



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

Luciana Lopes de Menezes

**Análise das células-tronco cardíacas residentes em modelo experimental de
obesidade**

Rio de Janeiro
2015

Luciana Lopes de Menezes

Análise das células-tronco cardíacas residentes em modelo experimental de obesidade

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a Dra. Lais de Carvalho

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

Rio de Janeiro

2015

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

M543 Menezes, Luciana Lopes de.
Análise das células-tronco cardíacas residentes em modelo experimental de
obesidade / Luciana Lopes de Menezes – 2015
79 f.

Orientadora: Laís de Carvalho.
Coorientadora: Erika Afonso Costa Cortez Marques.
Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia
Humana e Experimental.

1. Obesidade - Teses. 2. Dieta ocidental. 3. Células – tronco - Teses. 4.
Terapia Baseada em Transplante de Células e Tecidos. I. Carvalho, Laís de. II.
Marques, Erika Afonso Costa Cortez. III. Universidade do Estado do Rio de
Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-056.52

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

Assinatura

Data

Luciana Lopes de Menezes

Análise das células-tronco cardíacas residentes em modelo experimental de obesidade

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 15 de abril de 2015.

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

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Laís de Carvalho (Orientadora)

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. Loraine Campanati Araújo de Andrade

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

À Deus, em primeiro lugar, pois sem Ele esta jornada não seria cumprida.
À minha filha Beatriz que deu sentido a minha vida e tem me proporcionado grandes momentos de alegria e ao meu esposo e companheiro Matheus pelo amor, paciência e compreensão durante a trajetória deste trabalho.
À minha irmã Isabela e Luana pelo apoio imprescindível, com cuidados para com a Beatriz, e assim possibilitando a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Erika Cortez, por toda a dedicação ímpar, pelo acolhimento e acompanhamento durante todo este percurso acadêmico. Agradeço, também, por todos os conhecimentos compartilhados ao longo destes três anos que contribuíram de forma incomensurável para minha formação profissional.

À Prof^ª. Dr^ª. Lais de Carvalho, pela oportunidade a mim concedida, o acolhimento, confiança, apoio, ensinamentos e fundamentais aconselhamentos. Sempre serei grata por você ter aberto as portas pra mim. A você, o meu sincero obrigada.

À Prof^ª. Dr^ª. Ana Carolina Stumbo, Prof^ª. Dr^ª. Simone de Carvalho e À Prof^ª. Dr^ª. Alessandra Thole pelo apoio e conforto e preciosos ensinamentos.

À querida Fabiana Neves pela sua imensa contribuição para a conclusão deste projeto. Obrigada pelas gentilezas, pelo carinho, atenção, disponibilidade, companheirismo, ensinamentos, pelas intermináveis horas de W.B., nas quais me acompanhaste com muita dedicação e paciência. Muito obrigada.

Às pós-graduandas Genilza, Daniela, Daphne e Ana Lúcia pelos conhecimentos compartilhados, por todas as horas de dedicação e companheirismo, meu sincero obrigada.

Aos ICs João e Letícia pelo apoio na realização dos experimentos e demais tarefas. Vocês foram fundamentais. Muito obrigada.

Aos meus colegas do LPTC, por terem contribuído de forma direta ou indireta na conclusão deste trabalho.

À equipe técnica no departamento de Histologia e Embriologia – IBRAG – UERJ, em especial, Roberto e Joséfa. Sem os quais a realização dos experimentos não teria sido possível.

Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a *mim* decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir.

Cora Coralina

RESUMO

MENEZES, Luciana Lopes de. *Análise das células-tronco cardíacas residentes em modelo experimental de obesidade*. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

O processo de transição nutricional tem contribuído para o aumento dos índices de obesidade. Complicações cardíacas constituem a principal causa de mortalidade em pacientes obesos ou com diabetes tipo 2, nos quais um fornecimento aumentado de ácidos graxos está correlacionado com o aumento da adiposidade no coração e disfunção deste órgão. Ela promove hipertrofia, disfunção do ventrículo esquerdo (VE) e fibrose do miocárdio, além de danos ultraestruturais. O coração sempre foi concebido como um órgão pós-mitótico, no entanto, recentemente foi descoberta uma população de células-tronco cardíacas residentes (CTC) distribuídas pelo miocárdio, sugerindo um possível mecanismo de regeneração cardíaca. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da obesidade, induzida por dieta Ocidental desde o início da vida, sobre as CTCs. Para tanto, Camundongos *Swiss* machos de 21 dias foram divididos em: grupo controle (GC, N=8), alimentado com ração padrão AIN93G e grupo obeso (GO, N=8), alimentado com dieta ocidental, rica em carboidratos simples e gordura saturada. Os grupos receberam as dietas por 12 semanas, *ad libitum*. Para análise do desenvolvimento da obesidade foram aferidos: o peso corporal, os comprimentos naso-anal e da tíbia (CT), a glicemia, o peso da gordura epididimal, retroperitoneal e do coração. Após eutanásia, os corações foram coletados e processados para as técnicas: microscopia confocal, western blotting, citometria de fluxo, respirometria de alta-resolução e imunohistoquímica. A hipertrofia cardíaca foi estimada pela razão do peso do VE (PVE) e o CT. O GO apresentou um progressivo ganho de peso corporal em relação ao GC ($P<0,05$) e intolerância à glicose ($P<0,05$). A razão PVE/CT indicou hipertrofia cardíaca (131,82%, GO). A respirometria de alta resolução revelou disfunção mitocondrial, com redução da capacidade de oxidação de carboidratos e de ácidos graxos e aumento do desacoplamento mitocondrial ($P<0,001$). A análise da deposição de colágeno demonstrou um maior percentual de área corada por Picro-Sírius no GO ($P<0,0001$) e maior conteúdo de colágeno I ($P<0,01$), colágeno III ($P<0,05$) e MMP-9 ($P<0,02$), além de apresentar menor conteúdo de MMP-13 ($P<0,01$), indicando fibrose. Além disso, o GO apresentou redução no conteúdo de CD133 ($P<0,037$), c-Kit ($P<0,006$) e conexina 43 ($P<0,02$), quando comparado ao GC. Ademais, o GO apresentou aumento das proteínas pró-apoptóticas, demonstrando uma razão BAX/Bcl-2 maior que o GC ($P<0,0075$). A partir destes resultados, podemos concluir que a obesidade acarreta em alterações estruturais no coração, com o remodelamento adverso da matriz extracelular, menor acoplamento iônico entre os cardiomiócitos, disfunção do metabolismo energético e aumento da apoptose. Essas alterações estão associadas a um comprometimento e redução das CTC (c-Kit⁺) e Células progenitoras endoteliais (CD133⁺), o que sugere uma redução da capacidade regenerativa do órgão frente às injúrias.

Palavras chaves: Obesidade. Dieta ocidental. Células-tronco cardíacas residentes. Terapia celular.

ABSTRACT

MENEZES, Luciana Lopes de. *Analysis of resident cardiac stem cells in an experimental model of obesity*. 2015. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

The nutritional transition process has contributed to growing obesity rates. Cardiac complications constitute the main mortality cause in obese or type 2 diabetic patients, in which an increased fatty acid offer is related to the increased heart adiposity and dysfunction. Obesity promotes cardiac hypertrophy, left ventricle (LV) dysfunction, cardiac fibrosis and ultrastructural damage. For a long time, the heart has been known as a post-mitotic organ; however, it was recently discovered a resident cardiac stem cells (CSC) population distributed throughout the myocardium, suggesting a possible mechanism of cardiac regeneration. The aim of this work was to evaluate the effects of western diet induced obesity over CSC. For this purpose, 21d old - male *Swiss* mice were divided into control group (CG, N = 8), fed standard chow AIN93G and obese group (OG, N = 8), fed Western diet rich in simple carbohydrates and saturated fat. All groups were followed up for 12 weeks, with food and water *ad libitum*. To verify if western diet was able to induce obese mice, it was measured: body weight, naso-anal length, tibia length, fasting glucose, epididymal and retroperitoneal fat weight, and heart weight. After euthanasia, the hearts were collected and processed for the following techniques: confocal microscopy, western blotting, flow cytometry, high-resolution respirometry and immunohistochemistry. Cardiac hypertrophy was analyzed by left ventricle weight/tibia length ratio. OG presented a progressive weight gain ($P < 0.05$) and glucose intolerance ($P < 0.05$) compared to CG. Left ventricle weight/tibia length ratio indicated cardiac hypertrophy (131.82%, OG). High-resolution respirometry revealed mitochondrial dysfunction, with a significant reduction in carbohydrate and fatty acid oxidation capacity and increased mitochondrial uncoupling ($P < 0.001$). The analysis of collagen deposition showed a higher percentage of area stained by Sirius red in GO ($P < 0.0001$), and also increased contents of collagen I ($P < 0.01$), collagen III ($P < 0.05$), MMP-9 ($P < 0.02$) and MMP-13 ($P < 0.01$), indicating fibrosis. In addition, OG presented decreased contents of CD133 ($P < 0.037$), c-Kit ($P < 0.006$) and connexin 43 ($P < 0.02$), compared to CG. Moreover, OG demonstrated increased proapoptotic proteins, with a higher BAX/Bcl-2 ratio than CG ($P < 0.0075$). Taking all these results, we can conclude that obesity leads to structural heart modifications, with extracellular matrix adverse remodeling, decreased cardiomyocytes ionic coupling, energetic metabolism dysfunction and increased apoptosis. These changes are related to an impairment and reduction of CSC (c-Kit⁺) and endothelial progenitor cells (CD133⁺), suggesting a reduced regenerative capacity of the heart against injuries.

Keywords: Obesity. Western diet. Resident cardiac stem cells. Cellular therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Mapa da Obesidade Mundial.....	18
Figura 2 –	Secreção de adipocitocinas inflamatórias na obesidade.....	23
Figura 3 –	Esquema representativo do aumento da expressão de MMP-9 no coração.....	27
Figura 4 –	Esquema representativo da presença de células-tronco residentes cardíacas em nicho por entre milhares de cardiomiócitos.....	29
Figura 5 –	Esquema representativo do potencial de diferenciação das células-tronco	32
Figura 6 –	Microscopia de luz do coração de camundongos GC e GO, coloração de rotina H&E, tecido hepático.....	48
Figura 7 –	Microscopia de luz do coração de camundongos GC e GO corados com Picro Sírius.....	50
Figura 8 –	Quantificação de proteínas por western blotting. Análise da expressão de colágeno I e III.....	51
Figura 9 –	Quantificação de proteínas por western blotting. Análise da expressão MMP-9 e MMP-13 nos GC e GO.....	52
Figura 10 –	Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas de camundongos dos grupos controle e obeso, submetidas aos substratos relacionados à oxidação de carboidratos.....	54
Figura 11 –	Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas de camundongos dos grupos controle e obeso, submetidas aos substratos relacionados à oxidação de ácidos graxos.....	55
Figura 12 –	Quantificação de proteínas por western blotting. Análise da razão da expressão de BAX/Bcl-2 nos GC e GO.....	57
Figura 13 –	Microscopia confocal do coração imunomarcado com anticorpos anti-c-Kit e anti-CD45.....	58
Figura 14 –	Gráficos de citometria de fluxo, quantificação Ckit ⁺ Lin ⁻ e CD133 nos GC e GO. Análise por western blotting da expressão de CD133 nos GC e GO.....	59
Figura 15 –	Quantificação de proteínas por western blotting. Análise da expressão de Conexina 43 nos GC e GO.....	60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 – Evolução de indicadores na população de 20 + anos de idade, por sexo – Brasil – períodos 1974-75, 1989, 2002-2003 e 2008-2009.....	19
Gráfico 2 – Evolução de indicadores antropométricos na população de 10 a 19 anos de idade, por sexo – Brasil – períodos 1974-75, 1989 e 2008-2009.....	20
Quadro 1 – Composição das dietas controle e ocidental.....	38
Quadro 2 – Concentração dos anticorpos primários e secundários utilizados no Western blotting.....	44
Gráfico 3 – Consumo alimentar calórico de camundongos Swiss submetidos às dietas controle e ocidental.....	45
Gráfico 4 – Evolução da massa corporal de camundongos Swiss submetidos à dieta controle e dieta ocidental.....	46
Gráfico 5 – Teste intraperitoneal de tolerância à glicose Microscopia de luz do coração de camundongos GC e GO, coloração de retina H&E, tecido hepático.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Tecido Adiposo – proteínas relacionadas com a inflamação.....	22
Tabela 2 –	Massa corporal, comprimento naso-anal, gordura epididimal, gordura retroperitoneal, fígado e glicemia de jejum de camundongos Swiss submetidos à dieta controle e ocidental.....	47
Tabela 3 –	Estimativa de hipertrofia cardíaca através das medidas do ventrículo esquerdo e comprimento da tíbia dos grupos com dieta controle e ocidental.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACR - razão do controle acceptor
ADP- Adenosina difosfato
ATP- Adenosina trifosfato
BAX- gene Bax
Bcl-2- família de proteína reguladora de apoptose
BSA- bovinos Serumalbumin
°C- Grau centígrado
¹⁴C- isótopo radioativo do carbono
¹⁴CO₂- dióxido de carbono, isótopo radioativo ¹⁴C
Ca- Cálcio
CD133+- Células positivas para o antígeno de superfície CD133. Células progenitoras endoteliais
Cecal/FIOCRUZ- Centro de Criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz
c-Kit - relativo a células que expressão C-Kit
cm- centímetro
CPE- células progenitoras endoteliais
CT - comprimento da tíbia
CTC - células-tronco cardíacas residentes
CTMO- células mononucleares de medula óssea
DCNT - doenças crônicas não transmissíveis
DMEM- Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA- Ácido desoxido ribonucleico
EGTA- ethylene glycol tetraacetic acid
EROs - espécies reativas de oxigênio
Fig – figura
g- grama
g/Kg – grama por quilogramas
g/L, - grama por litro
GC – grupo controle
GO – grupo Obeso
h- horas
H&E – Hematoxilina e eosina
HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN- γ - interferon-gama
IL-1 β – interleucina-1 β
IL-2 - interleucina-2
IL-6 - interleucina-6
IMC- Índice de massa corpórea
K- Potássio

K₂HPO₄- Fosfato de Potássio dibásico
Kcal/g- Caloria por grama
Lin⁻ - Linhagem hematopoiética negativa
LPA- Lipoproteína A
MC - massa corporal
MEC - matriz extracelular
mg- miligrama
mg/dl - Miligrama por decilitro
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
min- minuto
miRNA - micro RNA
mL – mililitros
ml/g- mililitro por grama
mM - Milimol
MMP-13 – metaloproteinase-13
MMP-2- metaloproteinase-2
MMP-9 – metaloproteinase-9
MMPs- Metaloproteinases
N- número amostral
Na- Sódio
NaOH – Hidróxido de Sódio
nmol- Nanomol
OMS- Organização Mundial da Saúde
PBS- Phosphate Buffered Saline
PF - peso do fígado
pH- Potencial hidrogeniônico
PI3K- enzima fosfatidilinositol-3-cinase, do inglês phosphatidylinositol-3-kinase
pmol - Picromol
POF - Pesquisa de Orçamentos Familiares
PVE- Peso do ventrículo esquerdo
PVE/CT – razão entre peso do ventrículo esquerdo e comprimento da tíbia
RCR - razão do controle respiratório
RNA- ácido ribonucleico
RPM - Rotações por minuto
Sca-1⁺- relativo a células que expressão Sca-1⁺
TBS - Tampão salina tris
TEMED- Tetra metil etileno diamino
TIMP- família de enzimas reguladoras das metaloproteinases
TITG - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa (Tumor necrosis factor- α).
USA- United States of América
VE - ventrículo esquerdo
 μ g/ml - Micrograma por mililitros
 μ M – micro Mol

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1	TRANSIÇÃO NUTRICIONAL	17
2	OBESIDADE	18
2.1	Obesidade: processos inflamatórios	21
2.2	Obesidade: doenças cardiovasculares	25
3	CORAÇÃO: UM ÓRGÃO PÓS-MITÓTICO?	29
4	TERAPIA CELULAR: CÉLULAS-TRONCO CARDÍACAS RESIDENTES	32
5	OBJETIVOS	36
5.1	Objetivos específicos	36
6	MATERIAIS E MÉTODOS	37
6.1	Animais e modelo experimental de obesidade	37
6.2	Desenho experimental	38
6.3	Eutanásia	39
6.4	Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)	40
6.5	Respiração mitocondrial	40
6.5.1	<u>Obtenção de fibras cardíacas permeabilizadas</u>	40
6.5.2	<u>Respirometria de alta resolução</u>	41
6.6	Citometria de fluxo	41
6.7	Processamento do material histológico	42
6.8	Imunomarcção	42
6.9	Análise quantitativa de colágeno (fibrose)	42
6.10	Western blotting	43
6.11	Análises estatísticas	44
7	RESULTADOS	45
7.1	Comportamento alimentar	45
7.2	Parâmetros biométricos	46
7.2.1	<u>Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)</u>	47
7.2.2	<u>Estimativa de esteatose hepática</u>	48
7.2.3	<u>Estimativa de hipertrofia cardíaca</u>	49
7.2.4	<u>Análise de remodelamento de matriz-extracelular: estimativa de fibrose</u>	50

7.2.5	<u>Análise das metaloproteinases: MMP-9 e MMP-13</u>	52
7.3	Respiração mitocondrial e consumo de oxigênio nas fibras cardíacas	53
7.4	Análise de morte celular programada	56
7.5	Análise das células-tronco cardíacas residentes e células progenitoras endoteliais	58
7.6	Análise da conexina 43	60
8	DISCUSSÃO	61
	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO A - Dieta Controle: artigo Tikellis <i>et al.</i> (2008).....	77
	ANEXO B - Dieta Ocidental: artigo Tikellis <i>et al.</i> (2008).....	79

INTRODUÇÃO

O comportamento alimentar é um reflexo da interação de fatores fisiológicos, genéticos, psicológicos e das condições ambientais e sociais às quais os indivíduos estão expostos desde o útero (XU J & SINCLAIR KD, 2015). Há, em condições normais, um equilíbrio fisiológico no consumo e no gasto de energia, no qual o sistema nervoso central é responsável pela regulação do balanço energético, por meio de ajustes na ingestão alimentar, gasto e estoque de energia (GALE *et al.*, 2004; RUI L., 2013). Em alguns casos, no entanto, esse equilíbrio é alterado, sem prejuízos, tal como acontece no desenvolvimento da criança até a idade adulta e, também, na gravidez e no envelhecimento. As alterações que, por ventura, ocorram no sistema de controle do apetite em condições patológicas estão associadas, em grande medida, às mudanças no comportamento alimentar, as quais, por sua vez, resultam em distúrbios alimentares e desenvolvimento de obesidade (KENNEDY *et al.* 2001; LOH K *et al.*, 2015).

São intrínsecas ao controle do comportamento alimentar, além do âmbito fisiológico, outras variáveis, tais como: o meio ambiente, as condições socioeconômicas, e o contexto psicológico. No que se refere ao contexto socioeconômico destaca-se, sobretudo, a mudança na produção de alimentos observada nas últimas décadas. Esta transição tecnológica levou às mudanças no perfil alimentar e nutricional da população, definida por POPKIN (2011) como “*transição nutricional*”, a qual se atribui uma das principais causas da obesidade.

A obesidade está associada, entre outras doenças crônicas, com aumento de morbimortalidade, doenças cardiovasculares, diabetes, câncer e desordens musculares (ZALESIN *et al.*, 2011). Neste contexto, as complicações cardíacas constituem a principal causa de mortalidade em pacientes obesos ou com diabetes tipo 2. Nesses casos, o fornecimento aumentado de ácidos graxos está correlacionado com o aumento da adiposidade no coração e disfunção cardíaca (GUZZARDI & IOZZO, 2011). Além disso, a obesidade promove hipertrofia, disfunção do ventrículo esquerdo e fibrose do miocárdio. Podendo, também, ocorrer danos ultraestruturais aos cardiomiócitos (desorganização dos miofilamentos, aumento da deposição lipídica e alterações mitocondriais). Por consequência, o conjunto desses eventos leva ao comprometimento da função cardíaca e do metabolismo energético do coração (PARENTE *et al.*, 2008; LEOPOLDO *et al.*, 2010; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2011; LACERDA-MIRANDA *et al.*, 2012; COSTA *et al.* 2012; WONG & TAN, 2014; NEVES, CORTEZ *et al.*, 2014).

A hipertrofia patológica ou fisiológica, fibrose após morte celular e baixa incidência de tumores, fundamentaram a hipótese que assegura que o coração é um órgão pós-mitótico. Isso implica em dizer que se trata de um órgão terminalmente diferenciado e incapaz de originar novos cardiomiócitos após uma lesão (FERNANDES & PERIN, 2007). Pesquisas recentes, porém, demonstraram que, mesmo em pequena proporção, o coração adulto apresenta uma capacidade de renovação dos cardiomiócitos (BERGMAN, 2009). Outros pesquisadores, tais como WOO *et al* (2001), BELTRAMI *et al* (2003), ELLISON *et al* (2011; 2012), CHEN *et al* (2012), HONG *et al* (2014) e HAYASHI *et al* (2015) demonstraram a presença de uma população de células primitivas distribuídas pelo miocárdio, capazes de proliferarem quando expostas aos estímulos específicos. Essas descobertas possibilitaram inferir, por hipótese, a existência de um possível mecanismo de regeneração miocárdica. Tais células foram identificadas pela presença de marcadores de superfície (células c-kit⁺, Sca-1⁺ e Lin⁻) e são células auto-renováveis, clonogênicas e multipotentes. Desta forma, são capazes de dar origem a cardiomiócitos, células musculares lisas e células endoteliais, *in vitro* e *in vivo*, contribuindo para o remodelamento cardíaco (BELTRAMI *et al.*, 2003).

Estima-se que a causa morte em seres humanos por doenças cardiovasculares crescerá de 16,7 milhões em 2002 para 23,3 milhões em 2030 (OMS, 2011). Em contrapartida, as terapias médicas disponíveis até o momento podem melhorar os efeitos da insuficiência cardíaca, porém, não são capazes de reverter a perda de miocárdio funcional. O tratamento atualmente disponível para reverter a insuficiência cardíaca avançada é o transplante cardíaco, o qual não se apresenta como uma estratégia abrangente para toda a população cardiopata, pois é limitado pela pequena oferta de doadores. A concepção de uma estratégia terapêutica regenerativa eficaz tem se tornado, portanto, primordial na ciência cardiovascular moderna. Neste sentido, recentes avanços dos estudos da biologia das células-tronco oferecem grandes perspectivas na terapia cardíaca (PTASZEK *et al.*, 2012).

