1.	Animais e modelo experimental de obesidade	45
7.2.	Consumo alimentar em gramas e calorias	46
7.3.	Eutanásia	47
7.4.	Parâmetros Biométricos	47
7.4.1.	Massa corporal	47
7.4.2.	Comprimento Naso-anal e comprimento da tíbia	48
7.4.3.	Glicemia	48
7.4.4.	Peso da gordura epididimal e retroperitoneal	48
7.4.5.	Índice de Lee	48
7.4.6.	Massa do coração e Estimativa hipertrófica	48
7.5.	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose	49
7.6.	Quantificação dos níveis plasmáticos de insulina	49
7.7.	Cálculo do Homa-IR	49
7.8.	Respiração mitocondrial	50
7.8.1.	Obtenção das fibras cardíacas permeabilizadas	50
7.8.2.	Respirometria de alta-resolução	50
7.9.	Processamento de material histológico	51

7.9.1.	Análise quantitativa de colágeno.....	51
7.9.2.	Análise quantitativa da esteatose hepática.....	51
7.9.3.	Imunomarcção.....	52
7.10.	Análise do conteúdo de proteínas por Western blotting	52
7.11.	Citometria de fluxo	54
7.12.	Análise estatística	55
8.	RESULTADO	56
8.1.	Consumo alimentar	56
8.2.	Parâmetros biométricos	57
8.3.	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose	59
8.4.	Dosagem de Insulina e Homa IR	60
8.5.	Análise da esteatose hepática	62
8.6.	Estimativa hipertrófica cardíaca	63
8.7.	Análise da fibrose cardíaca	65
8.8.	Análise da MMP-9, MMP-13, e TIMP-1	67
8.9.	Análise da apoptose	68
8.10.	Análise da Conexina 43 e SERCA-2	69
8.11.	Respiração Mitocondrial	70
8.12.	Análise do conteúdo de UCP-2, CTP-1 e PGC1-α	73
8.13.	Análise das células-tronco cardíacas residentes e células progenitoras endoteliais	74
8.14.	Análise das células progenitoras cardíacas	77
8.15.	Análise da razão pAKT/AKT	78
9.	DISCUSSÃO	80
	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS	89
	ANEXOS	104

INTRODUÇÃO

A transição nutricional é a mudança na tendência alimentar adotada pela população, com o aumento do consumo de alimentos ricos em gordura saturada, açúcar e sal, dieta ocidental que, somada ao estilo de vida sedentário, contribui para desenvolvimento da obesidade.

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal que vem atingindo proporções epidêmicas. Além disso, estudos comprovam a relação da ingestão de gordura e carboidratos simples com a incidência de diversas comorbidades, como doenças cardiovasculares, câncer e diabetes tipo II.

Diversas alterações morfológicas no coração são desencadeadas pela elevada ingestão calórica, culminando em perda funcional e no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, que apresentam elevada taxa de mortalidade e morbidade, o que justifica o investimento em novas alternativas terapêuticas.

O coração foi considerado por muito tempo um órgão completamente diferenciado, entretanto, foi descoberta uma população de células-tronco com capacidade de diferenciação em cardiomiócitos, células musculares lisas e células endoteliais, as células-tronco cardíacas residentes. Essas células, ao serem ativadas, poderiam contribuir para regeneração tecidual e recuperação funcional do coração lesionado.

Já foram demonstrados os efeitos regenerativos de fatores de crescimento por mecanismo parácrino exercido por células-tronco transplantadas. Nesse sentido, o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) pode ser destacado, pois exerce efeito cardioprotetor, modulando a função mitocondrial, a sobrevivência e proliferação de células cardíacas.

O presente trabalho avaliou o efeito do IGF-1 sobre as células-tronco cardíacas residentes de camundongos obesos, após consumo de dieta ocidental, visto que essas células possuem elevado potencial terapêutico.

1. OBESIDADE

A obesidade, desordem originada pela interseção entre fatores genéticos e comportamentais, ganhou proporções pandêmicas no século XXI e tem impulsionado mudanças severas no sistema de saúde (Zhang & Ren, 2016). Em geral, a obesidade é resultado da excessiva ingestão calórica e um estilo de vida sedentário, resultando no acúmulo excessivo de gordura corporal. Ela vem sendo associada a várias comorbidades, como: diabetes tipo 2, dislipidemias, esteatose hepática não- Alcoólica, hipertensão, câncer e doenças cardiovasculares (Ren & Anversa, 2015; Dempersmier & Sul, 2015; Riehle & Abel, 2016; Mistry & Puthussery, 2015, Fructuoso *et al.*, 2018).

O comportamento alimentar é reflexo da interação de fatores fisiológicos, genéticos, psicológicos e das condições ambientais e sociais. No que se refere ao contexto socioeconômico, a mudança na produção de alimentos observada nas últimas décadas, em consequência da transição tecnológica, contribuiu para alterações no perfil alimentar da população, descritas por Popkin (2011) e denominadas coletivamente como transição nutricional.

A transição nutricional é um processo de modificações no padrão alimentar relacionadas com maior consumo de alimentos ricos em gordura saturada, açúcar e sal, sendo denominada dieta ocidental que, associada ao estilo de vida sedentário, contribui para a elevação da prevalência da obesidade (Tikellis *et al.*, 2008; Popkin, 2011).

Esse novo perfil nutricional está relacionado com os níveis pandêmicos de obesidade, que tem se revelado um dos mais importantes fenômenos clínicos e epidemiológicos da atualidade (Fructuoso *et al.*, 2018). A Organização Mundial de Saúde (OMS), em dados referentes ao ano de 2014, apontou a presença de 1,9 bilhões de indivíduos adultos acima do peso na população mundial (IMC > 25 kg/m²), sendo que destes, 600 milhões são obesos (IMC ≥ 30 kg/m²). Ainda segundo a OMS, 39% dos adultos com mais de 18 anos tem sobrepeso e, dentro desse percentual, 13% são obesos. No Brasil, a percentagem de indivíduos adultos com sobrepeso e obesidade chega a 55,6% da população adulta, e nos Estados Unidos já chega a 72,1%. A OMS apresentou dados sobre a população infantil mundial e indicou que mais de 42 milhões de crianças com menos de cinco anos de idade estariam com excesso de peso.

Figura 1: Mapa da obesidade mundial. Percentual de adultos com obesidade.

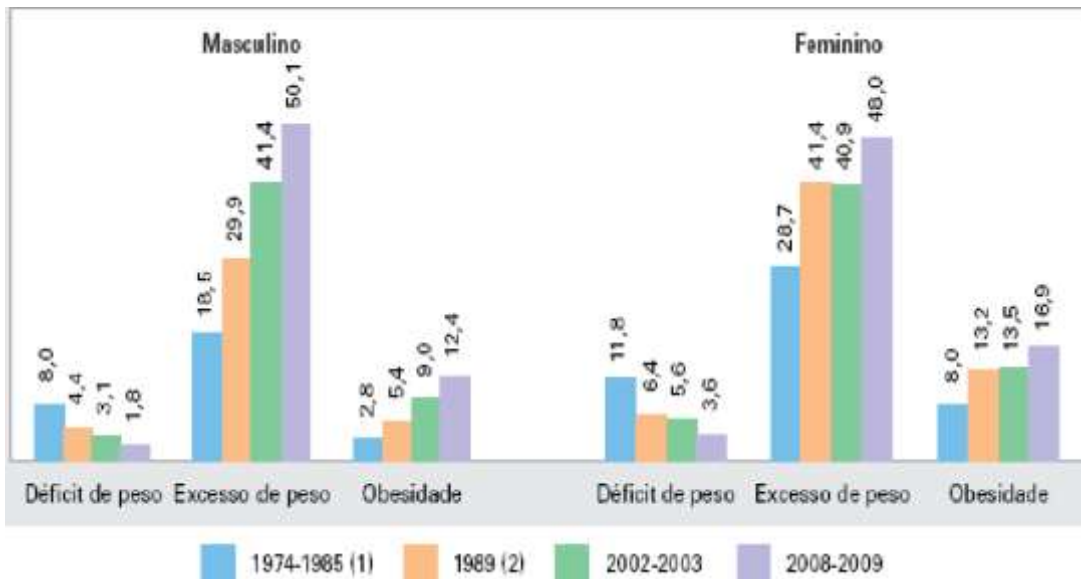


Fonte: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/overweight/en/, acessado em 13/04/18).

Os últimos dados levantados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2010), contidos no documento intitulado “Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009” (POF; 2008-2009), apontou um aumento contínuo do excesso de peso em todas as faixas etárias e de renda. Houve aumento expressivo do excesso de peso na população adulta com mais de 20 anos de idade, independente do gênero analisado, no intervalo entre 1974-1985 e 2008-09. O excesso de peso em homens e mulheres saltou de 18,5% para 50,1% e 28,7% para 48,0%, respectivamente (Gráfico 1).

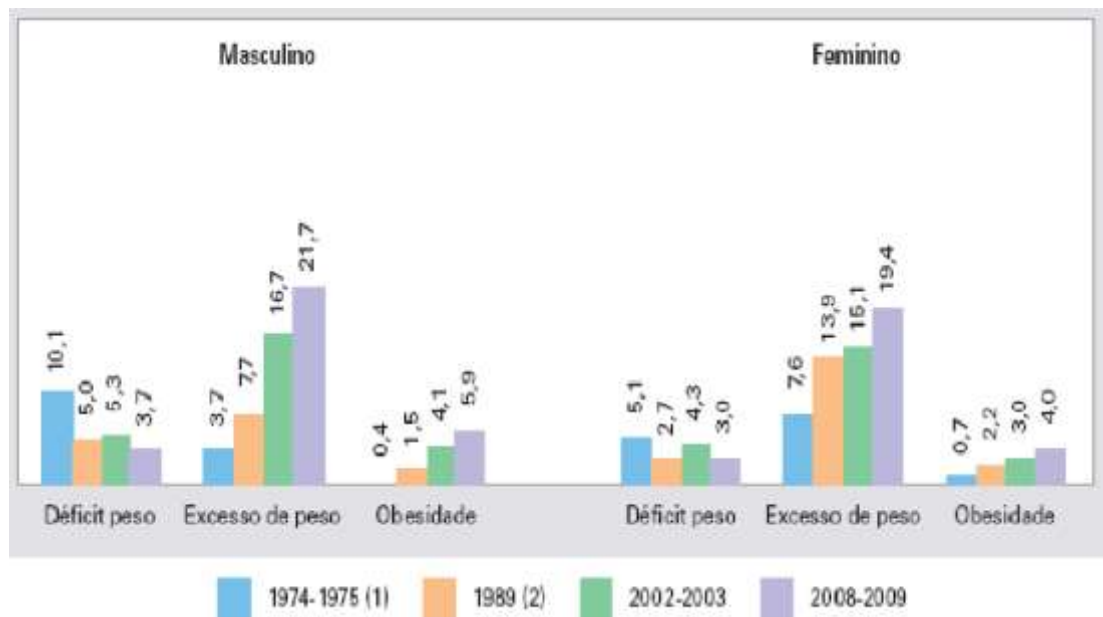
Outro dado alarmante desse documento (POF 2008-2009) apontou o mesmo perfil na população de 10-19 anos (Gráfico 2), com elevação de 3,7% em 1974-1975 para 21,7% para crianças do sexo masculino. Houve também uma elevação de 7,6% (1974-1975) para 19,4% (2008-2009) de meninas com excesso de peso no Brasil.

Gráfico 1: Evolução de indicadores na população adulta com mais de 20 anos de idade, por sexo, no Brasil.



Fonte: IBGE, Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009.

Gráfico 2: Evolução de indicadores na população de 10 a 19 anos de idade, por sexo, no Brasil.



Fonte: IBGE, Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009.

Dados mais recentes de vinte e sete cidades brasileiras analisados pela Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico – Vigitel (2017) indicaram que a obesidade cresceu 60% em 10 anos, passando de 11,8% em 2006 para 18,9% de adultos obesos, com IMC ≥ 30 kg/m², em 2016. Entretanto, a frequência entre os sexos é semelhante, com 19,6% do gênero feminino e 18,1% do gênero masculino. Com relação ao excesso de peso, houve um aumento de 26,3 % de 2006 a 2016, passando de 42,6% para 53,8%.

Neste contexto, a crescente prevalência de sobrepeso e obesidade no Brasil e no mundo tem contribuído para a elevação da morbidade e mortalidade, e consequentemente, maiores custos nos setores diretamente relacionados a serviços de saúde e naqueles indiretamente relacionados ao impacto sobre a qualidade de vida e produtividade. Como todos esses fatores têm consequências econômicas relevantes, a obesidade tornou-se um problema de saúde pública com enorme impacto sobre a economia (Hammond, 2010; Hammond & Levine, 2010; Zhang & Ren, 2016; Sarfert *et al.*, 2017).

1.1 Obesidade e doenças cardiovasculares

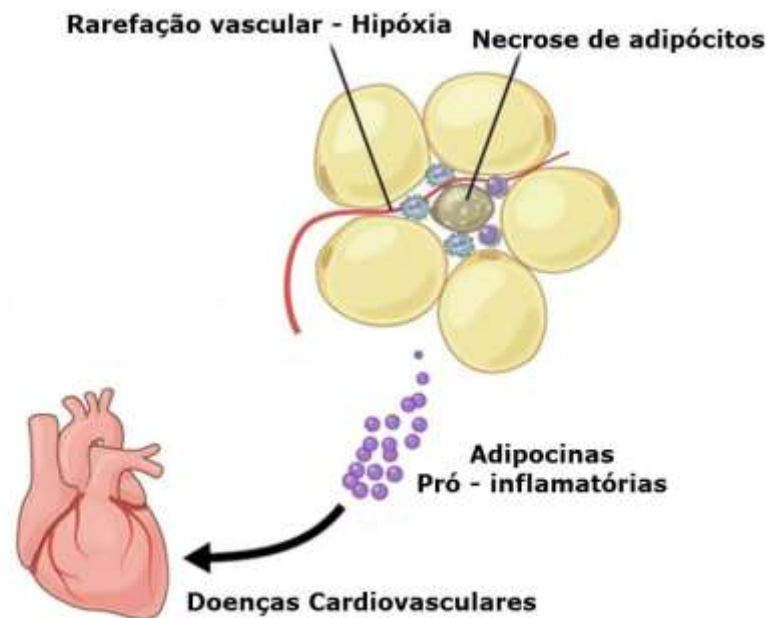
As doenças cardiovasculares (DVC) possuem altas taxas de mortalidade e morbidade, causando sérios prejuízos econômicos e sociais. O infarto do miocárdio e doenças coronarianas são as desordens cardiovasculares mais comuns, podendo levar à falência cardíaca e morte (Singla, 2016; Riehle & Abel, 2016; Dinicolantonio *et al.*, 2016). A insuficiência cardíaca é uma síndrome complexa, multifatorial e crônica, caracterizada por disfunção miocárdica. Diversos estudos têm demonstrado que a obesidade pode contribuir para o desenvolvimento de diferentes modificações fisiopatológicas que levam ao remodelamento cardíaco e função cardíaca anormal. No entanto, tais mecanismos ainda precisam ser melhor elucidados (Lopaschuk *et al.*, 2007; Mahajan *et al.*, 2015; Singla, 2016; Barkala *et al.*, 2015; Lombardo *et al.*, 2018).

Durante o desenvolvimento da obesidade acontece uma expansão dos depósitos de gordura, por meio da hipertrofia dos adipócitos, em resposta ao elevado consumo calórico, constituindo um fator de risco crucial para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. A desregulação endócrina do tecido adiposo induz uma

inflamação sistêmica de baixo grau relacionada com os mecanismos fisiopatológicos de diversas doenças (Costa *et al.*, 2011; Fuster *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2016). Sob condições de obesidade, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos Th1 CD4⁺ promovem o recrutamento de macrófagos do tipo M1, contribuindo para a inflamação do tecido adiposo (Fuster *et al.*, 2016). Tais células foram associadas ao desenvolvimento da resistência à insulina em indivíduos obesos (Wentworth *et al.*, 2010).

O remodelamento disfuncional do tecido adiposo acarreta em desequilíbrio na produção e liberação de adipocinas, o que contribui para o estado inflamatório associado à obesidade, tendo efeito direto no desenvolvimento de doenças cardiovasculares (figura 2). Além das regiões de depósito de gordura convencional, há o acúmulo ectópico de gordura em outros órgãos, como fígado, músculo esquelético e coração. O acúmulo ectópico de lipídios no coração, decorrente de uma dieta hiperlipídica, por exemplo, tem efeito tóxico nos cardiomiócitos, ativando a via apoptótica destas células. Além disso, desencadeia alterações do metabolismo de substratos que trazem, como consequência, distúrbios na hemodinâmica cardíaca e podem causar complicações cardiovasculares, como redução da função sistólica e a hipertrofia do ventrículo esquerdo (Lopaschuk *et al.*, 2010; Ikun & Boudina, 2013; Neves, Cortez *et al.*, 2014; Chavali *et al.*, 2013; Rani *et al.*, 2016; Fuster *et al.*, 2016).

Figura 2: Relação da disfunção do tecido adiposo e desenvolvimento de doenças cardiovasculares.



Nota: A obesidade promove a liberação de adipocinas pró-inflamatórias pelos adipócitos que constituem o tecido adiposo unilocular em resposta à expansão de depósitos de gordura, rarefação vascular, recrutamento de células inflamatórias e necrose de adipócitos.

Fonte: Adaptada de Fuster *et al.*, 2016.

O remodelamento cardíaco é um determinante importante do desfecho clínico da insuficiência cardíaca, independente da etiologia (Florea *et al.*, 1999; Dickstein *et al.*, 2008; Toprak *et al.*, 2013). O remodelamento ocorre na matriz extracelular (MEC), que está sendo continuamente sintetizada e degradada (Tyagi, 1997; Toprak *et al.*, 2013). Ele implica numa alteração da orientação espacial das células, de seus componentes intracelulares e da MEC, sendo esse remodelamento estrutural uma resposta compensatória do tecido após o estágio patológico (Tyagi, 1997). Um dos principais processos associados ao remodelamento patológico é a produção excessiva de MEC pelos fibroblastos cardíacos, isto é, fibrose cardíaca. A fibrose cardíaca é responsável por reduzir a complacência cardíaca, o que torna o coração rígido, contribuindo para a disfunção e insuficiência cardíaca (Ooi *et al.*, 2016; Travers *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018).

O processo inflamatório, assim como o estresse oxidativo, ativa as metaloproteinases (MMPs), proteases responsáveis pelo remodelamento da MEC, levando à reorganização de seus componentes com deposição de colágeno, fibronectina, elastina e outros componentes proteicos. A disposição dessas proteínas de matriz pode resultar em mudanças na estrutura e função do ventrículo esquerdo, sendo denominado remodelamento patológico (Yabluchanskiy *et al.*, 2013).

A MMP-2 tem sido indicada como importante reguladora intracelular de proteínas no miocárdio após o estresse oxidativo. A MMP-9 foi apontada em diversos estudos como marcador de doenças cardiovasculares, por participar ativamente do remodelamento adverso da MEC (Toprak *et al.*, 2013; Kandasamy *et al.*, 2010), já que regulam micro-RNAs que estão associados com o balanço do cálcio e contratilidade de cardiomiócitos, tendo papel fundamental na angiogênese, hipertrofia e fibrose no coração (Mishra *et al.*, 2013). Em oposição às MMPs descritas anteriormente, a MMP-13 participa da degradação de colágeno do tipo I e III, principais proteínas da fibrose cardíaca, desempenhando papel na regressão da fibrose (Toprak *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2014; Howes *et al.*, 2014).

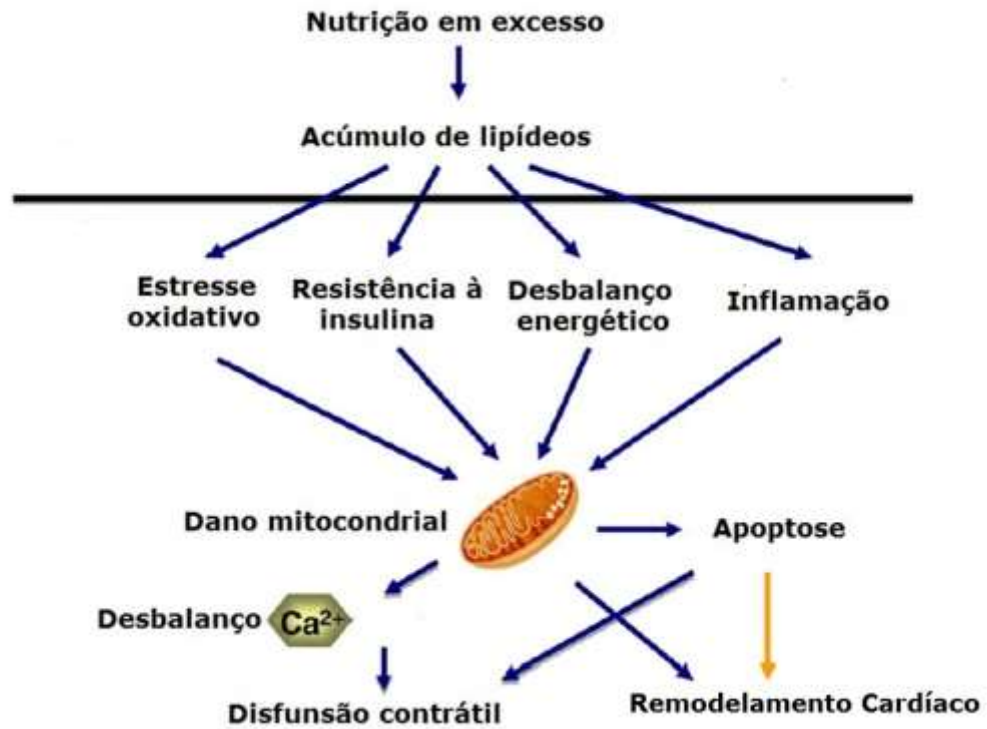
A fosforilação oxidativa (OXPHOS), constitui uma via metabólica que utiliza energia liberada pela oxidação de nutrientes de forma a produzir trifosfato de adenosina (ATP). Embora a OXPHOS seja uma parte vital do metabolismo, na maioria das células eucarióticas, a cadeia respiratória mitocondrial, notavelmente ao nível dos complexos I e III, constitui a principal fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular, tais como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, mesmo em condições basais (Galluzzi *et al.*, 2012). Assim, as EROs constituem um subproduto normal da respiração, necessárias para diversas vias de sinalização intracelular e são normalmente neutralizadas por sistemas antioxidantes. Entretanto, em níveis mais elevados, a ação de radicais livres (estresse oxidativo) pode danificar componentes celulares e impedir a função mitocondrial por causar modificações oxidativas nas proteínas mitocondriais, mutações no mtDNA e ativação da permeabilidade transitória (Bugger & Abel, 2010), contribuindo para processos de envelhecimento celular e derivadas patologias. Diversos estímulos podem desencadear a superprodução de EROs nas células. Por exemplo, no sistema cardiovascular são fatores importantes: a hiperglicemia, a hipóxia e a presença de citocinas inflamatórias (Ansley & Wang, 2013).

A disfunção mitocondrial, independente da etiologia, tem sido associada às doenças cardiovasculares, envolvendo estresse oxidativo, apoptose, redução da biogênese mitocondrial e síntese de ATP, assim como mudança da morfologia e remodelamento mitocondrial (Rogge, 2009; Bournat & Brown, 2010; Brand & Nicholls, 2011). O estresse oxidativo, com conseqüente oxidação de biomoléculas como lipídeos, proteínas e DNA, danifica estruturas celulares e potencializa a resposta inflamatória (Mello *et al.*, 2018). Estudos recentes demonstraram que a obesidade eleva os níveis de EROs, citocinas pró inflamatórias e promove a apoptose de cardiomiócitos. Além disso, acarreta danos às proteínas, disfunção mitocondrial com redução da síntese de ATP, e altera o tamanho dos cardiomiócitos e sua contratilidade, pois interfere na disponibilidade de Ca^{2+} intracelular (Zhang *et al.*, 2012; Neves, Cortez *et al.*, 2014; Ren & Anversa, 2015; Crecenzo *et al.*, 2015; Rani *et al.*, 2016; Pavillard *et al.*, 2018) (figura 3). Alterações na dinâmica mitocondrial também foram observadas na obesidade e relacionadas com mecanismos fisiopatológicos. Dietas ricas em glicose promovem fissão mitocondrial e elevação da síntese de ERO, enquanto que a ingestão calórica elevada diminui os níveis de PGC-1, proteína ligada à biogênese mitocondrial, e Mfn2 (mitofusina-2), levando à redução da fusão mitocondrial e conseqüente comprometimento da função da organela (Bournat & Brown, 2010; Pintus *et al.*, 2012).

A eficiência pela qual os equivalentes redutores são convertidos em ATP pela OXPHOS é conhecida como acoplamento mitocondrial. Quando as mitocôndrias não são perfeitamente acopladas (desacopladas), a força próton-motriz gerada pela OXPHOS é dissipada sob a forma de calor em vez de ser utilizada para impulsionar a ATP sintase, mecanismo chamado de “vazamento de prótons” (*próton leak*) (Johannsen & Ravussin, 2009). Este processo é realizado pelas proteínas desacopladoras (*uncoupling proteins* - UCPs) que ocorrem na membrana interna da mitocôndria. Dentre as UCPs mais comuns estão: a UCP1, expressa exclusivamente no tecido adiposo marrom, a UCP2, amplamente expressa em diferentes tecidos (incluindo o tecido adiposo, músculo, coração, fígado, rins e cérebro) e a UCP3, expressa principalmente nos tecidos musculares (Kim *et al.*, 2008; Johannsen & Ravussin, 2009). UCP2 e UCP3 tem um papel importante no *feedback* negativo da produção de EROs pela mitocôndria. Como as EROs são subprodutos normais da OXPHOS, níveis basais de expressão das UCPs são importantes para a neutralização dessas EROs, impedindo o estresse oxidativo. Entretanto, o aumento da produção de

EROs como consequência de dano mitocondrial acarreta no aumento da expressão das UCPs e, com isso, no desacoplamento mitocondrial e deficiência na produção de ATP (Mailloux & Harper, 2012). O desacoplamento mitocondrial contribui para a diminuição energética mitocondrial em condições associadas com aumento da disponibilidade de ácidos graxos, como na obesidade e diabetes (Bugger & Abel, 2010; Boudina & Abel, 2006; 2007). Além disso, níveis aumentados de UCPs e consequente diminuição da eficiência mitocondrial têm sido descritos em modelos de infarto e falência cardíaca (Murray *et al.*, 2008; Abel & Doenst, 2011; Neves *et al.*, 2014).

Figura 3: Processo fisiopatológico da obesidade no coração.



Nota: A elevada ingestão calórica promove o acúmulo ectópico de lipídeos no coração e expansão do tecido adiposo, desencadeando processos como estresse oxidativo, resistência à insulina, desbalanço energético e inflamação que estão relacionados com o desequilíbrio do influxo de Ca^{2+} e apoptose no coração, cujo desfecho é a disfunção contrátil e o remodelamento cardíaco.
 Fonte: Adaptado de Dong et al., 2013.

