

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E
EXPERIMENTAL – CLINEX

**A hipernutrição na lactação induz translocação prematura do transportador de
glicose GLUT4 e hipertrofia cardíaca.**

Annie Seixas Bello Moreira

Rio de Janeiro

2007

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E
EXPERIMENTAL – CLINEX

A hipernutrição na lactação induz translocação prematura do transportador de glicose GLUT4 e hipertrofia cardíaca.

Annie Seixas Bello Moreira

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental da Universidade do Estado do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Mestre em Fisiopatologia.

Rio de Janeiro

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

MOREIRA, ASB

A hipernutrição na lactação induz translocação prematura do transportador de glicose GLUT4 e hipertrofia cardíaca.

xvii, p.65

Orientador: Aníbal Sanchez Moura

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. hipernutrição. 2. hipertrofia cardíaca. 3. GLUT-4. I. Aníbal Sanchez Moura II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro – Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental III. Título

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO
CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM FISIOPATOLOGIA CLÍNICA E
EXPERIMENTAL – CLINEX

A hipernutrição na lactação induz translocação prematura do transportador de glicose GLUT4 e hipertrofia cardíaca.

ANNIE SEIXAS BELLO MOREIRA

Orientador: Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura

Aprovada em 7 de fevereiro de 2007 pela banca examinadora:

Professores Titulares:

Prof. Dr. Antônio Cláudio Mendes Ribeiro

Prof. Dra. Laís de Carvalho

Prof. Dra. Carmen Cabanelas Pazos-Moura

Professores Suplentes:

Prof. Dra. Maria das Graças Tavares do Carmo

Prof. Dra. Patrícia Cristina Lisboa da Silva

Revisor:

Rosely Schierl

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob a orientação do Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura com apoio financeiro concedido pelo CNPq, FAPERJ e CAPES.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.
(Leonardo da Vinci)

DEDICATÓRIA

À minha família, pela confiança e incentivo.

Ao meu namorado, pelo amor, paciência e companheirismo. Amo você.

As minhas amigas que me ajudaram na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aníbal Sanchez Moura pelos ensinamentos, confiança e orientação. E por ter me ajudado a descobrir e a trilhar o caminho do conhecimento científico. Muito obrigada.

A Prof. Dra. Rosely Schieri pela atenção e revisão do trabalho.

A toda equipe do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e Desenvolvimento: Prof^a Helena Galvão, Prof^a. Érica Garcia, Prof^a Renata Pereira, Prof. Mário Pereira, Mariana Renovato, Alessandra Cordeiro, e em especial as minhas amigas Michelle Teixeira, Fernanda Osso e Gisele França pela ajuda e amizade ao longo de toda essa caminhada. Valeu!

Ao Professor Doutor Egberto Gaspar de Moura pelo grande empenho e dedicação ao curso de Pós-graduação CLINEX.

Aos colegas de turma do mestrado pela amizade.

As secretárias do CLINEX, Maria Amélia Souza e Eliane Soares pela paciência em me atender as inúmeras vezes que as procurei.

Aos meus grandes amigos pela confiança, incentivo e amor. Para vocês, o meu muito obrigada é pouco.

E, finalmente, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
I LISTA DE TABELAS	Xii
II LISTA DE FIGURAS	Xiii
III LISTA DE ABREVIATURAS	Xv
IV RESUMO	Xvi
V ABSTRACT	Xvii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Modelo animal	15
3.2 Estimativa do volume de leite	16
3.3 Estado Nutricional	17
3.3.1 Peso corporal	17
3.3.2 Comprimento	17
3.3.3 Crescimento esquelético	17
3.3.4 Análise da composição de gordura na carcaça	17
3.3.5 Análise do glicogênio hepático e muscular	18
3.4 Peso do coração	19
3.5 Bioquímica	19
3.5.1 Análise da glicose plasmática	19
3.5.2 Colesterol total no plasma	19
3.5.3 Triglicerídio no plasma	20
3.5.4 Análise da Insulina plasmática	20
3.5.5 Análise da sensibilidade à insulina	21

3.6 Biologia Molecular	21
3.7 Tratamento Estatístico	23
4. RESULTADOS	24
4.1 Ingestão de leite	24
4.2 Estado nutricional dos filhotes	25
4.2.1 Peso corporal dos lactantes	25
4.2.1.1 Curva de crescimento	25
4.2.1.2 Peso corporal	26
4.2.2 Comprimento	27
4.2.3 Composição corporal ao 10º e 21º dia	28
4.2.4 Glicogênio hepático	29
4.2.5 Glicogênio muscular	30
4.3 Bioquímica	32
4.3.1 Colesterol Plasmático	33
4.3.2 Triglicerídios Plasmáticos	34
4.3.3 Glicose Plasmática	35
4.3.4 Insulina Plasmática	36
4.3.5 Relação Insulina/glicose plasmática	37
4.4 Morfometria	40
4.4.1 Hipertrofia Ventricular Esquerda	41
4.5. Biologia Molecular	42
4.5.1 Conteúdo de GLUT-1	42
4.5.2 Conteúdo de GLUT-4	43
4.5.3 Conteúdo de AKT	44
4.5.4 Relação pAKT/AKT	45