1 TRANSIÇÃO NUTRICIONAL

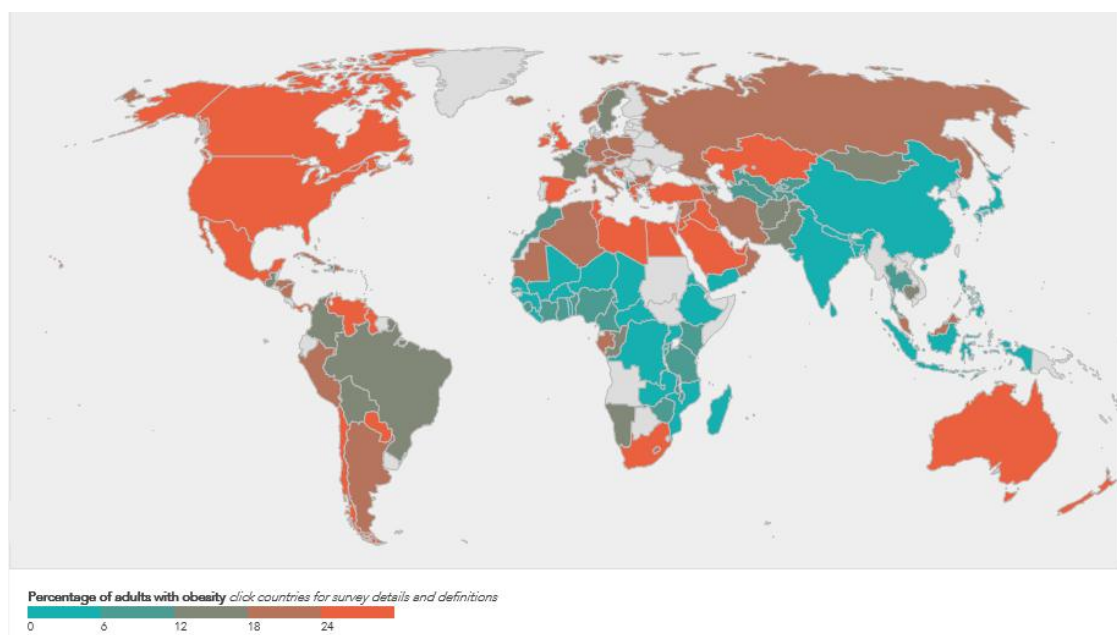
O mundo tem experimentado, nas últimas décadas, uma profunda transição tecnológica na produção de alimentos. Estas mudanças correspondem ao aumento do processamento, além da alteração da composição de produtos alimentares (POPKIN, 2001). Como descrito acima, as mudanças no perfil alimentar e da nutrição da população Ocidental foram definidas por POPKIN em 2011 como “*transição nutricional*”. A obesidade, apesar de ter um caráter multifatorial, está profundamente relacionada a estas mudanças, nas quais os indivíduos passam a consumir alimentos extremamente calóricos, ricos em gordura saturada, sal e açúcar. Esse novo *status* nutricional foi denominado como “*Dieta Ocidental*” ou, em inglês, “*Western Diet*” (SICHERI, 1998; OMS, 1998; ABESO, 2001; ASTRUP, 2001; KAC & VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2003; MENDONÇA & ANJOS, 2004; OMS, 2005; BRASIL, 2006; POPKIN, 2011; TEERDS *et al.*, 2011). Aliada a uma diminuição de atividades físicas, a transição nutricional leva, por conseguinte, ao aumento excessivo de gordura corporal, o qual está, por sua vez, correlacionado aos efeitos negativos à saúde (MONDA KL, *et al.*, 2007; Ng SW *et al.*, 2006, POPKIN *et al.* 2011). Assim, a dieta ocidental é considerada um fator determinante para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Neste caso, têm-se como exemplos mais expressivos as doenças cardiovasculares e a Síndrome Metabólica (MENDONÇA & ANJOS, 2004; ZAMBON *et al.*, 2009).

2 OBESIDADE

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a obesidade é definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que pode atingir graus capazes de afetar a saúde. Pode estar associada a um desequilíbrio nutricional e a distúrbios genéticos e/ou endocrinometabólicos (FISBERG M, 1995). Em geral, o excesso de ganho de peso ocorre devido ao desequilíbrio energético, que conta com uma excessiva ingestão de energia, particularmente, de alimentos com alto teor energético, e um estilo de vida sedentária (POPKIN, 2011; KANTER *et al.*, 2015). Segundo estudos da OMS, a prevalência da obesidade tem aumentado expressivamente no mundo, particularmente nos países em desenvolvimento, onde a trajetória de vida é mais acentuada que nos países desenvolvidos (Figura 1).

Com relação à população mundial, o último relatório da OMS apontou a presença de 1,3 bilhão de indivíduos com sobrepeso (índice de massa corpórea [IMC] >25) e mais de 300 milhões com obesidade ([IMC] >30). A OMS estima que, mundialmente, 23% dos adultos com mais de 20 anos tem sobrepeso. Nos Estados Unidos, a percentagem de indivíduos com sobrepeso e obesidade já chega a 68% da população adulta.

Figura 1 - Mapa da Obesidade Mundial. Percentual de adultos com obesidade



Fonte: Disponível em: <http://www.worldobesity.org/aboutobesity/world-map-obesity/>. Acesso em 18 jan 2015.

Enquanto no Brasil, de acordo com os últimos dados do IBGE, entre a população adulta, 49% apresenta excesso de peso e 14,8% obesidade. O resultado da Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), do IBGE em parceria com o Ministério da Saúde, mostrou que os brasileiros não estão se alimentando adequadamente. Segundo a pesquisa, 38,8 milhões de pessoas com 20 anos ou mais de idade estão acima do peso, o que representa 40,6% da população total do país. E, dentro deste grupo, 10,5 milhões são obesos. O excesso de peso em homens adultos saltou de 18,5% para 50,1% e ultrapassou, em 2008-09, o das mulheres, que foi de 28,7% para 48% (Gráfico 1). No entanto, os dados revelam que não apenas os brasileiros acima dos 20 anos têm apresentado aumento de peso, há um aumento do sobrepeso e da obesidade infantil. Em 2009, uma em cada três crianças de 5 a 9 anos estavam acima do peso recomendado pela (OMS). A parcela dos meninos e rapazes de 10 a 19 anos de idade com excesso de peso passou de 3,7% (1974-75) para 21,7% (2008-09), já entre as meninas e moças o crescimento do excesso de peso foi de 7,6% para 19,4% (Gráfico 2). A POF também observou que o aumento contínuo de excesso de peso ocorreu em todas as regiões brasileiras.

Gráfico 1 – Evolução de indicadores na população de 20+ anos de idade, por sexo – Brasil – períodos 1974-75, 1989, 2002-2003 e 2008-2009

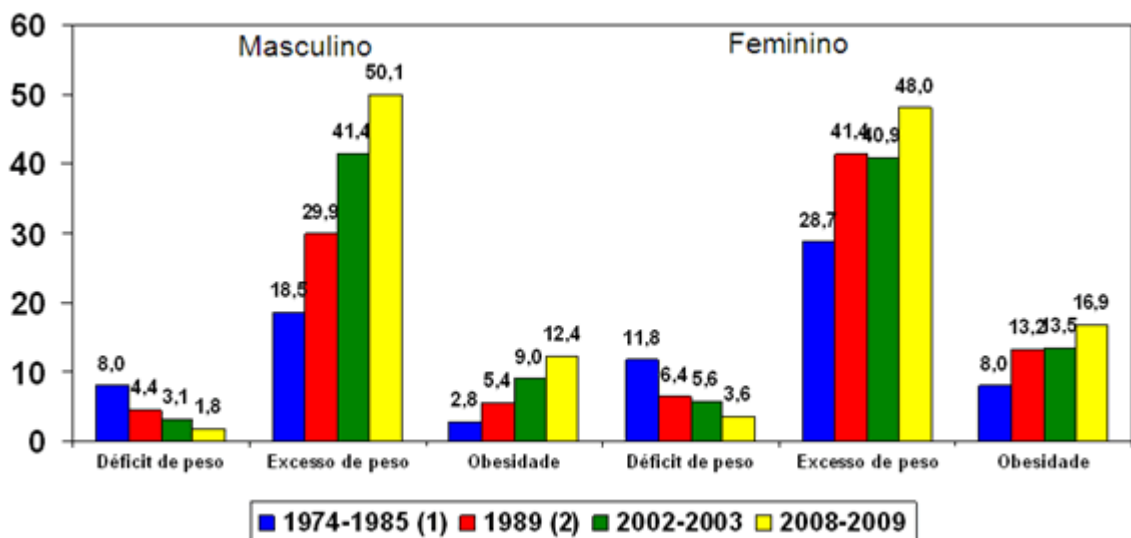
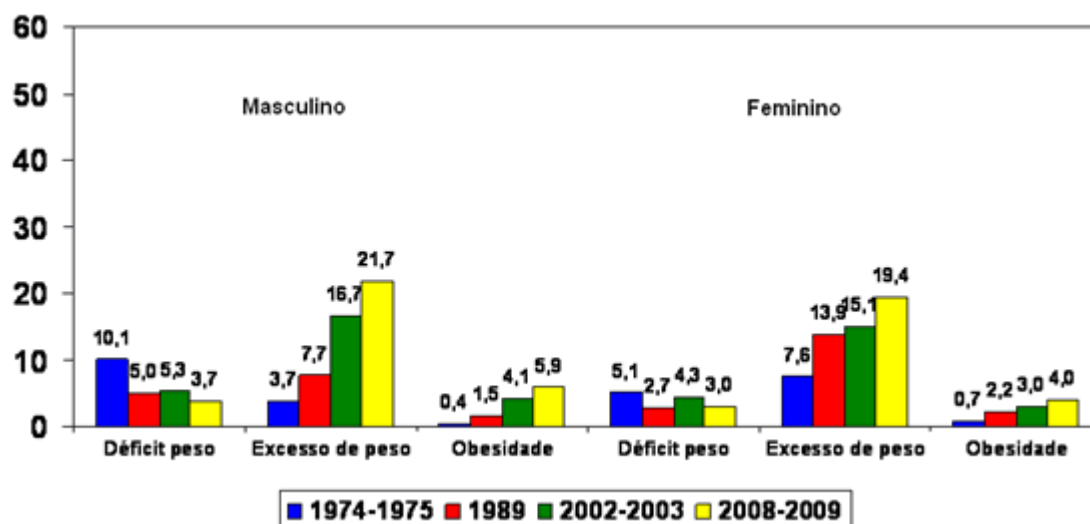


Gráfico 2 – Evolução de indicadores antropométricos na população de 10 a 19 anos de idade, por sexo – Brasil – períodos 1974-75, 1989 e 2008-2009



Fonte: IBGE, comunicação social Agosto de 2010.

Neste cenário, a epidemia mundial de obesidade é um fenômeno importante para a saúde pública com graves impactos econômicos (LAWLOR & CHATURVEDI, 2006; SICHIERI *et al.*, 2012). Ela está associada ao surgimento de doenças crônicas e ao aumento da morbimortalidade e incapacidade dos pacientes e, por conseguinte, responsável por onerar os serviços de saúde, além de comprometer a qualidade de vida e a produtividade.

A fim de melhor compreender as variáveis relacionadas ao fenômeno da obesidade, diversos esforços estão sendo realizados no campo da pesquisa em modelos experimentais e clínicos, assim como, campanhas publicitárias de cunho educativo. Estas iniciativas têm como objetivo a elaboração de estratégias de políticas públicas para reverter ou mitigar esta epidemia. As pesquisas têm apontado que, embora a obesidade tenha um caráter multifatorial, os principais fatores geradores do rápido crescimento dos índices de obesidade estão relacionados aos aspectos culturais e socioeconômicos, isto é, nas escolhas dos alimentos, predominantemente, *fast food* – ricos em gordura saturada, sal e açúcar (SICHIERI, 1998; OMS, 1998; ABESO, 2001; ASTRUP, 2001; KAC & VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2003; MENDONÇA & ANJOS, 2004; OMS, 2005; BRASIL, 2006; POPKIN, 2011; TEERDS *et al.*, 2011), no estilo de vida sedentário, e por fim, o desenvolvimento econômico, que está correlacionado ao aumento da renda familiar, que possibilita a inserção de novas classes sociais no padrão de

consumo Norte Americano, que passam rapidamente de um status nutricional de desnutrição para a obesidade (POPKIN 2011).

2.1 Obesidade: processos inflamatórios

A obesidade é, portanto, um problema de saúde pública que tem alcançado proporções epidêmicas, com um aumento da prevalência em todo o mundo (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013). O advento global da obesidade aumenta o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas crônicas (MENDONÇA & ANJOS, 2004; ZAMBON *et al.*, 2009). Estas doenças estão associadas com uma condição de inflamação sistêmica permanente (TALL AR *et al.*, 2015). Semelhante status é influenciado pela ativação do sistema imune por intermédio do tecido adiposo, que promove um aumento na produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (EROs) (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013; GRANT RW *et al.*, 2015). À vista disso, tal condição é característica de várias doenças crônicas, como: síndrome metabólica, diabetes, hipertensão, esteatose hepática não alcoólica, alguns tipos de câncer e doenças cardiovasculares (ZALESIN *et al.*, 2011; ZANG *et al.*, 2011; JUNG & CHOI, 2014). Logo, estas evidências demonstram o notável papel desempenhado pelo tecido adiposo na resposta inflamatória no contexto da obesidade e patogênese das doenças correlacionadas. Dentre as complicações citadas, as doenças cardíacas constituem a principal causa de mortalidade em pacientes obesos ou com diabetes tipo 2, nos quais um fornecimento aumentado de ácidos graxos está correlacionado com o aumento da adiposidade no coração e disfunção cardíaca (GUZZARDI E IOZZO, 2011).

A obesidade também é definida como o acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal, ou em outras palavras, aumento do tecido adiposo (OMS). Este tecido contém vários tipos celulares, incluindo principalmente: adipócitos, pré-adipócitos, células endoteliais e células do sistema imunológico (MARSEGLIA *et al.*, 2015). O tecido adiposo é responsável pela reserva energética, mobilizando ácidos graxos para a produção de energia (AIRES *et al.*, 2012). Esta reserva é de vital importância como mecanismo adaptativo, uma vez que garante a sobrevivência em situações de escassez de recursos. Além disso, ZHANG *et al.* (1994) demonstraram que este tecido também possui funções endócrinas, sendo ele identificado como a fonte do hormônio leptina. Tal observação motivou novos esforços investigativos

acerca dos fatores expressos no tecido adiposo. Hoje se sabe que os adipócitos sintetizam e liberam uma variedade de fatores, além da sua capacidade de depositar e mobilizar triglicerídeos, retinóides e colesterol (WAJCHENBERG, 2000; KERSHAW *et al*, 2004; JUNG & CHOI, 2014). Dentre os fatores expressos e secretados pelo tecido adiposo destacam-se as proteínas que estão envolvidas na ativação dos processos inflamatórios (Tabela 1). Estas se distinguem, pois, a obesidade está associada com inflamação sistêmica (GUZZARDI & IOZZO, 2011; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al*, 2013; JUNG & CHOI, 2014; GRANT RW *et al*, 2015).

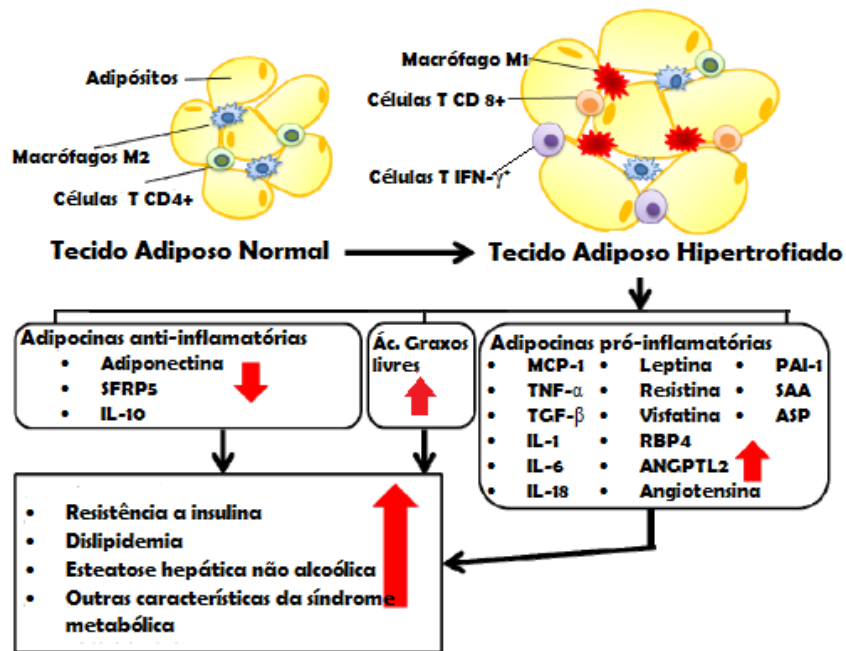
Tabela 1 - Tecido Adiposo – proteínas relacionadas com a inflamação

Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)
Interleucina-6 (IL-6)
Interleucina-1 β (IL-1 β)
Leptina
Adiponectina
Resistina
Proteína estimuladora de acilação
SSA3
Fator de inibição de macrófago
α 1 Glicoproteína Ácida
Pentraxina 3 (PTX3)
IL-1 receptor agonista

Fonte: Brent E. WISSE J Am Soc Nephrol 15: 2792–2800, 2004

Para melhor compreender a ponte entre a obesidade e o sistema imunológico, faz-se necessário, em primeiro lugar, esclarecer os mecanismos nos quais o tecido adiposo está envolvido na resposta imune. O tecido adiposo é um órgão endócrino e sua principal função é detectar e gerenciar o status energético global do organismo (KERSHAW *et al*, 2004). Para tanto, ele está envolvido em diversas vias metabólicas, dentre elas, a liberação de hormônios e adipocitocinas envolvidas na modulação da resposta imunológica, como por exemplo: Leptina, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Figura 2) (MIN DING *et al*, 2012; JUNG & CHOI, 2014). Outro evento observado no aumento deste tecido é o recrutamento de macrófagos, que no processo inflamatório tem um papel de destaque na produção de citocinas pró-inflamatórias e EROs (CRUVINEL *et al*, 2010; MARQUES & LANGOUCHE, 2013; JUNG & CHOI, 2014).

Figura 2 – Secreção de adipocitocinas inflamatórias na obesidade



Fonte: Adaptado de Jung & Choi (2014).

O aumento excessivo deste tecido na obesidade induz à perda da sua função (VÁZQUEZ-VELA, 2008). Posto que, a hipertrofia destas células resulta no aumento da expressão destes fatores e, por consequência, um aumento da ativação do sistema imune (RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ *et al*, 2013). Por fim, todos esses eventos conduzem ao desequilíbrio da lipogênese/lipólise, orientando a balança em favor da lipólise, e assim, intensificando o lançamento de ácidos graxos na circulação (JUNG & CHOI, 2014). Em sinergia a estes eventos, verificam-se danos correlacionados com a desregulação de enzimas-chave envolvidas na degradação intracelular de triglicerídeos (JOCKEN *et al*, 2007; McQUAID *et al*, 2011). Desta forma, os adipócitos disfuncionais contribuem para uma utilização anormal dos ácidos graxos, causando lipotoxicidade, aumento de citocinas pró-inflamatórias e EROs e, assim, corroborando para o quadro inflamatório crônico constatado na obesidade (MARSEGLIA *et al*, 2015).

A leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo, e sua expressão e secreção são proporcionais à adiposidade corporal (CONSIDINE RV *et al*, 1996; MIN DING *et al*, 2012). É principalmente conhecida pela sua ação anorexígena, através da sinalização no hipotálamo.

Além disso, tem ação sobre a modulação do sistema imune (STOJSAVLJEVIĆ *et al*, 2014; JUNG & CHOI, 2014). Em razão de promover o aumento de EROs, o aumento da atividade fagocítica dos macrófagos, indução da síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6, IL-2), e interferon-gama (IFN- γ), exercendo o seu efeito sobre várias células, por exemplo, células T, monócitos, neutrófilos e células endoteliais (HUKSHORN *et al*, 2004).

As interações entre leptina e inflamação são bidirecionais: o aumento de citocinas pró-inflamatórias aumenta a resposta à síntese de leptina, que por sua vez, faz manutenção do status inflamatório (PAZ-FILHO *et al*, 2012). Ademais, a leptina está intrincada com a melhora da sensibilidade à insulina no fígado e no músculo esquelético, além de regular a função das células β pancreáticas (MARROQUÍ *et al*, 2012).

Na obesidade, todavia, o aumento dos níveis séricos da leptina não resulta em atenuação do apetite. Assim, postula-se que a aparente diminuição dos efeitos anorexígenos é o resultado de um mecanismo de resistência à leptina (FONSECA-ALANIZ *et al*, 2007; RAHMOUNI, 2007; KOUIDHI *et al*, 2010). Observa-se, ainda, uma hiperleptinemia, tal como demonstrado nos estudos de FRIEDMAN *et al* (1998), onde os indivíduos obesos apresentavam um aumento da expressão de mRNA da leptina no tecido adiposo e na circulação.

Na resistência à insulina ocorre a diminuição da capacidade dos tecidos para responder à sua ação. O tecido adiposo é um dos tecidos responsivos a este hormônio, onde sua ação está envolvida no estímulo do armazenamento de triglicerídeos (MARQUES & LANGOUCHE, 2013). Este evento ocorre através de vários mecanismos, incluindo a promoção da diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (MARSEGLIA *et al*, 2015), o que resulta no aumento da absorção de glicose e de ácidos graxos derivados de lipoproteínas da circulação e lipogênese em adipócitos maduros (KAHN *et al*, 2000).

Através da ativação da via de sinalização PI3K e Akt, a insulina também atua como um anti-lipolítico, limitando a liberação de ácidos graxos a partir de adipócitos, isto por que, a ativação destas vias inibe a lipase hormônio sensível (MARSEGLIA *et al*, 2015).

Estabelecida a resistência à insulina, agrava-se a lipólise e, por consequência, o lançamento de ácidos graxos na circulação sanguínea (MARQUES & LANGOUCHE, 2013). A sobrecarga de ácidos graxos promove o aumento de sua oxidação e o acúmulo de triglicerídeos e metabólitos intermediários – que são desviados para vias não oxidativas, dando origem a intermediários lipotóxicos e pró-apoptóticos (GUZZARDI & IOZZO, 2011). Estes podem estar envolvidos em prejuízos à sinalização do cálcio, da β -oxidação e da utilização de glicose (SCHENK *et al*, 2008; GUZZARDI & IOZZO, 2011). Tais eventos estão fortemente correlacionados à disfunção mitocondrial, que resulta no aumento de EROs

e, portanto, uma retroalimentação positiva do status inflamatório, além do comprometimento das demais funções desta organela (GUZZARDI & IOZZO, 2011). Intermediários de ácidos graxos no miocárdio (lipoproteína A - LPA), ácido fosfatidil, diacilglicerol e ceramidas resultam no comprometimento e saturação da oxidação de ácidos graxos e ou de vias bioenergéticas e são responsáveis pela resposta inflamatória (GUZZARDI & IOZZO, 2011).

Todos esses eventos estão correlacionados a diversas doenças metabólicas crônicas, dentre elas, as cardiovasculares assumem papel de destaque, uma vez que complicações cardíacas constituem a principal causa de mortalidade em pacientes obesos ou com diabetes do tipo 2 (OMS). Diante das evidências apresentadas, podemos concluir que o acúmulo de triglicerídeos, aumento de EROs, além do cenário de inflamação crônica e de baixa intensidade, estão associados com a hipertrofia cardíaca e disfunção do ventrículo esquerdo (GUZZARDI & IOZZO, 2011).

2.2 Obesidade: doenças cardiovasculares

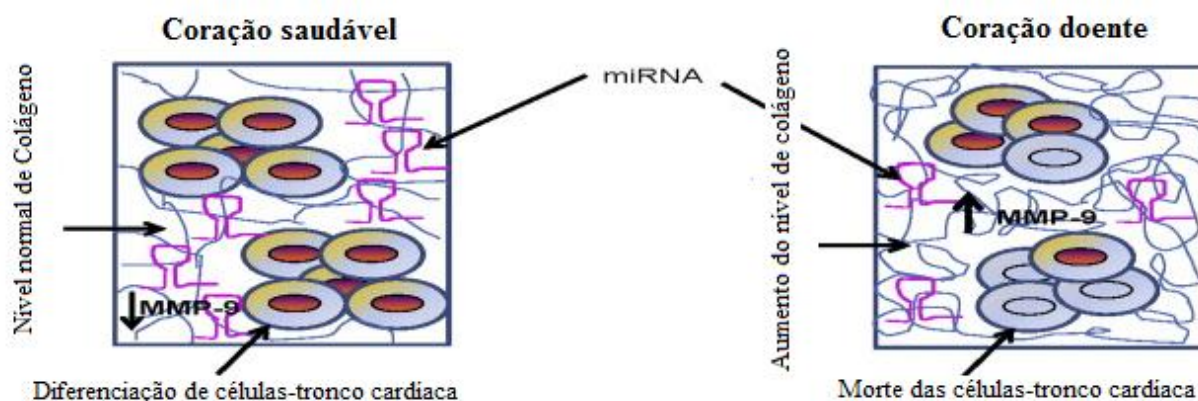
A ampla adesão populacional a produtos industrializados ricos em gordura saturada, hidratos de carbono simples e sal – a dieta ocidental (POPKIN, 2011), é apontada como a principal causa da obesidade. Pesquisas indicam que ácidos graxos saturados tem maior efeito obesogênico (SELVA *et al*, 2006). Este efeito é explicado pela sua baixa eficiência energética, sendo constantemente acilado em triglicerídeos e armazenados no tecido adiposo, enquanto os ácidos graxos poliinsaturados e monoinsaturados possuem alta eficiência energética e, portanto, são facilmente metabolizados para a produção de energia (CASAS-AGLESTENCH *et al*, 2009).