2. TERAPIA CELULAR E O CORAÇÃO

A insuficiência cardíaca é uma condição altamente prevalente e debilitante. Em uma quantidade significativa de casos, não há terapia eficaz para reverter o curso da doença além do transplante cardíaco. Entretanto, o transplante somente é possível para pequena fração de pacientes devido à escassez de doadores de órgãos. Sabe-se, ainda, que o coração adulto possui limitada capacidade intrínseca de reparar lesões teciduais e fisiológicas. Portanto, o objetivo da medicina regenerativa cardíaca tem-se centrado em estratégias que promovam a regeneração funcional do coração doente (Deutsch *et al.*, 2013).

As células-tronco são definidas como células indiferenciadas que tem o potencial de se renovar e diferenciar em múltiplos tipos de células especializadas, ou seja, elas possuem a capacidade de gerar vários ciclos de divisão celular, mantendo seu estado indiferenciado e podendo, em certas ocasiões, se diferenciar em diversas linhagens de células. A terapia celular utilizando células-tronco é um campo de estudo da medicina regenerativa. Diversos protocolos vêm sendo aplicados nos quais essas células podem ser transplantadas ou ativadas a fim de promover reparo tecidual e funcional (Gilchrist *et al.*, 2010; Lindroos *et al.*, 2011 e Robinton & Daley, 2012).

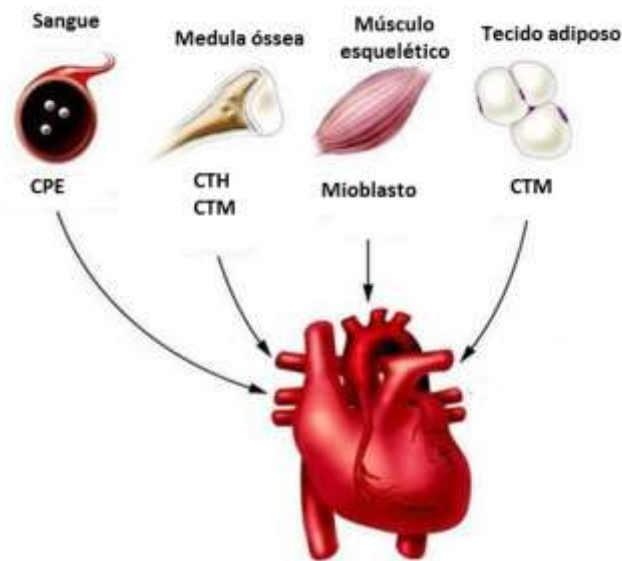
As células-tronco embrionárias (CTE), por serem pluripotentes, representam uma ferramenta bastante útil na medicina regenerativa, entretanto, a utilização dessas células envolve questões religiosas, éticas e de eficácia e segurança da terapia. Uma alternativa para esse problema tem sido proposta por estudos onde células adultas, como fibroblastos oriundos da pele, são transdiferenciadas em células pluripotentes, sendo denominadas células-tronco de pluripotência induzida (IPS). Entretanto, ainda existem questões legais, éticas e de segurança e eficácia da terapia (Gilchrist *et al.*, 2010; Lindroos *et al.*, 2011; Parikh *et al.*, 2017).

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são as células-tronco multipotentes mais bem caracterizadas, sendo isoladas da medula óssea, e dão origem às células sanguíneas. A medula óssea também é fonte de um outro tipo de célula-tronco multipotente, a células-tronco mesenquimal (CTM), que tem demonstrado grande potencial para uso clínico devido ao seu fácil isolamento, podendo ser expandidas *in vitro*, sem perda de fenótipo ou da capacidade de diferenciação. Além disso, outras propriedades as tornam viáveis para utilização na terapia celular, como a sua baixa

imunogenicidade, que permite o transplante alogênico sem drogas imunossupressoras, a ausência de controvérsia ética, e seu potencial de se diferenciar em tipos celulares de tecidos específicos com atividade trófica (Morigi et al., 2016). As CTM podem também ser isoladas a partir do tecido adiposo e cordão umbilical (Baraniak & McDevitt, 2010; Wagers & Weissman, 2004).

Grande parte dos estudos científicos na área de terapia cardíaca, tendo como objetivo a resolução de cardiomiopatias, englobam células-tronco adultas (multipotentes), sendo as CTM, CTH, células progenitoras endoteliais (CPE) e mioblastos esqueléticos, os principais tipos celulares transplantados (Fernandes & Perin, 2007) (figura 4).

Figura 4: Terapia celular em cardiomiopatias: tipos celulares.



Nota: Vários tipos de células-tronco são utilizadas em tratamentos da medicina regenerativa a fim de reverter o quadro fisiopatológico decorrente de lesões cardíacas. No esquema estão ilustrados os principais locais de origem e os tipos celulares mais utilizados, que são: a CPE (célula progenitora endotelial); CTH (célula-tronco hematopoiética); e CTM (célula-tronco mesenquimal).

Fonte: Adaptado: <http://www.remedi.uzh.ch/research/cell/cellbased-therapy.html>.

Os primeiros implantes de células no miocárdio humano começaram em 2000, quando Menasché e colaboradores (2001) iniciaram um ensaio fase I onde mioblastos esqueléticos autólogos foram injetados por via intramiocárdica. A abundância de células-tronco do músculo esquelético (células satélites) e a similaridade funcional e estrutural entre a célula muscular esquelética e o cardiomiócito levou ao emprego desse tipo celular em estudos experimentais e clínicos. Os mioblastos esqueléticos podem ser cultivados a partir de biópsia muscular e, em seguida, transplantados no coração infartado de animais, sendo essa uma das estratégias para remuscularização cardíaca. Uma das principais vantagens do uso deste tipo celular seria a possibilidade do transplante autólogo, a propensão a gerar células musculares por diferenciação espontânea e a capacidade de enxertar no coração com eficiência, além de sofrer diferenciação *in situ* em feixes musculares estriados (Taylor *et al.*, 1998; Durrani *et al.*, 2010; Hansson & Lendahl, 2013). Durrani *et al.* (2010), inclusive, demonstraram melhora da função cardíaca em um pequeno número de pacientes após o uso de mioblastos esqueléticos autólogos. Mioblastos esqueléticos foram usados em um grande ensaio clínico randomizado, placebo-controlado, duplo-cego, o MAGIC, que incluiu 97 pacientes com falência cardíaca (Menasché *et al.*, 2008). O estudo, no entanto, não alcançou seu desfecho primário de melhora na fração de ejeção do ventrículo esquerdo. Os pesquisadores relataram que não houve benefício significativo, com elevada prevalência de taquiarritmia ventricular, causada pelo baixo acoplamento entre os mioblastos esqueléticos transplantados e os cardiomiócitos nativos. Esses dados foram comprovados pela redução da proteína de junções comunicantes, conexina 43, o que levou ao abandono, pela maioria dos pesquisadores, de um maior desenvolvimento de terapias baseadas nesse tipo celular (Menasché, 2018).

As células derivadas da medula óssea foram o segundo tipo de célula não-cardíaca a entrar na arena clínica. No entanto, ocorreu um entusiasmo descontrolado sobre o uso dessas células que rapidamente levou a uma onda de ensaios clínicos, enquanto a pesquisa básica estava muito atrasada em relação aos estudos clínicos. Este cenário bastante incomum explica a dificuldade de interpretação dos resultados dos ensaios clínicos e a persistência da incerteza em relação à verdadeira eficácia dessas células para a reparação do coração (Menasché, 2018).

No entanto, muitas pesquisas desenvolvidas com transplante de células-tronco para doenças cardiovasculares apresentaram resultados promissores. Em particular,

os estudos com CTM tem sido amplamente realizados. Em março de 2018, uma busca pelo termo “células-tronco mesenquimais” no site ClinicalTrials.gov encontrou 580 ensaios clínicos registrados (ativo, recrutamento, ou ainda não concluído) para tratar vários tipos de doença. Dezesete desses estudos foram especificamente dedicados à insuficiência cardíaca crônica. Na maioria desses ensaios, as CTM derivam da medula óssea, com menos estudos utilizando cordão umbilical ou tecido adiposo como fonte celular. Resultados demonstrados por Hare *et al.* (2012) no POSEIDON indicaram que o transplante alogênico de CTM por via transendocárdica, possui segurança quando comparado com o transplante autólogo. Além disso, estudos randomizados feitos anteriormente pelo mesmo grupo revelaram que a aplicação intravenosa de CTM alogênicas após o infarto agudo do miocárdio, promoveu melhoria global dos sintomas e que, após 6 meses, foi identificada pequena, mas significativa melhora da fração de ejeção dos pacientes (Hare *et al.*, 2009).

Chen (2004) relatou o sucesso do transplante de CTM por via intracoronariana. Tal estudo demonstrou melhora global da contratilidade, sem relato de efeitos adversos. No entanto, estudos posteriores revelaram que esta via de administração era susceptível à eventos de embolia distal após o procedimento (Matsubara *et al.*, 2004; Vulliet *et al.*, 2004).

Estudos com outros tipos celulares tem sido realizados, como por exemplo, as células progenitoras endoteliais (CPE), que podem ser isoladas a partir da medula óssea ou do sangue periférico. CPE foram administradas por via intracoronariana e demonstraram segurança e melhora sustentada da região de perfusão, além de remodelamento do ventrículo esquerdo em pacientes com infarto do miocárdio (Patel *et al.*, 2015; Manginas *et al.*, 2007).

Diversos estudos demonstraram que a mobilização de células-tronco endógenas ou a administração exógena em tecidos lesionados promoveriam a reestruturação do tecido, assim como sua melhora funcional. Existem diferentes hipóteses sobre o mecanismo de ação destas células (figura 5). Uma das hipóteses atribui a recuperação funcional do tecido aos mecanismos de transdiferenciação celular pelo qual as células-tronco transplantadas se transdiferenciavam em células do tecido lesionado. Os primeiros trabalhos publicados sobre transdiferenciação apontaram que as CTH poderiam se diferenciar em células não-hematopoiéticas (Ferrari *et al.*, 1998) e células progenitoras neurais (Bjornson *et al.*, 1999). Grove *et al.* (2002) compilou alguns estudos utilizando células-tronco de medula óssea que corroboravam essa

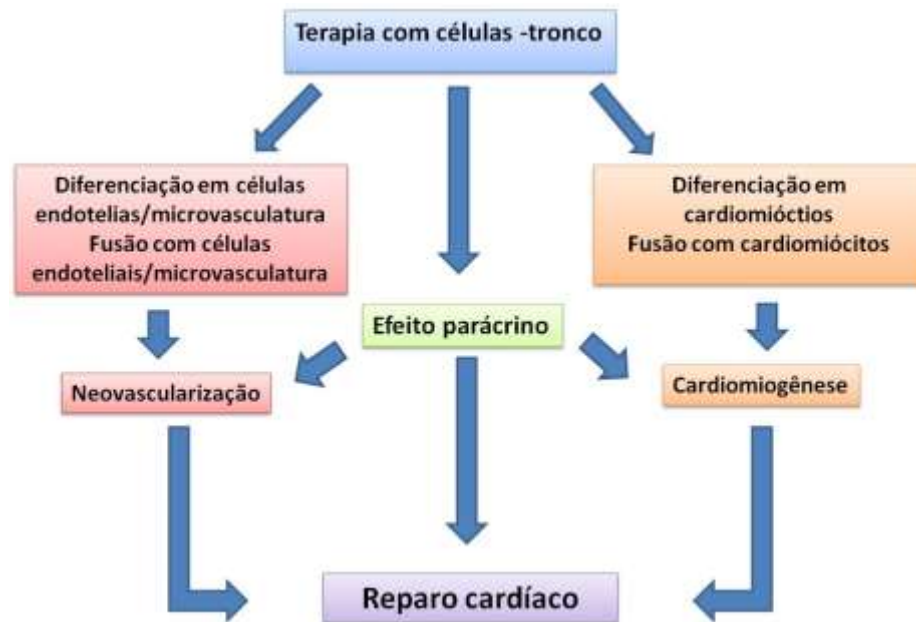
hipótese. No entanto, esta possibilidade foi percebida com entusiasmo e desconfiança dividindo a comunidade científica e clínica. Além disso, muitos desses estudos se mostraram irreprodutíveis (Baraniak & McDevitt, 2010; Wurmser & Gage, 2002).

A fusão célula-célula tem sido apontada como outra hipótese de ação das células-tronco no tecido lesionado. Alguns estudos demonstraram, através de marcadores genéticos e citogenéticos, que a fusão de células-tronco de medula óssea com hepatócitos os tornaria funcionais em modelo animal de tirosemia hereditária tipo I (Vassilopoulos *et al.*, 2003). Vários autores propuseram que a fusão de células heterotípicas seria capaz de reparar uma grande variedade de tecidos, inclusive, Nygren *et al.* (2004) atribuíram a renovação dos cardiomiócitos ao mecanismo de fusão celular. No entanto, a baixa frequência com a qual foram observados tais eventos (tipicamente menos de 1% de cardiomiócitos e <0,1% de hepatócitos ou células de Purkinje) fizeram com que Alvarez-Dolado *et al.* (2003) sugerissem que este fenômeno é raro e, portanto, é improvável que contribua significativamente para a regeneração dos tecidos normais.

Há inúmeras evidências que suportam a hipótese de que fatores secretados por células-tronco, por mecanismo parácrino, seriam responsáveis pelo processo de reparação tecidual (Baraniak & McDevitt, 2010). Tem sido demonstrado que as células-tronco podem produzir e sintetizar citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, pois após o transplante de CTM e células-tronco de medula óssea foram identificados grandes concentrações de fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento de fibroblasto (FGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) (Yoon *et al.*, 2005; Nagaya *et al.*, 2005). Estudos utilizando meio condicionado obtido a partir de cultura de CTM reproduziram os mesmos efeitos benéficos obtidos pelo transplante de células-tronco adultas no coração lesionado, corroborando esse mecanismo de ação (Gnecchi *et al.*, 2005; Gnecchi *et al.*, 2006). Outro estudo de Takahashi *et al.* (2006) demonstrou que a injeção de meio condicionado de células de medula óssea em modelo de infarto do miocárdio promoveu a vascularização, redução da área de tecido comprometido e melhora da função cardíaca. Daltro *et al.* (2017) trataram animais obesos submetidos à dieta hiperlipídica com meio condicionado de células-tronco mesenquimais de medula óssea e relataram que houve reestruturação do tecido cardíaco com redução da fibrose e melhora da função relacionada com a condução do impulso cardíaco e contratilidade. Esses resultados indicam que os fatores

secretados por células-tronco estariam diretamente relacionados com a melhora estrutural e funcional do coração em animais obesos.

Figura 5: Mecanismo proposto na regeneração cardíaca.



Nota: O esquema indica a participação das diferentes hipóteses para o mecanismo de ação das células-tronco no reparo cardíaco.

Fonte: Adaptado de GNECCHI *et al.*, 2008.

Portanto, atualmente, diversos trabalhos tem atribuído a melhora obtida após terapia celular ao efeito parácrino das células-tronco transplantadas, e não ao fenômeno de transdiferenciação. Sendo assim, a liberação de fatores parácrinos, o recrutamento de células-tronco/progenitoras, assim como a ativação de células-tronco residentes poderiam contribuir para o remodelamento da matriz extracelular, promover a angiogênese e a imunomodulação e reduzir a morte celular (Gnecchi *et al.*, 2008; Mathieu *et al.*, 2009; Sanganalmath & Bolli, 2013).

3. CÉLULAS-TRONCO CARDÍACAS RESIDENTES

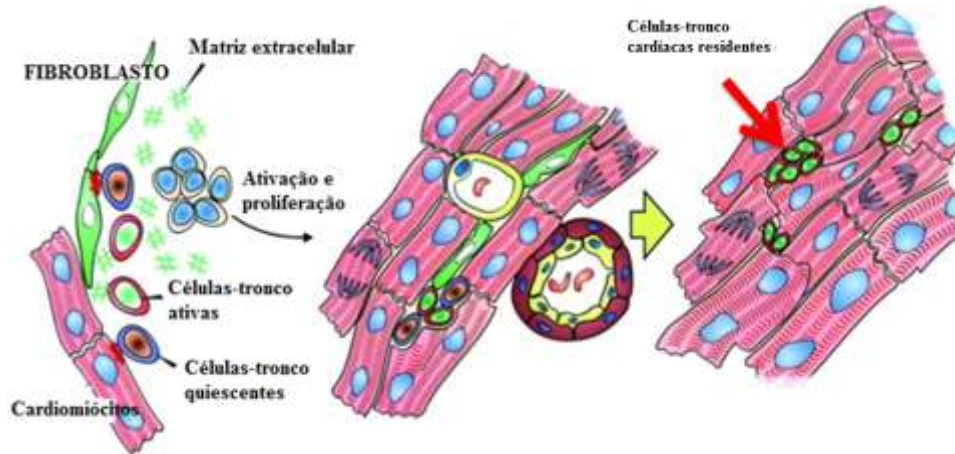
3.1. Coração: um órgão terminalmente diferenciado?

O coração foi considerado por muito tempo um órgão terminalmente diferenciado, sendo incapaz de gerar novos cardiomiócitos após lesão ou estímulo fisiológico. A conclusão de que novos cardiomiócitos não poderiam ser formados foi apoiada pela dificuldade de localização de núcleos mitóticos e negligência de uma análise mais profunda do grau de síntese de DNA (Beltrami *et al.*, 2003; Dimmerler *et al.*, 2005; Leri *et al.*, 2014). A hipertrofia dos cardiomiócitos residuais foi, por muito tempo, o mecanismo adaptativo proposto para o aumento do trabalho ou a morte celular. No entanto, estudos sugerem que os cardiomiócitos podem proliferar sob certas condições patológicas, e que o coração adulto apresentaria células com marcadores estaminais de superfície (Leri *et al.*, 2001; Beltrami *et al.*, 2001; Quiani *et al.*, 2002; Matsuura *et al.*, 2004).

Em 2003, um estudo foi publicado comprovando que o coração adulto apresentava capacidade proliferativa, no entanto, essa capacidade era limitada. Diversos estudos apontaram a presença de células-tronco cardíacas distribuídas pelo miocárdio, que seriam capazes de proliferar quando estimuladas, possibilitando a formulação de um mecanismo para regeneração cardíaca (Bergmann *et al.*, 2009; Beltrami *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2014; Leri *et al.*, 2015).

As células responsáveis pela regeneração cardíaca foram identificadas por apresentarem um perfil de marcadores de superfície, sendo denominadas células c-kit⁺, Sca-1⁺ e Lin⁻. Estas são auto-renováveis, clonogênicas e multipotentes, sendo capazes de dar origem a cardiomiócitos, células musculares lisas e células endoteliais (Beltrami *et al.*, 2003; Ellison *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2013) (Figura 6).

Figura 6: Esquema representativo da presença de células-tronco cardíacas residentes em nichos entre os cardiomiócitos.



Fonte: Adaptada de ZHAO et al, 2013.

As células $c\text{-kit}^+$ são as células-tronco cardíacas residentes (CTC) mais estudadas e podem expressar fatores de transcrição específicos de linhagem cardíaca como $Nkx2.5$, $GATA4$, e $Mef2$ (Beltrami *et al.*, 2003; Barile *et al.*, 2007). O receptor $c\text{-kit}$ é expresso em diversas células adultas diferenciadas, tais como mastócitos, e por isso, a caracterização das CTC $c\text{-kit}^+$ necessita também da seleção negativa para marcadores de linhagem específica, por exemplo, $c\text{-kit}^+ \text{Lin}^-$ (Fang *et al.*, 2012).

3.2. Terapia Celular e as células-tronco cardíacas residentes

A crescente conscientização da comunidade de pesquisa de que as esperanças levantadas pela terapia com células derivadas da medula óssea poderiam não ser atingidas levou alguns pesquisadores a explorar um caminho alternativo, baseado no uso de células comprometidas com a linhagem cardíaca. Essa abordagem baseou-se, em grande parte, em pesquisas básicas indicando que o coração de mamíferos abrigava células-tronco e / ou progenitoras, cuja capacidade de reparação tecidual

poderia ser utilizada em um produto terapêutico, com a ressalva de que essas células são mais abundantes no período neonatal, mas depois tendem a diminuir rapidamente ao longo do tempo (Bianconi *et al.*, 2018; Mishra *et al.*, 2011).

O mecanismo de homeostase de cardiomiócitos em condições normais é potencialmente diferente após lesão, o que pode desencadear uma cascata de sinais responsáveis pela ativação de células progenitoras quiescentes. Alguns estudos têm descrito a capacidade de multipotência das CTC, sendo estas capazes de gerar cardiomiócitos e células vasculares (Beltrami *et al.*, 2003; Ellison *et al.*, 2011; Fuentes *et al.*, 2013; Garbern & Lee, 2013).

As CTC demonstraram, em diversos trabalhos, a capacidade de gerar cardiomiócitos e, por isso, teriam elevado potencial terapêutico ao considerarmos o transplante autólogo em ensaios clínicos para regeneração do miocárdio. No entanto, o isolamento das CTC não é simples e a quantidade obtida cirurgicamente a partir de um indivíduo é pequena. Em contrapartida, tais células podem ser expandidas *in vitro* sem que seu potencial de diferenciação seja alterado (Gaetani *et al.*, 2009; Messina *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2007).

Diversos estudos investiram na administração de CTC em modelos animais de infarto do miocárdio. Estas promoveram o remodelamento cardíaco, reduziram a taxa de morte celular, ativaram mecanismos de reparação endógenos e contribuíram para a formação de novas células no miocárdio. Tais resultados sugeriram que estas células poderiam promover a regeneração do miocárdio, contribuindo para recuperação da função do coração (Bailey *et al.*, 2009; De Angelis *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram alcançados em modelo de dano difuso do miocárdio, gerando falência cardíaca, descrito por Ellison *et al.* (2013), onde a recuperação da função cardíaca foi atribuída à regeneração de cardiomiócitos perdidos, células musculares lisas, células endoteliais e fibroblastos.

Várias populações de CTC foram identificadas e caracterizadas com base em marcadores de superfície específicos, embora frequentemente sobrepostos. No entanto, até agora, apenas dois fenótipos de células entraram na arena clínica: CTC c-kit⁺ e células derivadas de cardiosferas (Malliaras *et al.*, 2014). No campo dos estudos clínicos de fase I, o SCIPIO (infusão de CTC c-kit⁺ em pacientes com cardiomiopatia isquêmica) apontou melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo dos pacientes com insuficiência cardíaca secundária grave que receberam infusão intracoronária de CTC c-kit⁺. Além da melhora da fração de ejeção continuada

após um ano da administração das CTC, houve também redução da área infartada e aumento da área viável do ventrículo esquerdo, indicando regeneração do miocárdio (Bolli *et al.*, 2011). Atualmente, dois estudos clínicos para testar CTC c-kit⁺ estão em andamento, o CONCERT-HF e o TAC-HFT-II, os quais também irão testar uma combinação de CTM autólogas derivadas da medula óssea e CTC c-kit⁺ (ClinicalTrials.gov, 2017; 2018).

Resultados bem-sucedidos dos futuros ensaios clínicos em terapias de regeneração cardíaca dependerão, em grande parte, da hipótese mecanicista em que esses estudos serão baseados. De fato, existem dois principais mecanismos hipotéticos para promover o reparo cardíaco. A primeira implica que as células transplantadas atuem construindo o novo tecido miocárdico destinado a substituir o miocárdio irreversivelmente perdido; neste caso, as células transplantadas devem enxertar permanentemente. A segunda é que as células agem liberando moléculas que aproveitam os mecanismos endógenos de reparo; nesse caso, a premissa aceita é que as células transplantadas só precisam enxertar transitoriamente (Menasché, 2018).

Com base nessa segunda hipótese, um dos potenciais mecanismos de ação da terapia celular no coração que tem recebido mais atenção recentemente é, realmente, a ativação parácrina das vias de sobrevivência das células atingidas e regeneração tecidual. Assim, a identificação das moléculas secretadas pelas células transplantadas deve tornar possível, inclusive, a concepção de terapias que eliminem a utilização de células e se concentrem na administração das moléculas efetoras principais. Terapias efetivas livres de células para a regeneração do miocárdio baseadas na ativação, multiplicação e diferenciação *in situ* das CTC seriam mais vantajosas do que as outras baseadas no transplante de células. Primeiro, os componentes terapêuticos estariam disponíveis e prontos para usar a qualquer momento, sem o tempo de latência necessário para as técnicas de terapia celular, além de vantagens clinicamente relevantes em termos de manufatura em larga escala, consistência do produto, padronização dos controles de qualidade, segurança e, por fim, redução de custos.

Tem sido demonstrado, tanto *in vitro* como em modelos animais, os efeitos regenerativos do tratamento com fatores de crescimento envolvidos no efeito parácrino exercido por células transplantadas (Chen *et al.*, 2012; Ellison *et al.*, 2011), portanto é concebível que estes fatores possam aumentar a proliferação, migração,

sobrevivência e diferenciação de CTC ou até restaurar os nichos de CTC (Gnecchi *et al.*, 2008). Por exemplo, Linke *et al.* (2005) demonstraram que a administração conjunta de IGF-1 e HGF no modelo de infarto do miocárdio induziu a proliferação, migração e diferenciação de CTC.

Além disso, o coquetel de IGF-1/HGF, de forma dose-dependente, melhorou a sobrevivência dos cardiomiócitos e reduziu a fibrose e a hipertrofia reativa dos cardiomiócitos. As alterações histológicas foram correlacionadas com redução da área do infarto e melhora da contratilidade e fração de ejeção ventricular (Ellison *et al.*, 2011). Chen *et al.* (2012) observaram que a injeção subcutânea de IGF-1 por uma semana aumentou a concentração de células-tronco Sca-1⁺ na medula óssea de ratos irradiados, além de ativar a via da Akt e inibir caspase 3, resultando em diminuição da apoptose, indicando que o IGF-1 pode modular a sobrevivência e proliferação de células-tronco.

Em algumas condições patológicas, as CTC apresentam incapacidade funcional, tornando o controle homeostático defeituoso, e resultando em senescência celular e apoptose (Urbanek *et al.*, 2005). A cardiomiopatia diabética, por exemplo, pode ser mediada por defeitos no crescimento e sobrevivência de CTC c-kit⁺, o que estaria associado ao estresse oxidativo e, também, ao remodelamento adverso (Rota *et al.*, 2006; Mirsha *et al.*, 2013). O estresse oxidativo resultante da obesidade também foi relacionado com a redução do desempenho das CTC (Xu & Ren, 2013).

4. FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-1 (IGF-1)

O fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) é um hormônio de crescimento anabólico de função endócrina, parácrina e autócrina, associado com proliferação, crescimento e metabolismo celular (Araujo *et al.*, 2007; Salminen & Kaarniranta, 2010; Ren & Anversa, 2015). O hormônio de crescimento (GH) estimula a síntese de IGF-1 pelo fígado, responsável por 75% do IGF-1 circulante. Os 25% restantes da produção são divididos por diferentes órgãos, inclusive pelo coração. Da mesma forma, o IGF-1 regula a liberação do GH por *feedback* negativo (Araujo *et al.*, 2007; Lewitt *et al.*, 2014; Aguirre *et al.*, 2016).

O IGF-1 circula ligado a uma proteína carreadora denominada proteína ligante de IGF - a IGFBP. Esta, tem o potencial de regular finamente o efeito do IGF-1, prolongando sua meia-vida, modulando a especificidade tecidual e, ainda, pode reforçar ou neutralizar suas ações biológicas. Existem diversas subformas da IGFBP, sendo que cerca de 80% são IGFBP-3 (Castellano *et al.*, 2009; Ren & Anversa, 2015; Aguirre *et al.*, 2016).

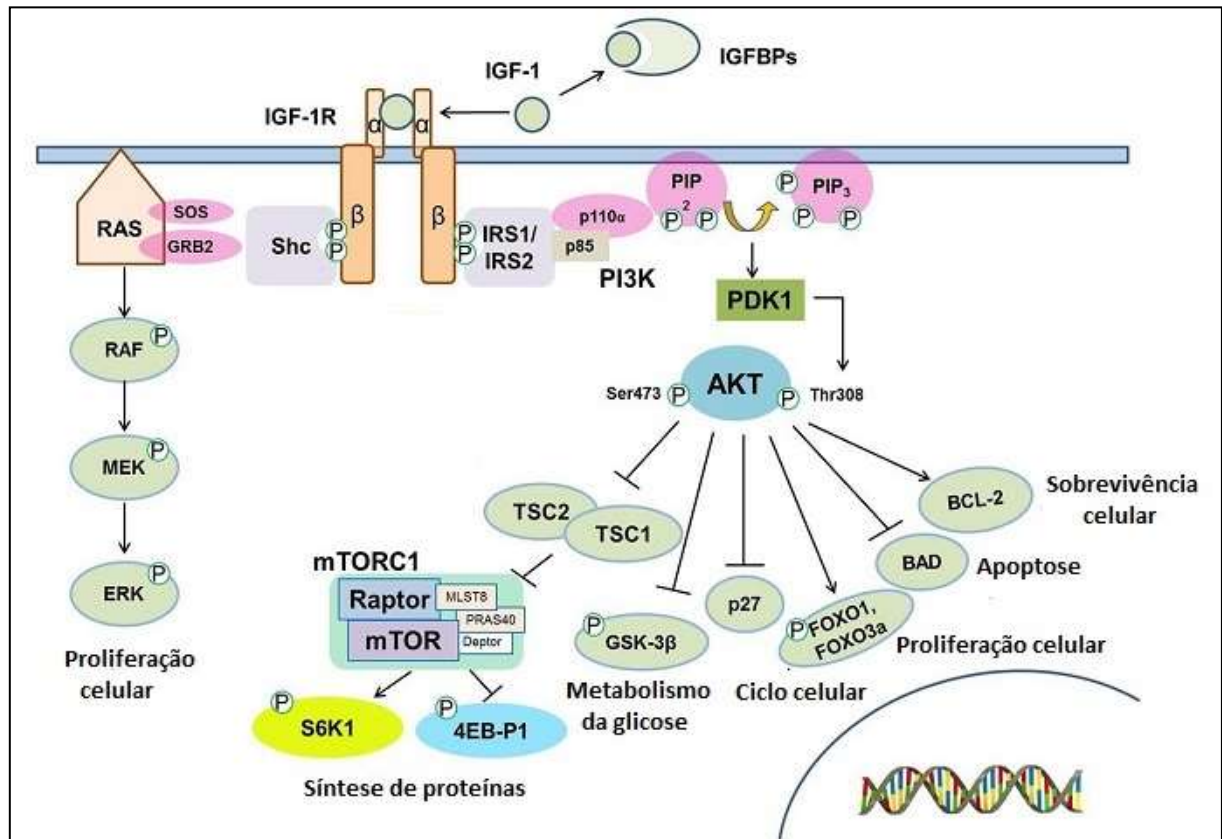
O IGF-1 e a insulina possuem estrutura homóloga e, portanto, o IGF-1 pode ligar-se ao receptor de insulina (IR), além da interação com seu receptor específico IGF-1R, que possui duas subunidades contendo domínios tirosina quinase. A ativação do receptor específico do IGF-1, o IGF-1R, permite a ativação do domínio tirosina quinase de suas subunidades β promovendo a fosforilação do próprio receptor e de diversos substratos. Um destes é o Shc (substrato homólogo ao colágeno) e o IRS (substrato receptor de insulina). A fosforilação do receptor leva à ativação de duas principais vias de sinalização celular (Garza *et al.*, 2017). A ativação da fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) e a via de sinalização -PDK1 – AKT, ao passo que a fosforilação de Shc conduz à ativação da via de sinalização de RAS, RAF e quinase regulada por sinal extracelular (ERK) / proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Sadagurski & White, 2013; Ren & Anversa, 2015; Brahmkhatri *et al.*, 2015; Guntur & Rosen, 2013; Troncoso *et al.*, 2014; Aguirre *et al.*, 2016) (figura 7).

A ativação da Akt inibe sinais apoptóticos associados à Bad e à caspase-9, além de ativar fatores de transcrição como mTOR, que servem como principais transdutores de sinais mitogênicos produzidos pela via PI3K/Akt (Troncoso *et al.*, 2014; Ren & Anversa, 2015). A sinalização pela via AKT, também influencia o metabolismo da

glicose através da regulação da atividade de GSK - 3 β , a síntese de proteínas e o crescimento celular, através da regulação da atividade do mTORC1 complexo (Jung & Shu, 2014). Portanto, a via PI3K/Akt resulta no aumento da síntese proteica, crescimento celular, conversão de glicose ao glicogênio, resistência ao estresse oxidativo, ativação da função mitocondrial, proliferação e sobrevivência celular, por meio da redução dos níveis de apoptose (Fuentes *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Guntur & Rosen, 2013; Kamenicky *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018).

A ativação da Shc estimula a via da proteína quinase ativada por mitógeno (RAS/MAPK), especificamente a quinase regulada por sinal extracelular (ERK), levando à transdução de sinais responsáveis pelo aumento da proliferação e diferenciação celular (Conti *et al.*, 2011; Morrison, 2012; Garza *et al.*, 2017).

Figura 7: Via de sinalização do IGF-1.



Nota: A ligação do IGF-1 com seu receptor IGF-1R na membrana celular acarreta na sua autofosforilação e recrutamento de proteínas adaptadoras IRSs e Shc. Isto induz a ativação do PI3K que converte PIP2 num segundo mensageiro lipídico PIP3, sendo a família da AKT quinases ativada pelo PDK1. A AKT ativada regula proteínas a juntante como TSC1 e 2 que inibem mTORC1 que regula a fosforilação de S6K1 e 4EB-P1, importantes para ativação da síntese de proteínas. Além disso, regula a proteínas como GSK-3β, p27, FOXO 1 e 3a, BAD e Bcl-2. Essas moléculas estão diretamente associadas com vários processos celulares como: metabolismo da glicose e sobrevivência celular. Em paralelo, a ativação da Shc induz a ativação da via Ras / MAP quinase, o que resulta em aumento proliferação celular

Fonte: Adaptado: Jung & Shu, 2014.

O IGF-1 tem efeito em diferentes órgãos. Nesse sentido, sendo um dos fatores de crescimento secretados pelas células-tronco, tem sido estudado em diferentes modelos por estar diretamente relacionado à obesidade e às doenças cardiovasculares.

No coração, ele regula o metabolismo, apoptose, autofagia, senescência e crescimento celular (Troncoso *et al.*, 2013; Troncoso *et al.*, 2014). O IGF-1 tem sido utilizado em diversos estudos a fim de reverter complicações associadas às doenças cardiovasculares. Pacientes com níveis de IGF-1 abaixo da normalidade possuem

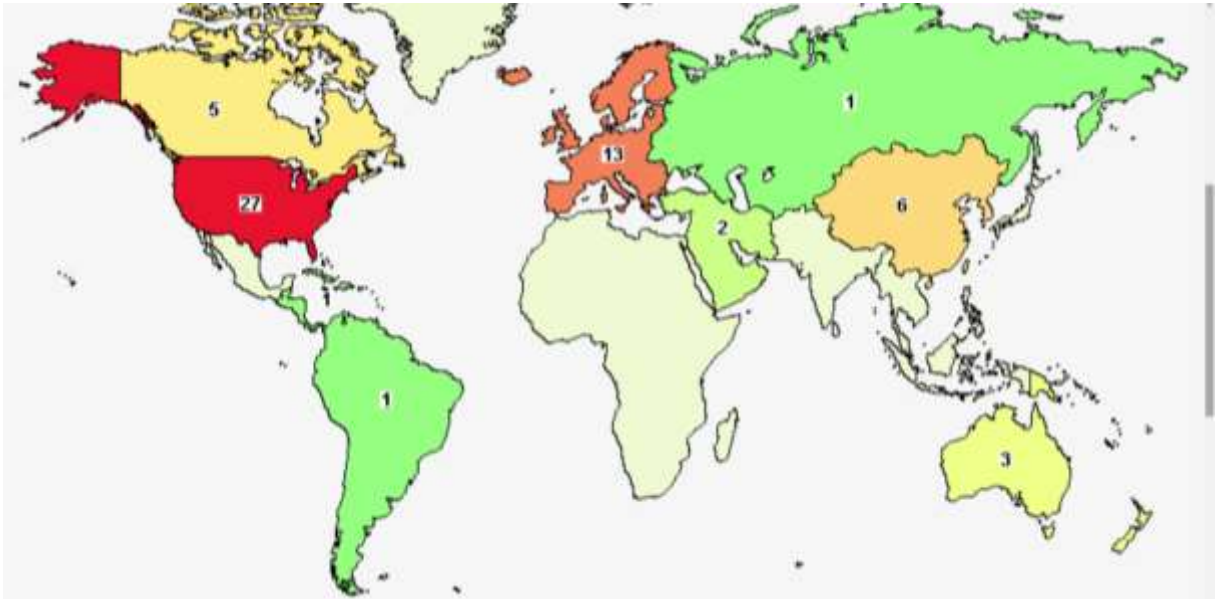
maior propensão de sofrer infarto isquêmico e falência cardíaca. Por isso, alguns grupos advogam que injeções endógenas deste fator de crescimento conferem proteção contra cardiomiopatias (Ramachandran *et al.*, 2003; Troncoso *et al.*, 2014; Ren & Anversa, 2015).

As principais vias de ativação pelo IGF-1 no coração são PI3K/Akt e ERK, ambas envolvidas na hipertrofia cardíaca e sobrevivência celular. Em cultura de cardiomiócitos de neonatos, a fosforilação do IGF-1R promoveu a ativação das vias Akt e ERK, assim como a sinalização de Ca^{2+} nuclear (Foncea *et al.*, 2000; Ibarra *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2008). A ativação da PI3K é essencial para a sobrevivência, metabolismo e o desempenho das funções de células cardíacas, pois regula o transporte de glicose, anti-lipólise, a síntese de proteínas e de glicogênio, inibe a apoptose e interfere na contratilidade celular, já que a administração de IGF-1 por um curto período foi capaz de elevar a contratilidade cardíaca, a capacidade de estocar Ca^{2+} intracelular, assim como a sensibilidade ao Ca^{2+} (Ren, 2008; Suleiman *et al.*, 2007; Ren & Anversa, 2015).

A administração de IGF-1 por via intracoronariana aumentou a proliferação de CTC c-Kit⁺ e a geração de novos cardiomiócitos, o que promoveu a recuperação da área infartada em porcos. Além disso, foi comprovado que esse fator de crescimento aumentou a sobrevivência dos cardiomiócitos, reduzindo o processo de apoptose (Ellison *et al.*, 2011).

Os resultados promissores utilizando o IGF-1 em modelo experimental impulsionaram ensaios clínicos com esse fator de crescimento. Atualmente, ele vem sendo utilizado em diversos estudos clínicos relacionados com diferentes tipos de patologias. Uma busca no site Clinical.Trails.gov (2018) apresentou a distribuição geográfica de 52 estudos clínicos utilizando IGF-1 recombinante, como pode ser observado no mapa abaixo (figura 8), sendo possível observar algumas das condições patológicas analisadas (tabela 1).

Figura 8: Distribuição geográfica de ensaios clínicos utilizando IGF-1 recombinante.



Nota: O mapa apresenta os 52 estudos clínicos cadastrados utilizando IGF-1 recombinante e sua distribuição geográfica.

Fonte: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=recombinant+insulinlike+growth+factor&Search=Apply&recrs=a&recrs=d&recrs=h&recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=, acesso em 22/06/18.

Tabela 1: Condições patológicas em estudo clínico utilizando IGF-1 recombinante.

Condição	Estudos
Metabolismo de carboidratos, erro congênito	1
Anormalidades cardiovasculares	2
Desordem no metabolismo da glicose	4
Defeitos cardíacos congênitos	2
Doenças cardíacas	2
Hiperglicemia	1
Hiperinsulinemia	4
Hiperfagia	1
Resistência à insulina	1
Doença metabólica	10
Metabolismo, erros congênitos	1
Atrofia muscular	1
Doença muscular	3
Desordem muscular, atrofia	1
Desordem nutricional	1
Obesidade	1
Hiperalimentação	1

Fonte: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=recombinant+insulinlike+growth+factor&Search=Apply&recrs=a&recrs=d&recrs=h&recrs=e&age_v=&gndr=&type=&rslt=, acesso em 22/06/18.

5.JUSTIFICATIVA

A obesidade tem tomado proporções epidêmicas, levando à morte milhares de pessoas por ano, mundialmente. Uma das principais co-morbidades relacionadas à obesidade é a falência cardíaca, entretanto, as terapias convencionais disponíveis atualmente não são capazes de reverter esse quadro. O transplante de células-tronco tem sido estudado em diferentes patologias, incluindo doenças cardiovasculares, e tem obtido resultados promissores. Sabe-se que o principal mecanismo de ação das células-tronco no tecido-alvo é o efeito parácrino, pela liberação local de diferentes citocinas e fatores de crescimento. No coração, acredita-se que esses fatores possam ativar as células-tronco cardíacas residentes (CTC) promovendo sua proliferação e diferenciação. Assim, mais recentemente, tem-se proposto a busca por terapias livres de células que foquem no efeito parácrino. Nesse sentido, o IGF-1, um dos fatores de crescimento secretados pelas células-tronco, tem sido estudado em diferentes modelos por estar diretamente relacionado à obesidade e às doenças cardiovasculares.

Além dos efeitos deletérios já conhecidos da obesidade, tem sido demonstrado recentemente que a obesidade pode provocar danos às células-tronco e/ou progenitoras adultas presentes em diferentes tecidos. Assim a relevância deste projeto baseia-se na avaliação dos efeitos da obesidade induzida por dieta ocidental desde o início da vida sobre as CTC e o potencial terapêutico do IGF-1 na modulação dessas células e na regeneração do coração.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo geral

Estudar as células-tronco cardíacas residentes e o potencial terapêutico de IGF-1 no coração em modelo experimental de obesidade induzida por dieta ocidental a partir do desmame em camundongos *Swiss*.

6.2. Objetivos específicos

Esse trabalho compreendeu os grupos experimentais controle, obeso e obeso tratado com IGF-1, e teve como objetivos específicos:

- Aferir os parâmetros biométricos e indicativos de obesidade e hipertrofia cardíaca;
- Identificar e quantificar as células-tronco cardíacas residentes (c-kit⁺) e as células progenitoras endoteliais (CD133⁺) no coração;
- Quantificar a formação de novos cardiomiócitos (Nkx2.5) no coração;
- Quantificar o desenvolvimento de fibrose cardíaca e as proteínas envolvidas neste processo (Colágenos I e III, MMP-9 e -13 e TIMP-1);
- Analisar a expressão de proteínas envolvidas no processo de apoptose (Bax, Bcl2), no ciclo de cálcio (Serca-2) e acoplamento cardíaco (Conexina 43);
- Avaliar a atividade mitocondrial dos cardiomiócitos e o conteúdo de proteínas relacionadas ao metabolismo energético mitocondrial (CPT-1 e PGC-1 α) e desacoplamento mitocondrial (UCP2);
- Analisar a via de sinalização intracelular pAkt/Akt no coração.

7. METODOLOGIA

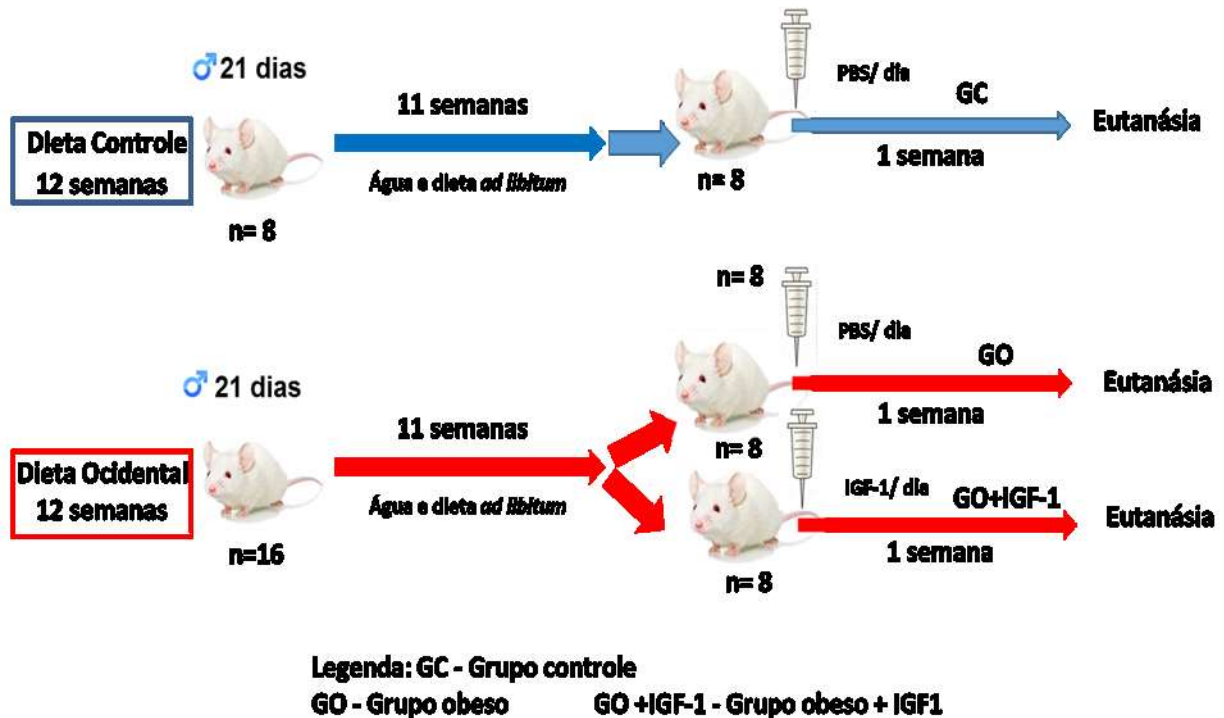
7.1. Animais e modelo experimental de obesidade

Camundongos *Swiss* machos de 21 dias de idade foram obtidos no centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Cecal/FIOCRUZ) e mantidos em caixas de polipropileno, dois animais por caixa, sob condições padrão de temperatura ($21\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade controlada ($60\pm 10\%$), com ciclo de claro e escuro de 12/12h e de exaustão de ar a cada 15 min/hora. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas do comitê de ética da UERJ (CEUA/026/2017).

Os animais foram divididos randomicamente em dois grandes grupos: grupo controle (GC, N=16), alimentado com ração padrão AIN93G (53,6% de carboidratos complexos, 10,0% de carboidratos simples, 20,3% de proteínas e 7,0% de lipídeos) e grupo obeso (GO, N=16), alimentado com dieta ocidental, rica em carboidratos simples e gordura saturada, baseada na adição de manteiga clarificada (Ghee) (15,4% de carboidratos complexos, 34,1% de carboidratos simples, 19,8% de proteínas e 21,0% de lipídeos), conforme descrito por Tikellis e colaboradores (2008), e já utilizada pelo nosso grupo (Oliveira *et al*, 2014; Neves *et al*, 2014). Ambas as rações foram compradas da empresa PragSoluções Ltda (Rio de Janeiro, Brazil).

A dieta foi administrada por 12 semanas, com livre acesso à água e ração. Após 11 semanas de dieta, parte dos animais do grupo obeso (N=8) receberam uma injeção subcutânea diária de 50 μl de IGF-1 recombinante humano (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{dia}$) (PeproTech) em solução salina por sete dias consecutivos (grupo obeso+IGF-1 - GO+IGF-1). A fim de mimetizar o estresse gerado pelas administrações de IGF-1 nos grupos correspondentes, os animais sem tratamento receberam injeções de 50 μl de solução salina (figura 9).

Figura 9: Desenho experimental.



Nota: Camundongos *Swiss* machos com 21 dias foram separados em dois grupos denominados: Controle (GC - n=8) e Obeso (GO - n= 16). Após 11 semanas da dieta, os 16 camundongos do grupo obeso foram divididos em dois grupos de 8 animais cada. Os camundongos que receberam dieta ocidental foram subdivididos em grupo obeso (GO) e grupo obeso + IGF-1 (GO+IGF1). Os animais pertencentes aos grupos tratados com IGF-1 receberam uma dose diária de IGF-1 por uma semana, sendo eutanasiados no final de 12 semanas de dieta. Os animais que não foram tratados com IGF-1 receberam uma dose diária de PBS estéril por uma semana.

Fonte: ANDRADE, 2018.

7.2 . Consumo alimentar em gramas e em calorias

O consumo alimentar foi acompanhado durante as 12 semanas de dieta. A ingestão semanal em gramas foi estimada por meio da média da pesagem das rações em gramas realizada quatro vezes por semana, em balança analítica de precisão. A partir dos dados da ingestão em gramas foi realizado o cálculo da ingestão em calorias (Kcal) ingeridas por semana com a seguinte fórmula: média de ração ingerida em gramas/semana x valor energético total da dieta (Kcal) /grama.

7.3. Eutanásia

No dia da eutanásia, após 12 semanas de consumo da dieta correspondente de cada grupo, os camundongos *Swiss* foram submetidos a 6 horas de jejum para análise de tolerância à glicose. A massa corporal foi aferida e, em seguida, os animais foram anestesiados utilizando Avertin®, por via intraperitoneal, numa concentração de 0,02 ml/g de massa corporal e, em seguida, mensurou-se o comprimento naso-anal com auxílio de um paquímetro.

Realizou-se a abertura do tórax, o coração foi retirado e imediatamente imerso em solução de relaxamento e preservação BIOPS (em mM: CaK₂EGTA 2.77, K₂EGTA 7.23, MgCl₂ 6.56, ditioneitol 0.5, K-MÊS 50, imidazol 20, taurina 20, Na₂ATP 5.77, fosfocreatina 15, pH 7.1, ajustado a 25°C) em placa de petri, sobre o gelo. O ventrículo esquerdo foi retirado e pesado em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2014N®).

O coração foi dividido para a utilização em diferentes técnicas: respirometria de alta-resolução, citometria de fluxo, microscopia óptica e western blotting.

Além do coração, outros órgãos e tecidos foram coletados: o sangue, o fígado e tecido adiposo (gordura retroperitoneal e epididimal). A massa de cada órgão/tecido foi mensurada em balança eletrônica de precisão. A massa do fígado (g) foi corrigida pela massa corporal (g) para estimativa de esteatose hepática.

7.4. Parâmetros biométricos

Com o objetivo de demonstrar o caráter obesogênico da dieta, os seguintes parâmetros biométricos foram aferidos:

7.4.1. Massa corporal

Os animais foram pesados semanalmente em balança analítica de precisão.

7.4.2. Comprimento Naso-anal e comprimento da tibia

Os animais tiveram seu comprimento naso-anal e comprimento da tibia verificados através da utilização do Paquímetro no dia da eutanásia.

7.4.3. Glicemia

No dia da eutanásia, após 6 horas de jejum, o sangue dos animais foi coletado da veia caudal para determinação da glicose plasmática, com o auxílio de glicosímetro e fitas de teste (Accu-Chek Active®). Os resultados foram apresentados em mg/dl.

7.4.4. Peso da gordura epididimal e retroperitoneal

O tecido adiposo (gordura epididimal e retroperitoneal) dos animais foi retirado e mensurado em balança eletrônica de precisão no dia da eutanásia.

7.4.5. Índice de Lee

O índice de Lee, equivalente ao IMC em humanos, foi calculado a partir da fórmula: raiz cúbica da massa corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) x 1000.

7.4.6. Peso do coração e estimativa da hipertrofia cardíaca

Para investigar a probabilidade da hipertrofia cardíaca, no dia da eutanásia, o coração foi retirado e o átrio removido, isolando o ventrículo esquerdo, que foi pesado

em balança eletrônica de precisão. Em seguida, foram feitas as razões: peso do VE (g) / comprimento da tíbia (cm) e peso do VE (g) / massa corporal (g).

7.5. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

Após jejum de 6 horas, os camundongos receberam, por via intraperitoneal, uma injeção de glicose (1g/Kg de peso do animal) e a glicemia foi aferida no sangue coletado da veia caudal utilizando o Accu-Chek Active® (Roche Diagnostics, Germany). As amostras de sangue foram coletadas antes da injeção de glicose, caracterizando o tempo 0 (zero) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose.

7.6. Quantificação dos níveis plasmáticos de insulina

No dia da eutanásia, após 6 horas de jejum, foi realizada a coleta do sangue em seringa contendo 20 µL de heparina sódica (5000UI/mL) e, posteriormente, foi transferido para um eppendorf e centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos para separar o plasma. Em seguida, o plasma foi aliquoteado e mantido a -80°C, para posterior quantificação da insulina plasmática por ELISA (ELISA Kit- Rat Mouse Insulin, EMD Millipore, EZRMI- 13K), seguindo as recomendações do fabricante.

7.7. Cálculo do índice Homa – IR

Com o objetivo de determinar a resistência à insulina foi calculado o índice Homa -IR (Matthews *et al.*, 1985) a partir dos valores da glicemia e insulinemia em jejum, por meio da equação: glicemia (mMol/L) x insulina (µU/mL) / 22,5. Valores acima de 2,7 caracterizam a resistência à insulina.

7.8. Respiração mitocondrial

7.8.1. Obtenção de fibras cardíacas permeabilizadas

Após a eutanásia, o coração foi imerso em solução de relaxamento e preservação (BIOPS) gelada e o ventrículo esquerdo foi isolado. Fatias do músculo entre 2-4 mm de comprimento, 1-1,5 mm de diâmetro, 5-7 mg de peso úmido, aproximadamente, foram retiradas seguindo a orientação das fibras, a fim de 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 da 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 a 4° C (no gelo), com agitação moderada, por 30 minutos para permeabilização do sarcolema. As fibras permeabilizadas foram 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) gelado.