5. DISCUSSÃO	46
6. CONCLUSÃO	52
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tabela resumo de dados antropométricos	31
Tabela 2	Tabela resumo de dados bioquímicos	38
Tabela 3	Tabela resumo de dados cardíacos	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Cascata de sinalização da insulina	10
Figura 2	Vias de sinalização de hipertrofia cardíaca	12
Figura 3	Estimativa do volume de leite ingerido pelos machos controles e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	24
Figura 4	Curva de crescimento dos machos controles e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	25
Figura 5	Peso Corporal dos lactentes machos controles e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	26
Figura 6	Comprimento naso-anal dos lactentes machos controles e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	27
Figura 7	Conteúdo de gordura corporal dos lactentes machos controles e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	28
Figura 8	Glicogênio hepático de machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	29
Figura 9	Glicogênio muscular de machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	30
Figura 10	Colesterol plasmático de lactentes machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	33
Figura 11	Triglicerídio plasmático de lactentes machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	34
Figura 12	Glicose plasmática de lactentes machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	35

Figura 13	Insulina plasmática de jejum de lactentes machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	36
Figura 14	Relação insulina/glicose de lactentes machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	37
Figura 15	Relação ventrículo esquerdo/ comprimento da tíbia de lactentes machos controle e hiperalimentados aos 21 dias de idade	41
Figura 16	Conteúdo de GLUT – 1 cardíaco de machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	42
Figura 17	Conteúdo de GLUT – 4 cardíaco de machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	43
Figura 18	Conteúdo de AKT cardíaco de machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	44
Figura 19	Relação de pAKT/AKT cardíaco de machos controles e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade	45

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
μU	-	Microunidades
AKT	-	Tirosina kinase A
ATP	-	Adenosina trifosfato
dl	-	Decilitro
GLUT	-	Transportador de glicose
PI3K	-	Fosfatidilinositol 3 kinase
GSK3	-	Glicogênio sintase kinase
HDL-c	-	Lipoproteína de alta densidade
IRS	-	Substrato de receptor de insulina
IR	-	Receptor de insulina
Kg	-	Kilograma
mg	-	Miligrama
ml	-	Mililitro
mM	-	Milimolar
mmol	-	Milimol
ng	-	Nanogramas
nM	-	Nanômetros
rpm	-	Rotações por minuto
<i>g</i>		Gravidade

RESUMO

Durante o início da vida mudanças nos transportadores de glicose GLUT4 e GLUT 1 parecem contribuir para regulação do suprimento energético e crescimento do coração. Substituição total ou parcial de GLUT1 por GLUT4 reflete um aumento da dependência a insulina. AKT é uma importante proteína da cascata de sinalização que modula vários processos intracelulares como crescimento e metabolismo, além de atuar na hipertrofia cardíaca. Neste estudo, investigamos as alterações metabólicas, mudanças no conteúdo dos transportadores de glicose e AKT nos corações dos ratos hiperalimentados na lactação. O metabolismo cardíaco foi analisado em filhotes Wistar hiperalimentados na lactação através da redução da ninhada. Aos 10 e 21 dia de vida, GLUT1, GLUT4, AKT e pAKT foram mensuradas por Western Blotting. Peso e comprimento dos filhotes, bem como, conteúdo total de lipídico corporal, conteúdo de glicogênio e níveis plasmáticos de insulina, glicose, colesterol e triglicerídios foram mensuradas. Para avaliar hipertrofia, foi realizada a relação peso do coração/ peso corporal e peso do ventrículo esquerdo/ comprimento da tibia. Os resultados mostram que os animais experimentais apresentavam sobrepeso com aumento do percentual de gordura, aumento de insulina, glicose, colesterol e triglicerídios plasmáticos, hipertrofia ventricular esquerda com maior ativação da AKT. Os corações dos hiperalimentados apresentavam antecipação da translocação do GLUT4 e regressão do conteúdo de GLUT1. Sugerimos que a hipernutrição na lactação induz alteração metabólica e cardíaca no início da vida, levando ao desenvolvimento de hipertrofia cardíaca e translocação prematura do GLUT4.

Palavras Chaves: 1. hipernutrição. 2. hipertrofia cardíaca. 3. GLUT4.