A insuficiência cardíaca é uma síndrome complexa e multicausal crônica, caracterizada por uma disfunção miocárdica profunda, na qual o desfecho é a incapacidade do coração em atender às exigências energéticas do corpo (LOPASCHUK *et al*, 2007). Este fenômeno é decorrente da diminuição de oxigênio e/ou da disponibilidade de substratos, onde as causas podem ser correlacionadas à hipóxia crônica, aterosclerose, doença arterial coronária, ou da disfunção mitocondrial induzida por fatores genéticos ou tóxicos (NOH *et al*, 2006). Ou ainda, pode resultar do aumento da carga de trabalho do miocárdio, após hipertensão, por exemplo, a partir de alterações na estrutura cardíaca ou utilização ineficiente de ATP, levando a uma perda na utilização de energia (NEVES, CORTEZ *et al*, 2014).

Neste contexto, a obesidade resulta em grandes mudanças no metabolismo energético cardíaco, com um efeito significativo no aumento da absorção de ácidos graxos e β -oxidação (LOPASCHUK *et al.*, 2007). Algumas das consequências correlacionadas a estas mudanças são o aumento de adipocinas, citocinas pró-inflamatórias e EROs, que resultam em uma depleção da capacidade funcional das mitocôndrias (TAEGTMEYER, 2004; NEUBAUER, 2007; INGWALL, 2009; NEVES, CORTEZ *et al.*, 2014). Além disso, as EROs podem danificar o acoplamento contração-excitação, pois prejudica a homeostase do Ca^{2+} (GUZZARDI & IOZZO, 2011).

Foi demonstrado, ainda, que o processo inflamatório é capaz de ativar metaloproteinases (MMPs) e, assim, conduzir um remodelamento adverso da matriz extracelular (MEC). As MMPs são uma família de 23 enzimas, que possuem um importante papel na estimulação/inibição de angiogêneses, regulação do crescimento e ciclo celular, liberação e ativação de fatores de crescimento na MEC, efeitos sobre a sinalização via integrinas, regulação da apoptose e vias de sobrevivência, alterações na motilidade celular, além de influenciar na ativação no sistema imune e, finalmente, modulação sobre a bioatividade de citocinas e quimiocinas (CAUWE, VAN DEN STEEN *et al.*, 2007). A MMP-2, por exemplo, tem sido indicada como uma importante protease na regulação intracelular de proteínas no miocárdio em lesão por estresse oxidativo (KANDASAMY *et al.*, 2010). Outra MMP que se destaca no remodelamento patológico da MEC cardíaca é a MMP-9, que foi demonstrada por Mishra *et al.* (2013) como reguladora da expressão de micro RNAs (miRNAs), no balanço de cálcio e de contratilidade dos cardiomiócitos. O aumento da expressão desses miRNAs está associado com angiogênese, hipertrofia e fibrose no coração. Além disso, a MMP-9 está relacionada com a inibição da sobrevivência e diferenciação das células-tronco cardíacas residentes (CTC) (Figura 3) (MISHRA *et al.*, 2012; 2013). Outro exemplo de MMP importante no remodelamento de MEC é a MMP-13. Estas enzimas, classificadas como colagenases, são importantes na clivagem de moléculas de colágenos tipos I e III, principais proteínas estruturais na fibrose cardíaca. Desta forma, elas desempenham um importante papel na regressão da fibrose, bem como a preservação da função cardíaca (HOWES JM *et al.*, 2014).

Figura 3 - Esquema representativo do aumento da expressão de MMP-9 no coração



Fonte: Figura adaptada de Mishra *et al.* (2013)

Além dos danos supracitados, outros desfechos da obesidade são conhecidos, tais como: apoptose, hipertrofia e danos ultraestruturais aos cardiomiócitos – desorganização dos miofilamentos –, o que em conjunto, levam ao comprometimento da função cardíaca e do metabolismo energético do coração (PARENTE *et al.*, 2008; LEOPOLDO *et al.*, 2010; VENTURA-CLAPIER *et al.*, 2011; LACERDA-MIRANDA *et al.*, 2012; NEVES, CORTEZ *et al.*, 2014; WONG & TAN, 2014).

A hipertrofia cardíaca é definida como sendo um aumento celular, caracterizado pelo acúmulo de componentes estruturais, tais como, miosina e actina e reorganização da ultraestrutura miofibrilar (HOUSTON & STEVENS, 2015). Paralelamente, ocorre o aumento do número de fibroblastos, das fibras colágenas e de células endoteliais que formarão novos capilares (McCURDY *et al.*, 2010). A hipertrofia é uma resposta adaptativa do coração mediante alterações hemodinâmicas, podendo ocorrer em duas circunstâncias: em resposta aos estímulos fisiológicos, como em períodos de gravidez, crescimento e exercício, ou em condições patológicas, como hipertensão, disfunção ventricular, insuficiência cardíaca, entre outros (LOPASCHUK *et al.*, 2010). Estes mecanismos possuem diversas características discrepantes entre si. Na primeira, a sobrecarga hemodinâmica resulta no alongamento dos cardiomiócitos e a melhora da capacidade oxidativa, enquanto que na segunda – hipertrofia patológica – nota-se uma diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial. Assim, a hipertrofia patológica está associada à redução na oxidação de ácidos graxos e consequente aumento na utilização da glicose (ALLARD, 2004).

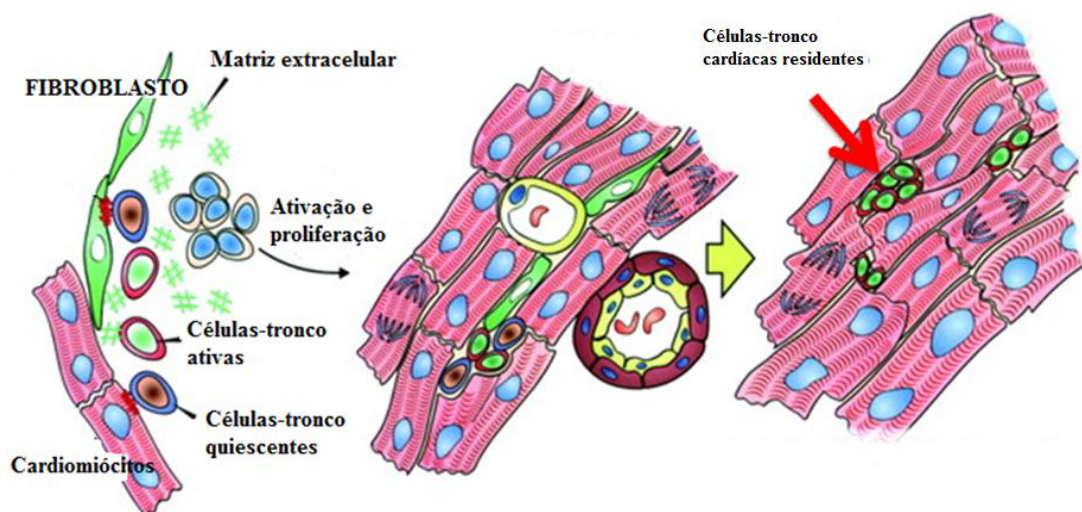
Em circunstâncias patológicas, o desequilíbrio entre a captação e utilização de ácidos graxos resulta no acúmulo ectópico de triglicerídeos nos cardiomiócitos (LOPASCHUK *et al.*, 2010; NEVES, CORTEZ *et al.*, 2014). Tal infiltração lipídica, conhecida como esteatose cardíaca, tem um efeito tóxico nos cardiomiócitos, que resulta em apoptose destas células (CHAVALI *et al.*, 2013). A perda destas células tem, por consequência, um processo de remodelamento do ventrículo esquerdo (LOPASCHUK *et al.*, 2010). No qual, o resultado é o comprometimento e consequente desordem na interação entre o metabolismo e a contração, progredindo para uma disfunção e falência cardíaca, o que explica o aumento de morte por doenças cardiovasculares em indivíduos obesos (GUSTAFSSON & GOTTLIEB, 2003).

Estima-se que a morte por doenças cardiovasculares crescerá de 16,7 milhões em 2002 para 23,3 milhões em 2030 (OMS, 2011). Em contrapartida, as terapias médicas disponíveis até o momento podem melhorar os efeitos da insuficiência cardíaca, porém não são capazes de reverter a perda de miocárdio funcional. A cura disponível hoje para insuficiência cardíaca avançada é o transplante cardíaco, que não é uma estratégia viável na população em geral devido à ausência absoluta de doadores. Portanto, a concepção de uma estratégia terapêutica regenerativa eficaz tem se tornado primordial na ciência cardiovascular moderna. Nesse sentido, os recentes avanços na biologia das células-tronco oferecem grandes perspectivas no tratamento de cardiopatias (PTASZEK *et al.*, 2012).

3 CORAÇÃO: UM ÓRGÃO PÓS-MITÓTICO?

O coração foi considerado por muito tempo como um órgão pós-mitótico, isto é, um órgão terminalmente diferenciado e incapaz de originar novos cardiomiócitos após uma lesão ou estímulo fisiológico (MACLELLAN & SCHNEIDER, 2000; CHIEN & OLSON, 2002). Acreditava-se que pouco depois do nascimento, a única maneira de reparação seria a hipertrofia das células miocárdicas (CHIEN & OLSON, 2002). Logo, a hipertrofia patológica ou fisiológica, a fibrose após morte celular e a baixa incidência de tumores fundamentaram essa hipótese. Entretanto, BERGMANN *et al* (2009) comprovaram que, mesmo em pequena proporção, o coração adulto apresenta uma capacidade proliferativa dos cardiomiócitos. Outros pesquisadores, como por exemplo, WOO *et al* (2001), BELTRAMI *et al* (2003), ELLISON *et al* (2011; 2012) e CHEN *et al* (2012), HONG *et al* (2014) e HAYASHI *et al* (2015), demonstraram a presença de uma população de células primitivas distribuídas pelo miocárdio, capazes de proliferarem quando expostas aos estímulos específicos. Essas descobertas possibilitaram inferir, por hipótese, a existência de um possível mecanismo de regeneração miocárdica. Tais células foram identificadas pela presença de marcadores de superfície (células c-kit⁺, Sca-1⁺ e Lin⁻) e são células auto-renováveis, clonogênicas e multipotentes (Figura 4). Dessa forma, são capazes de dar origem a cardiomiócitos, células musculares lisas e células endoteliais, *in vitro* e *in vivo*, contribuindo para o remodelamento cardíaco (ELLISON *et al*, 2011).

Figura 4 - Esquema representativo da presença de células-tronco cardíacas residentes em nichos por entre milhares de cardiomiócitos



Fonte: Figura adaptada de Beltrami *et al.*(2003).

Desse modo, a hipótese acerca da regeneração cardíaca teve início após uma série de evidências que demonstraram os potenciais mecanismos de reparação miocárdica. Na vanguarda dessas pesquisas para identificação e caracterização de células-tronco cardíacas residentes e do seu potencial terapêutico destaca-se o grupo de ANVERSA (1998). Eles demonstraram pela primeira vez a existência de células primitivas, distribuídas por todo o órgão cardíaco. Essas células foram identificadas pela presença de marcadores de superfície (células c-kit positivas e Lin negativas – c-kit⁺Lin⁻) e apresentavam capacidade proliferativa e formaram clones, *in vitro*. Além destes achados, esse grupo demonstrou que as células c-kit⁺Lin⁻, quando injetadas em regiões peri-infatadas do miocárdio, em modelo experimental, originaram vasos e cardiomiócitos jovens. Esses resultados foram um marco e encorajaram diversos outros grupos a explorar esse campo epistemológico, na busca de novas perspectivas em terapias para cardiopatias. Posteriormente, estudos de MINAMI *et al* (2005) com o transplante de um coração de um doador feminino para um receptor do sexo masculino, revelou através da biopsia do coração transplantado, um significativo número de cardiomiócitos XY positivos. Sugerindo a participação da medula óssea no processo de regeneração e homeostasia cardíaca.

Outros dados que contribuíram para consolidar o conceito de coração como um órgão com capacidade regenerativa foi o trabalho de BERGMAN *et al* (2009). Neste artigo, esses autores exploraram os dados das concentrações atmosféricas de carbono-14 (¹⁴C), produzidas nos testes nucleares na segunda guerra mundial, para datar o nascimento de cardiomiócitos em corações humanos. Uma característica do ¹⁴C é reagir com o oxigênio para formar ¹⁴CO₂, este espécime é incorporado pelas plantas através da fotossíntese. Assim, consumidores primários e, por consequência, os seres humanos incorporam esta molécula. Adquirindo, por fim, concentrações intracelulares que refletem as concentrações de ¹⁴C na atmosfera. Por conseguinte, a estabilidade do DNA depois de sua última divisão celular garante-o como um marcador seguro para se inferir a data de nascimento dos cardiomiócitos. Nos experimentos de BERGMANN *et al* (2009), o DNA foi extraído das células cardíacas e as concentrações de ¹⁴C foram medidas por espectrofotometria de aceleração de massa. Medidas de concentração de ¹⁴C atmosféricas foram usadas como determinante para datar o momento de divisão celular de um cardiomiócito. Essa análise revelou que os indivíduos examinados apresentavam cardiomiócitos com distintas concentrações desse isótopo radioativo, inclusive, havia concentrações que correspondiam ao período pós-natal. Neste estudo, portanto, concluiu-se

que os cardiomiócitos são renovados em uma taxa de 1% ao ano na idade de 25 e 0,45% na idade de 75.

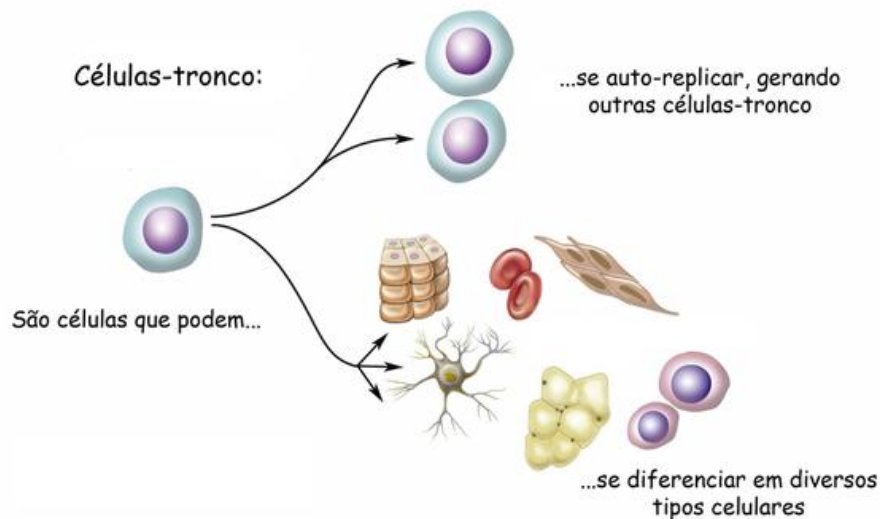
Tão logo, estas evidências sugerem que existem mecanismos de reparo e manutenção da homeostase cardíaca. As etapas específicas envolvidas neste processo, no entanto, não estão bem descritas. Acredita-se que a medula óssea está envolvida nesse processo, com o recrutamento de células e liberação de fatores de efeito parácrino. Além disso, diversos grupos de pesquisa demonstraram a existência de nichos celulares que possuem características de células-tronco no tecido cardíaco, no entanto, não está estabelecido seu potencial no processo de regeneração desse órgão. Ademais, a possibilidade de ocorrência de miogênese e angiogênese, cria grandes expectativas terapêuticas, que buscará influenciar a resposta endógena.

Assim, as evidências de que o coração não é um órgão pós-mitótico levaram a uma mudança de paradigma e da perspectiva da terapia cardíaca, que antes buscava a estabilização do processo patológico já instaurado, e agora existe a alternativa de regeneração do tecido lesado e reversão do processo patológico.

4 TERAPIA CELULAR: CÉLULAS-TRONCO CARDÍACAS RESIDENTES

A terapia celular é uma técnica onde as células-tronco são transplantadas ou ativadas para fins terapêuticos no campo da medicina regenerativa. A principal meta é o reparo e a melhoria de doenças e/ou lesões causadas por traumas ou por degenerações (MIMEAULT M, 2007; BANERJEE C, 2011). As células-troncos podem ser definidas como células indiferenciadas capazes de auto-renovação e de diferenciação, originando progenitores maduros (figura 5). Existem três principais tipos de células-tronco: as embrionárias, as adultas, que são encontradas principalmente na medula óssea, órgãos e no cordão umbilical, e as pluripotentes induzidas, que foram obtidas por Takahashi K *et al.* (2007).

Figura 5 - Esquema representativo do potencial de diferenciação das células-tronco



Fonte: Adaptado de www.nationalacademies.org/stemcells

As células-tronco adultas são células multipotentes e têm a capacidade de gerar um número limitado de células especializadas. Estas células são raras e estão localizadas em nichos por entre de células maduras em diferentes órgãos, sendo capazes de gerar células dos tecidos de que são provenientes e, assim, participar da reposição celular, quando necessário (MIMEAULT *et al.*, 2012). Evidência da existência destas células em diversos órgãos tem mobilizado vários estudos no campo da terapia celular. À vista disso, as células-tronco e a

terapia celular despontaram como uma panaceia no âmbito das pesquisas biomédicas. Neste trabalho destacam-se as pesquisas desenvolvidas para cardiopatias. A princípio, os estudos de terapia celular se concentravam na administração de células-tronco adultas. As principais células transplantadas eram as células-tronco mesenquimais, hematopoiética, células progenitoras endoteliais (CPE) e mioblastos esqueléticos (FERNANDES & PERIN, 2007).

Nos últimos anos, muitas pesquisas foram desenvolvidas com transplante de células-tronco para doenças cardíacas, e elas apresentaram resultados promissores. A título de exemplo, CHEN (2004) obteve sucesso com transplante de células-tronco mesenquimais autólogas, via intracoronária, demonstrando melhora da contratilidade global, sem relato de eventos adversos imediatos. Alguns trabalhos, no entanto, que utilizaram a administração intracoronária, relataram eventos embólicos distais após o procedimento (MATSUBARA *et al.*, 2004; VULLIET *et al.*, 2004). PRINCE *et al.* (2006) demonstraram que a injeção periférica de células-tronco mesenquimais alogênicas, em modelo suíno de infarto agudo do miocárdio, apresentou melhora na fração de ejeção e diminuição da área de enfarte. Estudos utilizando outros tipos celulares foram realizados, por exemplo, a administração de CPE via intracoronária para demonstração de perfil de segurança, tanto em pacientes pós-infarto como em casos de oclusão coronária crônica (ERBS *et al.*, 2005; ASSMUS *et al.*, 2002), e a administração de mioblastos, realizados no contexto de revascularização cirúrgica por via transepicárdica. No entanto, o uso dos mioblastos mostrou-se impróprio, pois foi relatada arritmia ventricular após transplante (DIB *et al.*, 2005; MENASCHE *et al.*, 2003).

Trabalhos posteriores demonstraram que as melhoras obtidas, ao contrário do que se imaginara a princípio, não foram resultado da transdiferenciação das células transplantadas e, sim, do efeito parácrino liberado por elas (TONGERS *et al.*, 2011; SHEN Q *et al.*, 2015). Assim, o principal potencial terapêutico desta técnica são os efeitos parácrinos, que estão envolvidos: na secreção de fatores parácrinos, recrutamento de células-tronco/células progenitoras, na ativação e recrutamento de células-tronco residentes, na modulação e remodelamento da matriz extracelular, angiogênese, prevenção da apoptose, imunomodulação, etc. (TONGERS *et al.*, 2011).

Apesar de demonstrado sua importância terapêutica na recuperação pós-infate, MEYER *et al.* (2006) demonstram, no estudo BOOST, que há uma perda do benefício observado aos seis primeiros meses. Adicionalmente, tem sido relatado que existem circunstâncias nas quais estas células não poderiam exercer plenamente seu potencial. Nosso grupo demonstrou que, em indivíduos obesos, as células-tronco mononucleares da medula óssea possuem baixa viabilidade e disfunção mitocondrial, sugerindo que há um

comprometimento do seu potencial terapêutico (OLIVEIRA, CORTEZ *et al.*, 2014). Além disso, a viabilidade terapêutica, também, está associada com fatores sistêmicos e idade (FERNANDES & PERIN, 2007). Assim, indivíduos com mais comorbidades possuem menor potencial terapêutico para o transplante autólogo. Ademais, células de origem alogênica ainda estão em análise em estudos pré-clínicos e questões como rejeição e reação inflamatória local ainda aguardam resposta.

Outro viés de pesquisa são as investigações de terapia celular por ativação parácrina. Nesta técnica, busca-se identificar fatores/moléculas capazes de ativar as vias de sobrevivência das células atingidas e, com isso, alcançar a regeneração tecidual/órgão. Assim, a identificação das moléculas secretadas pelas células transplantadas – as CTMO – deve tornar possível a concepção de terapias que eliminem a utilização de células, e se concentrem na administração das moléculas efetoras principais. Desse modo, a descoberta da existência de células-tronco cardíacas residentes enuncia a possibilidade de regeneração deste órgão. Posto isto, as terapias independentes de transplante de células para a regeneração do miocárdio, baseadas na ativação, proliferação celular e diferenciação *in situ* das células-tronco cardíacas residentes (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 do que, seriam econômicos, – em termos de custos de produção.

Todavia, sabe-se que estas células-tronco adultas estão quiescentes, com a atividade basal mínima (DIMOVA N *et al.*, 2014). No entanto, foi demonstrado que esta condição pode ser reversível (CHEUNG & RANDO, 2013; DIMOVA N *et al.*, 2014). Recentes avanços em isolamento de células-tronco adultas têm fornecido *insights* sobre a epigenética, controle transcricional e pós-transcricional da quiescência, e sugerem que é um estado ativamente mantido em que as vias de sinalização estão envolvidas na manutenção de um estado equilibrado que permite a ativação rápida (CHEUNG & RANDO, 2013). Decifrar os mecanismos moleculares que regulam esta condição nas células-tronco adulta, portanto, irá aumentar a nossa compreensão dos mecanismos de regeneração de tecido (CHEUNG & RANDO, 2013). Estas possibilidades enunciam grandes expectativas terapêuticas, cujo objetivo será influenciar a resposta endógena.

Apesar do grande avanço na compreensão das CTC, os mecanismos que regulam a sobrevivência e atividades dessas células em estados fisiopatológicos ainda não estão esclarecidos totalmente. Recentemente, foi demonstrado que a cardiomiopatia diabética está relacionada com a diminuição do número e capacidade proliferativa das CTC (LEONARDINI

E AVOGARO, 2013). O remodelamento adverso da matriz extracelular (MEC) em camundongos diabéticos está relacionado com maior apoptose das CTC e consequente falência cardíaca (MISHRA *et al.* 2013). O bom funcionamento do coração depende da MEC, que mantém a integridade estrutural e funcional cardíaca e apresenta o microambiente necessário para as atividades mecânicas, celulares e moleculares. As metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs) regulam a degradação dos componentes da MEC, que determina a fibrose cardíaca e o desempenho do miocárdio. A MMP-9, que está diretamente envolvida na degradação da matriz cardíaca e indução de fibrose, também está relacionada com a inibição da sobrevivência e diferenciação das CTC (MISHRA *et al.*, 2012; 2013). Ainda no coração, foi demonstrado que o desbalanço do cálcio intracelular e o estresse oxidativo, em consequência da obesidade, estão relacionados com a diminuição da atividade das CTC (XU & REN, 2013).