7.8.2. Respirometria de alta resolução

As fibras permeabilizadas foram pesadas em balança analítica e cerca de 2 a 3 mg de tecido foram adicionados à câmara do oxígrafo OROBOROS® Oxygraph-2k contendo 2 ml de MIR05 a 37°C. As análises foram realizadas em concentrações de oxigênio superiores a 400 nmol O₂ml⁻¹. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas em 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 da oxidação relacionada aos carboidratos com entrada de elétrons pelos complexos I e II da cadeia respiratória e (câmara B, em mM) palmitoil-carnitina 0.02 e malato 2, para a análise da oxidação relacionada aos ácidos graxos. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: taxa respiratória

basal, antes da adição de adenosina difosfato (ADP), estado 2; taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM), estado 3; e taxa respiratória na ausência de fosforilação de ADP, após adição de oligomicina (2 µg/ml), estado 4. Para examinar a integridade mitocondrial durante todo o experimento, a respiração foi mensurada em presença de 10 µM de citocromo c.

7.9. Processamento do material histológico

Os fragmentos de coração foram fixados em formaldeído a 4% tamponado por 48 horas, lavados em água corrente por uma hora, e desidratados em baterias crescentes de álcool e diafanizados com xilol. Em seguida, foram banhados e incluídos em parafina líquida. Os blocos formados foram seccionados e cortes de 5 µm, aderidos em lâminas.

7.9.1. Análise quantitativa de colágeno

Cortes não-seriados de 5 µm do coração foram corados com Picro-Sirius Red (solução a 0,1% de DirectRed 80, Sigma-Aldrich) por 45 min, e posteriormente analisados em microscópio de luz equipado com câmera de CCD. As imagens foram capturadas aleatoriamente em objetiva de 40X e analisadas com o software Image-Pro Plus. O valor médio de 15 áreas (5 áreas selecionadas de 3 lâminas da mesma amostra) foi expresso como a porcentagem da área de fibrose.

7.9.2. Análise quantitativa da esteatose hepática

Cortes não-seriados de 5 µm do fígado foram submetidos à coloração de rotina com hematoxilina e eosina. Em seguida, analisados em microscópio de luz com câmera CCD. As imagens foram capturadas em objetiva de 40X e analisadas no

software STEPnalyzer pelo método da contagem de pontos: Densidade/área (μm^2). As áreas analisadas foram obtidas aleatoriamente.

7.9.3. Imunomarcação

Cortes de 5 μm do coração foram incubados com anticorpo primário anti-c-kit (Santa Cruz, obtido em coelho) e anti-CD45 (Santa Cruz, obtido em cabra). Em seguida, foram lavados e incubados com anticorpo secundário específico, AlexaFluor 488 para marcação de c-kit e AlexaFluor 555 para marcação CD45, montados em lamínulas com meio de montagem SlowFade (Molecular Probes) e observados em microscópio de varredura confocal a laser.

7.10. Análise das proteínas por Western blotting

Após eutanásia, amostras do coração dos animais foram congeladas imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise do conteúdo proteico através da técnica de western blotting. O material foi fragmentado e em seguida homogeneizado em solução de lise gelada (em mmol: HEPES 30 pH 7,4, Na₄P₂O₇ 50, NaF 100, EDTA 1, Na₃VO₄ 10, Tritón X-100 1%,) contendo coquetel de inibidores (Complete, EDTA-Free, Roche Diagnostic®), por trituração manual com o homogeneizador potter-Elvehjem®, até tornar-se líquido.

O homogeneizado foi colocado em repouso no gelo por 40 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos, a 4°C e o sobrenadante foi coletado e congelado a -70°C. A concentração de proteínas totais foi determinada pelo método colorimétrico de detecção através do Kit Pierce® BCA ProteinAssay (ThermoScientific USA, Rockford, IL). Em seguida, as amostras foram fervidas por 3 minutos com 20% de solução tampão (glicerol 10%, 2- β -mercaptoetanol 5%, SDS 10% NaOH 10N e azul de bromofenol 0,0001%) a 100°C, para desnaturação das proteínas.

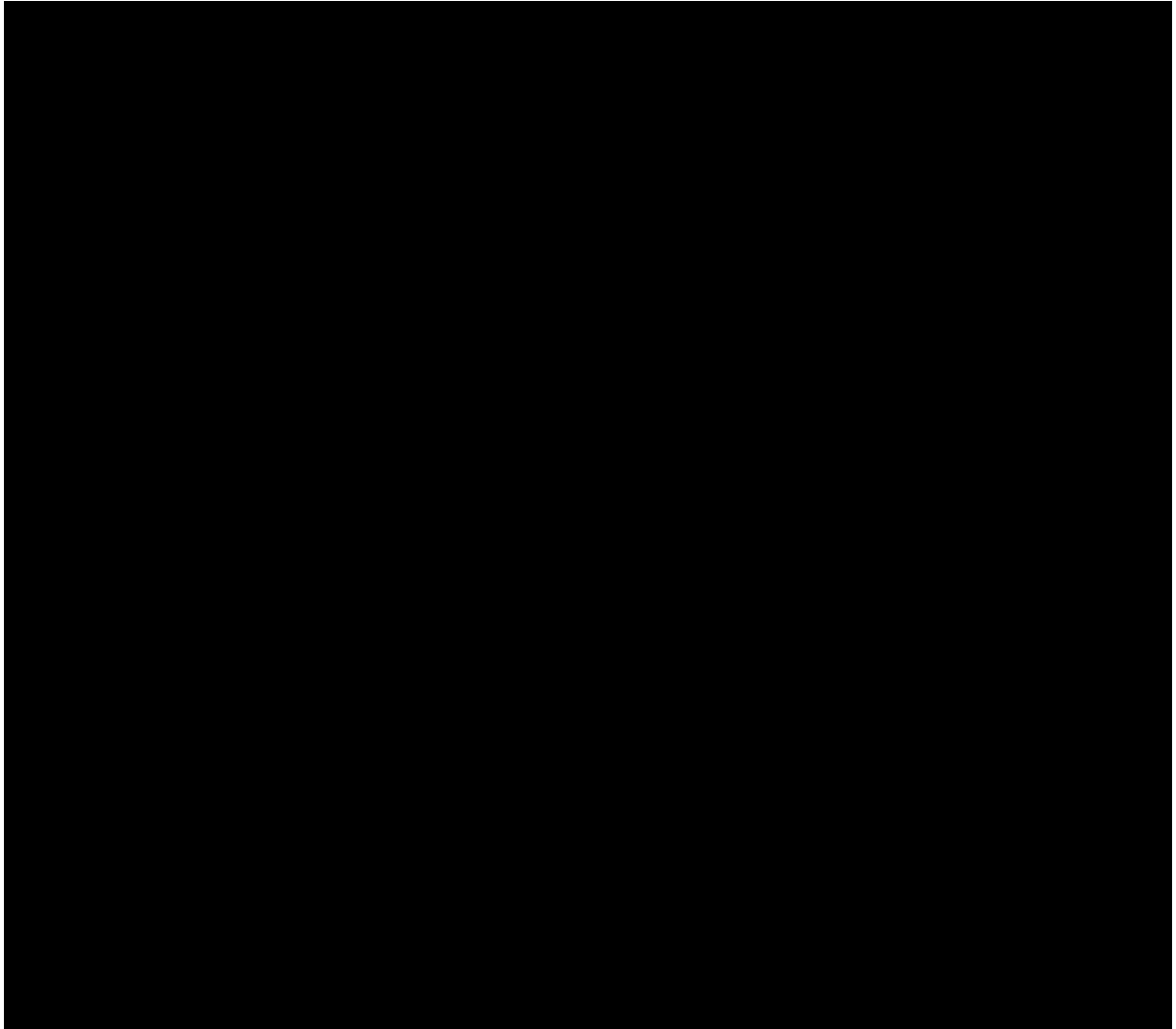
As proteínas totais (15 μg de proteína) foram aplicadas no gel de poliacrilamida de 12% (acrilamida 30%, bis-acrilamida 1,6%, APS 10%, TEMED, SDS 0,4 %, Tris 1,5

M) juntamente com o padrão de peso molecular para proteínas de 12/250 KDA (GE-Healthcare Life Sciences®) e submetidas à eletroforese SDS-PAGE em cuba de eletroforese (HoeferMiGOtySmall®).

Após a separação das proteínas de acordo com seu peso molecular, estas foram transferidas para uma membrana PVDF (Hybond-P, Amersham Pharmacia Biotech®), utilizando o sistema semi-dry (Bio-RAD®, EUA). Posteriormente, as membranas foram incubadas em solução de bloqueio Tween-TBS (NaCl 0,5M, Tris-HCl 20mM, pH 7,5, Tween-20 0,05%) contendo 5% de leite desnatado e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários específicos, overnight a 4°C (quadro 1). Após as lavagens com T-TBS, as membranas foram incubadas com os anticorpos secundários biotinilados específicos, seguido de estreptavidina-peroxidase (HRP) (Invitrogen), ambos por 1h. As diluições utilizadas estão descritas no quadro abaixo (quadro 1).

As membranas foram novamente lavadas em T-TBS e as bandas imunomarcadas foram reveladas utilizando um kit de ECL PLUS (AmershamBiosciences). A quimioluminescência foi detectada pelo sistema ChemiDoc MP (BioRad). As bandas obtidas foram quantificadas por densitometria, seguida de correção pelo controle endógeno (Actina), utilizando o software PhotoShop.

Quadro 1: Concentração dos anticorpos primários e secundários utilizados para western blotting.



Fonte: ANDRADE,2018.

7.11. Citometria de fluxo

Um fragmento de 250 µg do coração foi dissociado mecanicamente com auxílio de um bisturi, no fluxo laminar. Em seguida, foi incubado em solução contendo 5 ml de EGTA e 5 ml de colagenase, a 37°C em placa agitadora aquecida por 5 minutos. Após,

o sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon e o volume foi ajustado em 15 ml, em meio de cultura DMEM gelado, pH 7,4. A amostra foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e o pellet ressuspendido em 2 ml de PBS gelado. Em seguida, a amostra foi filtrada em cell strainer (Corning) em tubos de 50 ml, centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos e o pellet ressuspendido em PBS. Foram realizadas análises fenotípicas e quantificação de células-tronco cardíacas residentes (c-kit⁺ CD45⁻) e células progenitoras endotéliais (CD133⁺). Para isso, a suspensão de células foi alíquotada em eppendorf (20 µl por tubo, contendo 1X10⁶ células) e incubadas com 1µl de anticorpos primários conjugados: anti-ckit (APC, abcam), anti-CD45 (FITC, BD Biociences) e anti-CD133 (AlexaFluor 555), por 30 minutos a 4 °C. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada, lavada com PBS e um volume final de 300 µl foi utilizado na leitura no citômetro BD Accuri.

7.12. Análises estatísticas

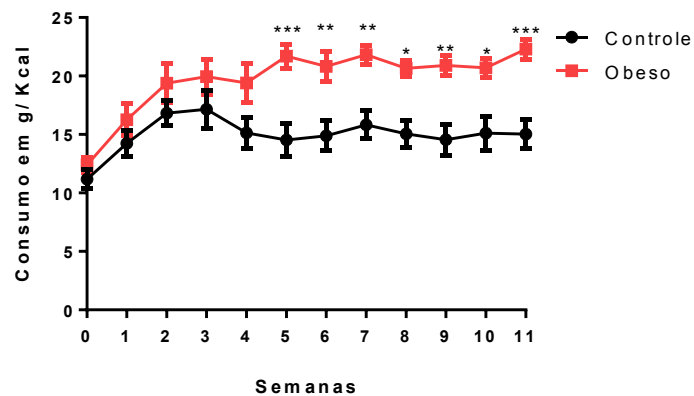
Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelos testes de One – way ANOVA ou Two - way ANOVA seguido de pós-teste de Holm–Sidak usando nível de significância de $p < 0,05$.

8. RESULTADOS

8.1. Consumo alimentar

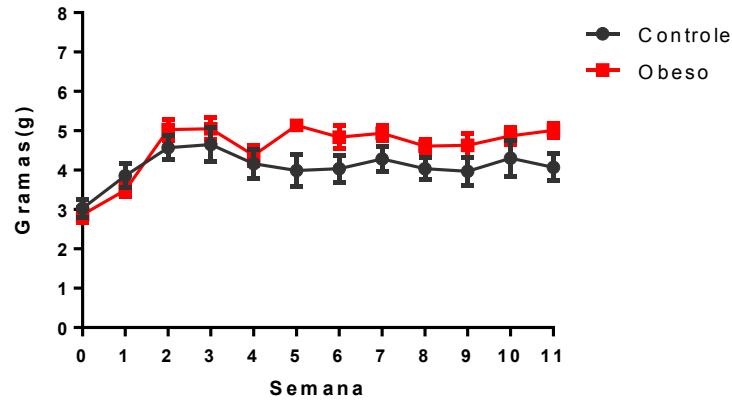
O consumo calórico (Kcal) apresentou-se significativamente maior a partir da 5ª semana de dieta ($p < 0,0001$) no grupo que recebeu dieta ocidental (GO) (Gráfico 3). Entretanto, não houve variação no consumo de ração em gramas entre os grupos (GC e GO), durante todo o período de dieta (Gráfico 4).

Gráfico 3: Evolução consumo calórico (Kcal) de camundongos *Swiss* submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO) ($p < 0,0001$).



Fonte: ANDRADE,2018.

Gráfico 4: Evolução consumo em gramas de ração de camundongos *Swiss* submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO) ($p < 0,0001$).

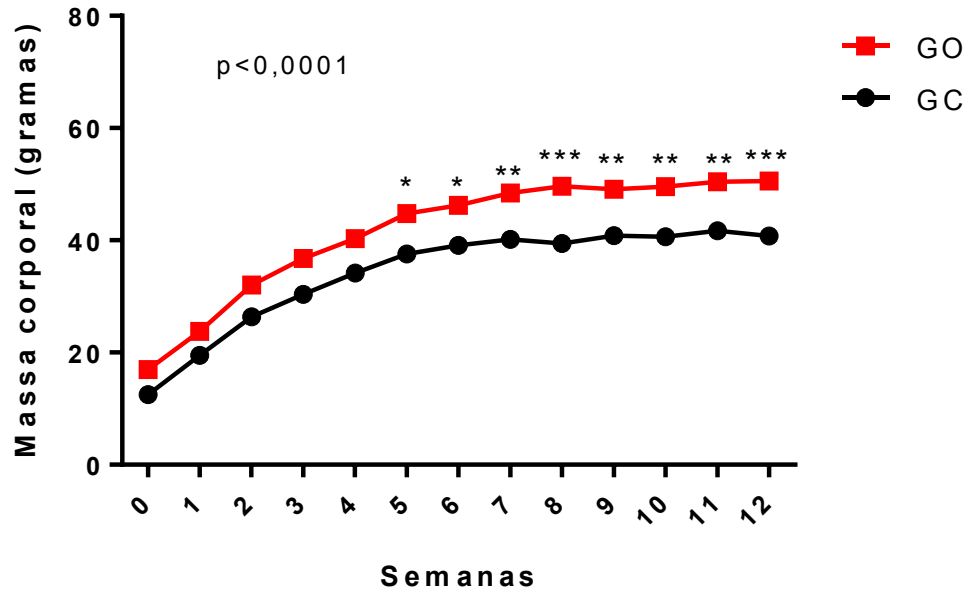


Fonte: ANDRADE, 2018.

8.2. Parâmetros biométricos

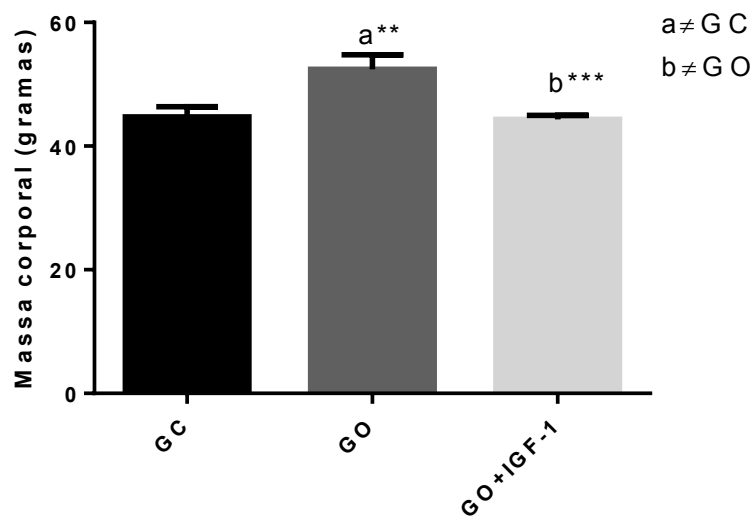
Os grupos experimentais apresentaram diferença significativa nos parâmetros biométricos analisados (Tabela 1). O GO apresentou aumento significativo da massa corporal a partir da 5ª semana de dieta, comparado ao GC, o que se observou até o final do experimento (Gráficos 5 e 6) ($p < 0,0001$). Entretanto, após o tratamento com IGF-1, o GO+IGF-1 ($44,33 \pm 0,65$) apresentou redução significativa da massa corporal em relação ao grupo GO ($52,4 \pm 6,23$), alcançando valores semelhantes ao GC ($44,72 \pm 1,64$) (Gráfico 6).

Gráfico 5: Evolução da massa corporal de camundongos *Swiss* submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO).



Fonte: ANDRADE,2018.

Gráfico 6: Massa corporal final. Massa corporal dos grupos tratados e não tratados com IGF-1.



Fonte: ANDRADE, 2018.

O GO+IGF-1 também apresentou redução significativa do índice de Lee, da gordura epididimal, da gordura retroperitoneal e da glicemia em jejum quando comparado com o grupo GO, restaurando valores próximos ao GC, com exceção da glicemia em jejum. Não houve diferença significativa do comprimento naso-anal nos grupos analisados. (Tabela 2).

Tabela 2: Massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, glicemia em jejum, gordura epididimal e gordura retroperitoneal de camundongos tratados e não tratados com IGF-1.

	GC	GO	GO+IGF-1
Peso corporal	44,7±1,6	52,4± 2,3^{a**}	44,3±0,6^{b***}
Comprimento Naso-anal (cm)	8,9±0,2	9,4±0,1	9,3±0,1
Índice de Lee	346,5±4,48	419,5±3,53^{a*}	318,6±13,53^{b****}
Glicemia em jejum	102,8±9,4	175,0±5,3^{a****}	139,8±9,4^{a*, b****}
Gordura Epididimal (g)	0,82±0,1	2,24±0,3^{a****}	1,32±0,1^{b**}
Gordura Retroperitoneal (g)	0,30±0,06	0,91±0,12^{a****}	0,52±0,06^{b**}

Nota: Sendo “a” diferente de GC e “b” diferente de GO.

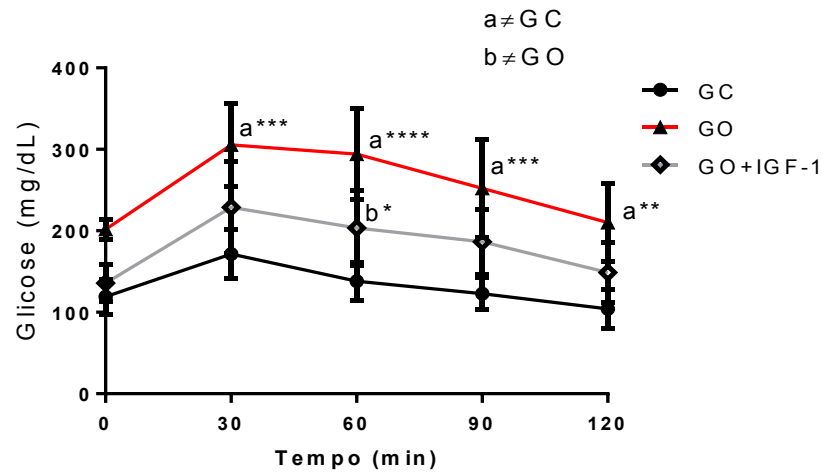
Fonte: ANDRADE,2018.

8.3. Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

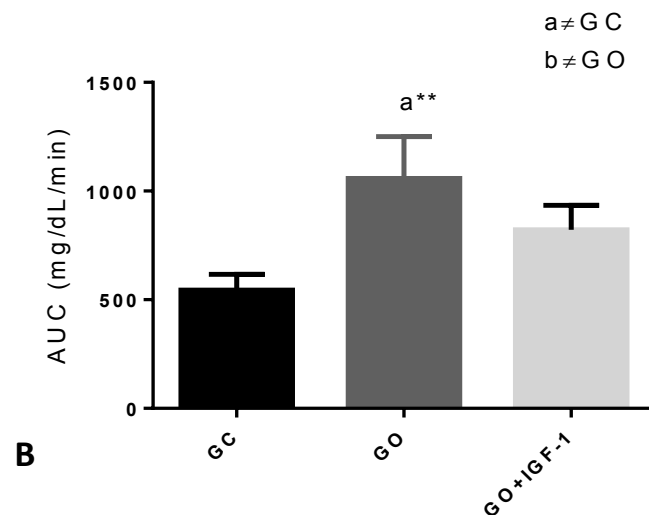
O GO apresentou intolerância à glicose quando comparado ao GC nos tempos analisados de 30, 60 e 90 minutos. Já o GO+IGF-1, apresentou melhora da tolerância à glicose aos 60 minutos (gráfico 7A), comparado ao GO. O gráfico da área sob a curva indicou redução significativa da tolerância à glicose no GO (1058±192,8) em relação ao GC (544±45,84) e consequente melhora no GO+IGF-1

($821,7 \pm 45,84$), embora esse último dado não tenha apresentado diferença estatística (gráfico 7B).

Gráfico 7: Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (A) e Área sob a curva (B).



A



B

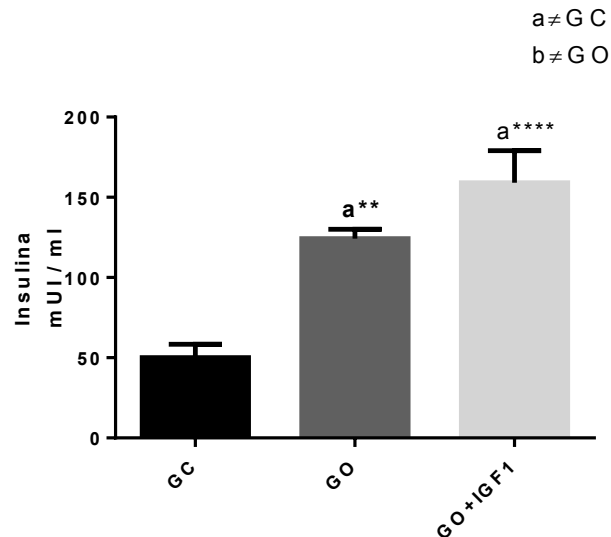
Fonte :ANDRADE, 2018.

8.4. Dosagem de insulina e Homa IR

O GO ($124,3 \pm 5,7$) apresentou aumento significativo do nível de insulina plasmática quando comparado ao GC ($50 \pm 8,4$), mantendo-se elevado após o tratamento com IGF-1 ($159,2 \pm 19,2$) (Gráfico 8). O mesmo foi observado para o índice

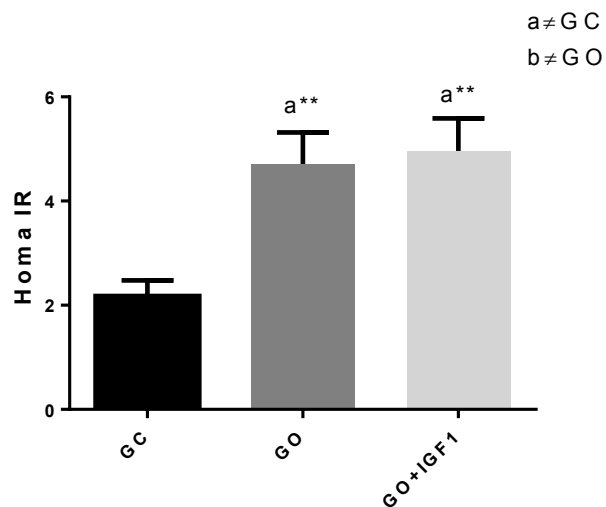
de Homa IR, aumentado no GO ($4,71\pm 0,6$) em relação ao GC ($2,18\pm 0,3$) e sem redução no GO+IGF-1 ($4,96\pm 0,62$) (Gráfico 9).

Gráfico 8: Dosagem de Insulina. Insulina plasmática dos animais dos GC, GO e GO+IGF-1.



Fonte: ANDRADE, 2018.

Gráfico 9: Índice de Homa IR. Homa IR dos animais GC, GO e GO+IGF-1.

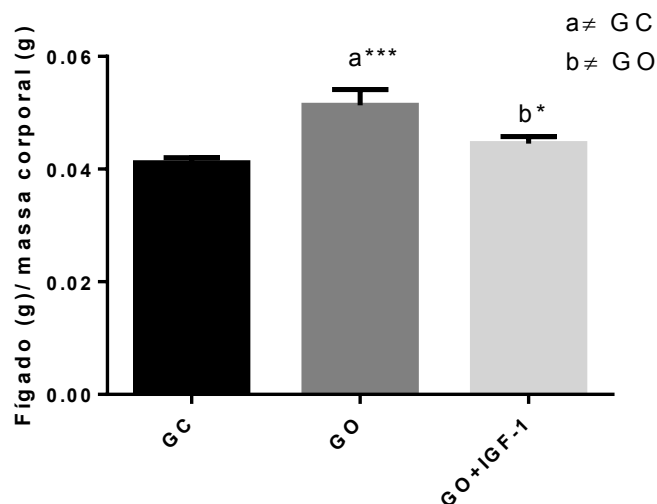


Fonte: ANDRADE, 2018.