ABSTRACT

During early life development changes of glucose transporters GLUT4 and GLUT1 seem to contribute to the regulation of heart energy supply and growth. Total or partial replacement of GLUT1 by GLUT4 reflects an increasing of tissue insulin dependence. AKT is an important signaling molecule of insulin cascade signaling system that modulates many intracellular processes such as cell growth and metabolism, besides it plays an important role in the regulation of cardiac hypertrophy. In this study, we investigated metabolic alterations, and changes in size, expression of glucose transporters, and AKT in the hearts of rats overfed during lactation. Heart metabolism was analyzed in Wistar rats overfed through litter size reduction to three pups per litter. At 10 and 21 days of life, GLUT1, GLUT4, AKT and pAKT were measured by Western Blotting. Pups' weight and length, as well as, total body lipid, glycogen content, and the plasma levels of insulin, glucose, total cholesterol and triglycerides were measured. To evaluate hypertrophy, we have done heart weight/body weight and heart weight/tibia length ratios. Our results showed that experimental animals were overweight, displayed a high total body lipids, increased insulin, glucose, cholesterol and triglycerides plasma levels, and left ventricular hypertrophy with AKT more activated. Moreover, the heart of overfed animals had anticipated translocation of GLUT4, and decreased content of GLUT1. We suggest that overfeeding during lactation might induce metabolic and cardiac alterations early in life, leading to the development of cardiac hypertrophy and premature translocation of GLUT4.

Key Word: 1. overfeeding. 2. heart hypertrophy . 3. GLUT4.

1. INTRODUÇÃO

A maior expectativa de vida da população mundial e seu conseqüente envelhecimento têm conduzido uma maior atenção às doenças crônicas com início na vida adulta, especialmente as cardiovasculares que representam a principal causa de morbi-mortalidade não somente em países desenvolvidos, mas também naqueles em desenvolvimento.

Nas últimas décadas, vários estudos vêm mostrando que mecanismos biológicos no início da vida, especialmente os relacionados às condições nutricionais, podem gerar, em longo prazo, o desenvolvimento de doenças crônicas na fase adulta, tais como: doenças cardiovasculares, obesidade e diabetes mellitus tipo 2 (Barker e col., 1990; Waterland & Garza, 1999; Sichieri e col., 2000; Lucas, 1991; Holness e col., 2000; Rasmussen, 2001, Desai & Hales, 1997).

O estudo da associação entre o padrão de nutrição no início da vida e surgimento de doenças crônicas na vida adulta proporcionou a conceituação dos termos impressão (*imprinting*) e programação (*programming*) metabólica. O termo impressão define o impacto de um fenômeno adverso em um momento específico da vida (janela crítica ou *critical window*), que pode gerar irreversivelmente alterações morfológicas, celulares e moleculares, fenômenos que agrupados são chamados de programação (Desai & Hales, 1997, Waterland & Garza, 1999).

Apesar dos mecanismos subjacentes, a impressão metabólica não está totalmente esclarecida, sabe-se que a fase da vida em que ocorre o insulto, bem como a sua duração, apresentam particular importância. Desta forma, estudos experimentais e epidemiológicos apontam à fase pré-natal (gestacional) e pós-natal (imediatamente após o nascimento e lactação) como sendo os períodos críticos para

a ocorrência da impressão metabólica (Godfrey & Robinson, 1998). Como resultado desta impressão, pode ocorrer uma programação irreversível que predispõe ao surgimento de doenças crônico-degenerativas na vida adulta.

Estudos experimentais revelam ainda que tais programações são memorizadas, podendo inclusive em alguns casos, serem transmitidas hereditariamente. Tem sido proposto que os mecanismos fisiopatológicos pelos quais os fatores ambientais provocam modificações epigenéticas, surgem de alterações estáveis da expressão gênica através da metilação do DNA (Waterland e col, 2004). Desta forma, hoje já se estuda alguns fatores ambientais como sendo um dos responsáveis pela promoção de alterações gênicas (Kaput & Rodriguez, 2004).

Um dos estudos clássicos a comprovar a relação entre nutrição no início da vida e surgimento de doenças crônicas na fase adulta foi realizado com indivíduos do sexo masculino, cujas mães sofreram restrição alimentar nos dois primeiros trimestres de gravidez, durante a segunda guerra mundial, no período da fome holandesa (1944 a 1945). Neste estudo, foi observado que aos 19 anos de idade esses indivíduos apresentavam 80% mais obesidade do que àqueles cujas mães não sofreram restrição alimentar no mesmo período (Ravelli e col., 1976). Quando avaliados aos 50 anos, esse mesmo grupo de crianças apresentou maiores índices de massa corporal (IMC) e circunferência da cintura do que àqueles cujas mães não sofreram restrição alimentar (Ravelli e col., 1999). Esses resultados foram também observados quando a restrição alimentar é estabelecida durante a gestação e lactação (Barker, 1995). Esse autor observou esse fenômeno em diferentes populações e cunhou a hipótese da origem fetal das doenças (Barker e col., 1990; Barker, 1995)