Portanto, a estratégia terapêutica baseada na modulação das CTC esbarra em muitos percalços. Por isso, fazem-se necessárias investigações profundas sobre os mecanismos específicos envolvidos no processo de ativação, proliferação, diferenciação e maturação destas células, a fim de responder questões chave: estas CTC são capazes de proliferarem? Se forem capazes, é possível ocorrer de forma espontânea ou por indução a miogênese e a angiogênese? Algumas destas questões, ainda que de forma incipiente, estão sendo respondidas e acredita-se que a partir de fatores genéticos e epigenéticos seja possível (CHEUNG & RANDO, 2013; DIMOVA N *et al.*, 2014), tal como abordado anteriormente nesse texto. Além disso, conhecido os efeitos deletérios da obesidade sobre as células-tronco e/ou progenitoras adultas presentes em diferentes tecidos (WOO & COLS., 2011), como estarão estas células no contexto de obesidade? Assim, nós propusemos a hipótese de que a obesidade induzida a partir do desmame está relacionada a um comprometimento das células-tronco/progenitoras cardíacas.

5 OBJETIVOS

Estudar os efeitos da obesidade, induzida por dieta Ocidental desde o início da vida, sobre as células-tronco cardíacas residentes em camundongos *Swiss*.

5.1 Objetivos específicos

- a) Analisar os parâmetros biométricos – evolução da massa corporal e tolerância a glicose – dos grupos experimentais obeso e controle;
- b) Identificar e quantificar as células-tronco cardíacas residentes e as células progenitoras endoteliais no coração de camundongos *Swiss* submetidos à dieta ocidental, por microscopia confocal, western blotting e citometria de fluxo;
- c) Estudar a bioenergética mitocondrial do coração de camundongos *Swiss* submetidos à dieta ocidental, por respirometria de alta-resolução;
- d) Quantificar a fibrose no coração de camundongos *Swiss* submetidos à dieta ocidental, por microscopia de luz e western blotting;
- e) Avaliar a morfologia ventricular através da estimativa de hipertrofia cardíaca obtida pela razão do peso do ventrículo esquerdo (VE) e comprimento da tíbia em camundongos *Swiss* submetidos à dieta ocidental;
- f) Analisar o processo de apoptose no coração de camundongos *Swiss* submetidos à dieta ocidental, por western blotting;
- g) Analisar o acoplamento entre os cardiomiócitos através da marcação de conexina 43 no coração de camundongos *Swiss* submetidos à dieta ocidental, por western blotting.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais e modelo experimental de obesidade

Camundongos *Swiss* machos de 21 dias de idade foram adquiridos no Centro de criação de animais de laboratório da Fundação Oswaldo Cruz (Cecal/FIOCRUZ). Estes animais foram divididos randomicamente em: grupo controle (GC, N=8), alimentados com ração padrão AIN93G (65,6% de carboidratos, 17,3% de proteínas e 17,1% de lipídeos) e grupo obeso (GO, N=8), alimentados com dieta ocidental, rica em carboidratos simples e gordura saturada, baseada na adição de manteiga clarificada (Ghee) (43.3% de carboidratos, 14% de proteínas e 42,7% de lipídeos) conforme descrito no artigo de Tikellis et al. (2008). Ambas as dietas foram confeccionadas pela empresa PragSoluções Ltda (Jaú - SP, Brasil), e a composição de ambas pode ser verificada nos anexos 1 e 2. A composição final de macronutrientes das dietas encontra-se descritas no quadro 1.

A dieta foi administrada a ambos os grupos por 12 semanas, com livre acesso à água e ração. Os animais foram 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 claro e escuro de 12/12h (07:00h às 19:00h) e de exaustão de ar a cada 15 min/hora.

Para o acompanhamento do efeito da dieta no desenvolvimento da obesidade, foram aferidos: massa corporal – semanalmente –, comprimento naso-anal, comprimento da tíbia, glicemia, peso da gordura epididimal e retroperitoneal, peso do coração, peso do ventrículo esquerdo, estimativa da hipertrofia cardíaca (razão entre o peso do coração e o comprimento da tíbia) e índice de Lee (raiz cúbica da massa corporal (g)/comprimento naso-anal (cm) x 1000) – no dia da eutanásia.

O consumo alimentar foi acompanhado durante as 12 semanas de intervenção. A ingestão alimentar semanal dos animais foi estimada através da média da pesagem rest- ingesta das rações, em grama, realizada quatro vezes por semana (em dias alternados), em balança analítica de precisão. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas institucionais de cuidado e uso de animais de laboratório (BAYNE, 1996), protocolo nº CEUA/033/2012.

Quadro 1 - Composição das dietas controle e ocidental

Composição	Dieta controle	Dieta Ocidental
Kcal/g	3,69	4,49
Carboidratos	65,6%	43,8%
• Complexo	53,7%	12,6%
• Simple	11,9%	31,2%
Proteínas	17,3%	13,9%
Lipídeos	17,1%	42,4%
• Gordura saturada	2,4%	22,3%
• Gordura Monoinsaturada	4,3%	-----
• Gordura Poliinsaturada	10,5%	-----
• Gordura Trans	0%	1,7%
• Colesterol	0%	0,3%

----- Não informado.

6.2 Desenho Experimental



Camundongos Swiss machos
Idade: 21 dias (Desmame)

Grupos Experimentais

Grupo Obeso (GO), N=8



Grupo Controle (GC), N=8



6.3 Eutanásia

No momento da eutanásia, aos 90 dias de idade, os animais foram submetidos a 6 horas de jejum para análise de tolerância a glicose. O sangue foi coletado da veia da caudal dos grupos Controle e Obeso para a determinação da glicose plasmática com o auxílio de glicosímetro e fitas teste (Accu-Chek Active®). Os resultados foram expressos em mg/dl.

Logo após, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de Avertin® (2,2,2-tribromoethanol, 2-metil-2-butanol) - 0,02 ml/g de massa corporal - e mensurou-se o comprimento naso-anal com o auxílio de um paquímetro.

Ainda sob o efeito da anestesia, feita 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, ditiotreitól 0.5, K-MES 50, imidazol 20, taurina 20, Na₂ATP 5.77, fosfocreatina 15, pH 7.1 ajustado a 25°C) contida em uma placa de petri, sobre gelo, o ventrículo esquerdo foi retirado e pesado em balança eletrônica de precisão (BIOPRECISA-FA-2104N®).

O coração foi dividido em diferentes partes para sua utilização nas técnicas de respirometria, citometria, imunohistoquímica, microscopia de óptica e western blotting.

Além do coração, outros órgãos/ tecidos foram coletados: o sangue, o fígado e o tecido adiposo branco (gordura epididimal e retroperitoneal), após retirados e pesados em balança eletrônica de precisão. O peso do fígado (g) foi corrigido pela massa corporal (g) para avaliação de possível esteatose hepática, visto que esta razão tem sido associada a tal comprometimento hepático (SERVIDDIO *et al.*, 2011). A tíbia esquerda foi dissecada e o seu comprimento (CT) foi aferido com auxílio de um paquímetro, fez-se então, estimativa de hipertrofia cardíaca através da razão entre o peso do ventrículo esquerdo do coração e o comprimento da tíbia.

6.4 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

Após o jejum de 6 horas, foram realizados testes de tolerância à glicose nos camundongos de ambos os grupos. Os animais receberam uma injeção intraperitoneal de glicose (1g/Kg de peso) e a glicemia foi verificada através do sangue retirado da veia da cauda do animal, com o auxílio de glicosímetro (Accu-Check Active®, Roche Diagnostics, Germany). As amostras de sangue foram coletadas antes da injeção de glicose (tempo 0) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração de glicose.

6.5 Respiração mitocondrial

6.5.1 Obtenção de fibras cardíacas permeabilizadas

Após imersão do coração em solução de relaxamento e preservação, BIOPS, gelada, o ventrículo esquerdo foi isolado e 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 da fibra para evitar danos mecânicos às células. Usando pinças microcirúrgicas, as fibras musculares foram parcialmente separadas umas das outras, deixando pequenas áreas de contato. O grau de separação pode ser avaliado observando a mudança de coloração de vermelho para pálido. Em seguida, as fibras foram transferidas para um recipiente com solução BIOPS gelada contendo 50µg/ml de saponina e incubadas no gelo, com agitação suave, por 30 minutos à 4° C para a solubilização do sarcolema. As fibras permeabilizadas foram, então, lavadas por 10 minutos em meio de respiração mitocondrial MIR05 (em mM: EGTA 0.5, MgCl₂ 3.0, K-MES 60, taurina 20, K₂HPO₄ 10, HEPES 20, Sacarose 110 e BSA 1g/L, pH 7.1 ajustado a 25°C) no gelo.

6.5.2 Respirometria de alta resolução

Após a permeabilização, as fibras foram pesadas em balança analítica e 2 a 3 mg de tecido foram adicionados à câmara do oxígrafo OROBOROS® Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) contendo 2ml de MIR05 a 37°C. Todas as análises foram realizadas em concentrações de oxigênio superiores a 400 nmol O₂ ml⁻¹. As taxas de consumo de oxigênio foram expressas como pmol de O₂ s⁻¹ mg de peso úmido⁻¹. O estudo foi realizado com dois grupos de substratos independentes em cada câmara: (câmara A, em mM) glutamato 10, malato 2 e succinato 10, para a análise da oxidação de carboidratos (complexos I e II da cadeia respiratória) e (câmara B, em mM) palmitoil-carnitina 0.02 e malato 2, para a análise da oxidação de ácidos graxos. Os parâmetros respiratórios foram definidos como: taxa respiratória basal, antes da adição de adenosina difosfato (ADP), estado 2; taxa respiratória máxima estimulada por ADP (5 mM), estado 3 e taxa respiratória na ausência de fosforilação de ADP, após a adição de oligomicina (2 µg/ml), estado 4. Para examinar a integridade mitocondrial através de todas as preparações, a respiração foi mensurada em presença de 10µM de citocromo c.

6.6 **Citometria de fluxo**

Um fragmento de 250µg do coração foi dissociado mecanicamente com auxílio de 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 15mL com meio de cultura DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), 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 com cell strainer (Corning) em tubos de 50 mL, centrifugada a 1500 RPM por 5 minutos e o pellet ressuspendido em PBS. Foram feitas as análises fenotípicas e quantificação das células-tronco cardíacas residentes (c-kit⁺CD45⁻) e células progenitoras endoteliais (CD133⁺). Para isso, a amostra foi aliqotada em tubos eppendorf (20µL por tubo, contendo 1x10⁶ células) e incubadas com 1µL de anticorpo conjugado: anti-Ckit (APC Abcan), anti-CD45 (FITC BD Biociences) e anti-CD133 (obtido em cabra, conjugado com Alexa Fluor

555), por 30min a 4°C. Após, a amostra foi centrifugada, lavada com PBS e um volume final de 300µL foi utilizado para leitura no citômetro BD Accuri.

6.7 Processamento do material histológico

Os corações coletados 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 diafanizado com xilol. Em seguida, foram banhados e incluídos em parafina líquida. Os blocos formados foram seccionados em cortes seriados de 5µm, aderidos em lâminas silanizadas.

6.8 Imunomarcação

Cortes de 5 µm do coração foram incubados com anticorpos primários anti-c-kit (Santa Cruz, obtido em coelho) e anti-CD45 (Santa Cruz, obtido em cabra) (células-tronco cardíacas residentes – c-kit⁺CD45⁻). Em seguida, foram lavados e incubados com o anticorpo secundário específico, c-kit (conjugado Alexa Fluor 488) e CD45 (conjugado a Alexa Fluor 555), montados em lamínulas com meio de montagem SlowFade (Molecular Probes) e observados ao microscópio de varredura confocal a laser.

6.9 Análise quantitativa de colágeno (fibrose)

Cortes de 5µm do coração foram corados com Picro-Sirius Red (solução a 0,1% de Direct Red 80, Sigma-Aldrich) por 45min, posteriormente analisados em microscópio de luz equipado com câmera CCD. As imagens das áreas coradas em vermelho, consideradas fibróticas pelo acúmulo excessivo de colágeno, foram capturadas com 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) selecionadas aleatoriamente por animal foi expresso como a porcentagem de área de fibrose, N=8 para os grupos obeso e controle.

6.10 Western blotting

Oito animais de cada grupo (GC e GO) foram submetidos a eutanásia, parte do ventrículo esquerdo retirado destes animais foi congelado imediatamente em nitrogênio líquido para posterior análise do conteúdo proteico através da técnica de Western Blotting de rotina, segundo Cortez e colaboradores (2012b).

O material foi fragmentado e homogenizado em solução de lise gelada (em mmol: HEPES 30 pH 7,4, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 50, NaF 100, EDTA 1, Na_3VO_4 10, Tritón X-100 1%,) contendo coquetel de inibidores (Complete, EDTA-Free, Roche Diagnostic®), por trituração manual com o homogenizador potter-Elvehjem® até tornar-se líquido. O homogeneizado foi colocado em repouso no gelo por 30 minutos. Em seguida, foi centrifugado a 13000 rpm por 15 minutos, a 4°C (Micro Centaur, Sanyo®) 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 Protein Assay (Thermo Scientific 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 (15µg 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®) em cuba de eletroforese (Bio-RAD®, EUA). 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.

As membranas foram incubadas (*overnight*) com anticorpos primários específicos para detecção de proteínas anti-Metaloproteinases 13 e 9 (ambos Santa Cruz, obtidos em coelho). O teor das proteínas dos colágenos I e III (ambos Santa Cruz, obtidos em cabra) também foi quantificado. Para análise de morte celular programada foram quantificadas as proteínas pró-

apoptóticas Bax (Santa Cruz, obtido em coelho) e anti-apoptótica Bcl-2 (Santa Cruz, obtido em camundongo). Além disso, os marcadores de células-tronco, tais como, c-kit (Santa Cruz, obtido em coelho) e CD133 (Santa Cruz, obtido em cabra), foram analisados. Além disso, foi analisada a proteína conexina 43 (Chemicon, obtida em mouse) para análise do acoplamento iônico das fibras cardíacas.

Após, as membranas foram incubadas com anticorpos secundários específicos biotinilado apropriados. Entre a incubação dos anticorpos primários e secundários e a streptavidina, realizou-se 3 lavagens/ 5min cada com Tween-TBS. A revelação foi realizada por ECL-Plus (GE Healthcare-Life Sciences®) e as bandas obtidas foram quantificadas por densitometria, seguida de correção pelo controle endógeno (β -Actina), utilizando o software ImageJ (NIH, USA).

Quadro 2 - Concentração dos anticorpos primários e secundários utilizados no Western blotting

Anticorpos	Anticorpo Primário	Anticorpo secundário
Bcl-2	1:1000	1:3000
Bax	1:1000	1:2000
MMP-13	1:500	1:2000
MMP-9	1:500	1:2000
Colágeno I	1:1000	1:3000
Colágeno III	1:1000	1:2000
c-kit	1:1000	1:2000
CD133	1:1000	1:2000
Conexina 43	1:1000	1:2000

6.11 Análises Estatísticas

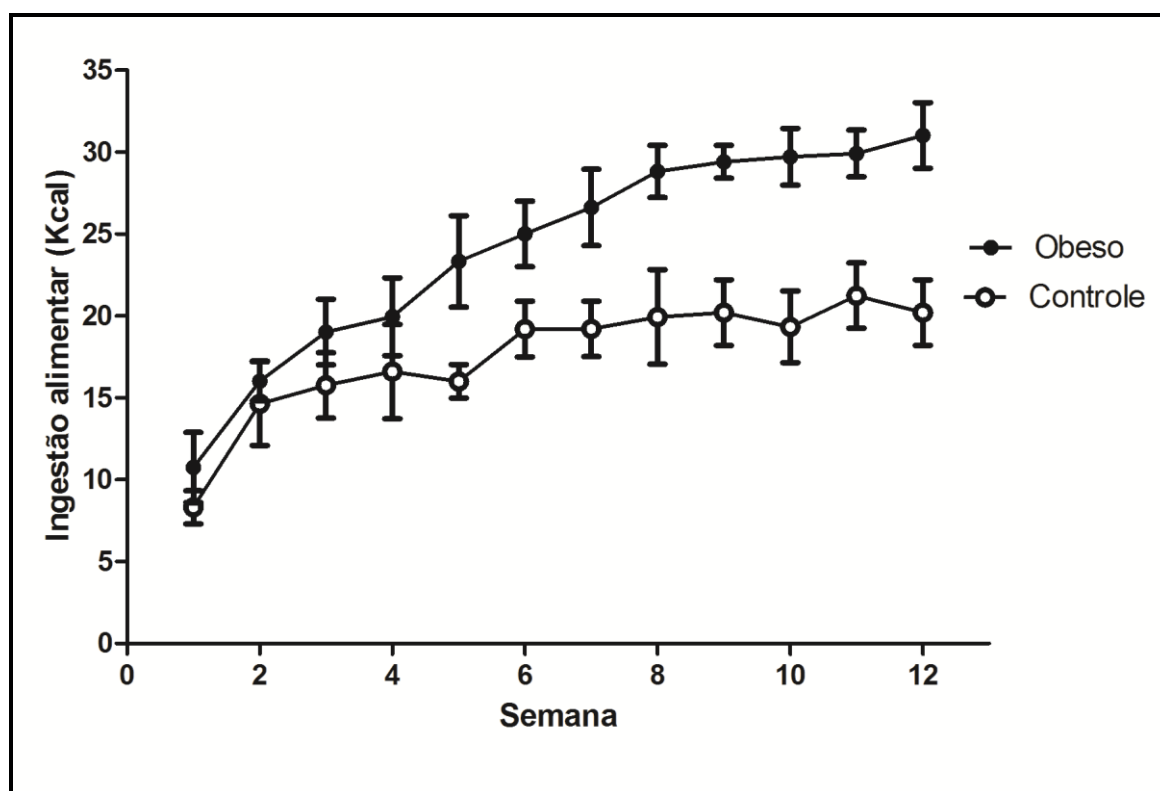
Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio-padrão. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste t-student, usando nível de significância de $P < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Comportamento alimentar

Os animais que receberam a dieta Ocidental – SF05-031, com aumento nas concentrações de carboidratos simples (31,2%) e gordura saturada (22,3%), o Grupo Obeso (GO), apresentaram um consumo calórico (Kcal) significativamente maior quando comparados ao consumo registrado dos animais que receberam dieta controle – AIN93 G, grupo controle (GC) (Gráfico 3), valor de $P < 0,01$.

Gráfico 3 - Consumo alimentar calórico de camundongos *Swiss* submetidos às dietas controle e ocidental, durante 12 semanas. Valores representam média±SEM** $P < 0,01$, n=8/grupo



7.2 Parâmetros biométricos

Ao final do período de estudo, os grupos experimentais apresentavam diferenças significativas nos parâmetros biométricos analisados. O GO apresentou aumento do peso absoluto corporal (17,62%, $P < 0,001$), da gordura epididimal (126,24 %, $P < 0,001$), da gordura retroperitoneal (100%, $P < 0,001$), do peso do fígado (30,29%, $P < 0,03$), do índice de Lee (25,13%, $P < 0,01$) e da glicemia de jejum (71,19%, $P < 0,05$) quando comparado ao grupo controle (GC) (Gráfico 4, Tabela 2).

Gráfico 4 - Evolução da peso corporal de camundongos *Swiss* submetidos à dieta controle (GC) e dieta ocidental (GO)

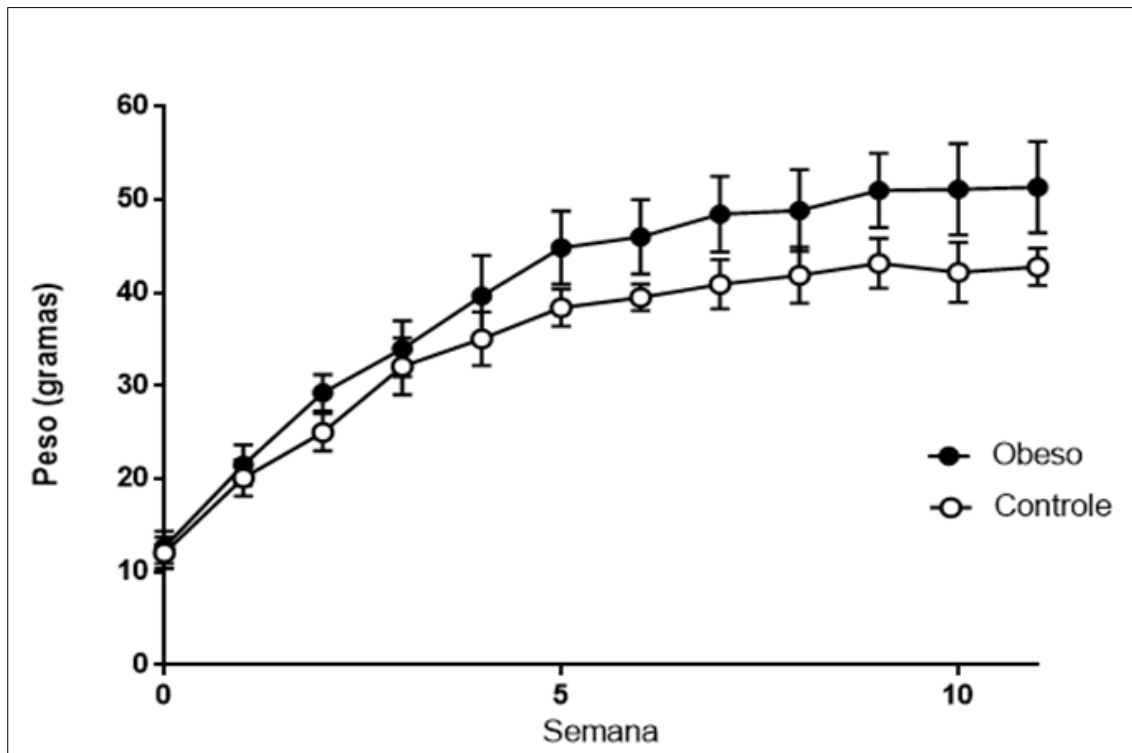


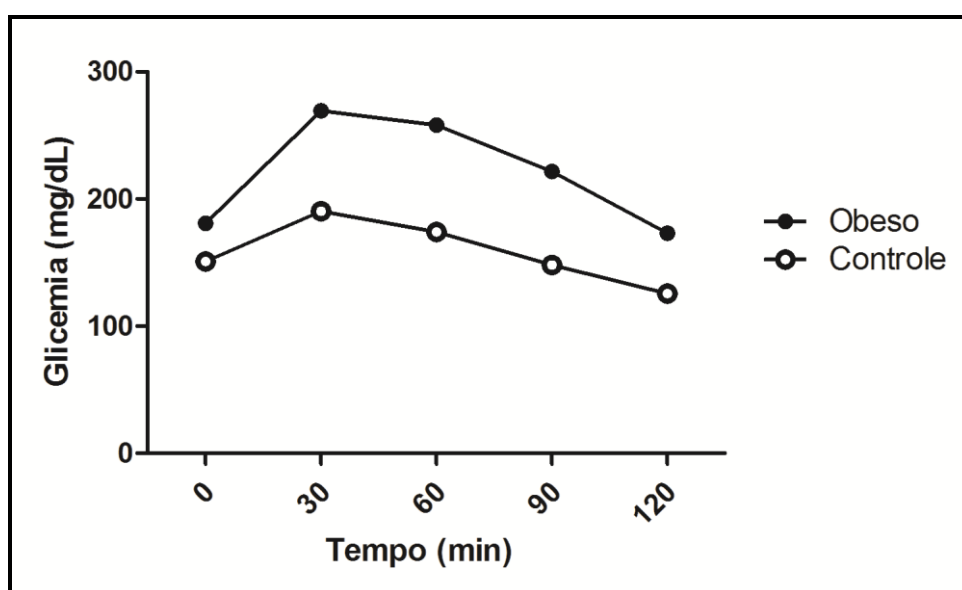
Tabela 2 - Massa corporal, comprimento naso-anal, índice de Lee, gordura epididimal, gordura retroperitoneal e glicemia de jejum de camundongos *Swiss* submetidos à dieta controle e ocidental durante 12 semanas

	GC	GO	Valor de P
Peso corporal (g)	47,1±0,8	55,4±2,9	0,0001
Comprimento Naso-anal (cm)	91,56±2,1	95,63±1,9	-
Índice de Lee	150,4 ± 3,4	188,2 ± 12	0,01
Gordura Epididimal (g)	1,41±0,30	3,19±0,20	0,001
Gordura Retroperitoneal (g)	0,62±0,11	1,24±0,05	0,001
Glicemia (mg/dL)	84,7± 6,4	145±16,2	0,05

7.2.1 Teste intraperitoneal de tolerância à glicose (TITG)

O GO apresentou menor tolerância à glicose quando comparado ao CG nos tempos de 30, 60 e 90 minutos ($P < 0,02$) (Gráfico 5).