8.5. Análise de esteatose hepática

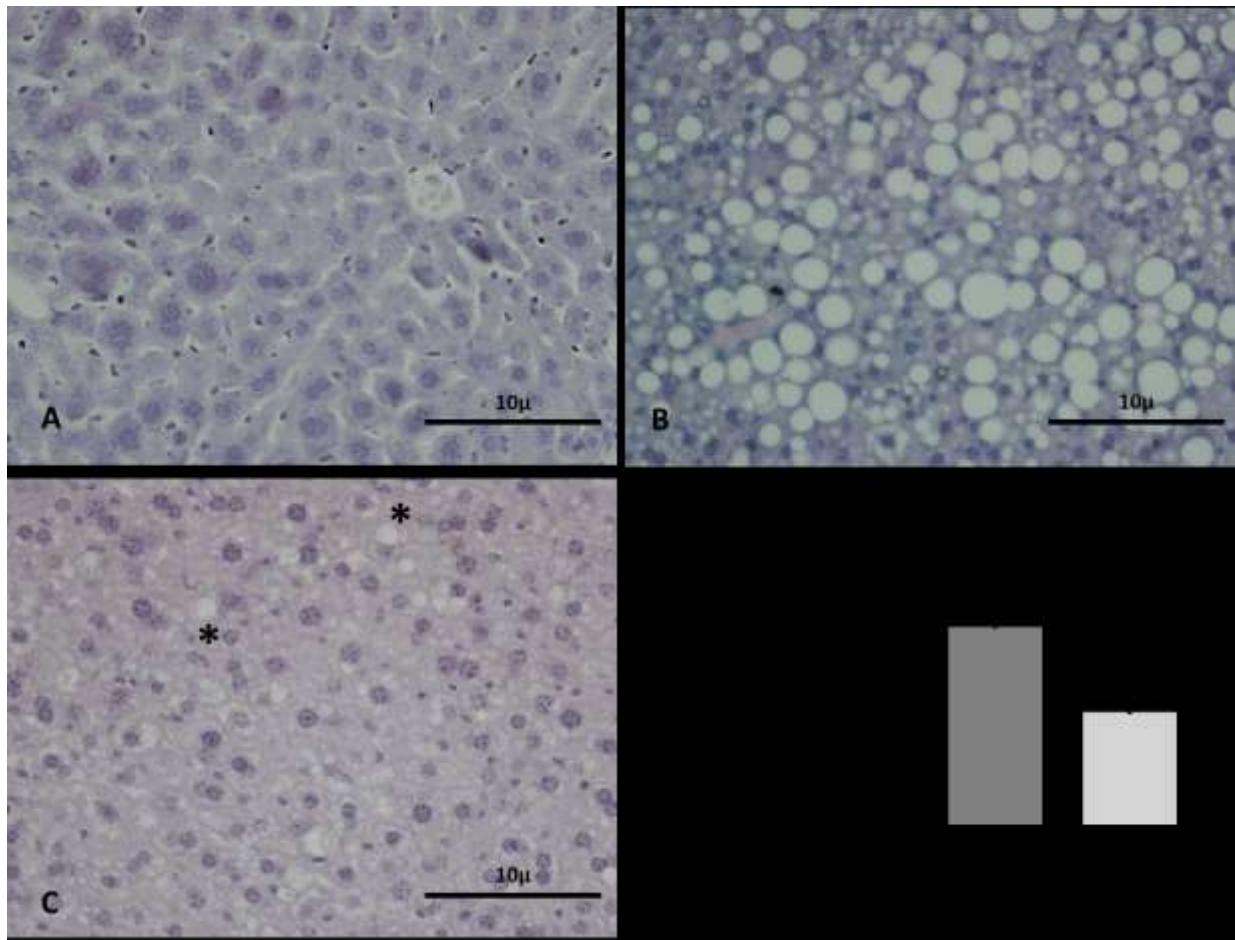
O GO ($0,051 \pm 0,0028$) apresentou aumento significativo da estimativa da esteatose hepática, mensurada pela correção do peso do fígado (g) pela massa corporal (g), quando relacionado com o GC ($0,041 \pm 0,00094$). Após o tratamento com IGF-1, o GO+IGF-1 ($0,044 \pm 0,0012$) apresentou redução significativa da esteatose hepática em relação ao grupo GO (Gráfico 10). Esse resultado foi confirmado pela quantificação das gotículas de gordura, no qual o GO ($1097 \pm 135,5$) apresentou aumento significativo das gotículas de gordura por área em relação com GC ($321,9 \pm 80,75$). O GO+IGF-1 ($621,3 \pm 53,32$) apresentou redução significativa da esteatose hepática (Figura 10D).

Gráfico 10: Estimativa da esteatose hepática obtida pela razão do peso do fígado pela massa corporal.



Fonte: ANDRADE, 2018.

Figura 10: Análise qualitativa e quantitativa da esteatose hepática.



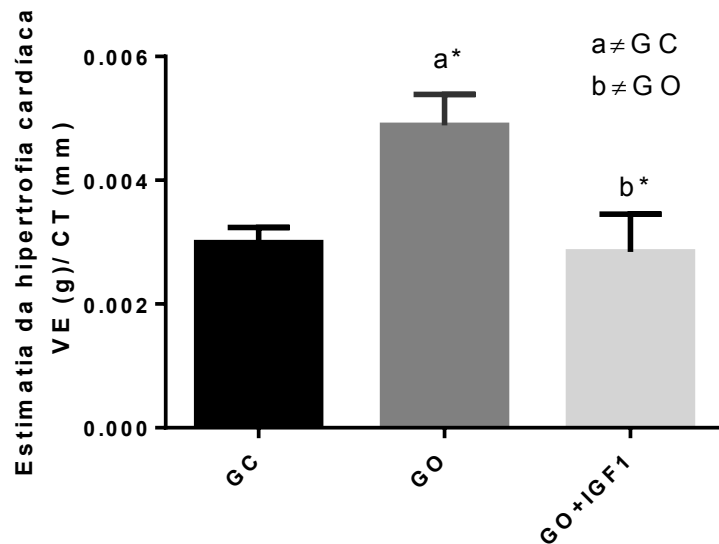
Nota: Fotomicrografia de fígado corado com hematoxilina e eosina (40X) (A- C). A - Grupo controle - parênquima hepático preservado; B - Grupo obeso - regiões com acúmulo de gotículas de gordura (esteatose); C - Grupo obeso + IGF-1 - regiões com microgotículas de gordura representadas por asterisco (microesteatose); D - Gráfico da quantificação das gotículas de lipídeo no parênquima hepático.

Fonte: ANDRADE,2018.

8.6. Estimativa de hipertrofia cardíaca

As análises das medidas do peso do ventrículo esquerdo (VE) e a sua razão com o valor correspondente ao comprimento da tíbia (CT) demonstraram aumento significativo de 100% no GO ($0,0049 \pm 0,0005$) em relação ao GC ($0,0029 \pm 0,0002$). Após o tratamento com IGF-1, houve redução significativa do GO+IGF-1 ($0,0028 \pm 0,0006$) em relação ao GO, alcançando valores iguais ao GC (Gráfico 11).

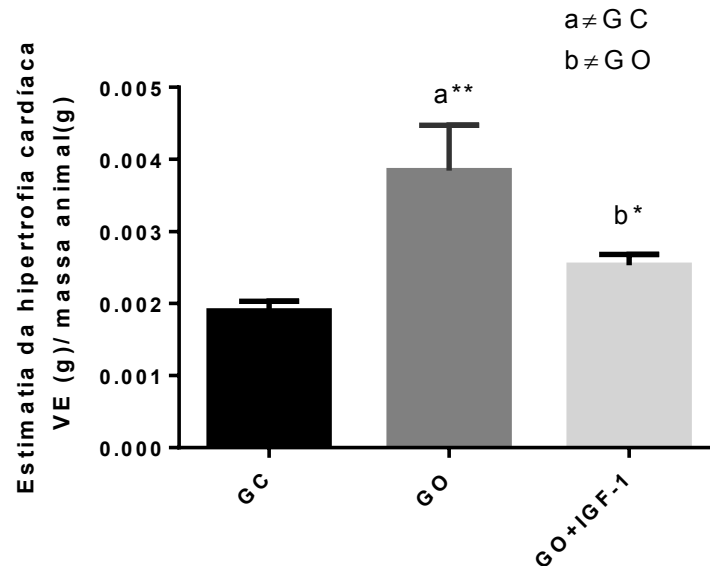
Gráfico 11: Estimativa da hipertrofia cardíaca mensurada através da razão entre o ventrículo esquerdo (VE) (g) e o comprimento da tíbia (mm) dos animais tratados e não tratados com IGF-1.



Fonte: ANDRADE, 2018.

A hipertrofia cardíaca também foi mensurada pela razão entre o ventrículo esquerdo (VE) (g) e a massa do animal (g). O GO ($0,0038 \pm 0,0006$) apresentou aumento significativo em relação ao GC ($0,0019 \pm 0,0001$). O tratamento com IGF-1 (GO+IGF-1) promoveu redução significativa da hipertrofia cardíaca ($0,0025 \pm 0,0001$) (Gráfico 12).

Gráfico 12: Estimativa da hipertrofia cardíaca mensurada através da razão entre massa do ventrículo esquerdo (VE) (g) e massa corporal (g) dos animais controle e obesos tratados e não tratados com IGF-1.

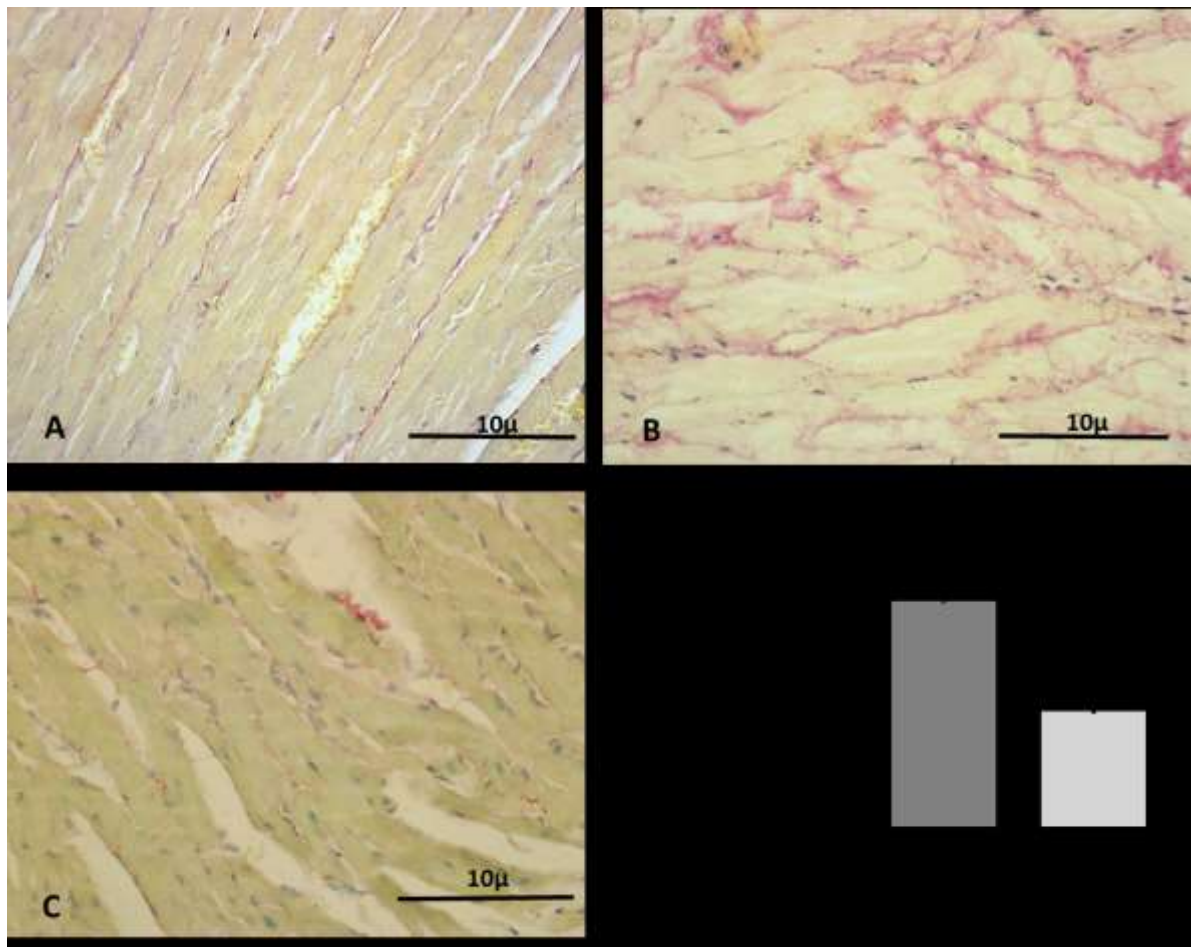


Fonte: ANDRADE, 2018.

8.7. Análise da fibrose cardíaca

A análise da área total de colágeno no coração realizado por coloração com Picro-Sirius Red demonstrou um aumento significativo de 158,6% da concentração de colágeno no GO ($3,00 \pm 0,19$) em relação ao GC ($1,16 \pm 0,09$). Em contrapartida, após o tratamento com IGF-1, ocorreu uma redução significativa de 51% da área de fibrose no GO+IGF-1 ($1,53 \pm 0,12$) comparado ao GO (Figura 11D).

Figura 11: Análise qualitativa e quantitativa da fibrose cardíaca.



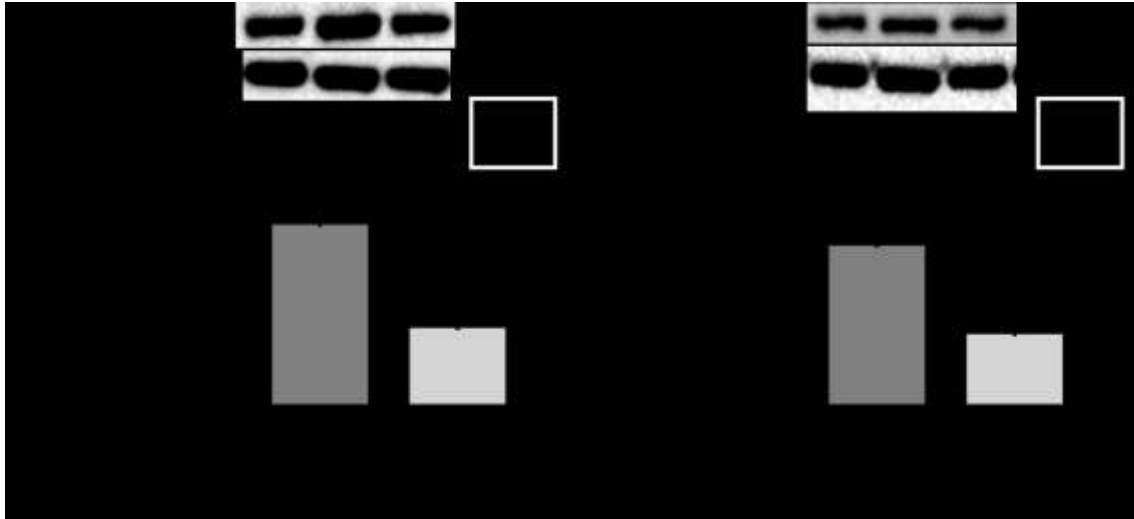
Nota: Fotomicrografia do coração dos grupos GC (A), GO (B) e GO+IGF-1 (C) corados com Picro-Sirius Red, que destaca a área de colágeno do total. Objetiva 40X. (D) Análise quantitativa da área corada com Picro-Sirius.

Fonte: ANDRADE, 2018.

Esse resultado foi corroborado pela análise do conteúdo de colágeno I e III por western blotting (Figura 12). Em relação ao conteúdo de colágeno I (Figura 12A), o GO ($0,97 \pm 0,15$) apresentou aumento significativo de 162,2% em relação ao GC ($0,37 \pm 0,06$), enquanto que após o tratamento com IGF-1, o GO+IGF-1 apresentou redução de 136,6% desta proteína ($0,41 \pm 0,08$) comparado ao GO.

O resultado foi observado para o conteúdo de colágeno III (figura 12B), que demonstrou aumento significativo de 160,6% no GO ($0,86 \pm 0,13$) em relação ao GC ($0,33 \pm 0,06$) e redução de 126,3% após do tratamento com IGF-1 no GO +IGF-1 ($0,38 \pm 0,1$).

Figura 12: Quantificação do conteúdo das proteínas colágeno I e III por western blotting.

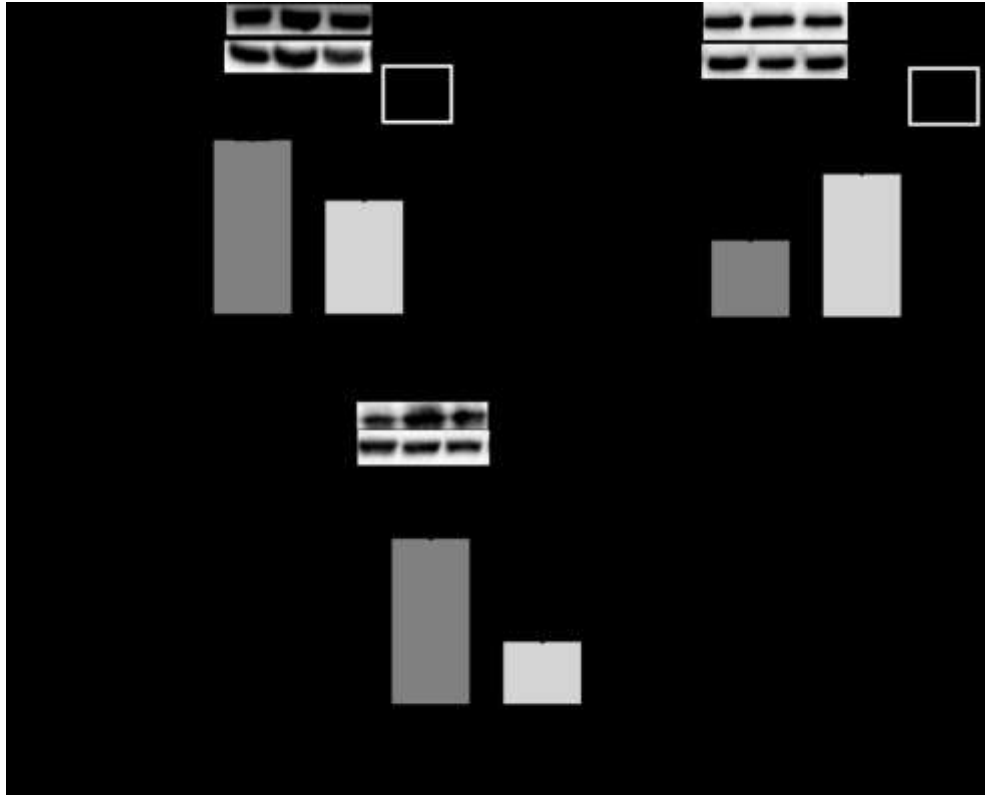


Nota: (A) Análise da expressão de colágeno I. (B) Análise da expressão de colágeno III.
Fonte: ANDRADE, 2018.

8.8. Análise das MMP-9, MMP-13 e TIMP-1

A análise da MMP-9 demonstrou aumento significativo no GO ($1,16 \pm 0,01$) de 56,7% em relação ao grupo GC ($0,74 \pm 0,04$). Após o tratamento com IGF-1, houve redução significativa de 54,7% no conteúdo de MMP-9 no GO+IGF-1 ($0,75 \pm 0,06$) comparado ao GO, restaurando os níveis do GC (Figura 13A). Nossos dados demonstram redução significativa de 77,2% da MMP-13 no GO ($0,68 \pm 0,07$) em relação ao GC ($1,27 \pm 0,14$). O tratamento com IGF-1 restaurou os níveis de MMP-13 no GO+IGF-1 ($1,27 \pm 0,19$) à valores iguais ao do GC, quando comparado com o GO (Figura 13B). Já a análise do conteúdo de TIMP-1 revelou aumento significativo de 340% no GO ($1,10 \pm 0,23$) em relação ao GC ($0,25 \pm 0,07$). O tratamento com IGF-1 (GO+IGF-1) promoveu uma redução estatística de 168,3% no conteúdo de TIMP-1 ($0,41 \pm 0,08$) comparado ao GO (Figura 13C).

Figura 13: Quantificação do conteúdo das metaloproteinases 9 ,13 e o inibidor específico de metaloproteinase 1 por western blotting.



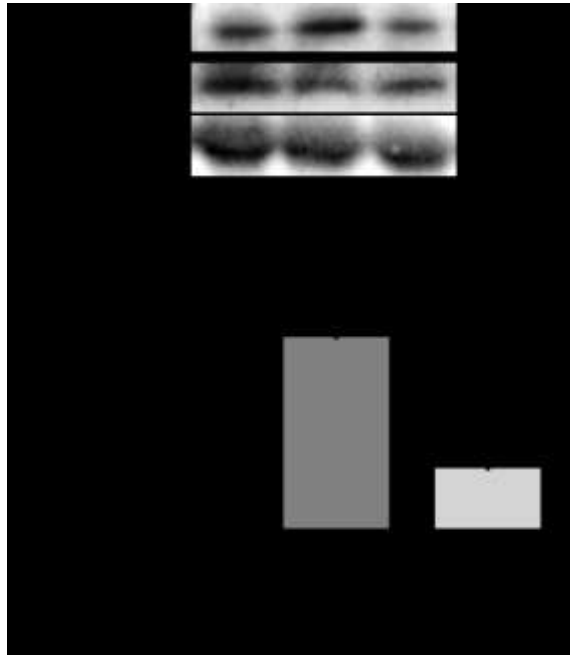
Nota: (A) Análise do conteúdo de MMP-9. (B) Análise do conteúdo de MMP-13. (C) Análise do conteúdo de TIMP-1.

Fonte: ANDRADE, 2018.

8.9. Análise da apoptose

A razão entre o conteúdo das proteínas Bax e Bcl2 revelou aumento significativo de 260% nos níveis de apoptose no GO ($1,26 \pm 0,2$) quando comparado com o GC ($0,35 \pm 0,07$). O GO+IGF-1 apresentou uma redução significativa de 223,1% desse parâmetro ($0,39 \pm 0,1$) comparado ao GO, assemelhando-se ao GC (Figura 14).

Figura 14: Quantificação da apoptose no coração de camundongos.

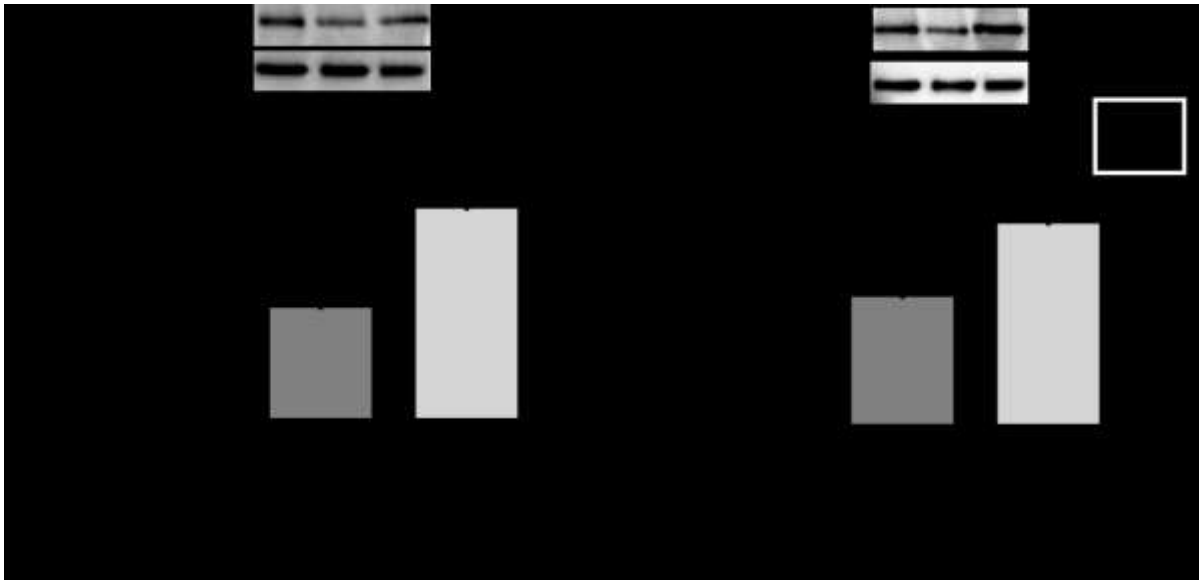


Nota: Análise da apoptose pela razão do conteúdo de Bax e Bcl2.
Fonte: ANDRADE, 2018.

8.10. Análise do conteúdo de Conexina 43 e SERCA-2

A análise do conteúdo de SERCA-2 no coração do GO ($0,18 \pm 0,01$) demonstrou uma redução significativa de 94,4% dessa proteína quando comparado com o GC ($0,35 \pm 0,04$). O tratamento com IGF-1 promoveu aumento significativo do conteúdo dessa proteína ($0,35 \pm 0,05$), restaurando os valores do GC (figura 15- A). O mesmo foi observado para o conteúdo de conexina 43, que também apresentou redução significativa de 37,2% no GO ($0,86 \pm 0,04$) em relação ao GC ($1,18 \pm 0,06$), com restauração dos valores no GO+IGF-1 ($1,36 \pm 0,08$) (Figura 15- B).

Figura 15: Quantificação do conteúdo SERCA-2 e Conexina 43.



Nota: (A) Análise do conteúdo de SERCA-2 (B) Análise do conteúdo de Conexina 43.
 Fonte: ANDRADE, 2018.

8.11. Respiração mitocondrial

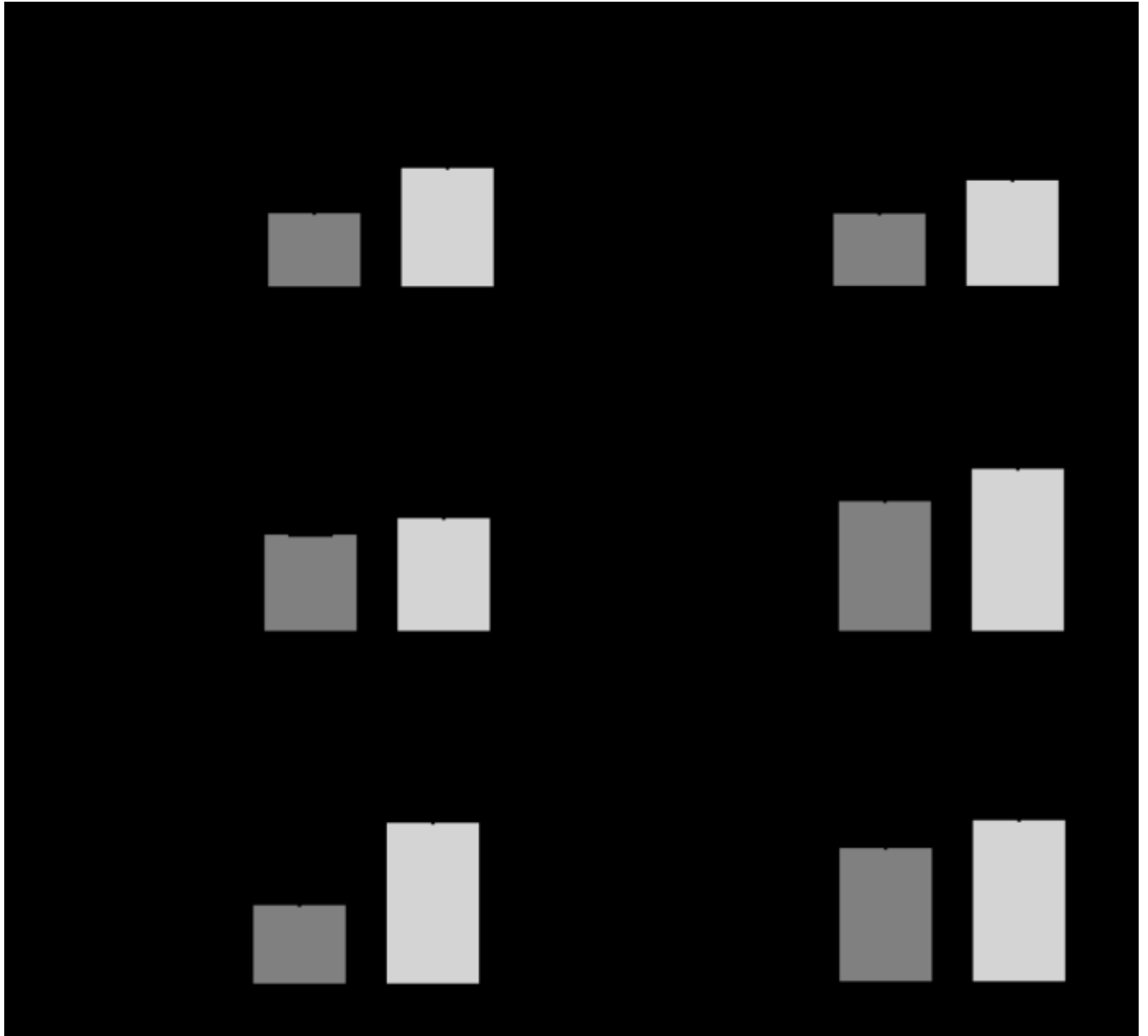
O GO apresentou disfunção mitocondrial, com redução significativa na taxa máxima de respiração estimulada por ADP (estado3), indicando redução na capacidade de oxidação de carboidratos ($129,0 \pm 13,91$) (Figura 16A) e de ácidos graxos ($47,98 \pm 2,79$) (Figura 16B) em relação ao GC ($313,3 \pm 18,76$ e $91,32 \pm 9,05$, respectivamente). Após o tratamento com IGF-1, o GO+IGF-1 ($209,1 \pm 26,26$ e $70,11 \pm 3,14$, respectivamente) demonstrou aumento significativo desta taxa na oxidação de ambos os substratos.