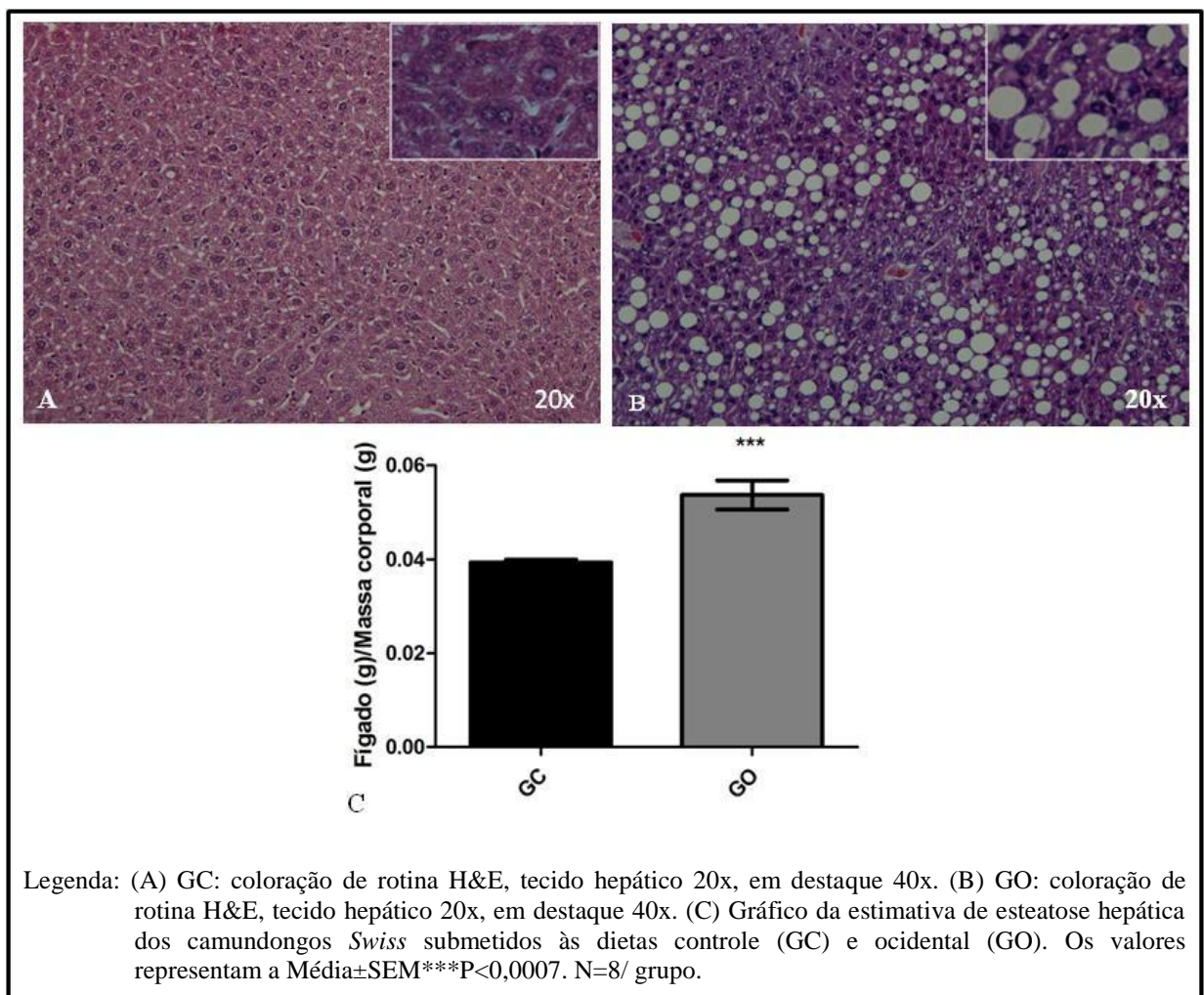
Gráfico 5 - Teste intraperitoneal de tolerância à glicose



7.2.2 Análise de esteatose hepática

Ao corrigirmos o peso do fígado (g) pela massa corporal (g), constatamos uma relação positiva para esteatose hepática no GO, visto que este se apresentou com a razão 36,51% maior do que o GC (GC: $0,039 \pm 0,001$; GO: $0,054 \pm 0,003$, Média \pm SEM ***P< 0,0007) (Figura 6).

Figura 6 - Coloração de rotina Hematoxilina e Eosina de tecido hepático



7.2.3 Estimativa de hipertrofia cardíaca

As análises das medidas do peso do ventrículo esquerdo (VE) e a razão deste valor com o comprimento da tíbia (CT) demonstraram um aumento de 131,82% (SEM** $P < 0,007$) no GO. Esta medida faz estimativa da hipertrofia cardíaca (Tabela 3).

Tabela 3 - Estimativa de hipertrofia cardíaca através das medidas do ventrículo esquerdo e comprimento da tíbia dos grupos com dieta controle e ocidental durante 12 semanas

	GC N=9	GO N=8	
	Média±SEM	Média±SEM	Valor de P
PVE (g)	0,06 ± 0,0028	0,12 ± 0,0064	0,0001
CT (mm)	24,3 ± 0,73	25,5 ± 0,63	0,2486
PVE/CT	0,0022 ± 0,001	0,0051 ± 0,003	0,0001

Os valores estão representados como média e desvio padrão da média
PVE= Peso do ventrículo esquerdo; CT= Comprimento da tíbia.

7.2.4 Análise de remodelamento de matriz-extracelular: estimativa de fibrose

A análise do colágeno, no tecido cardíaco, através da técnica de Picro-Sirius demonstrou um aumento significativo da concentração de colágeno (Figura 7). Este aumento, também, pode ser observado nas análises de Western Blotting para a quantificação de Colágeno I e Colágeno III (Figuras 8A e 8B). Os dados são expressos em EPM* $P < 0,0001$.

Figura 7 - Microscopia de luz do coração de camundongos corados com Picro-Sirius Red

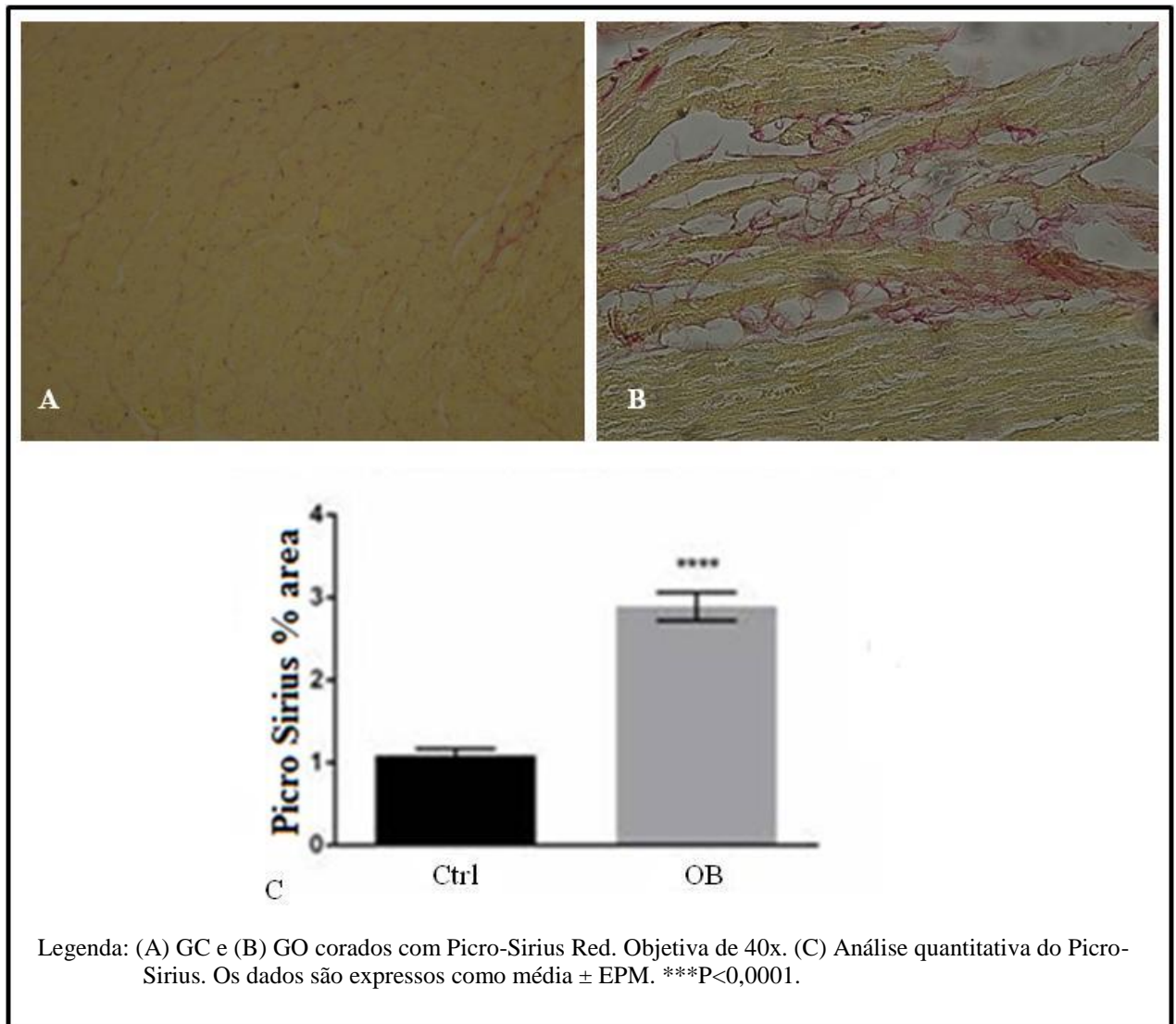
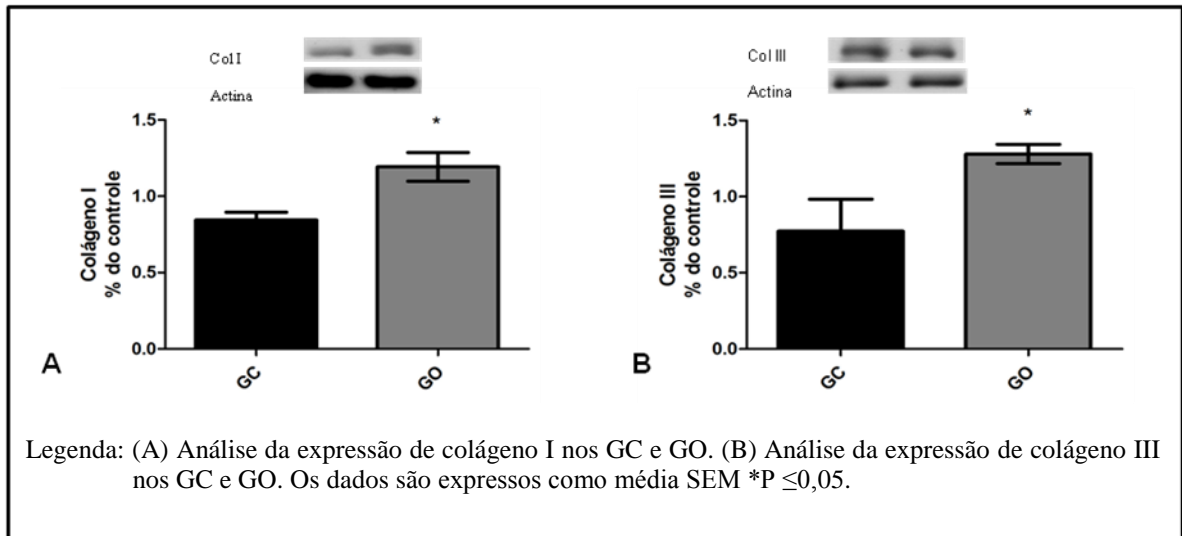


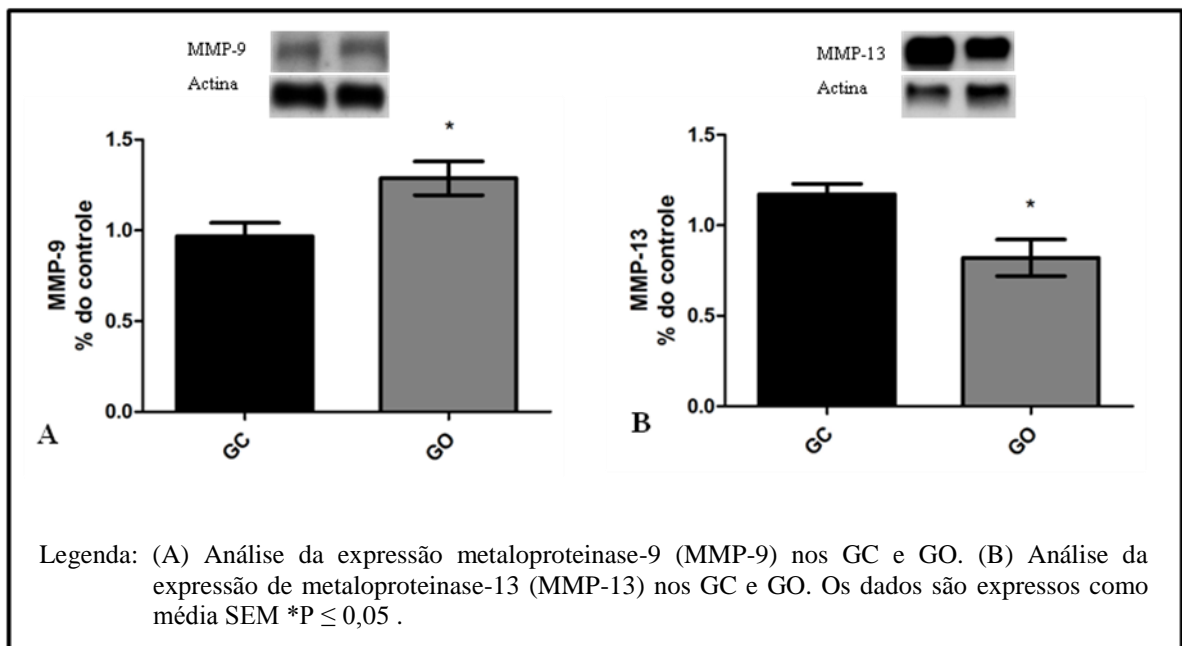
Figura 8 - Quantificação de proteínas por western blotting (Col I e Col III)



7.2.5 Análise das metaloproteinases: MMP-9 e MMP-13

A Análise das MMP-9 (figura 9A) por western blotting mostrou um aumento significativo desta proteína no GO, comparado ao GC. Enquanto a análise da expressão de MMP-13 (Figura 9B) apresentou-se menor no GO, comparado ao GC (SEM*P<0,02).

Figura 9 - Quantificação de proteínas por western blotting (MMP-9 e MMP-13)

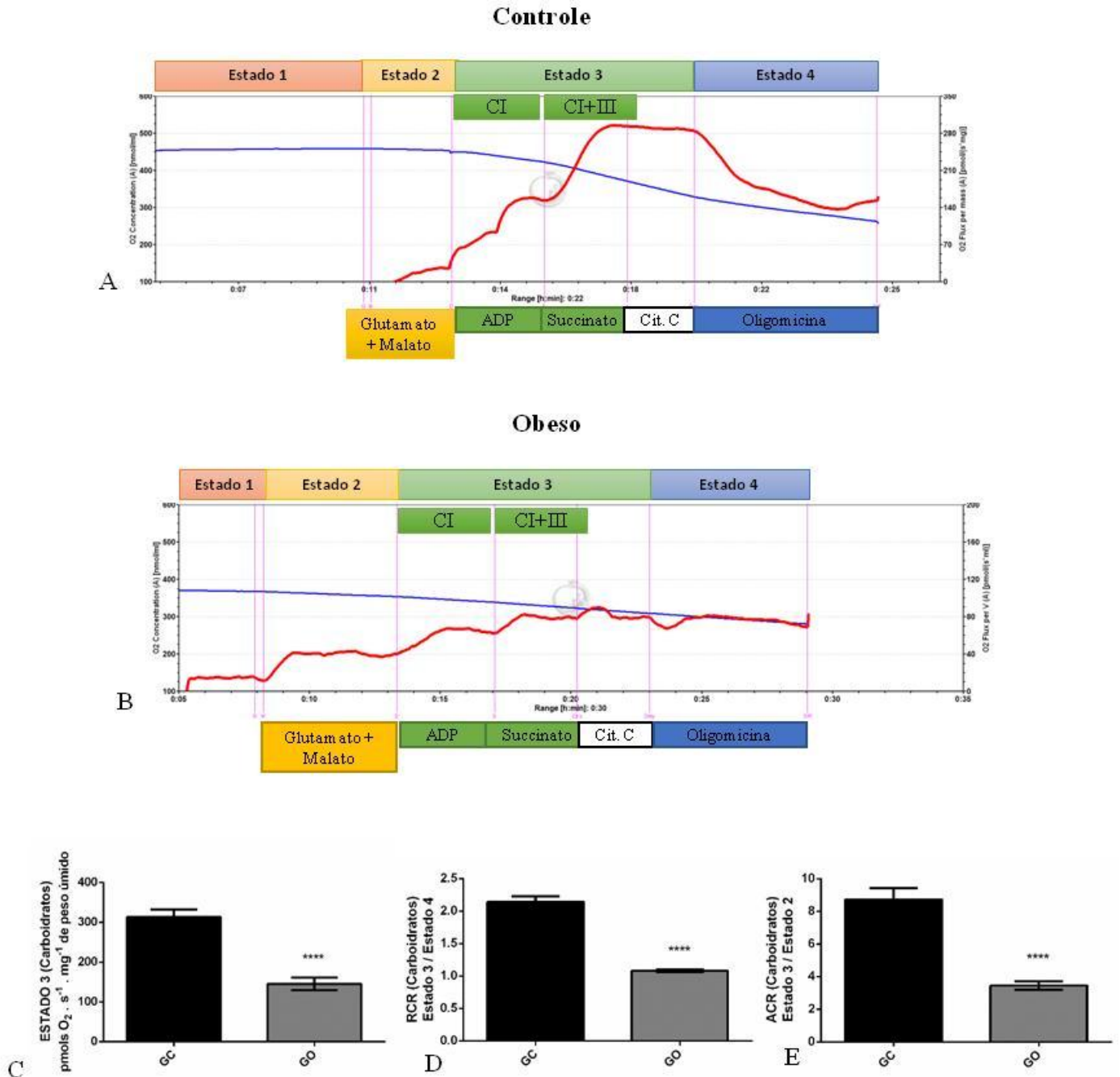


7.3 Respiração mitocondrial e consumo de oxigênio nas fibras cardíacas

O GO apresentou disfunção mitocondrial, com redução significativa na taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3), indicando redução da capacidade de oxidação de carboidratos ($P < 0,001$) (Figura 10A) e de ácidos graxos ($P < 0,001$) (Figura 11A)

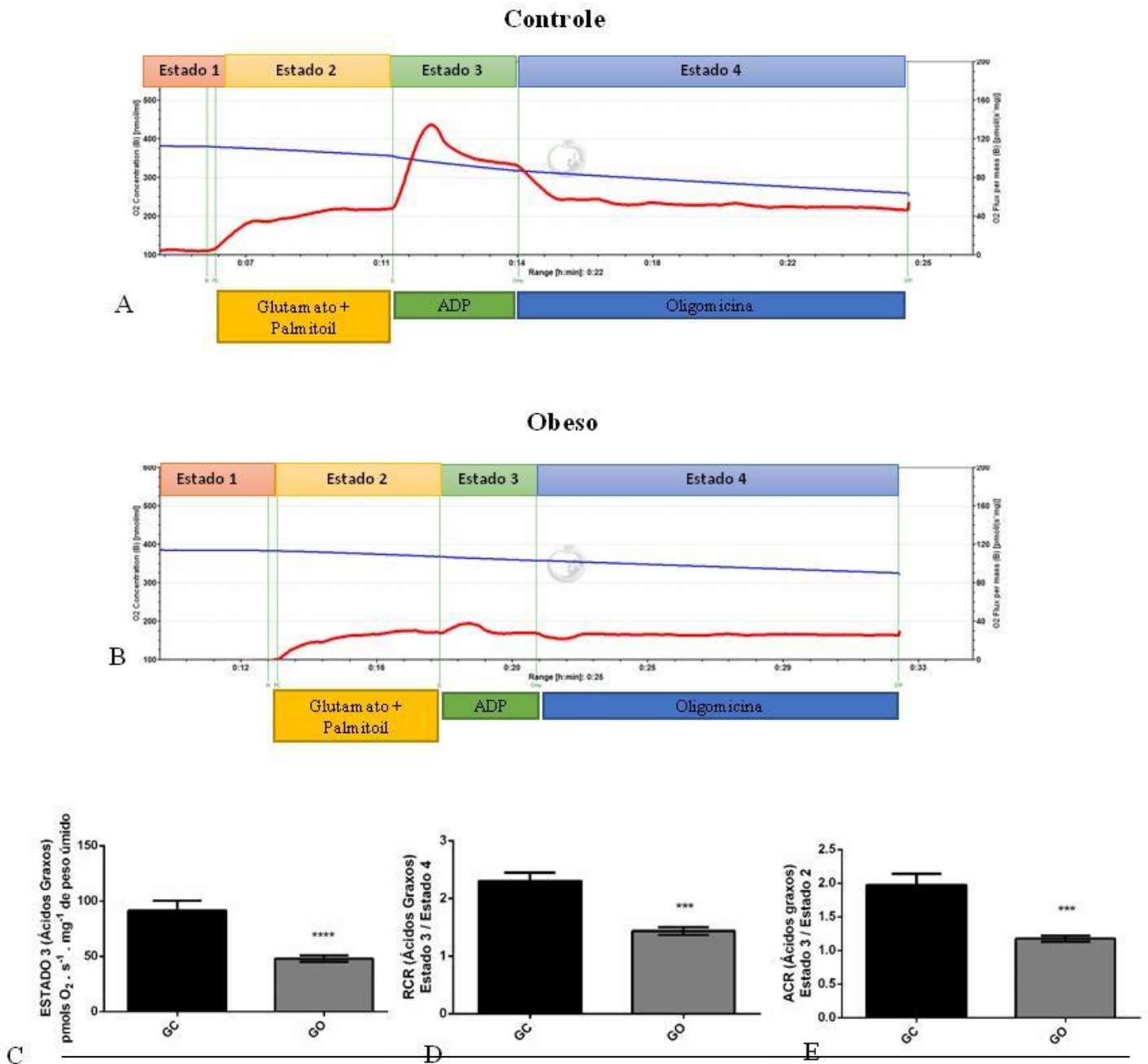
Além disso, constatamos um aumento do desacoplamento mitocondrial através da razão do controle respiratório (RCR) ($P < 0,001$) (Figuras 10D e 11D). Observamos, também, uma diminuição da razão do controle aceptor (ACR) no GO, comparado ao GC, indicando menor capacidade de produção de ATP (Figuras 10E e 11E). Avaliamos a integridade da membrana mitocondrial utilizando citocromo c e observamos que não houve aumento do fluxo respiratório em nenhum dos grupos, indicando ausência de danos na membrana mitocondrial ($P < 0,001$) (Figura 10 e 11).

Figura 10 - Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de animais dos grupos controle e obeso, submetidas aos substratos relacionados à oxidação de carboidratos



Legenda: (A, B) Gráficos originais típicos do oxígrafo. Eixo Y da esquerda (linha azul): concentração de oxigênio na câmara. Eixo Y da direita (linha vermelha): fluxo de oxigênio. Eixo X: tempo em horas e minutos. GM: glutamato+malato; D: ADP; S: succinato; c: citocromo c; Omy: Oligomicina. (C) Taxa respiratória máxima estimulada por ADP (Estado 3) dos grupos controle (barras pretas) e Obeso (barras cinzas). (D) Razão do controle respiratório (RCR), calculada como a razão Estado 3 / Estado 4. (E) Razão do controle acceptor (ACR), calculada como a razão Estado 3 / Estado 2. Os dados são expressos como média e erro padrão da média. $P < 0,05$; $N = 6$ /grupo.

Figura 11 - Respirometria de alta resolução de fibras cardíacas permeabilizadas obtidas de animais dos grupos controle e obeso, submetidas aos substratos relacionados à oxidação de ácidos graxos

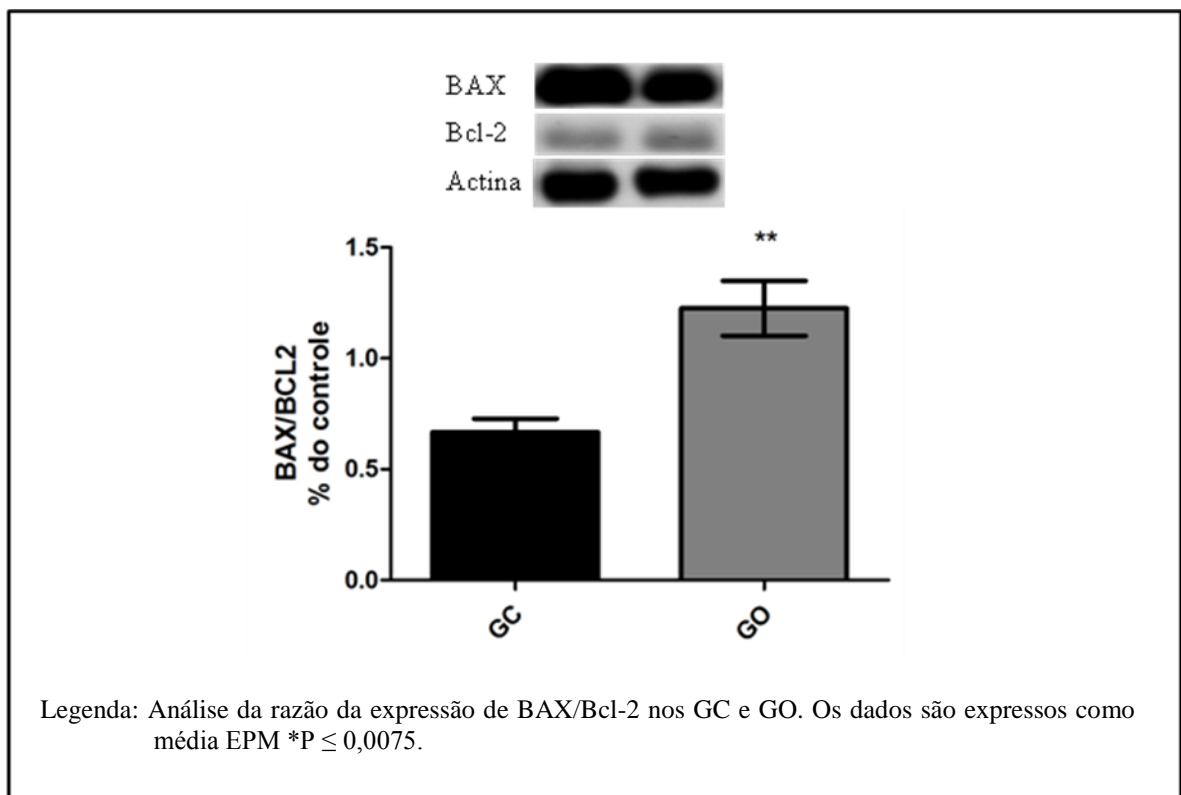


Legenda: (A, B) Gráficos originais típicos do oxígrafo. Eixo Y da esquerda (linha azul): concentração de oxigênio na câmara. Eixo Y da direita (linha vermelha): fluxo de oxigênio. Eixo X: tempo em horas e minutos. MPC: malato + palmitoil-L-carnitina; D: ADP; Omy: Oligomicina. (C) Taxa respiratória máxima estimulada por ADP (Estado 3) dos grupos controle (barras pretas) e Obeso (barras cinzas). (D) Razão do controle respiratório (RCR), calculada como a razão Estado 3 / Estado 4. (E) Razão do controle acceptor (ACR), calculada como a razão Estado 3 / Estado 2. Os dados são expressos como média e erro padrão da média. $P < 0,05$; $N = 6$ /grupo.

7.4 Análise de morte celular programada

Os resultados da quantificação por western blotting do conteúdo de proteínas pró-apoptóticas (BAX) e anti-apoptóticas (Bcl-2) mostraram que o GO apresenta um aumento significativo da razão BAX/ Bcl-2 (Figura 12). Os dados são expressos em EPM* $P < 0,0075$.

Figura 12 - Quantificação de proteínas por western blotting (BAX e Bcl-2)



7.5 Análise das células-tronco cardíacas residentes e células progenitoras endoteliais

Para identificação e localização das células-tronco cardíacas residentes ($c\text{-Kit}^+/\text{CD45}^-$) fizemos imunomarcção para $c\text{-kit}$ (em verde), CD45 (em vermelho), e os núcleos foram corados em azul por DAPI (Figura 13A). As imagens foram observadas em microscopia confocal. Assim as células-tronco cardíacas residentes ($c\text{-Kit}^+/\text{CD45}^-$) foram observadas por entre os cardiomiócitos. Nas análises por western blotting (Figura 13) e citometria de fluxo (Figura 14), verificamos que o GO apresentou redução no conteúdo de CD133 (marcador de células progenitoras endoteliais) e no conteúdo de $c\text{-Kit}$ (marcador de células-tronco cardíacas residentes) no coração, quando comparado ao GC (Fig. 13B e 13C). Os dados são expressos em SEM* $P < 0,05$.

Figura 13 - Microscopia confocal do coração imunomarcado com anticorpos anti- $c\text{-Kit}$ (verde) e anti-CD45 (vermelho)

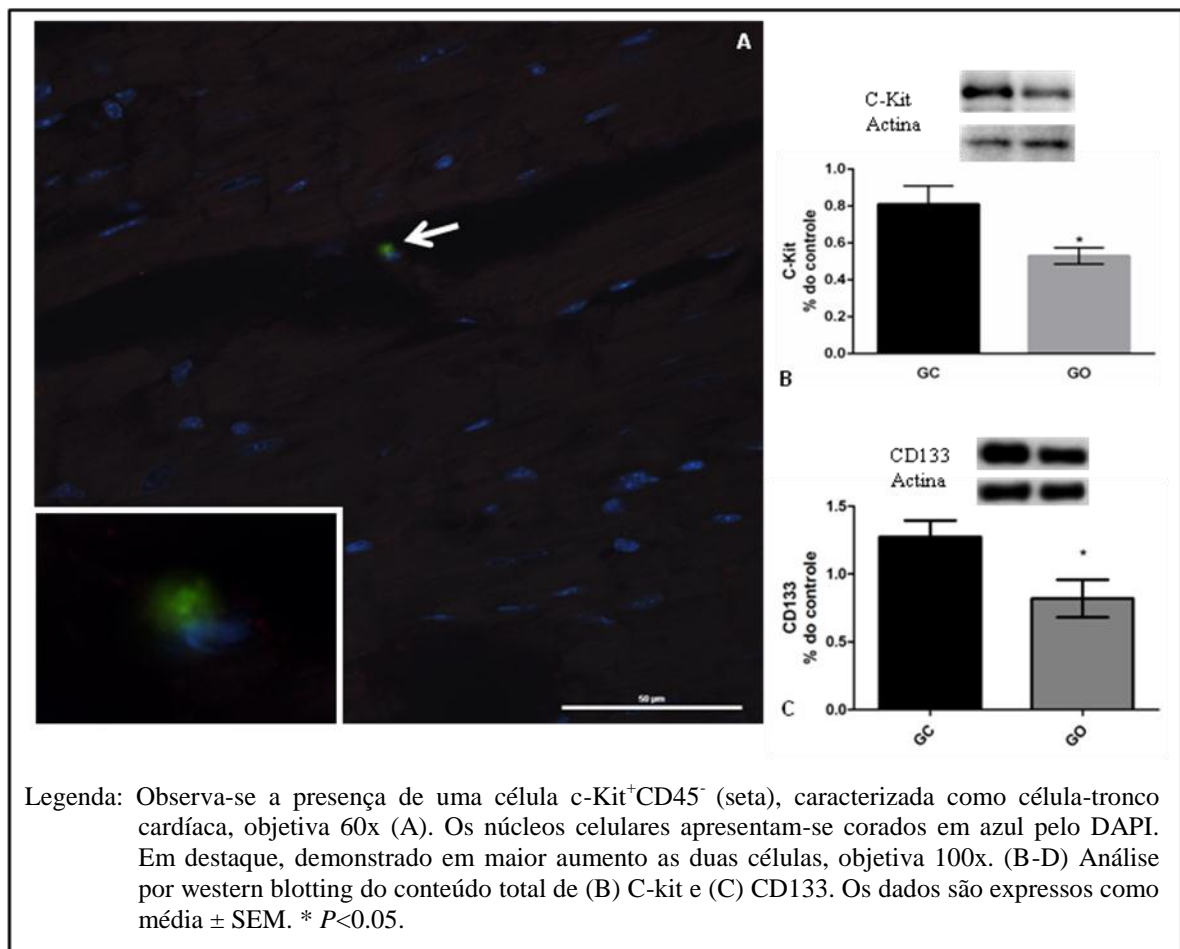
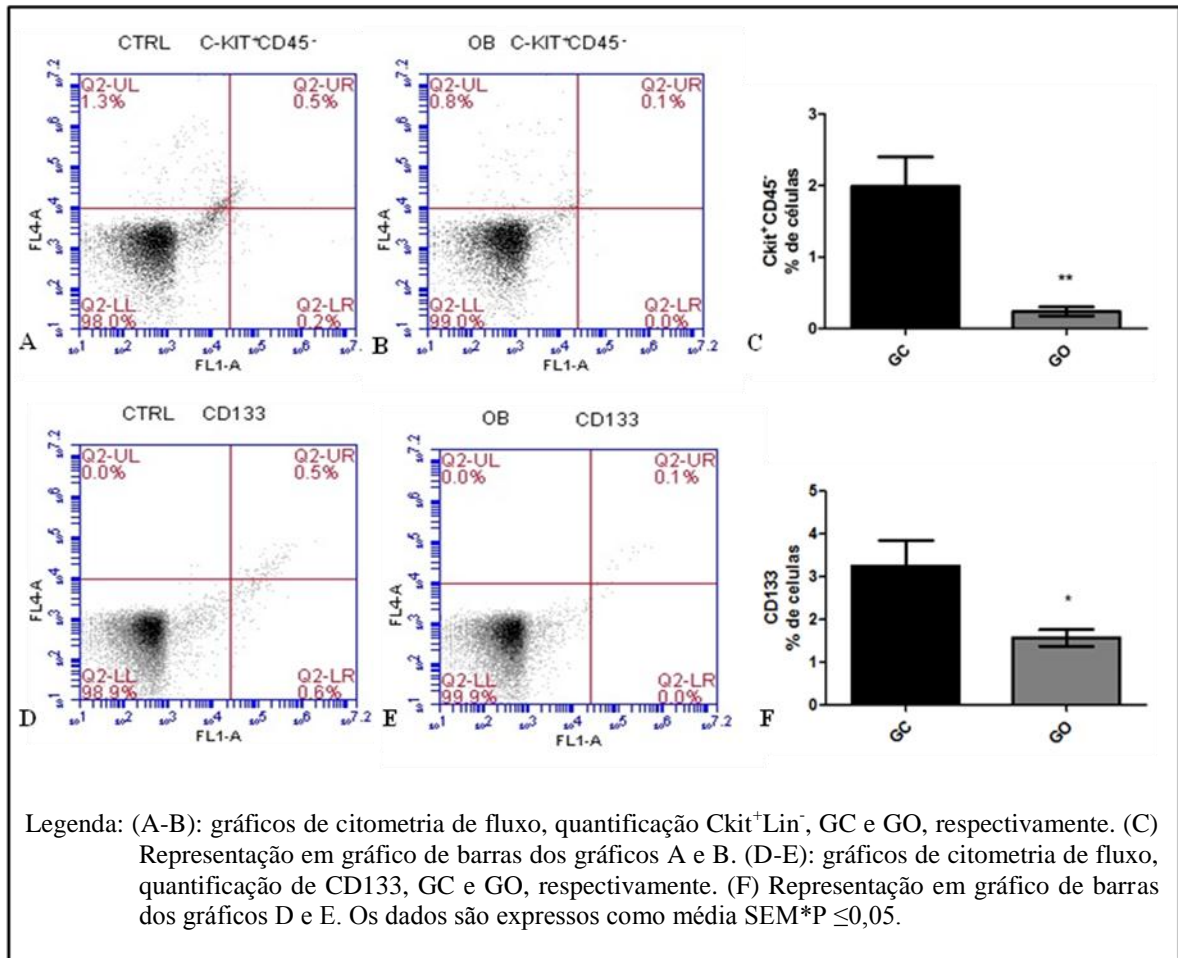


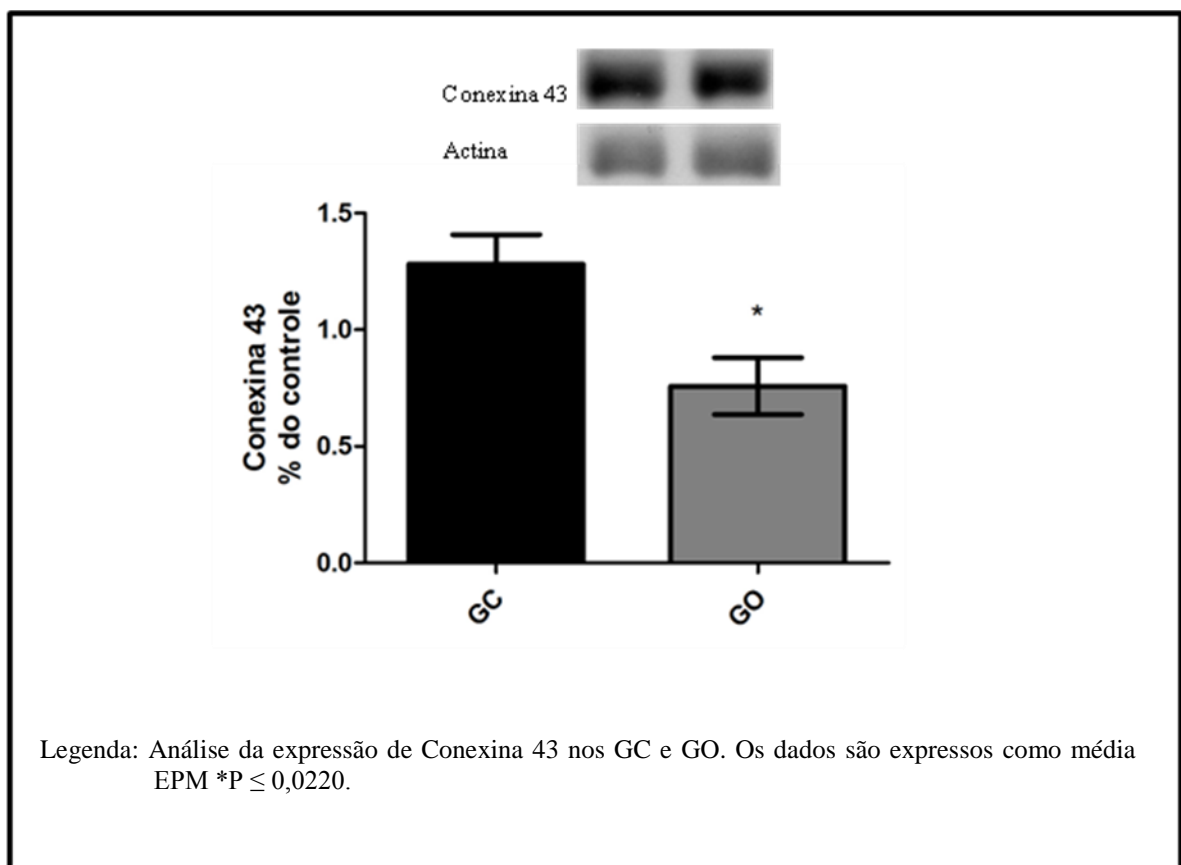
Figura 14 - Análise de citometria de Fluxo



7.6 Análise da conexina 43

A quantificação da expressão de conexina 43 por western blotting revelou que o GO apresenta uma menor expressão desta proteína quando comparado com o GC (Figura 15). Os dados são expressos em SEM* $P < 0,02$.

Figura 15 - Quantificação de proteínas por western blotting (Conexina 43)



8 DISCUSSÃO

O processo de transição nutricional, decorrente das mudanças no padrão de produção e consumo de alimentos, tem contribuído para o aumento dos índices de obesidade. A ampla adesão populacional a produtos industrializados, ricos em gordura saturada, hidratos de carbono simples e sal – a dieta ocidental (POPKIN, 2011), é apontada como a principal causa. Assim, neste estudo, buscamos reproduzir semelhante padrão alimentar, utilizando o modelo experimental de dieta de TIKELLIS *et al.* (2008) em camundongos *Swiss*, machos. A administração desta dieta ocorreu logo após o desmame (21 dias) até o início da fase adulta (90 dias). Assim pudemos avaliar o efeito obesogênico desta dieta. Nossos resultados, então, indicaram um aumento de 17,62% de ganho de peso corporal nos animais submetidos à dieta ocidental ($P < 0,05$) quando comparados ao grupo controle ($P < 0,05$), ainda que ambos os grupos experimentais tenham iniciado com massa corporal semelhante (Gráfico 4).

Ademais, as análises de resto/ingesta revelaram alteração no comportamento alimentar dos animais do GO, que se manifestaram hiperfágicos (Gráfico 3). Além do aumento calórico (Kcal) intrínseco à dieta ocidental, estes animais ingeriram quantidades de alimentos superiores às suas necessidades fisiológicas. Portanto, postula-se que tal fato contribua significativamente para o desenvolvimento da obesidade (GALLOU-KABANI *et al.*, 2007). Já estão bem descritos os processos fisiológicos que controlam a saciedade (HALFORD JC & HARROLD JA *et al.*, 2012; CAMILLERI M, 2015) e que eles estão comprometidos na obesidade (HARIRI & THIBAUT, 2010; ARAFAT AM *et al.*, 2013). Estes mecanismos são coordenados pelo hipotálamo, que integra os sinais do cérebro, da circulação periférica e do trato gastrointestinal para regular o consumo e o dispêndio de energia (GALE *et al.*, 2004; RUIL, 2013).

Os camundongos do GO apresentaram um aumento de 71,19% da hiperglicemia de jejum quando comparados ao GC ($P < 0,05$). Adicionalmente, demonstramos através do teste intraperitoneal de tolerância à glicose que o GO apresentou menor capacidade de captação de glicose (Gráfico 5). Logo, quando comparado ao GC, o GO apresenta maiores concentrações de glicose no sangue nos tempos de 30, 90 e 120 min. Esses dados reforçam nossa compreensão dos efeitos obesogênico dessa dieta.

Finalmente, para melhor caracterizar o status de obesidade do GO, observamos o fígado por coloração de rotina (H&E), além de estimarmos esteatose hepática através da razão do peso do fígado (PF) (g) pela massa corporal (MC) (g). A observação da figura 6B,

correspondente ao GO, permite-nos notar claramente intensa deposição de gotículas lipídicas localizadas na região interlobular e no citoplasma dos hepatócitos, caracterizando esteatose hepática não-alcoólica. Além disso, a razão PF(g) /MC(g) demonstrou um aumento de 36,51% no GO quando comparado ao GC ($P < 0,0007$). Estes dados são corroborados pelo estudo de Serviddio *et al.* (2011), onde o fígado de ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica também apresentaram esteatose hepática não-alcoólica, aumento do peso do fígado e, como consequência, o aumento da relação peso do fígado/massa corporal. No estudo de Hwang *et al.* (2009), camundongos C57Bl/6 submetidos à dieta ocidental apresentaram grandes gotículas de gordura no fígado, característica de esteatose hepática macrovesicular. Desta forma, estes resultados reforçam nossa hipótese que o GO desenvolveu a obesidade, apresentando aumento de massa corporal e esteatose hepática (Figura 6).

Ao que se refere às modificações na estrutura do ventrículo esquerdo (VE), realizamos estimativas de hipertrofia através da razão PVE/CT. Esta estimativa demonstrou que o GO apresentou um aumento de 131,82% em comparação ao GC ($P < 0,007$) (Tabela 3), o que sugere uma possível hipertrofia cardíaca. Este fenômeno, também, foi observado por Tikellis *et al.* (2008) em camundongos C57Bl/6. Outros estudos que reproduziram o mesmo modelo de obesidade, induzida por dieta ocidental, observaram resultados semelhantes a estes, e concluíram que dietas ricas em gordura saturada aumentam o espessamento do VE, resultando em hipertrofia dos cardiomiócitos (FANG *et al.*, 2008; JECKEL *et al.*, 2011). Este fenômeno é uma resposta adaptativa do coração mediante as alterações hemodinâmicas. No contexto da obesidade, trata-se de um processo patológico que resulta, afinal, em disfunção ventricular e insuficiência cardíaca (VARNAVA *et al.*, 2001; SHIRANI *et al.*, 2000; LOPASCHUK *et al.*, 2010).

A hipertrofia observada poder ser decorrente de alterações, como: aumento celular, devido ao acúmulo de seus componentes estruturais – miosina e actina –, e reorganização da ultraestrutura miofibrilar, além do depósito de lipídeos intracelular (HOUSTON & STEVENS, 2015). Paralelamente, também, pode está correlacionado ao aumento de elementos de matriz extracelular e, por consequência, um possível remodelamento, que pode originar um processo de fibrose tecidual (McCURDY S *et al.*, 2010). Ao analisarmos o colágeno total através da técnica de Picro-Sírius observamos um aumento significativo destas proteínas no GO quando comparados ao GC ($P < 0,0001$) (Figura 7). Esse resultado foi corroborado pela quantificação das proteínas colágeno I e colágeno III por western blotting. Novamente, o GO apresentou um aumento significativo tanto de colágeno I ($P < 0,01$) como de colágeno III ($P < 0,05$) (Figura 8).