Além disso, constatamos desacoplamento mitocondrial, através da razão do controle respiratório (RCR), expressa pela razão do estado 3 pelo estado 4. A RCR obtida na oxidação de carboidratos e ácidos graxos demonstrou redução significativa do GO ($1,06 \pm 0,01$ e $1,43 \pm 0,06$, respectivamente) em relação ao GC ($2,14 \pm 0,08$ e $2,13 \pm 0,15$, respectivamente), indicando desacoplamento mitocondrial. Após o tratamento com IGF-1, houve aumento significativo do RCR na oxidação de carboidratos no GO+IGF-1 ($1,24 \pm 0,04$) em relação ao GO, porém, sem diferença

estatística do RCR na oxidação de ácidos graxos entre estes dois grupos ($1,79 \pm 0,15$) (Figura 16 C e D).

Mensuramos, também, o aceptor do controle respiratório (ACR), que reflete a quantidade máxima de ATP sintetizada após o fornecimento de substrato (ADP) por meio da razão entre o estado 3 e o estado 2. Nossos resultados demonstraram redução significativa do ACR do GO ($3,45 \pm 0,25$) em relação ao GC ($8,73 \pm 0,69$) na oxidação de carboidratos. Após o tratamento com IGF-1, houve aumento significativo ($7,09 \pm 0,63$). Na oxidação de lipídeos, o ACR do GO ($1,17 \pm 0,04$) também estava reduzido significativamente em relação ao GC ($1,64 \pm 0,03$), enquanto que o tratamento com IGF-1 ($1,42 \pm 0,07$) também foi capaz de restaurar esse parâmetro (figura 16 E e F).

Figura 16: Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas dos animais controle e obeso tratados e não tratados do IGF-1, submetidos aos substratos relacionados à oxidação de carboidratos e ácidos graxos.



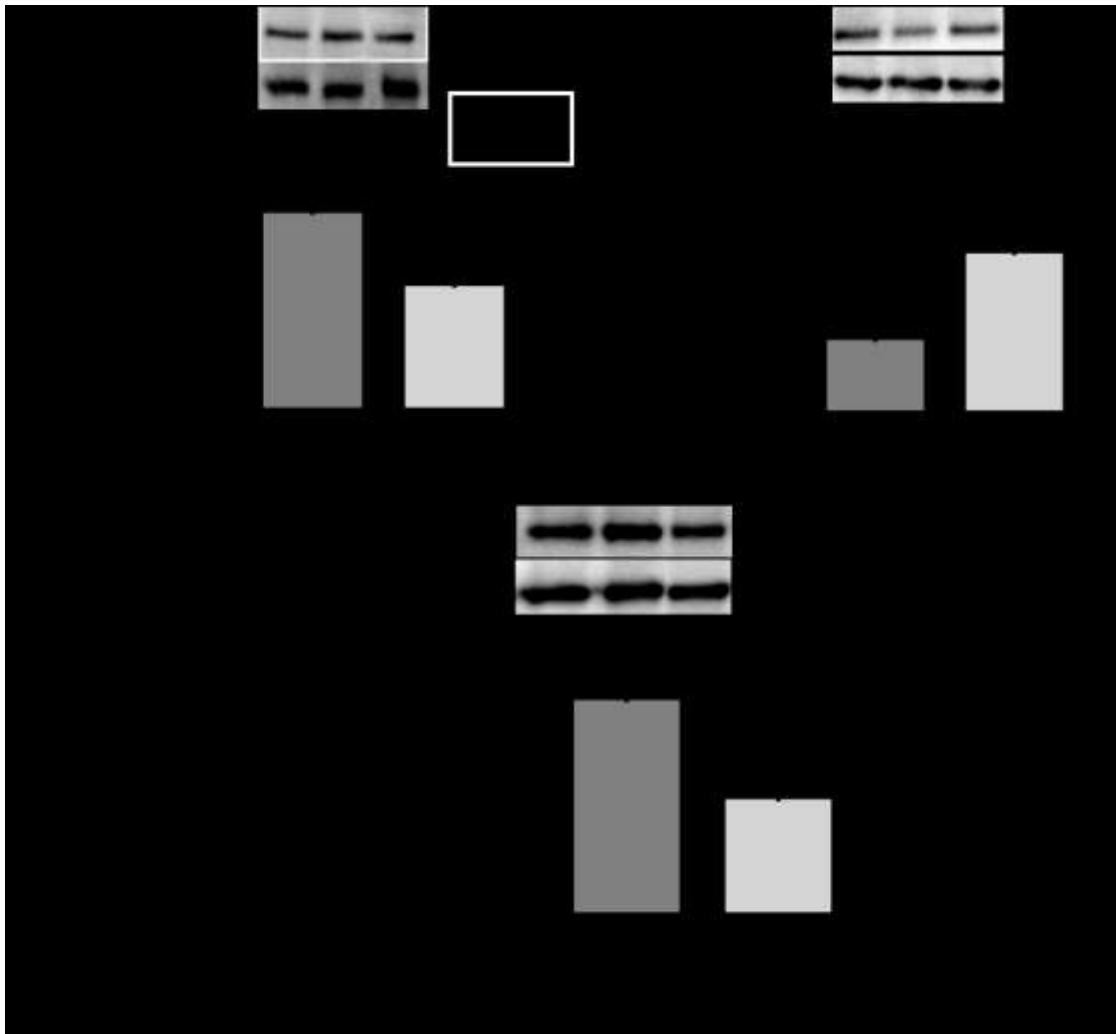
Nota: (A) Taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3) na oxidação de carboidratos. (B) Taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3) na oxidação de ácidos graxos. (C) Razão do controle respiratório (estado 3/estado 4) na oxidação de carboidratos. (D) Razão do controle respiratório (estado 3/estado 4) na oxidação de ácidos graxos. (E) Aceptor do controle respiratório (estado 3/estado 2) na oxidação de carboidratos. (F) Aceptor do controle respiratório (estado 3/estado 2) na oxidação de ácidos graxos.

Fonte: ANDRADE, 2018.

8.12. Análise do conteúdo de UCP-2, CPT-1 e PGC-1 α .

Os conteúdos de UCP-2 e CPT-1 estavam elevados significativamente no GO ($1,3\pm 0,06$; $1,39\pm 0,23$, respectivamente) comparado ao GC ($0,73\pm 0,14$; $0,33\pm 0,02$), com redução significativa no GO+IGF-1 ($0,85\pm 0,15$; $0,74\pm 0,05$) comparado ao GO (Figura 17A e C). O inverso foi observado para conteúdo de PGC-1 α . O GO apresentou redução significativa ($0,37\pm 0,03$) em relação ao GC ($1,03\pm 0,02$). Após o tratamento com IGF-1 (GO+IGF-1), houve elevação significativa do PGC-1 α ($0,84\pm 0,01$) (Figura 17B).

Figura 17: Quantificação do conteúdo UCP-2, PGC-1 α e CPT-1.



Nota: (A) Análise do conteúdo de UCP-2; (B) Análise do conteúdo de PGC-1 α ; e (C) Análise do conteúdo de CPT-1.

Fonte: ANDRADE, 2018.

8.13. Análise das células-tronco cardíacas residentes e células progenitoras endoteliais

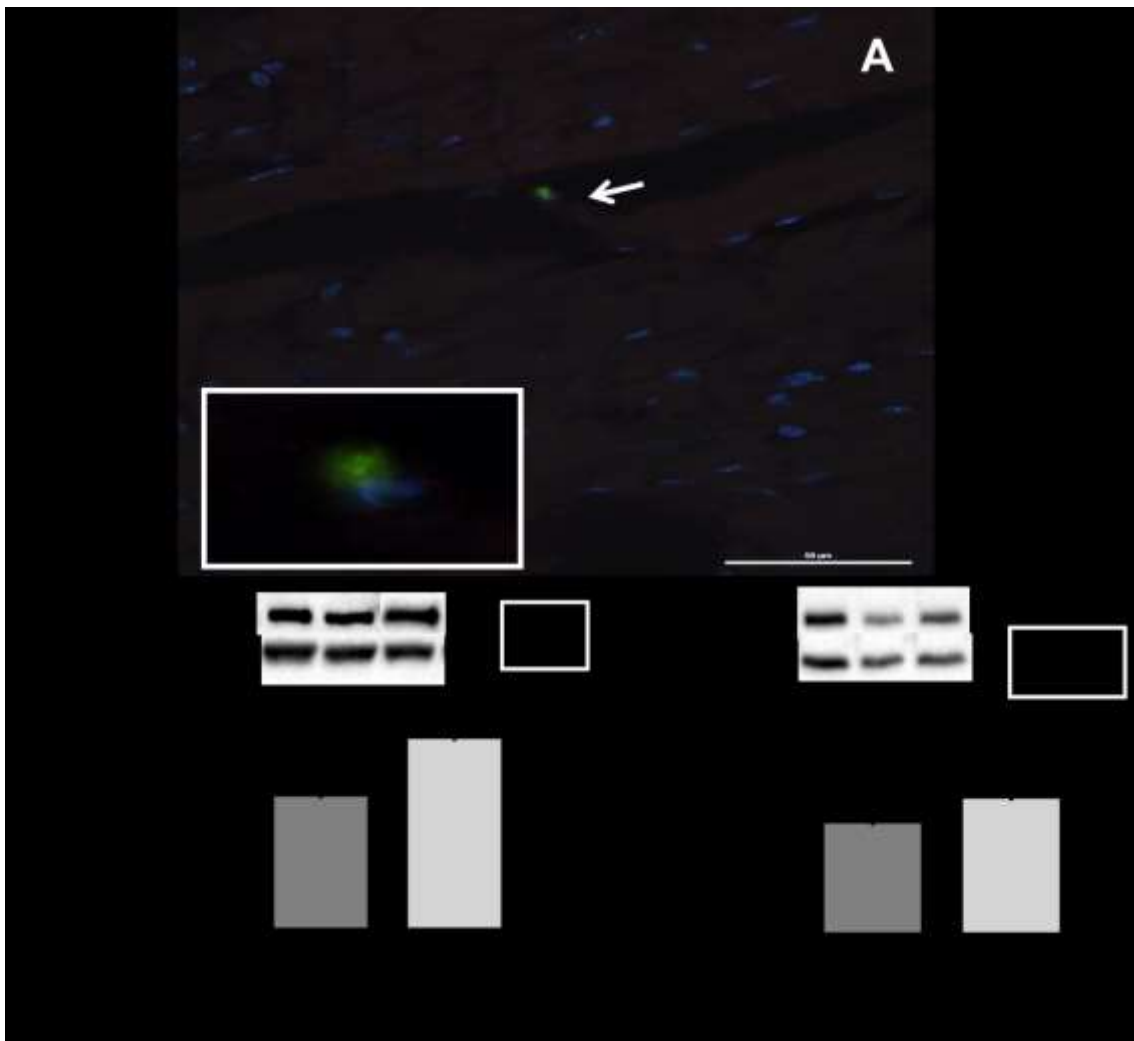
Para identificação e localização das células-tronco cardíacas residentes (CTC) (c-Kit⁺/CD45⁻) foi realizada imunomarcagem para c-kit (em verde), CD45 (em vermelho), e os núcleos foram corados em azul por DAPI. As imagens foram observadas em microscopia confocal. Assim, a CTC, marcada em verde (c-kit), foi observada por

microscopia confocal entre os cardiomiócitos (seta), objetiva de 60X. No inset, a CTC pode ser observada em maior aumento (objetiva de 100X). Não houve imunomarcacão correspondente ao CD45 (vermelho) (Figura 18 A).

A análise por western blotting das CTC (c-kit⁺) demonstrou uma redução significativa de 48,7% do conteúdo de c-kit no GO ($0,78 \pm 0,04$) em relação ao GC ($1,16 \pm 0,05$). Após o tratamento com IGF-1, o conteúdo desse marcador apresentou aumento significativo de 44,9% no GO+IGF-1 ($1,13 \pm 0,07$) em relação ao GO, alcançando valores próximos ao GC (Figura 18 B).

Em relação ao conteúdo de CD133, o GO ($0,62 \pm 0,06$) apresentou redução significativa de 67,7% desse marcador de células progenitoras endoteliais em relação ao GC ($1,04 \pm 0,09$). Entretanto, após o tratamento com IGF-1, houve um aumento discreto, sem diferença significativa desse marcador no GO+IGF-1 ($0,81 \pm 0,06$) (Figura 18 C).

Figura 18: Análise do conteúdo de células-tronco cardíacas e células progenitoras endoteliais.



Nota: (A) Microscopia confocal do coração imunomarcado com anticorpos anti-c-Kit (verde) e anti-CD45 (vermelho). Observa-se a presença de uma célula c-Kit+CD45- (seta), caracterizada como CTC. Os núcleos celulares apresentam-se corados em azul pelo DAPI; objetiva 60x. Inset demonstrando a célula em maior aumento, objetiva 100x. Análise por Western blotting do conteúdo total de c-kit (B) e CD133 (C).

Fonte: ANDRADE, 2018.

A análise quantitativa das células-tronco cardíacas residentes por citometria de fluxo

indicou que houve redução significativa de 412,8% no GO ($0,39 \pm 0,09$) em relação ao GC ($2,00 \pm 0,06$) e que, após o tratamento com IGF-1, o GO+IGF-1 ($0,67 \pm 0,05$) apresentou aumento significativo de 71,8% das células c-Kit⁺ CD45⁻ em relação ao GO (Figura 19A).

Houve redução de 73,7% das células progenitoras endoteliais no GO ($1,56 \pm 0,14$) quando comparado com o GC ($2,71 \pm 0,26$) e o tratamento com IGF-1 foi capaz de aumentar significativamente em 63,5% o número destas células no GO+IGF-1 ($2,55 \pm 0,12$) (Figura 19B).

Figura 19: Análise por citometria de fluxo do conteúdo total de c-kit (A) e CD133 (B).

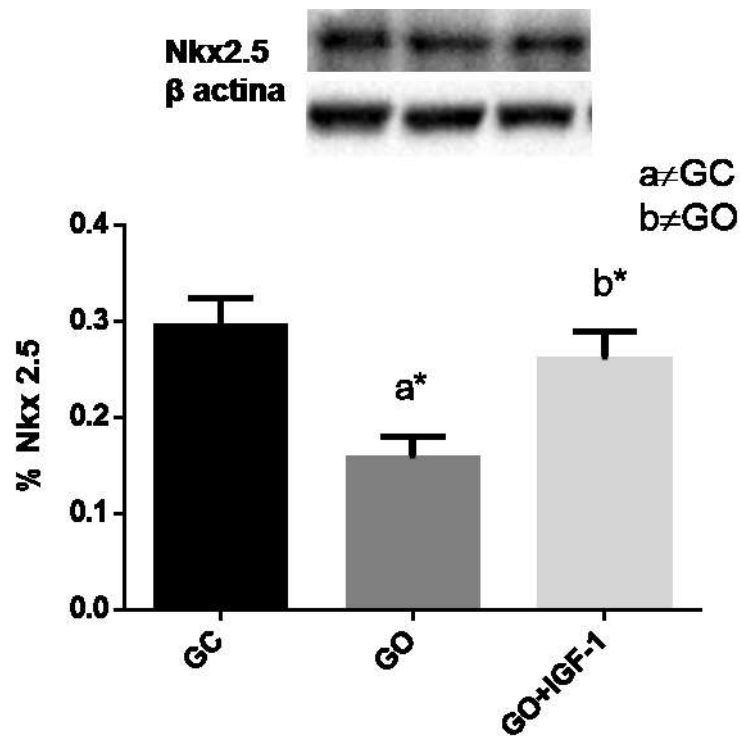


Fonte: ANDRADE, 2018.

8.14. Análise das células progenitoras cardíacas

O conteúdo de Nkx 2.5 no coração do GO ($0,15 \pm 0,02$) revelou-se estatisticamente reduzido em comparação com o GC ($0,29 \pm 0,02$). Após a terapia com IGF-1, observou-se aumento significativo do conteúdo de Nkx 2.5 ($0,26 \pm 0,02$) (Figura 20).

Figura 20: Quantificação de células progenitoras cardíacas. Análise do conteúdo Nkx 2.5.

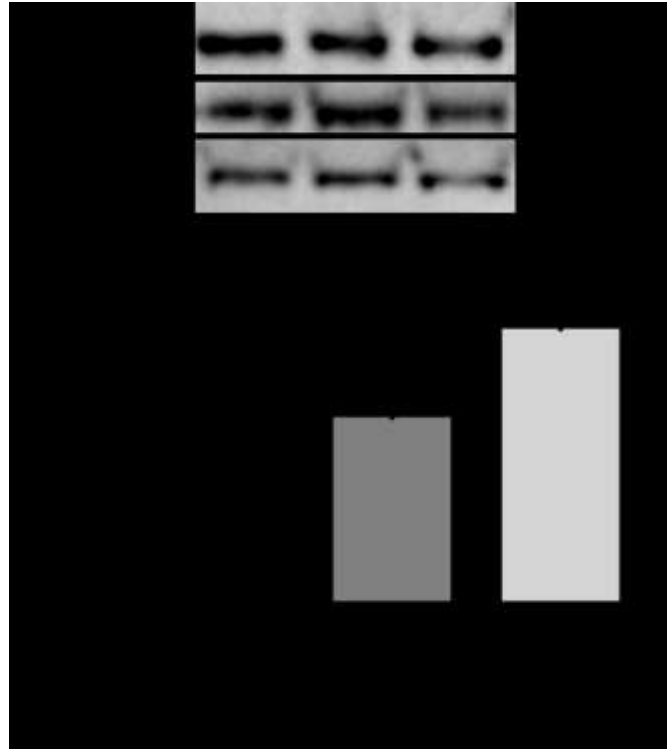


Fonte: ANDRADE, 2018.

8.15. Análise da razão de pAkt e Akt

A análise da razão entre pAKT e AKT apresentou-se significativa reduzida no GO ($0,32 \pm 0,02$) comparada com o GC ($0,49 \pm 0,05$). Após o tratamento com IGF-1, houve aumento significativo dessa razão ($0,48 \pm 0,04$) (figura 21).

Figura 21: Quantificação da ativação da via AKT no coração de camundongos.
Análise da razão do conteúdo de pAKT e AKT.



Fonte: ANDRADE, 2018.

DISCUSSÃO

O aumento do consumo de alimentos industrializados, ricos em carboidratos simples e gordura saturada – dieta ocidental - tem contribuído para o aumento dos índices de obesidade. No presente estudo, reproduzimos esse padrão alimentar, utilizando o modelo descrito por Tikellis *et al.* (2008) em camundongos *Swiss*, e já utilizado pelo nosso grupo há alguns anos (Neves *et al.* 2014, Oliveira *et al.*, 2014), a fim de testarmos nossa hipótese de que a cardiomiopatia desenvolvida na obesidade está relacionada com danos às CTC e que a terapia com IGF-1 poderia reverter esse processo.

Observamos um aumento do consumo calórico nos animais obesos, a partir da 5ª semana de administração da dieta ocidental, evento compatível com o desenvolvimento da obesidade (Fuster *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2016). Outros resultados corroboraram o caráter obesogênico da dieta ocidental, visto que sua administração por 12 semanas elevou significativamente a massa corporal dos animais do grupo obeso em relação ao grupo controle, assim como todos os outros parâmetros biométricos analisados, tais como, gordura epididimal e retroperitoneal e glicemia de jejum. Para melhor caracterização da obesidade do GO, foram analisados cortes histológicos do fígado e o depósito de gotículas lipídicas foi quantificado, revelando o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica nesse grupo. Estudos utilizando dieta hiperglicídica / hiperlipídica / dieta ocidental encontraram resultados similares (Oliveira *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2014; Haubert *et al.*, 2010; Vansaun *et al.*, 2009).

O tratamento com o IGF-1 promoveu a redução da massa corporal e dos outros parâmetros biométricos analisados, assim como da esteatose hepática em camundongos obesos, o que pode ser explicado, pois o IGF-1 ativa a via Akt produzindo efeitos anabólicos, promovendo o aumento da massa magra por meio da síntese de proteínas (Oliveira *et al.*, 2011). Ainda, segundo Bredella *et al.* (2011), esse fator de crescimento seria capaz de reduzir a massa gorda, incluindo a gordura visceral, pois promove o aumento da oxidação de lipídeos. Alguns ensaios clínicos também avaliaram a eficácia do uso de IGF-1 recombinante em pacientes obesos, devido a suas propriedades anteriormente descritas (Zhang *et al.*, 2012; Berryman *et al.*, 2013; Ren & Anversa, 2015). A redução dos parâmetros biométricos observados

no GO+IGF-1 pode ser associada com a regulação positiva da via AKT, identificada em nossos resultados por meio da análise da razão do conteúdo de pAKT/AKT.

Nossos resultados demonstraram que o GO apresentou intolerância à glicose, hiperinsulinemia e resistência à insulina, esse último indicado pelo cálculo do HOMA-IR que apresentou valor superior a 2,6. Esse estado é compatível com o encontrado em indivíduos obesos, pré-diabéticos e corroboram resultados já publicados pelo nosso grupo (Pouvreau *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2014; Neves *et al.*, 2014). O tratamento com IGF-1 foi capaz de reduzir significativamente a glicemia de jejum e a intolerância à glicose após 60 min de sobrecarga. Entretanto, o tratamento com IGF-1 não foi capaz reverter a intolerância à glicose nos demais tempos analisados, assim como não apresentou eficácia na redução da hiperinsulinemia e resistência à insulina.

O IGF-1 apresenta homologia de quase 50% da sua sequência de aminoácidos com a insulina, o que possibilita a ligação desse fator com os receptores de insulina, mesmo que em menor grau de afinidade (Friedrich *et al.*, 2012). Estudos demonstraram a relação entre baixos níveis circulantes de IGF-1 com parâmetros relacionados com o metabolismo da glicose, como glicemia em jejum, hiperinsulinemia e resistência à insulina, o que é compatível com o estabelecimento da obesidade (Lewitt *et al.*, 2014; Yakar *et al.*, 2001; Sjogren *et al.*, 2001). Modelos experimentais em animais e humanos demonstraram aumento da sensibilidade à insulina após a ligação do IGF-1 ao seu receptor, no entanto, a redução da glicemia somente corresponde à 5% da ação desencadeada pela insulina (Frysak *et al.*, 2015). Sugerimos que estudos complementares da via de sinalização da glicose seriam necessários para elucidar o possível mecanismo de ação do IGF-1 nesses parâmetros.

A obesidade promove a produção de citocinas inflamatórias e adipocinas que afetam diversos órgãos, inclusive o coração. No coração, o processo inflamatório e o estresse oxidativo são gatilhos para o remodelamento adverso do parênquima, caracterizado pelo aumento do depósito de colágeno e apoptose de células cardíacas, que acarretam em mudanças na estrutura e função do ventrículo esquerdo. O remodelamento adverso, resultando na fibrose cardíaca, tem sido amplamente associado com o aumento da expressão de MMP-9, que tem sido apontada em diversos estudos como biomarcador de doenças cardiovasculares (Toprak *et al.*, 2013, Halade *et al.*, 2013). Esta gelatinase regula micro-RNAs que estão associados com o balanço do cálcio e a contratilidade de cardiomiócitos, tendo papel fundamental

na angiogênese, hipertrofia e fibrose do coração. A MMP-13 está envolvida no remodelamento da matriz extracelular, atuando de maneira oposta à MMP-9. A MMP-13 é uma colagenase importante na clivagem de colágeno I e III, desempenhando importante papel na regressão da fibrose (Mishra *et al.*, 2013; Toprak *et al.*, 2013; Howes *et al.*, 2014; Rani *et al.*, 2016). Alguns estudos associaram o aumento da expressão de TIMP-1 no coração ou a níveis plasmáticos com o estabelecimento da falência cardíaca, já que ele é um inibidor específico de metaloproteínases, o que proporcionaria a preservação das proteínas de matriz extracelular relacionadas com a fibrose (Frantz *et al.*, 2008; Heymans *et al.*, 2005; Daltro *et al.*, 2017).

Nossos resultados demonstraram que a dieta ocidental foi capaz de modificar a estrutura do ventrículo esquerdo (VE) no grupo obeso. Observamos aumento da estimativa de hipertrofia, acompanhada do aumento da área de fibrose, indentificada pela coloração de Picro-Sirius Red. Nossos resultados também demonstraram aumento do processo apoptótico no GO, foi detectado por meio da razão do conteúdo Bax/Bcl2, o que contribui para o remodelamento adverso do parênquima cardíaco, resultando em perda funcional. Esses resultados foram confirmados pela elevação do conteúdo dos colágenos I e III, MMP-9 e TIMP-1 no GO. Nossos resultados também demonstraram redução da razão pAKT/AKT no GO, o que permite o estabelecimento de um paralelo, já que animais *knockout* para AKT apresentam fibrose e hipertrofia cardíaca, assim como, elevados níveis de apoptose (Ock *et al.*, 2018). Nossos resultados também demonstraram redução significativa de Colágeno I, Colágeno III, MMP-9 e TIMP-1 no GO+IGF1, resultados similares foram observados em animais obesos submetidos à dieta hiperlipídica tratados com células-tronco mesenquimais de medula óssea, que também apresentaram redução da área de fibrose, o que pode estar relacionado com o efeito parácrino dessa célula no local da lesão (Daltro *et al.*, 2017). Acreditamos que a redução da cicatriz fibrótica encontrada nos animais obesos tratados com IGF-1, em conjunto com a redução dos tipos de colágenos analisados, seja consequência da elevação da MMP-13, relacionada com a degradação da matriz fibrótica, acarretando em reestruturação do parênquima, com consequente redução da estimativa da hipertrofia cardíaca. O IGF-1 reduziu os níveis de apoptose no GO+IGF-1, o que pode estar associado com a ativação da via PI3K/AKT, que possui efeito antiapoptótico em cardiomiócitos (Xia *et al.*, 2016).