A MMP-9 se destaca no remodelamento patológico da MEC cardíaca, como reguladora da expressão de microRNAs (miRNAs), no balanço de cálcio e de contratilidade dos cardiomiócitos, que está diretamente envolvida na degradação da matriz cardíaca e indução de fibrose (MISHRA *et al.*, 2012; 2013). Análises da expressão de MMP-9 por western blotting demonstrou que o GO contém uma maior concentração desta proteína ($P < 0,02$) quando comparada ao GC ($P < 0,02$). A MMP-13, no entanto, está envolvida no remodelamento da MEC de outra forma, esta enzima, classificada como colagenase, é importante na clivagem de moléculas de colágenos tipos I e III, principais proteínas estruturais na fibrose cardíaca. Desta forma, elas desempenham um importante papel na regressão da fibrose, bem como a preservação da função cardíaca (HOWES JM *et al.*, 2014). Nossos resultados mostraram que esta enzima encontra-se em menor concentração no GO (GO: 0.8 ± 0.1 , $P < 0,01$) quando comparado ao GC (GC: 1.2 ± 0.06 , $P < 0,01$) (Figura 9). Estes resultados, portanto, corroboram nossa hipótese que a obesidade promove a fibrose cardíaca.

De maneira complementar, a literatura descreve que no processo patológico de hipertrofia cardíaca ocorre uma diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial, assim, a hipertrofia patológica está associada à redução na oxidação de ácidos graxos e consequente aumento na utilização da glicose (ALLARD, 2004). Em nossos resultados de respirometria de alta resolução demonstramos que o GO apresentou disfunção mitocondrial, com redução significativa na taxa respiratória máxima estimulada por ADP (estado 3), indicando redução da capacidade de oxidação de carboidratos ($P < 0,001$) (Fig. 10B) e de ácidos graxos ($P < 0,001$) (Fig. 11B). Observamos, também, um aumento do desacoplamento mitocondrial através da razão do controle respiratório (RCR) ($P < 0,001$) (Fig. 10D e 11D).

Na última década, as células-tronco adultas, principalmente as células-tronco de medula óssea (CTMO), e a terapia celular despontaram como uma panaceia no âmbito das pesquisas biomédicas. A princípio, a expectativa era que estas células fossem capazes de se transdiferenciar nas células específicas dos tecidos/órgãos alvos. No entanto, trabalhos mais recentes demonstraram que o principal potencial terapêutico desta técnica são os efeitos parácrinos, que estão envolvidos na secreção de fatores parácrinos, recrutamento de células-tronco/células progenitoras, na ativação e recrutamento de células-tronco residentes, na modulação e remodelamento da matriz extracelular, vasculogênese/ angiogênese, prevenção da apoptose, imunomodulação, etc. (TONGERS *et al.*, 2011). Embora, diversos trabalhos tem demonstrado sua importância terapêutica, existem circunstâncias nas quais estas células não poderiam exercer plenamente seu potencial. Nosso grupo demonstrou que em indivíduos obesos as células-tronco mononucleares da medula óssea possuem baixa viabilidade e

disfunção mitocondrial, sugerindo que há um comprometimento do seu potencial terapêutico (OLIVEIRA, CORTEZ *et al.*, 2014).

Outro viés de pesquisa são as investigações de terapia celular por ativação parácrina. Nesta técnica busca-se identificar fatores/moléculas capazes de ativar as vias de sobrevivência das células atingidas, e com isso, alcançar a regeneração tecidual/órgão. Assim, a identificação das moléculas secretadas pelas células transplantadas – as CTMO – deve tornar possível a concepção de terapias que eliminem a utilização de células, e se concentrem na administração das moléculas efetoras principais. Desse modo, a descoberta da existência de células-tronco cardíacas residentes enuncia a possibilidade de regeneração deste órgão. Posto isto, as terapias independentes de transplante de células para a regeneração do miocárdio, baseadas na ativação, proliferação celular e diferenciação *in situ* das células-tronco cardíacas residentes (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 do que, seriam econômicos, – em termos de custos de produção.

No entanto, em indivíduos obesos foi demonstrado que há um aumento de componentes característicos da fibrose, sejam eles, o colágeno I e o colágeno III, a MMP-9, está relacionada com o remodelamento patológico da MEC. Foi descrito por MISHRA *et al.*, (2012) que a fibrose está correlacionada como a inibição da sobrevivência e diferenciação das células-tronco cardíacas residentes (CTC) (MISHRA *et al.*, 2012; 2013). Ademais, foi demonstrado, também, que a cardiomiopatia diabética está relacionada com a diminuição do número e capacidade proliferativa das CTC (LEONARDINI & AVOGARRO, 2013).

Assim, fazem-se necessários esclarecer algumas questões: estas CTC são capazes de entrar em citocinese? Além disso, conhecido os efeitos deletérios da obesidade sobre as células-tronco e/ou progenitoras adultas presentes em diferentes tecidos (WOO & COLS., 2011), como estarão estas células no contexto de obesidade? Assim, nós propusemos a hipótese de que a obesidade induzida a partir de períodos iniciais da vida estaria relacionada a um comprometimento das células-tronco/progenitoras cardíacas. Nossos resultados demonstraram o GO apresentou uma diminuição expressiva da população de células-tronco cardíacas residentes (C-kit⁺Lin⁻), analisadas por citometria de fluxo, quando comparado ao GC (P <0,0057), esta diferença corresponde a 729, 17% a menos de CTC no GO (Fig. 14). Além disso, nas análises de western blotting e citometria de fluxo, observamos que a expressão da proteína CD133 (marcador de células progenitoras endoteliais) no GO apresentou redução significativa de 107,4% comparada ao GC (P< 0,05) (Fig. 14). À vista

disso, estes dados corroboram nossa hipótese acerca dos danos promovidos pela obesidade a estas populações de células primitivas, e podemos, assim, inferir que esta perda está vinculada a uma menor capacidade regenerativa e de angiogênese/ vasculogênese do órgão cardíaco frente às injúrias no contexto da obesidade.

Em circunstâncias patológicas, o desequilíbrio entre a captação e utilização de ácidos graxos resulta no acúmulo ectópico de triglicerídeos nos cardiomiócitos (LOPASCHUK *et al*, 2010). Tal infiltração lipídica, conhecida como esteatose cardíaca, tem um efeito tóxico para essas células, que resulta no aumento da apoptose (CHAVALI *et al*, 2013). De fato, os resultados da análise de western blotting revelaram que o GO possui uma maior relação BAX/Bcl-2 (Figura 12), isto é, a expressão de proteínas pró-apoptóticas é preponderante sobre as proteínas anti-apoptóticas, assim, podemos inferir que no GO há o aumento da apoptose em relação ao GC ($P < 0,0075$). A perda destas células tem por consequência um processo de remodelamento do ventrículo esquerdo (LOPASCHUK *et al*, 2010). No qual, o resultado, é o seu comprometimento e consequente desordem na interação entre o metabolismo e a contração, progredindo para uma disfunção e falência cardíaca, o que explica o aumento de morte por doenças cardiovasculares em indivíduos obesos (GUSTAFSSON & GOTTLIEB, 2003; OMS, 2011).

Outro evento importante observado na cardiopatia no contexto da obesidade são alterações morfológicas decorrentes da infiltração lipídica. Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que o GO apresentou maior deposição lipídica intramiocárdica comparado ao GC (NEVES, CORTEZ *et al.*, 2014), provavelmente, em consequência da menor capacidade de oxidação de ácidos graxos (principal fonte energética do coração adulto). Além disso, o GO apresentou alteração tecidual evidente, com cardiomiócitos danificados, os quais não possuíam as estruturas bem preservadas, como os discos intercalares e as estriações transversais, comparado ao GC, demonstrando o efeito lipotóxico causado pela deposição lipídica aumentada.

Ao discutir as repercussões e desfechos da obesidade no contexto da cardiopatia vimos que esse cenário resulta, afinal, em disfunção ventricular e insuficiência cardíaca (VARNAVA *et al*, 2001; SHIRANI *et al*, 2000; LOPASCHUK *et al*, 2010), que estão correlacionados com o remodelamento da matriz extracelular, a diminuição da capacidade oxidativa, além da hipertrofia do VE. Somaremos a esta conjuntura outra variável comumente observada em pacientes obesos – a arritmia cardíaca. As mudanças na estrutura e tamanho do coração alteram seu funcionamento e sua função elétrica, acarretando na fibrilação atrial (GIZURARSON S *et al*, 2014). A conexina 43 é descrita como uma importante proteína que

participa no acoplamento da arritmia cardíaca (ROELL W *et al.*, 2007). As conexinas são proteínas que estão presentes nas junções comunicantes, dos discos intercalares, que permitem a passagem de pequenas substâncias e a transmissão dos impulsos elétricos pelo tecido cardíaco. Este mecanismo é fundamental para a contração muscular do órgão e para o sincronismo de seu movimento (ROELL W *et al.*, 2007). Apesar de haver mais de 20 tipos diferentes de conexinas, nas células musculares do coração aparecem apenas quatro delas, sendo a conexina 43 a mais abundante no ventrículo (GIZURARSON S *et al.*, 2014). Nossas análises por western blotting da conexina 43 mostraram uma expressiva redução de 69,06% desta proteína no GO quando comparado ao GC ($P < 0,02$) (Fig. 15). Assim, podemos inferir por hipótese que o aumento da ingestão de gordura saturada e carboidratos simples, também, esta associada à diminuição desta proteína, contribuindo, desta forma, para amplificar os prejuízos desta dieta na função cardíaca.

CONCLUSÃO

A epidemia mundial de obesidade é um fenômeno importante para a saúde pública com graves impactos econômicos. O aumento dos índices de risco de obesidade está correlacionado a uma mudança de *habitus* alimentar populacional, que incluiu na sua dieta gordura saturada e carboidratos simples – a dieta ocidental. Nossos resultados mostraram que o aumento da ingestão desses nutrientes está correlacionado ao aumento do peso corporal, esteatose hepática e alterações no comportamento alimentar, resultando na hiperfagia. Além disso, a obesidade está associada ao surgimento de doenças crônicas e ao aumento da morbimortalidade e incapacidade dos pacientes e, por conseguinte, no comprometimento da qualidade de vida e da produtividade. Estão bem descritas na literatura as relações entre as patologias associadas à obesidade e o aumento das citocinas pró-inflamatórias e das espécies reativas de oxigênio. Este cenário resulta em grandes mudanças no metabolismo energético cardíaco – na oxidação de carboidratos e ácidos graxos –, e na expressão de proteínas envolvidas no acoplamento iônico, depois, contribui para o remodelamento patológico da matriz extracelular, fibrose, hipertrofia e esteatose cardíaca. Além dos prejuízos supracitados na obesidade observam-se uma diminuição expressiva da população de células-tronco cardíacas residentes e células progenitoras endoteliais. Portanto, a partir desses resultados podemos concluir que na obesidade ocorrem danos morfológicos e fisiológicos que comprometem a função cardíaca. Estes prejuízos sofrem ressonância à medida que as populações de células-tronco e células progenitoras endoteliais estão expressivamente reduzidas na obesidade. A perda destas populações celulares pode significar uma redução da capacidade de revascularização (angiogênese e vasculogênese) e no percentual de substituição cardiomiócitos, comprometendo, assim, a homeostase fisiológica deste órgão.

REFERÊNCIAS

- ABESO. Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e Síndrome Metabólica. *Documento do Consenso Latino-Americano em Obesidade*. São Paulo: ABESO; 2001.
- ALLARD, M. F. Energy substrate metabolism in cardiac hypertrophy. *Curr Hypertens Rep.* v. 6, n. 6, p. 430-435, Dec. 2004.
- AIRES, M. M (org) et al. *Fisiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
- ANVERSA P, KAJSTURA J. Ventricular myocytes are not terminally differentiated in the adult mammalian heart. *Circ Res* 1998; 83:1-14.
- ARAFAT A.M., WEICKERT MO, ADAMIDOU A, OTTO B, PERSCHEL FH, SPRANGER J, MÖHLIG M, PFEIFFER AF. The impact of insulin-independent, glucagon-induced suppression of total ghrelin on satiety in obesity and type 1 diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Oct;98(10):4133-42. doi: 10.1210/jc.2013-1635. Epub 2013 Aug 21.
- ASSMUS B, SCHACHINGER V, TEUPE C, BRITTEN M, LEHMANN R, DOBERT N, et al. Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002, p. 3009-17.
- ASTRUP, A. Healthy lifestyles in Europe: prevention of obesity and type II diabetes by diet and physical activity. *Public Health Nutr.* v. 4, p. 499–515, 2001
- BANERJEE C. Stem cells therapies in basic science and translational medicine: current status and treatment monitoring strategies. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011 Apr;12(4):469-87.
- BAYNE, K. Revised guide for the care and use of laboratory animals available. *American Physiological Society. Physiologist.* v. 39, n. 4, p. 208-211, Aug. 1996.
- BELTRAMI AP, BARLUCCHI L, TORELLA D, BAKER M, LIMANA F, CHIMENTI S, KASAHARA H, ROTA M, MUSSO E, URBANEK K, LERI A, KAJSTURA J, NADALGINARD B, ANVERSA P. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell.* 2003;114:763-76.
- BERGMANN O, BHARDWAJ R, BERNARD S, ZDUNEK S, BARNABE-HEIDER F, WALSH S, ZUPICICH J, ALKASS K, BUCHHOLZ B, DRUID H, JOVINGE S, FRISEN J. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science.* 2009;324:98–102.
- BERGMANN O, ZDUNEK S, ALKASS K, DRUID H, BERNARD S, FRISEN J. Identification of cardiomyocyte nuclei and assessment of ploidy for the analysis of cell turnover. *Exp Cell Res.* 2011;327:188 –194.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. *Departamento de Atenção Básica. Obesidade*. Brasília: Ministério da Saúde; 2006.

BRENT EW. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. *J Am Soc Nephrol* 15: 2792–2800, 2004.

CAMILLERI M. Peripheral Mechanisms In Appetite Regulation. *Gastroenterology* 2014 Sep 21. pii: S0016-5085(14)01138-X. doi: 10.1053/j.gastro.2014.09.016.

CASAS-AGUSTENCH, P. et al. Acute effects of three high-fat meals with different fat saturations on energy expenditure, substrate oxidation and satiety. *Clin Nutr.* v. 28, p. 39–45, 2009.

CHAVALI, VISHALAKSHI, SURESH C TYAGI, PARAS K MISHRA. Predictors and prevention of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* 2013;6 151–160.

CAUWE B, VAN DEN STEEN PE, OPDENAKKER G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2007 May-Jun;42(3):113-85.

CHEN S, XU Y, WANG S, SHEN M, CHEN F, CHEN M, WANG A, CHENG T, SU Y, WANG J. Subcutaneous administration of rhIGF-I post irradiation exposure enhances hematopoietic recovery and survival in BALB/c mice. *J Radiat Res.* 2012, p. 530-581.

CHEN SL, FANG WW, Ye F, Liu YH, OIAN 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, p. 94 – 120.

CHEUNG, TOM H. & THOMAS A. Rando Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14, 329-340 (June 2013) doi:10.1038/nrm3591.

CHIEN KR, OLSON EN. Converging pathways and principles in heart development and disease. *Cell.* 2002 Jul 26;110(2):153-62.

CONSIDINE RV, SINHA MK, HEIMAN ML, KRIAUCIUNAS A, STEPHENS TW, Nyce MR, OHANNESIAN JP, MARCO CC, MCKEE LJ, BAUER TL, et al.: Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 1996, 292–295.

CORTEZ E, NEVES FA, BERNARDO AF, STUMBO AC, CARVALHO L, GARCIA-SOUZA E, SICHIERI R, MOURA AS. Lymphocytes Mitochondrial Physiology as Biomarker of Energy Metabolism during Fasted and Fed Conditions. *ScientificWorldJournal.* 2012, p. 320 - 380.

COSTA MV, FERNANDES-SANTOS C, FARIA TDA S, AGUILA MB, MANDARIM-DE-LACERDA CA. Diets rich in saturated fat and/or salt differentially modulate atrial natriuretic peptide and renin expression in C57BL/6 mice. *Eur J Nutr.* 2012;51(1):89-96.

CRUVINEL, MELO W, JÚNIOR, D. M, ARAÚJO, J A P., CATELAN, T. T., SOUZA, A W. S., SILVA, N P, ANDRADE, E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória.

Rev Bras Reumatol. 2010; p. 380 – 434 in <http://www.scielo.br/pdf/rbr/v50n4/v50n4a08.pdf>, acessado em 20/10/2014.

DIB N, MICHLER RE, PAGANI FD, WRIGHT S, KEREIAKES DJ, LENGERICH R, et al. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* 2005; 112:1748-55.

DIMOVA N1, WYSOCZYNSKI M, ROKOSH G. STROMAL cell derived factor-1 α promotes C-Kit+ cardiac stem/progenitor cell quiescence through casein kinase 1 α and GSK3 β . *Stem Cells.* 2014 Feb;32(2):487-99. doi: 10.1002/stem.1534.

ELLISON GM, TORELLA D, DELLEGROTTAGLIE S, PEREZ-MARTINEZ C, PEREZ DE PRADO A, VICINANZA C, PURUSHOTHAMAN S, GALUPPO V, IACONETTI C, WARING CD, SMITH A, TORELLA M, CUELLAS RAMON C, GONZALO-ORDEN JM, AGOSTI V, INDOLFI C, GALIÑANES M, FERNANDEZ-VAZQUEZ F, NADAL-GINARD B. 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. Epub 2011 Jun 30.

ELLISON GM, NADAL-GINARD B, TORELLA D. Optimizing Cardiac Repair and Regeneration Through Activation of the Endogenous Cardiac Stem Cell Compartment. *J Cardiovasc Transl Res.* 2012 Jun 12.

ERBS S, LINKE A, ADAMS V, LENK K, THIELE H, DIEDERICH KW, et al. Transplantation of blood-derived progenitor cells after recanalization of chronic coronary artery occlusion: first randomized and placebo-controlled study. *Circ Res* 2005;97: 756-62. FANG, C. X. et al. Hypertrophic cardiomyopathy in high-fat diet-induced obesity: role of suppression of forkhead transcription factor and atrophy gene transcription. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008. v. 295, p. H1206–H1215.

FERNANDES MR AND PERIN EC. Regeneração Cardíaca. Coração: um Órgão Pós-Mitótico? *Rev Bras Cardiol Invas* 2007; 15:61-69.

FISBERG M. Obesidade na infância e adolescência. In: Fisberg M (ed.). Obesidade na infância e adolescência. São Paulo: Fundação BYK, 1995. p. 9-13.)

FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; LIMA, F.B. Adipose tissue as an endocrine organ: From theory to practice. *J. Pediatr.* 2007, 83, 192–203.

FRIEDMAN, J.M.; HALAAS, J.L. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 1998, 395, 763–770.

GALE, S. M. et al. Energy homeostasis, obesity and eating disorders: recent advances in endocrinology. *J Nutr.* v. 134, n.2, p. 295-298, 2004.

GALLOU-KABANI, C. et al. Resistance to high-fat diet in the female progeny of obese mice fed a control diet during the periconceptual, gestation, and lactation periods. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 292, p. E1095–E1100, 2007.

GIZURARSON S, STÅHLMAN M, JEPSSON A, SHAO Y, REDFORS B, BERGFELDT L, BORÉN J, OMEROVIC E. Atrial fibrillation in patients admitted to coronary care units in western Sweden - focus on obesity and lipotoxicity. *J Electrocardiol.* 2014 Dec 13. pii: S0022-0736(14)00498-1. doi: 10.1016/j.jelectrocard.2014.12.010.

GRANT RW, DIXIT VD Adipose tissue as an immunological organ. *Obesity (Silver Spring).* 2015 Jan 22. doi: 10.1002/oby.21003]

GUSTAFSSON, A. B.; GOTTLIEB, R. A. Mechanisms of apoptosis in the heart. *J Clin Immunol.* v. 23, n. 6, p. 447-459, Nov. 2003.

GUZZARDI MA, IOZZO P. Fatty heart, cardiac damage, and inflammation. *Rev Diabet Stud.* 2011;8:403-17.

HUKSHORN, C.J.; LINDEMAN, J.H.; TOET, K.H.; SARIS, W.H.; EILERS, P.H.; WESTERTER-PLANTENGA, M.S.; KOOISTRA, T. Leptin and the proinflammatory state associated with human obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, 89, 1773–1778.

JECKEL, K. M. et al. The role of dietary fatty acids in predicting myocardial structure in fat-fed rats. *Lipids in Health and Disease.* v. 10, n. 92, p. 1-11, 2011.

JOCKEN, J.W.; LANGIN, D.; SMIT, E.; SARIS, W.H.; VALLE, C.; HUL, G.B.; HOLM, C.; ARNER, P.; BLAAK, E.E. Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase protein expression is decreased in the obese insulin-resistant state. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2007, 92, 2292–2299.

HARROLD JA, DOVEY TM, BLUNDELL JE, HALFORD JC, CNS regulation of appetite. *Neuropharmacology*, 2012, 63-78, 1016/J.NEUROPHARM.2012.01.007. EPUB 2012 JAN 30.

HAYASHI, E., & HOSODA, T. How do resident stem cells repair the damaged myocardium? *World Journal of Stem Cells*, 7(1), 182–185. doi:10.4252/wjsc.v7.i1.182. Available in <http://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v7/i1/182.htm>.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutrition Research Reviews.* 2010. p. 270-299

HONG, K. U., & BOLLI, R. (2014). Cardiac Stem Cell Therapy for Cardiac Repair. *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 16(7), 324. doi:10.1007/s11936-014-0324-3

HOWES, BIHAN D, SLATTER DA, HAMAIA SW, PACKMAN LC, KNAUPER V, VISSE R, FARNDAL RW. The recognition of collagen and triple-helical toolkit peptides by MMP-13: sequence specificity for binding and cleavage. 2014 Aug 29; 289, 2409, 2014.

HOUSTON, B. A., & STEVENS, G. R. (2014). HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY: A REVIEW. *Clinical Medicine Insights. Cardiology*, 8 (Suppl 1), 53–65. doi:10.4137/CMC.S15717.

HWANG, B.; JEOUNG, N. H.; HARRIS, R. A. Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 (PDH4) deficiency attenuates the long-term negative effects of a high-saturated fat diet. *Biochem J.* v. 423, n. 2, p. 243-252, Sep. 2009.

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.

INGWALL, J. S. Energy metabolism in heart failure and remodelling. *Cardiovasc Res.* v. 81, p. 412-419, 2009.

JUNG, UN JU AND MYUNG-SOOK CHOI. Obesity and Its Metabolic Complications: The Role of Adipokines and the Relationship between Obesity, Inflammation, Insulin Resistance, Dyslipidemia and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 6184-6223; doi:10.3390/ijms15046184

KAC, G.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. *Cad Saude Publica.* V. 19, n. 1, p. 4-5, 2003.

KANDASAMY AD, CHOW AK, ALI MA, SCHULZ R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc Res* 2010. 85(3):413-423.

KANTER, REBECCA, AND BENJAMIN CABALLERO. Global Gender Disparities in Obesity: A Review. *Advances in Nutrition* 3.4 (2012): 491–498. PMC. Web. 18 Jan. 2015.

KENNEDY ET, BOWMAN SA, SPENCE JT, FREEDMAN M, KING J. Popular diets: correlation to health, nutrition, and obesity. *J am diet assoc.* 2001, p. 101-120.

KERSHAW, E.E.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2004, 89, 2548–2556.

KOUIDHI, S.; JARBOUI, S.; CLERGET FROIDEVAUX, M.S.; ABID, H.; DEMENEIX, B.; ZAOUCHE, A.; BENAMMAR ELGAAIED, A.; GUISSOUMA, H. Relationship between subcutaneous adipose tissue expression of leptin and obesity in Tunisian patients. *Tunis. Med.* 2010, 88, 569–572.

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

LAWLOR, D. A.; CHATURVEDI, N. Treatment and prevention of obesity--are there critical periods for intervention? *Int J Epidemiol.* v. 35, n. 1, p. 3-9, Feb. 2006.

LEONARDINI A, AVOGARO A. Abnormalities of the cardiac stem and progenitor cell compartment in experimental and human diabetes. *Arch Physiol Biochem.* 2013 Oct;119(4):179-87. doi: 10.3109/13813455.2013.798334. Epub 2013 Jun 12.