As mudanças na estrutura e tamanho do coração alteram seu funcionamento e sua função elétrica, acarretando na fibrilação atrial (Gizurarson *et al.*, 2014). As

conexinas são proteínas presentes nas junções comunicantes, nos discos intercalares, que permitem a passagem de pequenas substâncias e a transmissão dos impulsos elétricos no tecido cardíaco. Este mecanismo é fundamental para a contração muscular do órgão e para o sincronismo de seu movimento (Roell *et al.*, 2007). Apesar de haver mais de 20 tipos de conexinas, nas células musculares cardíacas aparecem apenas quatro delas, sendo a conexina 43 a mais abundante no ventrículo (Gizurarson *et al.*, 2014). A arritmia ventricular esquerda é uma das principais causas de mortalidade associadas ao coração estruturalmente anormal, o que é explicado por mudanças na expressão de conexina 43, implicando em alteração na condução do impulso elétrico (Fontes *et al.*, 2012; Weng *et al.*, 2016). A contratilidade dos cardiomiócitos depende do influxo de cálcio intracelular, que é liberado por meio da SERCA-2 (Kumar *et al.*, 2009; Khan *et al.*, 2009). Nossos resultados revelaram redução significativa do conteúdo de conexina 43 e SERCA-2 no GO, indicando a perda de função contrátil desses animais. O estudo realizado por Ballal *et al.* (2010) corroboram nossos resultados, onde demonstraram a redução da expressão de SERCA-2 em ratos alimentados com dieta ocidental, contribuindo para alterações contráteis em consequência de uma disfunção na disponibilidade de Ca^{2+} . Ock *et al.* (2018) também observaram que camundongos *knockout* para AKT apresentavam redução da expressão de conexina 43 e ZO-1, proteína de interação com a conexina.

Nos cardiomiócitos, o IGF-1 aumenta a função contrátil dependente de PI3K/AKT, estimulando a expressão de SERCA-2 e o influxo de Ca^{2+} (Kim *et al.*, 2008), o que foi observado em modelos animais de coração diabéticos. Além disso, foi demonstrado que a depleção de MMP-9 estaria relacionada com esse fenômeno (Norby *et al.*, 2002; Mishra *et al.*, 2010). Após o tratamento com IGF-1, nossos animais do GO+IGF-1 apresentaram aumento do conteúdo de conexina 43 e de SERCA-2, o que acreditamos ter contribuído para o restabelecimento funcional do ventrículo esquerdo. Sugerimos que a redução de MMP-9 e a ativação da via AKT, observado em nossos resultados após o tratamento com IGF-1, estaria contribuindo para melhora da função contrátil do coração.

Alguns estudos dissertam sobre o comprometimento do metabolismo energético na obesidade. Grande parte destes distúrbios na produção e utilização de energia se relacionam com a mitocôndria. A insuficiência cardíaca foi associada às anormalidades morfológicas e funcionais da mitocôndria, tais como, hiperplasia,

redução do tamanho da organela e comprometimento da integridade mitocondrial (Sharov *et al.*, 2000). A hipertrofia cardíaca patológica tem sido associada, em diversos estudos, com a redução da capacidade oxidativa mitocondrial, culminando em alteração funcional cardíaca através da redução da atividade da proteína SERCA 2 e da redistribuição da miosina de cadeia pesada (Li *et al.*, 2006). Estudos do nosso grupo, utilizando o mesmo modelo experimental, já relataram alteração na atividade mitocondrial no coração e em células da medula óssea (Neves *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2014). Laurent *et al.* (2007) demonstraram que uma dieta rica em gordura era capaz de reduzir a síntese de ATP. Esse resultado também foi demonstrado por Zhang *et al.* (2012).

Nossos resultados apontam redução da capacidade oxidativa de carboidratos e ácidos graxos, além de desacoplamento mitocondrial e redução da biogênese mitocondrial nos animais do GO, caracterizando disfunção mitocondrial. Esses dados corroboram estudos anteriores que mostram que a disfunção mitocondrial está associada com redução da síntese de ATP, estresse oxidativo e alteração da morfologia mitocondrial (Neves *et al.*, 2014, Zhang *et al.*, 2012). Entretanto, nossos resultados demonstram que o tratamento com IGF-1 foi capaz de restaurar o metabolismo energético mitocondrial cardíaco do GO+IGF-1, por meio da melhora da capacidade oxidativa dos substratos, do acoplamento mitocondrial e da biogênese mitocondrial. Trabalhos anteriores relataram a melhora do metabolismo de carboidratos e lipídeos, além da normalização de enzimas antioxidantes e redução de ativação de caspase 3 no fígado e no cérebro de ratos velhos que receberam baixa dosagem de IGF-1, o que poderia ser associado com a redução do processo de peroxidação lipídica, consequência do estresse oxidativo (Puche *et al.*, 2008; García-Fernández *et al.*, 2008). Além disso, Ribeiro *et al.* (2014) observaram que o IGF-1 ativou a via Akt e inibiu a via Erk, o que foi acompanhado da redução de Drp1, sugerindo diminuição da fissão mitocondrial e aumento do potencial de membrana mitocondrial de células estriatais em modelo de doença de Huntington.

Observamos, também, aumento do conteúdo de CPT-1, proteína que participa do transporte de ácidos graxos para o interior das mitocôndrias, no coração do GO. Esse resultado está de acordo com Neves e colaboradores (2014) que observaram, no mesmo modelo experimental de dieta ocidental, aumento do conteúdo de CPT-1 associado à deposição ectópica de gordura no miocárdio e redução da capacidade oxidativa de ácidos graxos, indicando um possível mecanismo compensatório. Esse

fenômeno também foi observado no fígado com esteatose (Rizki *et al.*, 2009). Entretanto, nossos resultados demonstraram que o tratamento com IGF-1 foi capaz de reduzir o conteúdo de CPT-1 comparado ao GO, justificado pela normalização da oxidação de ácidos graxos observada nesse grupo.

Dietas ricas em glicose promovem fissão mitocondrial e elevação da síntese de ERO, enquanto a ingestão calórica elevada diminui os níveis de PGC-1, proteína ligada à biogênese mitocondrial, e Mfn2 (mitofusina-2), levando à redução da fusão mitocondrial e consequente comprometimento da função da organela (Bournat & Brown, 2010; Pintus *et al.*, 2012). A dieta ocidental promoveu o aumento do vazamento de prótons, que foi associado a elevação do conteúdo UCP2 no coração de camundongos obesos. Além disso, existe correlação entre ácidos graxos livres e o conteúdo de UCP2 e UCP3 na disfunção cardíaca, levando ao desacoplamento da fosforilação oxidativa e, portanto, diminuição da síntese de ATP e eficiência cardíaca (Neves *et al.*, 2014; Murray *et al.*, 2008). Nossos resultados também demonstraram a redução do conteúdo de UCP-2 e o aumento de PGC-1 α no GO+IGF-1, portanto sugerimos que a melhora do metabolismo energético cardíaco no grupo tratado com IGF-1 estaria associada com o aumento do acoplamento mitocondrial e aumento da biogênese mitocondrial.

Diversos trabalhos já demonstraram a capacidade das células-tronco cardíacas residentes de gerar cardiomiócitos e, por isso, estas células teriam elevado potencial terapêutico ao considerarmos o transplante autólogo em ensaios clínicos para regeneração do miocárdio. Elas têm sido amplamente utilizadas na terapia celular em modelo de infarto de miocárdio. Estudos como o de Bolli *et al.* (2011) relataram melhora da fração de ejeção do ventrículo esquerdo de pacientes com insuficiência cardíaca secundária grave que receberam infusão intracoronária de CTC c-kit⁺, além da melhora da fração de ejeção continuada após 1 ano da administração das CTC. Houve, também, redução da área infartada e aumento da área viável do ventrículo esquerdo, indicando regeneração do miocárdio.

Nossos resultados de citometria de fluxo e western blotting revelaram redução quantitativa de CTC c-kit⁺ e das células progenitoras endoteliais (CD133⁺) no GO. Esses resultados podem ser explicados pelo remodelamento adverso da MEC e disfunção do metabolismo energético, promovendo um ambiente hostil gerado na obesidade para a sobrevivência dessas células, visto que, em condições patológicas elas apresentam incapacidade funcional, tornando o seu controle homeostático

defeituoso, e resultando em senescência celular e apoptose (Urbanek *et al.*, 2005). Estudos anteriores já demonstraram que o diabetes pode conduzir à cardiomiopatia mediada por defeitos no crescimento e sobrevivência de células c-kit⁺, o que estaria associado ao estresse oxidativo e, também, ao remodelamento adverso da MEC (Rota *et al.*, 2006; Mirsha *et al.*, 2013).

O tratamento do grupo obeso com IGF-1 (GO+IGF-1), em nosso estudo, demonstrou levar a um aumento significativo das CTC e progenitoras endoteliais. Sugerimos que a reestruturação do parênquima cardíaco, assim como, a melhora do metabolismo energético promovidos pelo IGF-1 contribuiriam para a reconstituição dessas populações celulares. Além disso, o IGF-1 tem sido apontado como um fator parácrino ativador das CTC, sendo capaz de estimular a sobrevivência e proliferação destas células, promovendo regeneração histológica e fisiológica em modelo de infarto do miocárdio (Urbanek *et al.*, 2005; Padin- Iruegas *et al.*, 2009; Ellison *et al.*, 2011). O aumento da expressão de c-kit foi relacionado ao aumento da proliferação e migração de CTC c-kit⁺ em camundongos (Chen *et al.*, 2013). A ativação do c-kit aumenta a proliferação e a sobrevivência de CTC c-kit⁺, por meio da redução da apoptose e esse evento foi explicado pela ativação da via PI3K/ AKT (Vajravelu *et al.*, 2015). O IGF-1 aumentaria a expressão de c-kit por meio da fosforilação de AKT, que ativaria DNA metiltransferases (DNMT's), por hipermetilação, silenciando o miRNA-193, responsável pela redução da expressão de c-kit (Sun *et al.*, 2018). Portanto, a elevação significativa da ativação da via Akt no GO+IGF-1 corroboraria essa elevação no número de CTC observado no grupo tratado com IGF-1.

A superexpressão de IGF-1 por transgênese no coração está relacionada com a proliferação celular pós-natal (Reiss *et al.*, 1996). Embora a mitose de cardiomiócitos permaneça controversa, a descoberta de CTC poderia contribuir para proliferação celular do coração (Beltrami *et al.*, 2003). Gude *et al.*, (2006) relataram o aumento das células progenitoras cardíacas positivas para Nkx 2.5 no coração após o uso de transgênese nuclear de AKT, indicando aumento na formação de novos cardiomiócitos. Os mecanismos de indução e diferenciação de cardiomiócitos durante a cardiogênese dependem da expressão de alguns fatores transcricionais, dentre eles o fator transcricional NK2 relacionado ao locus 5 (Nkx 2.5). Nkx 2.5 é um dos cinco genes membros da família Nkx 2 que são expressos durante o desenvolvimento do coração de vertebrados (Shiojima *et al.*, 1996). Seus genes são expressos na fase inicial do desenvolvimento embrionário e essa expressão se mantém predominante

no músculo cardíaco adulto (Komuro *et al.*, 1993; Lints *et al.*, 1993). Portanto, sua expressão em células progenitoras do miocárdio embrionário e no coração adulto sugerem um papel na diferenciação da linhagem do miocárdio e na manutenção do fenótipo muscular cardíaco (Mably & Liew, 1996). O Nkx 2.5 junto a outros fatores de transcrição, como GATA4, induzem a expressão dos genes estruturais das células cardíacas, por exemplo, genes que codificam as proteínas do sarcômero (Thomas *et al.*, 2001). Além do seu papel na cardiogênese, o Nkx 2.5 também participa da homeostase cardíaca pós-natal. Trabalhos anteriores mostraram que a superexpressão de Nkx 2.5 preveniu a apoptose induzida por peróxido de hidrogênio em cultura de cardiomiócitos (Monzen *et al.*, 2002; Toko *et al.*, 2002; Akazawa, 2015). Nossos resultados demonstraram redução da expressão de Nkx 2.5 no GO, o que pode ser explicado pela diminuição das CTC e aumento da apoptose no coração. O tratamento com IGF-1 promoveu o aumento da expressão de Nkx 2.5 no coração dos camundongos obesos, correlacionado com a ativação da via AKT também observada nesse grupo, indicando aumento da formação de novos cardiomiócitos, além de apresentar uma contribuição direta na manutenção da homeostase cardíaca.

CONCLUSÃO

A obesidade induzida por dieta ocidental causa fibrose cardíaca, apoptose de células cardíacas, redução da contratilidade e danos ao metabolismo energético do coração, criando um microambiente tecidual adverso, o que leva à redução das células-tronco cardíacas residentes e células progenitoras endoteliais. Essas alterações foram relacionadas com uma regulação negativa da via de sinalização AKT, configurando a cardiomiopatia que, a longo prazo, leva à falência cardíaca.

A terapia com IGF-1 foi capaz de reverter o quadro de obesidade e cardiomiopatia com: (1) melhora do metabolismo energético cardíaco, restaurando a capacidade oxidativa e aumentando o acoplamento e a biogênese mitocondrial; (2) reestruturação da MEC, diminuindo a fibrose e a hipertrofia cardíaca; (3) diminuição dos níveis de apoptose; (4) restauração do acoplamento cardíaco e (5) do balanço intracelular de cálcio. Essas alterações foram desencadeadas principalmente pela ativação da via de sinalização AKT. A reversão do quadro de cardiomiopatia proporcionou a melhora do ambiente tecidual, garantindo a sobrevivência das células-tronco cardíacas residentes e células progenitoras endoteliais, bem como a formação de novos cardiomiócitos. Paralelamente, a ativação da via AKT tem ação direta sobre as células-tronco cardíacas residentes, ativando a sobrevivência e proliferação dessas células. Por sua vez, as células-tronco cardíacas residentes ativadas secretam uma série de fatores que agem de forma parácrina no tecido cardíaco, eventos positivos para recuperação morfofuncional do órgão, contribuindo para a reversão da falência cardíaca.

REFERÊNCIAS

- Abel ED, Doenst T. Mitochondrial adaptations to physiological vs. pathological cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2):234-42.
- Aguirre GA, De Ita JR, de la Garza RG, Castilla-Cortazar I. Insulin-like growth factor-1 deficiency and metabolic syndrome. *J Transl Med.* 2016;14:3.
- Akazawa H. Mechanisms of Cardiovascular Homeostasis and Pathophysiology--From Gene Expression, Signal Transduction to Cellular Communication. *Circ J.* 2015;79(12):2529-36.
- Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003;425(6961):968-73.
- Ansley DM, Wang B. Oxidative stress and myocardial injury in the diabetic heart. *J Pathol.* 2013;229(2):232-41.
- Araujo AS, Enzweiler AT, Schenkel P, Fernandes TR, Ribeiro MF, Partata WA, et al. Oxidative stress activates insulin-like growth factor I receptor protein expression, mediating cardiac hypertrophy induced by thyroxine. *Mol Cell Biochem.* 2007;303(1-2):89-95.
- Bailey B, Izarra A, Alvarez R, Fischer KM, Cottage CT, Quijada P, et al. Cardiac stem cell genetic engineering using the alphaMHC promoter. *Regen Med.* 2009;4(6):823-33.
- Ballal K, Wilson CR, Harmancey R, Taegtmeyer H. Obesogenic high fat western diet induces oxidative stress and apoptosis in rat heart. *Mol Cell Biochem.* 2010;344(1-2):221-30.
- Baraniak PR, Cooke MT, Saeed R, Kinney MA, Fridley KM, McDevitt TC. Stiffening of human mesenchymal stem cell spheroid microenvironments induced by incorporation of gelatin microparticles. *J Mech Behav Biomed Mater.* 2012;11:63-71.
- Baraniak PR, McDevitt TC. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regen Med.* 2010;5(1):121-43.
- Barile L, Messina E, Giacomello A, Marbán E. Endogenous cardiac stem cells. *Prog Cardiovasc Dis.* 2007;50(1):31-48.
- Barlaka E, Görbe A, Gáspár R, Pálóczi J, Ferdinandy P, Lazou A. Activation of PPAR β/δ protects cardiac myocytes from oxidative stress-induced apoptosis by suppressing generation of reactive oxygen/nitrogen species and expression of matrix metalloproteinases. *Pharmacol Res.* 2015;95-96:102-10.

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 2003;114(6):763-76.

Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J, Yan SM, Finato N, Bussani R, et al. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med*. 2001;344(23):1750-7.

Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, Zdunek S, Barnabé-Heider F, Walsh S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science*. 2009;324(5923):98-102.

Berryman DE, Glad CA, List EO, Johannsson G. The GH/IGF-1 axis in obesity: pathophysiology and therapeutic considerations. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9(6):346-56.

Bianconi V, Sahebkar A, Kovanen P, Bagaglia F, Ricciuti B, Calabrò P, et al. Endothelial and cardiac progenitor cells for cardiovascular repair: A controversial paradigm in cell therapy. *Pharmacol Ther*. 2018;181:156-68.

Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 1999;283(5401):534-7.

Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *Lancet*. 2011;378(9806):1847-57.

Boudina S, Abel ED. Mitochondrial uncoupling: a key contributor to reduced cardiac efficiency in diabetes. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:250-8.

Boudina S, Abel ED. Diabetic cardiomyopathy revisited. *Circulation*. 2007;115(25):3213-23.

Bournat JC, Brown CW. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010;17(5):446-52.

Brahmkhatri VP, Prasanna C, Atreya HS. Insulin-like growth factor system in cancer: novel targeted therapies. *Biomed Res Int*. 2015;2015:538019.

Brand MD, Nicholls DG. Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J*. 2011;435(2):297-312.

Bredella MA, Torriani M, Ghomi RH, Thomas BJ, Brick DJ, Gerweck AV, et al. Vertebral bone marrow fat is positively associated with visceral fat and inversely associated with IGF-1 in obese women. *Obesity (Silver Spring)*. 2011;19(1):49-53.

Castellano G, Affuso F, Conza PD, Fazio S. The GH/IGF-1 Axis and Heart Failure. *Curr Cardiol Rev*. 2009;5(3):203-15.

Chavali V, Tyagi SC, Mishra PK. Predictors and prevention of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Metab Syndr Obes*. 2013;6:151-60.

Chen L, Ma XH, Zhao L, Bai R, Li SN, Wang L, et al. [A preliminary study on the relationship between idiopathic arrhythmia and cardiac magnetic resonance imaging defined cardiac features in patients with straight back syndrome]. *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*. 2017;45(11):948-53.

Chen SL, Fang WW, Ye F, Liu YH, Qian J, Shan SJ, et al. Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2004;94(1):92-5.

Chen S, Xu Y, Wang S, Shen M, Chen F, Chen M, et al. Subcutaneous administration of rhIGF-I post irradiation exposure enhances hematopoietic recovery and survival in BALB/c mice. *J Radiat Res*. 2012;53(4):581-7.

Chen Z, Pan X, Yao Y, Yan F, Chen L, Huang R, et al. Epigenetic regulation of cardiac progenitor cells marker c-kit by stromal cell derived factor-1 α . *PLoS One*. 2013;8(7):e69134.

Clinical Trails. Gov. U.S. National Library of Medicinal. 2018

Conti E, Musumeci MB, De Giusti M, Dito E, Mastromarino V, Autore C, et al. IGF-1 and atherothrombosis: relevance to pathophysiology and therapy. *Clin Sci (Lond)*. 2011;120(9):377-402.

Costa CA, Carlos AS, dos Santos AeS, Monteiro AM, Moura EG, Nascimento-Saba CC. Abdominal adiposity, insulin and bone quality in young male rats fed a high-fat diet containing soybean or canola oil. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(10):1811-

Crescenzo R, Bianco F, Mazzoli A, Giacco A, Cancelliere R, di Fabio G, et al. Fat Quality Influences the Obesogenic Effect of High Fat Diets. *Nutrients*. 2015;7(11):9475-91.

Daltro PS, Barreto BC, Silva PG, Neto PC, Sousa Filho PHF, Santana Neta D, et al. Therapy with mesenchymal stromal cells or conditioned medium reverse cardiac alterations in a high-fat diet-induced obesity model. *Cytotherapy*. 2017;19(10):1176-88.

De Angelis A, Piegari E, Cappetta D, Marino L, Filippelli A, Berrino L, et al. Anthracycline cardiomyopathy is mediated by depletion of the cardiac stem cell pool and is rescued by restoration of progenitor cell function. *Circulation*. 2010;121(2):276-92.

de la Garza RG, Morales-Garza LA, Martin-Estal I, Castilla-Cortazar I. Insulin-Like Growth Factor-1 Deficiency and Cirrhosis Establishment. *J Clin Med Res*. 2017;9(4):233-47.

de Mello AH, Costa AB, Engel JDG, Rezin GT. Mitochondrial dysfunction in obesity. *Life Sci*. 2018;192:26-32.

de Oliveira GP, Cortez E, Araujo GJ, de Carvalho Sabino KC, Neves FA, Bernardo AF, et al. Impaired mitochondrial function and reduced viability in bone marrow cells of obese mice. *Cell Tissue Res*. 2014;357(1):185-94.

Dempersmier J, Sul HS. Shades of brown: a model for thermogenic fat. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2015;6:71.

Deutsch MA, Sturzu A, Wu SM. At a crossroad: cell therapy for cardiac repair. *Circ Res*. 2013;112(6):884-90.

Dickstein K, Cohen-Solal A, Filippatos G, McMurray JJ, Ponikowski P, Poole-Wilson PA, et al. ESC guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM). *Eur J Heart Fail*. 2008;10(10):933-89.

Dimmeler S, Zeiher AM, Schneider MD. Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest*. 2005;115(3):572-83.

DiNicolantonio JJ, Lucan SC, O'Keefe JH. The Evidence for Saturated Fat and for Sugar Related to Coronary Heart Disease. *Prog Cardiovasc Dis*. 2016;58(5):464-72.

Dong M, Zheng Q, Ford SP, Nathanielsz PW, Ren J. Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;55:111-6.

Durrani S, Konoplyannikov M, Ashraf M, Haider KH. Skeletal myoblasts for cardiac repair. *Regen Med*. 2010;5(6):919-32.

Ellison GM, Torella D, Dellegrottaglie S, Perez-Martinez C, Perez de Prado A, Vicinanza C, et al. Endogenous cardiac stem cell activation by insulin-like growth factor-1/hepatocyte growth factor intracoronary injection fosters survival and regeneration of the infarcted pig heart. *J Am Coll Cardiol*. 2011;58(9):977-86.

Ellison GM, Vicinanza C, Smith AJ, Aquila I, Leone A, Waring CD, et al. Adult c-kit(pos) cardiac stem cells are necessary and sufficient for functional cardiac regeneration and repair. *Cell*. 2013;154(4):827-42.

Fan D, Takawale A, Basu R, Patel V, Lee J, Kandam V, et al. Differential role of TIMP2 and TIMP3 in cardiac hypertrophy, fibrosis, and diastolic dysfunction. *Cardiovasc Res*. 2014;103(2):268-80.

Fang CH, Jin J, Joe JH, Song YS, So BI, Lim SM, et al. In vivo differentiation of human amniotic epithelial cells into cardiomyocyte-like cells and cell transplantation effect on myocardial infarction in rats: comparison with cord blood and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Cell Transplant*. 2012;21(8):1687-96.

Fernandes MR, Silva GV, Caixeta A, Rati M, de Sousa e Silva NA, Perin EC. Assessing intermediate coronary lesions: angiographic prediction of lesion severity on intravascular ultrasound. *J Invasive Cardiol*. 2007;19(10):412-6.

Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998;279(5356):1528-30.

Florea VG, Mareyev VY, Samko AN, Orlova IA, Coats AJ, Belenkov YN. Left ventricular remodelling: common process in patients with different primary myocardial disorders. *Int J Cardiol.* 1999;68(3):281-7.

Foncea R, Gálvez A, Pérez V, Morales MP, Calixto A, Meléndez J, et al. Extracellular regulated kinase, but not protein kinase C, is an antiapoptotic signal of insulin-like growth factor-1 on cultured cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;273(2):736-44.

Fontes MS, van Veen TA, de Bakker JM, van Rijen HV. Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1818(8):2020-9.

Frantz S, Störk S, Michels K, Eigenthaler M, Ertl G, Bauersachs J, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases levels in patients with chronic heart failure: an independent predictor of mortality. *Eur J Heart Fail.* 2008;10(4):388-95.

Friedrich N, Thuesen B, Jørgensen T, Juul A, Spielhagen C, Wallaschofski H, et al. The association between IGF-I and insulin resistance: a general population study in Danish adults. *Diabetes Care.* 2012;35(4):768-73.

Fructuoso M, Rachdi L, Philippe E, Denis RG, Magnan C, Le Stunff H, et al. Increased levels of inflammatory plasma markers and obesity risk in a mouse model of Down syndrome. *Free Radic Biol Med.* 2018;114:122-30.

Frysak Z, Schovanek J, Iacobone M, Karasek D. Insulin-like Growth Factors in a clinical setting: Review of IGF-I. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2015;159(3):347-51.

Fuentes T, Kearns-Jonker M. Endogenous cardiac stem cells for the treatment of heart failure. *Stem Cells Cloning.* 2013;6:1-12.

Fuster JJ, Ouchi N, Gokce N, Walsh K. Obesity-Induced Changes in Adipose Tissue Microenvironment and Their Impact on Cardiovascular Disease. *Circ Res.* 2016;118(11):1786-807.

Gaetani R, Barile L, Forte E, Chimenti I, Ionta V, Di Consiglio A, et al. New perspectives to repair a broken heart. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* 2009;7(2):91-107.

Galluzzi L, Kepp O, Trojel-Hansen C, Kroemer G. Mitochondrial control of cellular life, stress, and death. *Circ Res.* 2012;111(9):1198-207.

Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. *Cell Stem Cell.* 2013;12(6):689-98.

García-Fernández M, Delgado G, Puche JE, González-Barón S, Castilla Cortázar I. Low doses of insulin-like growth factor I improve insulin resistance, lipid metabolism, and oxidative damage in aging rats. *Endocrinology.* 2008;149(5):2433-42.