LEOPOLDO AS, SUGIZAKI MM, LIMA-LEOPOLDO AP, DO NASCIMENTO AF, LUVIZOTTO RDE A, DE CAMPOS DH, OKOSHI K, DAL PAI-SILVA M, PADOVANI CR, CICOGNA AC. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol.* 2010;26:423-9.

LOH K, HERZOG H, SHI YC. Regulation of energy homeostasis by the NPY system. *Trends Endocrinol Metab.* 2015 Feb 5. pii: S1043-2760(15)00004-1. doi: 10.1016/j.tem.2015.01.003.

LOPASCHUK GARY D., CLIFFORD D.L. FOLMES AND WILLIAM C. STANLEY. Cardiac Energy Metabolism in *Obesity* 2007 295-347.

LOPASCHUK GARY D., JOHN R. USSHER, CLIFFORD D. L. FOLMES, JAGDIP S. JASWAL, AND WILLIAM C. STANLEY. Myocardial Fatty Acid Metabolism in Health and Disease. *Physiol Rev* 90: 207–258, 2010; doi:10.1152/physrev.00015.2009

MACLELLAN WR, SCHNEIDER MD. Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu Rev Physiol.* 2000, p. 262:289-319.

MARQUES MB, LANGOUCHE L. Endocrine, metabolic, and morphologic alterations of adipose tissue during critical illness. *Crit Care Med.* 2013, 317-325. doi: 10.1097/CCM.0b013e318265f21c.

MARROQUÍ, L.; GONZALEZ, A.; ÑECO, P.; CABALLERO-GARRIDO, E.; VIEIRA, E.; RIPOLL, C.; NADAL, A.; QUESADA, I. Role of leptin in the pancreatic β -cell: Effects and signaling pathways. *J. Mol. Endocrinol.* 2012, 49, R9–R17.

MARSEGLIA, L., MANTI, Sara, D'ANGELO Gabriella, NICOTERA Antonio, PARISI, Eleonora 3, ROSA Gabriella Di, GITTO Eloisa and ARRIGOINT Teresa. Oxidative Stress in Obesity: A Critical Component in Human Diseases. *J. Mol. Sci.* 2015, 16, 378-400.

MATSUBARA H. Risk to the coronary arteries of intracoronary stem cell infusion and G-CSF cytokine therapy. *Lancet* 2004; 363:746-7.

MCCURDY S, BAICU CF, HEYMANS S, BRADSHAW AD. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC), 2010.

MCQUAID, S.E.; HODSON, L.; NEVILLE, M.J.; DENNIS, A.L.; CHEESEMAN, J.; HUMPHREYS, S.M.; RUGE, T.; GILBERT, M.; FIELDING, B.A.; FRAYN, K.N.; ET AL. Downregulation of adipose tissue fatty acid trafficking in obesity: A driver for ectopic fat deposition? *Diabetes* 2011, 47–55.

MENASCHE P, HAGEGE AA, VILQUIN JT, DESNOS M, ABERGEL E, POUZET B, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003, 78-83.

MIMEAULT M, BATRA SK. Great promise of tissue-resident adult stem/progenitor cells in transplantation and cancer therapies. *Adv Exp Med Biol.* 2012, p. 122-212.

MENDONÇA, C. P.; ANJOS, L. A. Aspectos das práticas alimentares e da atividade física como determinantes do crescimento do sobrepeso/obesidade no Brasil. *Cad. Saúde Pública.* v. 20, n. 3, p. 698-709, 2004.

MEYER GP, WOLLERT KC, LOTZ J, STEFFENS J, LIPPDT P, FICHTNER S, et al. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months' follow-

up data from the randomized, controlled BOOST (BOne marrOw transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial. *Circulation* 2006;113:1287-94.

MIMEAULT M, HAUKE R, BATRA SK. Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Sep;82(3):252-64. Epub 2007 Aug 1.

MIN DING·EVA M. RZUCIDLO, DAVEY JENNIFER C., YI XIE, RENJING LIU, YU JIN, LINDSEY STAVOLA, KATHLEEN A. MARTIN CHAPTER ELEVEN – Adiponectin in the Heart and Vascular System in <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-398313-8.00011-7>, acessado em 23/09/2014.

MINAMI E, LAFLAMME MA, SAFFITZ JE, MURRAY CE. Extracardiac progenitor cells repopulate most major cell types in the transplanted human heart. *Circulation* 2005, 122 - 180.

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 - 170.

MISHRA, P.K.; GIVVIMANI, S., CHAVALI, VISHALAKSHI, . TYAGI SURESH C. Cardiac matrix: A clue for future therapy. *Biochim Biophys Acta* 2013 Dec;1832(12):2271-6. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.09.004. Epub 2013 Sep 17.

P.K. MISHRA, V. CHAVALI, N. METREVELI, S.C. TYAGI. Ablation of MMP9 induces survival and differentiation of cardiac stem cells into cardiomyocytes in the heart of diabetics: a role of extracellular matrix. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2012, pp. 353–360

MONDA KL, ADAIR LS, ZHAI F. Longitudinal relationships between occupational and domestic physical activity patterns and body weight in China. *Eur J Clin Nutr* 2007, 662 -731. PubMed.

NEUBAUER, S. The failing heart - an engine out of fuel. *N Engl J Med.* v. 356, p. 1140-1151, 2007.

NEVES FA, CORTEZ E, BERNARDO AF, MATTOS AB, VIEIRA AK, MALAFAIA TDE O, THOLE AA, RODRIGUES-CUNHA AC, GARCIA-SOUZA EP, SICHIERI R, MOURA AS. Heart energy metabolism impairment in Western-diet induced obese mice. *J Nutr Biochem.* 2014, 255 -327.

NG SW, NORTON EC, POPKIN BM. WHY have physical activity levels declined among Chinese adults? Findings from the 1991–2006 China health and nutrition surveys. *Soc Sci Med*, 2009 p. 1285–1314. [PubMed: 19232811]

NOH, HYE-LIM, HARUYO YAMASHITA, IRA J. GOLDBERG. Cardiac metabolism and mechanics are altered by genetic loss of lipoprotein triglyceride lipolysis. *Cardiovascular Drugs and Therapy* December 2006, p. 230-265.

OLIVEIRA GP, CORTEZ E, ARAUJO GJ, DE CARVALHO SABINO KC, NEVES FA, BERNARDO AF, DE CARVALHO SN, MOURA AS, CARVALHO L, THOLE AA.

Impaired mitochondrial function and reduced viability in bone marrow cells of obese mice. *Cell Tissue Res.* 2014, p. 23 -38.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Obesidade: Prevenção e gestão da epidemia global. Relatório de uma Consulta da OMS sobre Obesidade. *Geneva*: OMS, 1998.

OMS, 2011. Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control

OMS. Organização Mundial de Saúde. Prevenção de doenças crônicas, um investimento vital. *Geneva*: OMS, 2005, p. 234-320.

PARENTE LB, AGUILA MB, MANDARIM-DE-LACERDA CA. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. *Clin Nutr.* 2008, p. 27-40.

PAZ-FILHO, G.; MASTRONARDI, C.; FRANCO, C.B.; WANG, K.B.; WONG, M.L.; LICINIO, J. LEPTIN: Molecular mechanisms, systemic pro-inflammatory effects, and clinical implications. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 2012, 567–607.

POPKIN, B. M. Contemporary nutritional transition: determinants of diet and its impact on body composition. The Summer Meeting of the Nutrition Society hosted by the Scottish Section was held at Heriot-Watt University, Edinburgh on 28 June–1 July 2010. *Proceedings of the Nutrition Society.* v. 70, p. 82-91, 2011.

PRICE MJ, CHOU CC, FRANTZEN M, MIYAMOTO T, KAR S, LEE S, ET AL. Intravenous mesenchymal stem cell therapy early after reperfused acute myocardial infarction improves left ventricular function and alters electrophysiologic properties. *Int J Cardiol* 2006, 111-231.

PTASZEK LM, MANSOUR M, RUSKIN JN, CHIEN KR. Towards regenerative therapy for cardiac disease. *Lancet.* 2012, 379-433.

RAHMOUNI, K. Differential Control of the Sympathetic Nervous System by Leptin: Implications for Obesity. *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology. Supplement*, 2007, p. 221-322 -1440-1681.2007.04760.x

ROELL W, LEWALTER T, SASSE P, TALLINI YN, CHOI BR, BREITBACH M, DORAN R, BECHER UM, HWANG SM, BOSTANI T, VON MALTZAHN J, HOFMANN A, REINING S, EIBERGER B, GABRIS B, PFEIFER A, WELZ A, WILLECKE K, SALAMA G, SCHRICKEL JW, KOTLIKOFF MI, FLEISCHMANN BK. Engraftment of connexin 43-expressing cells prevents post-infarct arrhythmia. *Nature.* 2007 Dec 6;450(7171):819-24.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, H., SIMENTAL-MENDÍA, L. E., RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, G., & REYES-ROMERO, M. A. Obesity and Inflammation: Epidemiology, Risk Factors, and Markers of Inflammation. *International Journal of Endocrinology*, 2013, 678159. doi:10.1155/2013/678159.

RUI L. Brain regulation of energy balance and body weight *Rev Endocr Metab Disord.* 2013 Dec;14(4):387-407. doi: 10.1007/s11154-013-9261-9. Review.

SERVIDDIO, G. et al. Oxidation of Hepatic Carnitine Palmitoyl Transferase-I (CPT-I) Impairs Fatty Acid Beta- Oxidation in Rats Fed a Methionine-Choline Deficient Diet. *PLoS ONE*. v. 6, n. 9, p. e24084 1-9, 2011.

SHEN Q, CHEN B2, XIAO Z2, ZHAO L1, XU X1, WAN X1, JIN M3, DAI J2, Dai H1. Paracrine factors from mesenchymal stem cells attenuate epithelial injury and lung fibrosis. *Mol Med Rep*. 2015 Apr;11(4):2831-7. doi: 10.3892/mmr.2014.3092. Epub 2014 Dec 15.

SICHERI, R. Medidas e determinantes da obesidade. In: Sichieri, R., organizadora. *Epidemiologia da obesidade*. Rio de Janeiro: *EDUERJ*; 1998.

SICHERI R, MOURA A.S. Lymphocytes Mitochondrial Physiology as Biomarker of Energy Metabolism during Fasted and Fed Conditions. *Scientific World Journal*. 2012; 320 - 380.

SILVA, A. P. S. et al. Dietary fatty acids early in life affect lipid metabolism and adiposity in young rats. *Lipids*. v. 41, p. 535-541, 2006.

STOJSAVLJEVIĆ, SANJA, MARIJA GOMERČIĆ PALČIĆ, LUCIJA VIROVIĆ JUKIĆ, LEA SMIRČIĆ DUVNJAK AND MARKO DUVNJAK. Adipokines and proinflammatory cytokines, the key mediators in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease *World J Gastroenterol*. 2014 December 28; 20(48): 18070-18091.

TAEGTMEYER, H. Cardiac metabolism as a target for the treatment of heart failure. *Circulation*. v. 110, p. 894-896, 2004.

TAKAHASHI K, TANABE K, OHNUKI M, NARITA M, ICHISAKA T, TOMODA K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007 Nov 131-.

TALL AR, YVAN-CHARVET L Cholesterol, inflammation and innate immunity *Nat Rev Immunol*. 2015 Jan 23;15(2):104-16. doi: 10.1038/nri3793.

TIKELLIS, C. et al. Cardiac inflammation associated with a Western diet is mediated via activation of RAGE by AGEs. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. v. 295, n. 2, p. E323-E330, Aug. 2008.

TEERDS, K.J.; DE ROOIJ, D.G.; KEIJER, J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Human Reproduction Update*. v.17, n. 5, p. 667-683, 2011.

VARNAVA AM, E. P. Relation between myocyte disarray and outcome in hypertrophic cardiomyopathy. *Am J Cardiol* , 2001, p. 88-129.

VÁZQUEZ-VELA , MARIA EUGENIA FRIGOLET, NIMBE TORRES, AND ARMANDO R. TOVAR. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity . *Archives of Medical Research*, 2008, p. 715 - 728.

VENTURA-CLAPIER R, GARNIER A, VEKSLER V, JOUBERT F. Bioenergetics of the failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011, 1813:1360-72.

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 -383.

XU J, SINCLAIR KD. One-carbon metabolism and epigenetic regulation of embryo development. *Reprod Fertil De*. 2015 Feb 25. doi: 10.1071/RD14377

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

WAJCHENBERG, Bernardo Léo. Tecido adiposo como glândula endócrina. *Arq Bras Endocrinol Metab [online]*. 2000, vol.44, n.1, pp. 13-20. ISSN 0004-2730. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302000000100004>

RAYMOND CHING-CHIEW WONG¹, MBBS, MRCP, KONG BING TAN. Asymmetric left ventricular hypertrophy associated with morbid obesity mimicking familial hypertrophic cardiomyopathy, MBBS, FRCPath. *Singapore Med J* 2014; 55(12): e201-e204 doi: 10.11622/smedj.2014186

WOO M, ISGANAITIS E, CERLETTI M, FITZPATRICK C, WAGERS AJ, JIMENEZ-CHILLARON J, PATTI ME. Early Life Nutrition Modulates Muscle Stem Cell Number: Implications for Muscle Mass and Repair. *Stem Cells Dev.*, 2011, 201-276.

ZALESIN KC, FRANKLIN BA, MILLER WM, PETERSON ED, McCullough PA. Impact of obesity on cardiovascular disease. *Med Clin North Am*. 2011, 95-119.

ZAMBON, L. et al. Efeitos de dois tipos de treinamento de natação sobre a adiposidade e o perfil lipídico de ratos obesos exógenos. *Rev. Nutr.* v. 22, n. 5, 2009. p. 707-715

ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372: 425– 432, 1994

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, 159-230.

ANEXO A - Dieta Controle: artigo Tikellis *et al.* (2008)


Specialty Feeds

3150 Great Eastern Hwy
Glen Forrest
Western Australia 6071
p: +61 8 9298 8111
F: +61 8 9298 8700
Email: info@specialtyfeeds.com

Diet

AIN93G

Standard AIN93G Rodent Diet

A semi-pure diet formulation for laboratory rats and mice based on AIN-93G. This formulation satisfies the nutritional requirements for growth of rats and mice. Some modifications have been made to the original formulation to suit locally available raw materials.

- We have evidence that vitamin losses and other changes to the diet can occur when irradiated at 25KGy. The diet SF09-091 is formulated with extra vitamins to allow for losses during the irradiation process. Please contact us for more information if the diet is to be irradiated.

Calculated Nutritional Parameters		Ingredients	
Protein	19.40%	Casein (Acid)	200 g/Kg
Total Fat	7.00%	Sucrose	100 g/Kg
Crude Fibre	4.70%	Canola Oil	70 g/Kg
AD Fibre	4.70%	Cellulose	50 g/Kg
Digestible Energy	16.1 MJ / Kg	Wheat Starch	404 g/Kg
% Total calculated digestible energy from lipids	16.00%	Dextrinised Starch	132 g/Kg
% Total calculated digestible energy from protein	21.00%	DL Methionine	3.0 g/Kg
Ash	4.50%	Calcium Carbonate	13.1 g/Kg
		Sodium Chloride	2.6 g/Kg
		AIN93 Trace Minerals	1.4 g/Kg
		Potassium Citrate	2.5 g/Kg
		Potassium Dihydrogen Phosphate	6.9 g/Kg
		Potassium Sulphate	1.6 g/Kg
		Choline Chloride (60%)	2.5 g/Kg
		AIN93 Vitamins	10 g/Kg

Diet Form and Features	
<ul style="list-style-type: none"> Semi pure diet. 12 mm diameter pellets. Pack size 5 Kg, vacuum packed in oxygen impermeable plastic bags, under nitrogen. Bags are packed into cardboard cartons to protect them during transit. Smaller pack quantity on request. Diet suitable for irradiation but not suitable for autoclave. Lead time 2 weeks for non-irradiation or 4 weeks for irradiation. 	

Calculated Amino Acids	
Valine	1.30%
Leucine	1.80%
Isoleucine	0.90%
Threonine	0.80%
Methionine	0.80%
Cystine	0.06%
Lysine	1.50%
Phenylalanine	1.00%
Tyrosine	1.00%
Tryptophan	0.30%

Calculated Total Minerals	
Calcium	0.47%
Phosphorous	0.35%
Magnesium	0.09%
Sodium	0.15%
Chloride	0.16%
Potassium	0.40%
Sulphur	0.23%
Iron	75 mg/Kg
Copper	7.0 mg/Kg
Iodine	0.2 mg/Kg
Manganese	19 mg/Kg
Cobalt	No data
Zinc	50 mg/Kg
Molybdenum	0.15 mg/Kg
Selenium	0.3 mg/Kg
Cadmium	No data
Chromium	1.0 mg/Kg
Fluoride	1.0 mg/Kg
Lithium	0.1 mg/Kg
Boron	3.3 mg/Kg
Nickel	0.5 mg/Kg
Vanadium	0.1 mg/Kg

Calculated Total Vitamins	
Vitamin A (Retinol)	4 000 IU/Kg
Vitamin D (Cholecalciferol)	1 000 IU/Kg
Vitamin E (a Tocopherol acetate)	75 mg/Kg
Vitamin K (Menadione)	1 mg/Kg
Vitamin C (Ascorbic acid)	None added
Vitamin B1 (Thiamine)	6.1 mg/Kg
Vitamin B2 (Riboflavin)	6.3 mg/Kg
Niacin (Nicotinic acid)	30 mg/Kg
Vitamin B6 (Pryridoxine)	7 mg/Kg
Pantothenic Acid	16.5 mg/Kg
Biotin	200 ug/Kg
Folic Acid	2 mg/Kg
Inositol	None added
Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	103 mg/Kg
Choline	1670 mg/Kg

Calculated Fatty Acid Composition	
Myristic Acid 14:0	No data
Palmitic Acid 16:0	0.40%
Stearic Acid 18:0	0.10%
Palmitoleic Acid 16:1	No data
Oleic Acid 18:1	4.20%
Gadoleic Acid 20:1	0.10%
Linoleic Acid 18:2 n6	1.30%
a Linolenic Acid 18:3 n3	0.70%
Arachadonic Acid 20:4 n6	No data
EPA 20:5 n3	Trace
DHA 22:6 n3	No data
Total n3	0.78%
Total n6	1.33%
Total Mono Unsaturated Fats	3.98%
Total Polyunsaturated Fats	2.50%
Total Saturated Fats	0.50%

Calculated data uses information from typical raw material composition. It could be expected that individual batches of diet will vary from this figure. We are happy to provide full calculated nutritional information for all of our products, however we would like to emphasise that these diets have been specifically designed for manufacture by Specialty Feeds.

ANEXO B- Dieta Occidental: artigo Tikellis *et al.* (2008)


Specialty Feeds

3150 Great Eastern Hwy
Glen Forrest
Western Australia 6071
p: +61 8 9298 8111
F: +61 8 9298 8700
Email: info@specialtyfeeds.com

Diet
SF05-031 21% Fat, 0.15% Cholesterol Semi-Pure Rodent Diet

A semi-pure high fat diet formulation for laboratory rats and mice based on SF00-219, using AIN93 Vitamins.

- This Diet was developed to generate arteriosclerotic lesions in a range of susceptible mice strains.
- We have evidence that irradiation at 25Kgy can cause vitamin losses and possibly other changes in the diet. Please contact us if the diet is to be irradiated.

Calculated Nutritional Parameters		Ingredients	
Protein	19.00%	Casein (Acid)	195 g/Kg
Total Fat	21.00%	Sucrose	341 g/Kg
Crude Fibre	4.70%	Clarified Butter (Ghee)	210 g/Kg
AD Fibre	4.70%	Cellulose	50 g/Kg
Digestible Energy	19.4 MJ / Kg	Wheat Starch	132 g/Kg
% Total calculated digestible energy from lipids	40.00%	Dextrinised Starch	22.4 g/Kg
% Total calculated digestible energy from protein	17.00%	DL Methionine	3.0 g/Kg
		Calcium Carbonate	17.1 g/Kg
		Sodium Chloride	2.6 g/Kg
		AIN93 Trace Minerals	1.4 g/Kg
		Potassium Citrate	2.6 g/Kg
		Potassium Dihydrogen Phosphate	6.9 g/Kg
		Potassium Sulphate	1.6 g/Kg
		Choline Chloride (75%)	2.5 g/Kg
		AIN93 Vitamins	10 g/Kg
		USP Cholesterol	1.5 g/Kg
		Oxicap E2	0.04 g/Kg

Diet Form and Features	
<ul style="list-style-type: none"> • Semi pure high fat diet. 12 mm diameter pellets. • Pack size 1.5 Kg trays, vacuum packed in oxygen impermeable plastic bags, under nitrogen. Bags are packed into cardboard cartons to protect them during transit. Smaller pack quantity on request. • Diet suitable for irradiation but not suitable for autoclave. • Lead time 2 weeks for non-irradiation or 4 weeks for irradiation. 	

Calculated Amino Acids		Calculated Total Vitamins			
Valine	1.20%	Vitamin A (Retinol)	5 650 IU/Kg		
Leucine	1.80%	Vitamin D (Cholecalciferol)	1 000 IU/Kg		
Isoleucine	0.80%	Vitamin E (a Tocopherol acetate)	77 mg/Kg		
Threonine	0.80%	Vitamin K (Menadione)	1 mg/Kg		
Methionine	0.80%	Vitamin C (Ascorbic acid)	None added		
Cystine	0.06%	Vitamin B1 (Thiamine)	6.1 mg/Kg		
Lysine	1.50%	Vitamin B2 (Riboflavin)	6.3 mg/Kg		
Phenylalanine	1.00%	Niacin (Nicotinic acid)	30 mg/Kg		
Tyrosine	1.00%	Vitamin B6 (Pyridoxine)	7 mg/Kg		
Tryptophan	0.30%	Pantothenic Acid	16.5 mg/Kg		
Calculated Total Minerals		Biotin	200 ug/Kg		
		Folic Acid	2 mg/Kg		
		Inositol	None added		
		Vitamin B12 (Cyanocobalamin)	103 ug/Kg		
		Choline	1 670 mg/Kg		
		Calculated Fatty Acid Composition		Saturated Fats C12:0 or less	1.80%
				Myristic Acid 14:0	2.60%
				Palmitic Acid 16:0	7.00%
				Stearic Acid 18:0	2.40%
				Palmitoleic Acid 16:1	0.40%
				Oleic Acid 18:1	5.50%
				Gadoleic Acid 20:1	No data
				Linoleic Acid 18:2 n6	0.40%
				a Linolenic Acid 18:3 n3	0.20%
				EPA 20:5 n3	No data
				DHA 22:6 n3	No data
				Total n3	0.35%
Total n6	0.41%				
Cholesterol	0.15%				
Total Mono Unsaturated Fats	6.23%				
Total Polyunsaturated Fats	0.77%				
Total Saturated Fats	13.99%				
Calcium	0.60%				
Phosphorous	0.32%				
Magnesium	0.10%				
Sodium	0.14%				
Chloride	0.16%				
Potassium	0.40%				
Sulphur	0.20%				
Iron	78 mg/Kg				
Copper	7.0 mg/Kg				
Iodine	0.2 mg/Kg				
Manganese	20 mg/Kg				
Cobalt	No data				
Zinc	51 mg/Kg				
Molybdenum	0.15 mg/Kg				
Selenium	0.3 mg/Kg				
Cadmium	No data				
Chromium	1.0 mg/Kg				
Fluoride	1.0 mg/Kg				
Lithium	0.1 mg/Kg				
Boron	2.7 mg/Kg				
Nickel	0.5 mg/Kg				
Vanadium	0.1 mg/Kg				

Calculated data uses information from typical raw material composition. It could be expected that individual batches of diet will vary from this figure. **Diet post treatment by irradiation or auto clave could change these parameters.** We are happy to provide full calculated nutritional information for all of our products, however we would like to emphasise that these diets have been specifically designed for manufacture by Specialty Feeds.