Gilchrist ES, Plevris JN. Bone marrow-derived stem cells in liver repair: 10 years down the line. *Liver Transpl.* 2010;16(2):118-29.

- Gizurarson S, Ståhlman M, Jeppsson A, Shao Y, Redfors B, Bergfeldt L, et al. Atrial fibrillation in patients admitted to coronary care units in western Sweden - focus on obesity and lipotoxicity. *J Electrocardiol.* 2015;48(5):853-60.
- Gnecchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, et al. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med.* 2005;11(4):367-8.
- Gnecchi M, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res.* 2008;103(11):1204-19.
- Grove JE, Lutzko C, Priller J, Henegariu O, Theise ND, Kohn DB, et al. Marrow-derived cells as vehicles for delivery of gene therapy to pulmonary epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(6):645-51.
- Gude N, Muraski J, Rubio M, Kajstura J, Schaefer E, Anversa P, et al. Akt promotes increased cardiomyocyte cycling and expansion of the cardiac progenitor cell population. *Circ Res.* 2006;99(4):381-8.
- Guntur AR, Rosen CJ. IGF-1 regulation of key signaling pathways in bone. *Bonekey Rep.* 2013;2:437.
- Halade GV, Jin YF, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase (MMP)-9: a proximal biomarker for cardiac remodeling and a distal biomarker for inflammation. *Pharmacol Ther.* 2013;139(1):32-40.
- Hammond RA. Social influence and obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2010;17(5):467-71.
- Hammond RA, Levine R. The economic impact of obesity in the United States. *Diabetes Metab Syndr Obes.* 2010;3:285-95.
- Hansson EM, Lendahl U. Regenerative medicine for the treatment of heart disease. *J Intern Med.* 2013;273(3):235-45.
- Hare JM, Fishman JE, Gerstenblith G, DiFede Velazquez DL, Zambrano JP, Suncion VY, et al. Comparison of allogeneic vs autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cells delivered by transendocardial injection in patients with ischemic cardiomyopathy: the POSEIDON randomized trial. *JAMA.* 2012;308(22):2369-79.
- Hare JM, Traverse JH, Henry TD, Dib N, Strumpf RK, Schulman SP, et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54(24):2277-86.
- Haubert NJ, Padovan GJ, Zucoloto S, Vannucchi H, Marchini JS. Experimental induction of steatosis in different tissues after the ingestion of a carbohydrate-rich diet: effect on the liver, on the heart and on indicators of oxidation. *Arq Gastroenterol.* 2010;47(4):388-92.

Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, Milting H, Gao F, Kassner A, et al. Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart. *Circulation*. 2005;112(8):1136-44.

Hong KU, Guo Y, Li QH, Cao P, Al-Maqtari T, Vajravelu BN, et al. c-kit⁺ Cardiac stem cells alleviate post-myocardial infarction left ventricular dysfunction despite poor engraftment and negligible retention in the recipient heart. *PLoS One*. 2014;9(5):e96725.

Howes JM, Bihan D, Slatter DA, Hamaia SW, Packman LC, Knauper V, et al. The recognition of collagen and triple-helical toolkit peptides by MMP-13: sequence specificity for binding and cleavage. *J Biol Chem*. 2014;289(35):24091-101.

Ibarra C, Vicencio JM, Varas-Godoy M, Jaimovich E, Rothermel BA, Uhlén P, et al. An integrated mechanism of cardiomyocyte nuclear Ca²⁺ signaling. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;75:40-8.

Ilkun O, Boudina S. Cardiac dysfunction and oxidative stress in the metabolic syndrome: an update on antioxidant therapies. *Curr Pharm Des*. 2013;19(27):4806-17.

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

Johannsen DL, Ravussin E. The role of mitochondria in health and disease. *Curr Opin Pharmacol*. 2009;9(6):780-6.

Jung HJ, Suh Y. Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. *Front Genet*. 2014;5:472.

Kamenický P, Mazziotti G, Lombès M, Giustina A, Chanson P. Growth hormone, insulin-like growth factor-1, and the kidney: pathophysiological and clinical implications. *Endocr Rev*. 2014;35(2):234-81.

Kandasamy AD, Chow AK, Ali MA, Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res*. 2010;85(3):413-23.

Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, et al. The Roles of Adipokines, Proinflammatory Cytokines, and Adipose Tissue Macrophages in Obesity-Associated Insulin Resistance in Modest Obesity and Early Metabolic Dysfunction. *PLoS One*. 2016;11(4):e0154003.

Khan H, Metra M, Blair JE, Vogel M, Harinstein ME, Filippatos GS, et al. Istaroxime, a first in class new chemical entity exhibiting SERCA-2 activation and Na-K-ATPase inhibition: a new promising treatment for acute heart failure syndromes? *Heart Fail Rev*. 2009;14(4):277-87.

Kim H, Tu HC, Ren D, Takeuchi O, Jeffers JR, Zambetti GP, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis. *Mol Cell*. 2009;36(3):487-99.

Kim J, Wende AR, Sena S, Theobald HA, Soto J, Sloan C, et al. Insulin-like growth factor I receptor signaling is required for exercise-induced cardiac hypertrophy. *Mol Endocrinol*. 2008;22(11):2531-43.

Komuro I, Izumo S. Csx: a murine homeobox-containing gene specifically expressed in the developing heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(17):8145-9.

Kumar S, Kain V, Sitasawad SL. Cardiotoxicity of calmidazolium chloride is attributed to calcium aggravation, oxidative and nitrosative stress, and apoptosis. *Free Radic Biol Med*. 2009;47(6):699-709.

Laurent D, Didier L, Yerby B, Deacon R, Gao J. Diet-induced modulation of mitochondrial activity in rat muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293(5):E1169-77.

Leri A, Quaini F, Kajstura J, Anversa P. Myocyte death and myocyte regeneration in the failing human heart. *Ital Heart J*. 2001;2 Suppl 3:12S-4S.

Leri A, Rota M, Hosoda T, Goichberg P, Anversa P. Cardiac stem cell niches. *Stem Cell Res*. 2014;13(3 Pt B):631-46.

Leri A, Rota M, Pasqualini FS, Goichberg P, Anversa P. Origin of cardiomyocytes in the adult heart. *Circ Res*. 2015;116(1):150-66.

Lewitt MS, Dent MS, Hall K. The Insulin-Like Growth Factor System in Obesity, Insulin Resistance and Type 2 Diabetes Mellitus. *J Clin Med*. 2014;3(4):1561-74.

Li L, Zhao Q, Kong W. Extracellular matrix remodeling and cardiac fibrosis. *Matrix Biol*. 2018;68-69:490-506.

Li SY, Yang X, Ceylan-Isik AF, Du M, Sreejayan N, Ren J. Cardiac contractile dysfunction in Lep/Lep obesity is accompanied by NADPH oxidase activation, oxidative modification of sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and myosin heavy chain isozyme switch. *Diabetologia*. 2006;49(6):1434-46.

Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev*. 2011;7(2):269-91.

Linke A, Müller P, Nurzynska D, Casarsa C, Torella D, Nascimbene A, et al. Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(25):8966-71.

Lints TJ, Parsons LM, Hartley L, Lyons I, Harvey RP. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development*. 1993;119(3):969.

Liu T, Song D, Dong J, Zhu P, Liu J, Liu W, et al. Current Understanding of the Pathophysiology of Myocardial Fibrosis and Its Quantitative Assessment in Heart Failure. *Front Physiol.* 2017;8:238.

Lombardo GE, Lepore SM, Morittu VM, Arcidiacono B, Colica C, Procopio A, et al. Effects of Oleacein on High-Fat Diet-Dependent Steatosis, Weight Gain, and Insulin Resistance in Mice. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:116.

Lopaschuk GD, Folmes CD, Stanley WC. Cardiac energy metabolism in obesity. *Circ Res.* 2007;101(4):335-47.

Lopaschuk GD, Jaswal JS. Energy metabolic phenotype of the cardiomyocyte during development, differentiation, and postnatal maturation. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2010;56(2):130-40.

Mably JD, Liew CC. Factors involved in cardiogenesis and the regulation of cardiac-specific gene expression. *Circ Res.* 1996;79(1):4-13.

Mahajan R, Lau DH, Sanders P. Impact of obesity on cardiac metabolism, fibrosis, and function. *Trends Cardiovasc Med.* 2015;25(2):119-26.

Mailloux RJ, Harper ME. Mitochondrial proticity and ROS signaling: lessons from the uncoupling proteins. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(9):451-8.

Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived aUtologous stem CElls to reverse ventricUlar dySfunction). *J Am Coll Cardiol.* 2014;63(2):110-22.

Manginas A, Goussetis E, Koutelou M, Karatasakis G, Peristeri I, Theodorakos A, et al. Pilot study to evaluate the safety and feasibility of intracoronary CD133(+) and CD133(-) CD34(+) cell therapy in patients with nonviable anterior myocardial infarction. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2007;69(6):773-81.

Mathieu M, Bartunek J, El Oumeiri B, Touihri K, Hadad I, Thoma P, et al. Cell therapy with autologous bone marrow mononuclear stem cells is associated with superior cardiac recovery compared with use of nonmodified mesenchymal stem cells in a canine model of chronic myocardial infarction. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2009;138(3):646-53.

Matsubara S, Kitaguchi T. Pathological changes of the myonuclear fibrous lamina and internal nuclear membrane in two cases of autosomal dominant limb-girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbance (LGMD1B). *Acta Neuropathol.* 2004;107(2):111-8.

Matsuura K, Wada H, Nagai T, Iijima Y, Minamino T, Sano M, et al. Cardiomyocytes fuse with surrounding noncardiomyocytes and reenter the cell cycle. *J Cell Biol.* 2004;167(2):351-63.

Menasché P. Skeletal myoblasts for cardiac repair: Act II? *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(23):1881-3.

Menasché P. Cell therapy trials for heart regeneration - lessons learned and future directions. *Nat Rev Cardiol*. 2018.

Menasché P, Hagège A, Scorsin M, Pouzet B, Desnos M, Duboc D, et al. [Autologous skeletal myoblast transplantation for cardiac insufficiency. First clinical case]. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 2001;94(3):180-2.

Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95(9):911-21.

Mishra PK, Givvimani S, Chavali V, Tyagi SC. Cardiac matrix: a clue for future therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(12):2271-6.

Mishra PK, Metreveli N, Tyagi SC. MMP-9 gene ablation and TIMP-4 mitigate PAR-1-mediated cardiomyocyte dysfunction: a plausible role of dicer and miRNA. *Cell Biochem Biophys*. 2010;57(2-3):67-76.

Mishra R, Vijayan K, Colletti EJ, Harrington DA, Matthiesen TS, Simpson D, et al. Characterization and functionality of cardiac progenitor cells in congenital heart patients. *Circulation*. 2011;123(4):364-73.

Mistry SK, Puthussery S. Risk factors of overweight and obesity in childhood and adolescence in South Asian countries: a systematic review of the evidence. *Public Health*. 2015;129(3):200-9.

Monzen K, Zhu W, Kasai H, Hiroi Y, Hosoda T, Akazawa H, et al. Dual effects of the homeobox transcription factor Csx/Nkx2-5 on cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002;298(4):493-500.

Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(11).

Murray AJ, Cole MA, Lygate CA, Carr CA, Stuckey DJ, Little SE, et al. Increased mitochondrial uncoupling proteins, respiratory uncoupling and decreased efficiency in the chronically infarcted rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2008;44(4):694-700.

Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation*. 2005;112(8):1128-35.

Neves FA, Cortez E, Bernardo AF, Mattos AB, Vieira AK, Malafaia TeO, et al. Heart energy metabolism impairment in Western-diet induced obese mice. *J Nutr Biochem*. 2014;25(1):50-7.

Norby FL, Wold LE, Duan J, Hintz KK, Ren J. IGF-I attenuates diabetes-induced cardiac contractile dysfunction in ventricular myocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;283(4):E658-66.

Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, Säwén P, Röhl W, Hescheler J, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004;10(5):494-501.

Ock S, Lee WS, Kim HM, Park KS, Kim YK, Kook H, et al. Connexin43 and zonula occludens-1 are targets of Akt in cardiomyocytes that correlate with cardiac contractile dysfunction in Akt deficient hearts. *Biochim Biophys Acta*. 2018;1864(4 Pt A):1183-91.

Oliveira CR, Meneguz-Moreno RA, Aguiar-Oliveira MH, Barreto-Filho JA. Emerging role of the GH/IGF-I on cardiometabolic control. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(5):434-9.

OMS. Organização Mundial de Saúde. *Obesidade: Prevenção e gestão da epidemia global. Relatório de uma consulta da OMS sobre Obesidade*. Geneva: OMS, 2015.

Ooi JY, Bernardo BC, McMullen JR. Therapeutic potential of targeting microRNAs to regulate cardiac fibrosis: miR-433 a new fibrotic player. *Ann Transl Med*. 2016;4(24):548.

Padin-Iruegas ME, Misao Y, Davis ME, Segers VF, Esposito G, Tokunou T, et al. Cardiac progenitor cells and biotinylated insulin-like growth factor-1 nanofibers improve endogenous and exogenous myocardial regeneration after infarction. *Circulation*. 2009;120(10):876-87.

Parikh SS, Blackwell DJ, Gomez-Hurtado N, Frisk M, Wang L, Kim K, et al. Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res*. 2017;121(12):1323-30.

Patel RS, Li Q, Ghasemzadeh N, Eapen DJ, Moss LD, Janjua AU, et al. Circulating CD34+ progenitor cells and risk of mortality in a population with coronary artery disease. *Circ Res*. 2015;116(2):289-97.

Pavillard LE, Marín-Aguilar F, Bullon P, Cordero MD. Cardiovascular diseases, NLRP3 inflammasome, and western dietary patterns. *Pharmacol Res*. 2018;131:44-50.

Pintus F, Floris G, Rufini A. Nutrient availability links mitochondria, apoptosis, and obesity. *Aging (Albany NY)*. 2012;4(11):734-41.

Popkin BM. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. *Proc Nutr Soc*. 2011;70(1):82-91.

Pouvreau C, Dayre A, Butkowski EG, de Jong B, Jelinek HF. Inflammation and oxidative stress markers in diabetes and hypertension. *J Inflamm Res*. 2018;11:61-8.

Puche JE, García-Fernández M, Muntané J, Rioja J, González-Barón S, Castilla Cortazar I. Low doses of insulin-like growth factor-I induce mitochondrial protection in aging rats. *Endocrinology*. 2008;149(5):2620-7.

Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B, et al. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*. 2002;346(1):5-15.

Ramachandran S, Croft P, Neary RH. A prospective study in primary care in patients without vascular disease comparing levels of coronary risk factors in those

recommended for lipid-lowering drugs based on either absolute risk or absolute risk reduction. *Prev Cardiol.* 2003;6(1):17-21.

Ramachandran S, Croft P, Neary RH. A prospective study in primary care in patients without vascular disease comparing levels of coronary risk factors in those recommended for lipid-lowering drugs based on either absolute risk or absolute risk reduction. *Prev Cardiol.* 2003;6(1):17-21.

Rani V, Deep G, Singh RK, Palle K, Yadav UC. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci.* 2016;148:183-93.

Reiss K, Cheng W, Ferber A, Kajstura J, Li P, Li B, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in the heart is coupled with myocyte proliferation in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(16):8630-5.

Ren J, Anversa P. The insulin-like growth factor I system: physiological and pathophysiological implication in cardiovascular diseases associated with metabolic syndrome. *Biochem Pharmacol.* 2015;93(4):409-17.

Ren J, Duan J, Thomas DP, Yang X, Sreejayan N, Sowers JR, et al. IGF-I alleviates diabetes-induced RhoA activation, eNOS uncoupling, and myocardial dysfunction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2008;294(3):R793-802.

Ribeiro M, Rosenstock TR, Oliveira AM, Oliveira CR, Rego AC. Insulin and IGF-1 improve mitochondrial function in a PI-3K/Akt-dependent manner and reduce mitochondrial generation of reactive oxygen species in Huntington's disease knock-in striatal cells. *Free Radic Biol Med.* 2014;74:129-44.

Riehle C, Abel ED. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circ Res.* 2016;118(7):1151-69.

Rizki G, Arnaboldi L, Gabrielli B, Yan J, Lee GS, Ng RK, et al. Mice fed a lipogenic methionine-choline-deficient diet develop hypermetabolism coincident with hepatic suppression of SCD-1. *J Lipid Res.* 2006;47(10):2280-90.

Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* 2012;481(7381):295-305.

Roell W, Lewalter T, Sasse P, Tallini YN, Choi BR, Breitbach M, et al. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature.* 2007;450(7171):819-24.

Rogge MM. The role of impaired mitochondrial lipid oxidation in obesity. *Biol Res Nurs.* 2009;10(4):356-73.

Rota M, LeCapitaine N, Hosoda T, Boni A, De Angelis A, Padin-Iruegas ME, et al. Diabetes promotes cardiac stem cell aging and heart failure, which are prevented by deletion of the p66shc gene. *Circ Res.* 2006;99(1):42-52.

Sadagurski M, White MF. Integrating metabolism and longevity through insulin and IGF1 signaling. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2013;42(1):127-48.

- Salminen A, Kaarniranta K. Insulin/IGF-1 paradox of aging: regulation via AKT/IKK/NF-kappaB signaling. *Cell Signal*. 2010;22(4):573-7.
- Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res*. 2013;113(6):810-34.
- Sarfert KS, Knabe ML, Gunawansa NS, Blythe SN. Western-style diet induces object recognition deficits and alters complexity of dendritic arborization in the hippocampus and entorhinal cortex of male rats. *Nutr Neurosci*. 2017:1-10.
- Sharov VG, Todor AV, Silverman N, Goldstein S, Sabbah HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32(12):2361-7.
- Shiojima I, Komuro I, Mizuno T, Aikawa R, Akazawa H, Oka T, et al. Molecular cloning and characterization of human cardiac homeobox gene CSX1. *Circ Res*. 1996;79(5):920-9.
- Singla DK. Stem cells and exosomes in cardiac repair. *Curr Opin Pharmacol*. 2016;27:19-23.
- Sjögren K, Wallenius K, Liu JL, Bohlooly-Y M, Pacini G, Svensson L, et al. Liver-derived IGF-I is of importance for normal carbohydrate and lipid metabolism. *Diabetes*. 2001;50(7):1539-45.
- Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative potential of cardiosphere-derived cells expanded from percutaneous endomyocardial biopsy specimens. *Circulation*. 2007;115(7):896-908.
- Suleiman MS, Singh RJ, Stewart CE. Apoptosis and the cardiac action of insulin-like growth factor I. *Pharmacol Ther*. 2007;114(3):278-94.
- Sun Y, Xu R, Huang J, Yao Y, Pan X, Chen Z, et al. Insulin-like growth factor-1-mediated regulation of miR-193a expression promotes the migration and proliferation of c-kit-positive mouse cardiac stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):41.
- Takahashi M, Li TS, Suzuki R, Kobayashi T, Ito H, Ikeda Y, et al. Cytokines produced by bone marrow cells can contribute to functional improvement of the infarcted heart by protecting cardiomyocytes from ischemic injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(2):H886-93.
- Taylor DA, Atkins BZ, Hungspreugs P, Jones TR, Reedy MC, Hutcheson KA, et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med*. 1998;4(8):929-33.
- Thomas PS, Kasahara H, Edmonson AM, Izumo S, Yacoub MH, Barton PJ, et al. Elevated expression of Nkx-2.5 in developing myocardial conduction cells. *Anat Rec*. 2001;263(3):307-13.

Tikellis C, Thomas MC, Harcourt BE, Coughlan MT, Pete J, Bialkowski K, et al. Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;295(2):E323-30.

Toko H, Zhu W, Takimoto E, Shiojima I, Hiroi Y, Zou Y, et al. Csx/Nkx2-5 is required for homeostasis and survival of cardiac myocytes in the adult heart. *J Biol Chem*. 2002;277(27):24735-43.

Toprak G, Yüksel H, Demirpençe Ö, Islamoglu Y, Evliyaoglu O, Mete N. Fibrosis in heart failure subtypes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013;17(17):2302-9.

Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res*. 2016;118(6):1021-40.

Troncoso R, Díaz-Elizondo J, Espinoza SP, Navarro-Marquez MF, Oyarzún AP, Riquelme JA, et al. Regulation of cardiac autophagy by insulin-like growth factor 1. *IUBMB Life*. 2013;65(7):593-601.

Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E, Lavandero S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(3):128-37.

Tyagi SC. Proteinases and myocardial extracellular matrix turnover. *Mol Cell Biochem*. 1997;168(1-2):1-12.

Urbanek K, Rota M, Cascapera S, Bearzi C, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Cardiac stem cells possess growth factor-receptor systems that after activation regenerate the infarcted myocardium, improving ventricular function and long-term survival. *Circ Res*. 2005;97(7):663-73.

Vajravelu BN, Hong KU, Al-Maqtari T, Cao P, Keith MC, Wysoczynski M, et al. C-Kit Promotes Growth and Migration of Human Cardiac Progenitor Cells via the PI3K-AKT and MEK-ERK Pathways. *PLoS One*. 2015;10(10):e0140798.

VanSaun MN, Lee IK, Washington MK, Matrisian L, Gorden DL. High fat diet induced hepatic steatosis establishes a permissive microenvironment for colorectal metastases and promotes primary dysplasia in a murine model. *Am J Pathol*. 2009;175(1):355-64.

Vassilopoulos G, Russell DW. Cell fusion: an alternative to stem cell plasticity and its therapeutic implications. *Curr Opin Genet Dev*. 2003;13(5):480-5.

Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet*. 2004;363(9411):783-4.

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116(5):639-48.

Weng CH, Chung FP, Chen YC, Lin SF, Huang PH, Kuo TB, et al. Pleiotropic Effects of Myocardial MMP-9 Inhibition to Prevent Ventricular Arrhythmia. *Sci Rep*. 2016;6:38894.

Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, et al. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes*. 2010;59(7):1648-56.

Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature*. 2002;416(6880):485-7.

Xia P, Liu Y, Cheng Z. Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis. *Biomed Res Int*. 2016;2016:9583268.

Xu X, Ren J. Cardiac stem cell regeneration in metabolic syndrome. *Curr Pharm Des*. 2013;19(27):4888-92.

Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML. Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(6):391-403.

Yakar S, Liu JL, Fernandez AM, Wu Y, Schally AV, Frystyk J, et al. Liver-specific igf-1 gene deletion leads to muscle insulin insensitivity. *Diabetes*. 2001;50(5):1110-8.

Yang HF, Lin XJ, Wang XH. [Effects of aerobic exercise plus diet control on serum levels of total IGF-1 and IGF-1 binding protein-3 in female obese youths and adolescents]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2018;34(1):78-82.

Yoon YS. Cardiac regeneration with novel bone marrow-derived multipotent stem cells. *Discov Med*. 2005;5(26):204-8.

Zhang J, Liu XY, Tang CS. [Obesity and skeletal muscle remodeling]. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 2012;43(6):405-10.

Zhang Y, Ren J. Epigenetics and obesity cardiomyopathy: From pathophysiology to prevention and management. *Pharmacol Ther*. 2016.

Zhang Y, Yuan M, Bradley KM, Dong F, Anversa P, Ren J. Insulin-like growth factor 1 alleviates high-fat diet-induced myocardial contractile dysfunction: role of insulin signaling and mitochondrial function. *Hypertension*. 2012;59(3):680-93.

Zhao X, Huang L. Cardiac stem cells in patients with heart disease. *Exp Ther Med*. 2013 May; 5(5): 1273–1276.

ANEXOS

Tabela da composição da dieta AIN 93G modificada



Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Camila Luna UERJ
 Data 02/12/2014
 Validade 02/03/2015 Em geladeira 31/05/2015 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta AIN 93 G modificada
 Dose (g ou ml) 12.500 1 vezes
 Dose (Kg ou L) 12,50

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fonecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	40,40000%		1			5.050,000	5.050,000	
	CASEINA	20,00000%		1			2.500,000	2.500,000	
	AMIDO DEXTRINIZADO	13,20000%		1			1.650,000	1.650,000	
	SACAROSE	10,00000%		1			1.250,000	1.250,000	
	METIONINA	0,30000%		1			37,500	37,500	
	OLEO DE CANOLA	7,00000%		1			875,000	875,000	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%		1			625,000	625,000	
	CARBONATO DE CALCIO	1,31000%		1			163,750	163,750	
	CLORETO DE SODIO	0,28000%		1			32,500	32,500	
	CITRATO DE POTASSIO	0,25000%		1			31,250	31,250	
	FOSFATO DE POTASSIO	0,69000%		1			86,250	86,250	
	SULFATO DE POTASSIO	0,16000%		1			20,000	20,000	
	ELEM TRACOS MIX M AIN 93 G	0,14000%		1			17,500	17,500	
	BITARTARATO DE COLINA	0,25000%		1			31,250	31,250	
	COLESTEROL	0,00000%		1			-	-	
	BHT	0,00000%		1			-	-	
	MIX MINERAL G	0,00000%		1			-	-	
	MIX VIT	1,00000%		1			125,000	125,000	
		99,960%					12.495	12.495	

diluições: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Tabela da composição da dieta SF05 (Dieta Ocidental)



Quantidades produzidas de cada substância na fórmula

Pedido
 Cliente Camila Luna UERJ
 Data 02/12/2014
 Validade 02/03/2015 Em geladeira 31/05/2015 Em freezer
 Manipulador
 Formula Dieta SF05-031
 Dose (g ou ml) 12,500 1 vezes
 Dose (Kg ou L) 12,50

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml) qsp	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	13,20000%		1			1.650,000	1.650,000	
	CASEINA	19,50000%		1			2.437,500	2.437,500	
	AMIDO DEXTRINIZADO	2,24000%		1			280,000	280,000	
	SACAROSE	34,04000%		1			4.255,000	4.255,000	
	METIONINA	0,30000%		1			37,500	37,500	
	GHEE	21,00000%		1			2.625,000	2.625,000	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%		1			625,000	625,000	
	CARBONATO DE CALCIO	1,71000%		1			213,750	213,750	
	CLORETO DE SODIO	0,26000%		1			32,500	32,500	
	CITRATO DE POTASSIO	0,26000%		1			32,500	32,500	
	FOSFATO DE POTASSIO	0,69000%		1			86,250	86,250	
	SULFATO DE POTASSIO	0,16000%		1			20,000	20,000	
	ELEM TRACOS MIX M AIN 93 G	0,1400%		1			17,500	17,500	
	BITARTARATO DE COLINA	0,3100%		1			38,750	38,750	
	COLESTEROL	0,1500%		1			18,750	18,750	
	BHT	0,0040%		1			0,500	0,500	
	MIX MINERAL G	0,00000%		1			-	-	
	MIX VIT	1,00000%		1			125,000	125,000	
		99,964%					12.496	12.496	

diluições: 1/0000 em sacarose

Manipulado:

Aprovado:

Produto destinado a pesquisa. Isento de registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

Ghee produzido internamente com Manteiga Pura Aviação, lote 140, validade: 20-09-14.