A influência da nutrição no desenvolvimento de doença crônica na idade adulta também foi comprovada em estudo realizado na cidade do Rio de Janeiro. Neste estudo, a baixa estatura (importante indicador de desnutrição no início da vida) se relacionou positivamente com a incidência de hipertensão arterial na vida adulta e tal relação mostrou-se gênero-dependente, sendo mais evidente em homens (Sichieri e col., 2000a). Estes mesmos autores, em outro estudo, ao relacionarem desnutrição no início da vida com obesidade na fase adulta, observaram uma maior incidência em mulheres (Sichieri e cols., 2000b). Estes trabalhos levantam a importante questão de que os insultos nutricionais induzem respostas metabólicas gênero dependentes.

Simultâneos aos estudos realizados com humanos, vários modelos experimentais também foram propostos e comprovam a hipótese de programação metabólica, onde animais desnutridos no período gestacional ou lactacional tornam-se obesos, hipertensos e apresentam alteração da sensibilidade à insulina (Moura e col., 1996; Moura e col., 2002a; Caldeira Filho & Moura, 2000; Waterland, 1999, Godfrey & Robinson, 1998).

Desta forma, muitas são as evidências tanto em estudos epidemiológicos quanto experimentais, que a nutrição em períodos críticos da vida pode influenciar no surgimento de processos patológicos na fase adulta.

Dentre as várias hipóteses que têm sido propostas para explicar as influências da nutrição pregressa o ambiente hormonal intra-uterino tem sido explorado no fenômeno da impressão metabólica. Tal hipótese decorre do fato que a organização do sistema neuroendócrino se dá quase que completamente durante os períodos entre a gestação e a lactação. Desta forma, a presença de hormônios pode induzir alterações que re-programariam o sistema neuroendócrino, levando a uma

adaptação momentânea, além do aparecimento de desordens metabólicas tardias no transcorrer da vida (Barker e col., 1990; Barker, 1995; Plagemann, 2005; Loizzo e col., 2006).

Nessa direção é exemplar o caso da insulina. É consensual na literatura científica, o papel do excesso desse hormônio e também dos glicocorticóides durante a gestação na impressão metabólica e no surgimento de doenças crônicas, principalmente as cardiovasculares, na vida adulta (Hoet & Hanson, 2002; Loizzo e col., 2006). Concordantes com a literatura, também são consistentes os resultados encontrados demonstrando o efeito da nutrição sobre a secreção e ação de diferentes hormônios no início da lactação e o surgimento do processo de programação metabólica (Toste e col, 2006; Moura & Passos, 2005).

Em relação ao sistema cardiovascular, sabe-se que seu desenvolvimento se inicia no período intra-utero sendo extremamente susceptível a influências nutricionais neste período. Por exemplo, a mortalidade por doença cardiovascular e hipertensão na vida adulta apresenta correlação inversa com o peso ao nascimento. (Hoet & Hanson, 1999).

No contexto das doenças crônicas, a obesidade ganha destaque. A importância de tal doença decorre do fato de que no mundo e em particular nos países em desenvolvimento a obesidade, hoje, possui características endêmicas. Por exemplo, no Brasil, o sobrepeso e a obesidade já acometem 38,8 milhões de adultos, correspondendo a 40% da população, sendo 39,2% mulheres e 41% homens (IBGE 2002-03). Nos Estados Unidos esta doença é responsável por 300.000 mortes e gasto de 139 bilhões de dólares por ano.

A obesidade é definida como uma doença endócrina metabólica crônica, heterogênea e multifatorial, caracterizada pelo excesso de gordura. Em termos

específicos, encontra-se associada a altas taxas de morbidade e mortalidade prematura, como a Diabetes Mellitus, dislipidemia, hipertensão e doença coronariana, além de ser a causa mais importante de morte por câncer em não fumantes (Calle e col., 2003).

Hoje a obesidade é vista como grave problema de saúde pública. As conseqüências a curto e em longo prazo são extremamente severas, levando os prejuízos para o indivíduo, tais como: pior qualidade de vida e redução de expectativa de vida. Além disso, contribui de forma intensa com os gastos do governo devido aos custos diretos de prevenção e cura, assim como, a redução da produtividade no trabalho (Lawlor & Chaturvedi, 2006). Acrescenta-se ainda o caráter universal da doença que acomete os diferentes extratos sociais.

Desta forma, é essencial o combate à obesidade e para tal faz-se necessário a investigação de sua etiopatogenia. Sabemos que, em relação ao desenvolvimento da obesidade, existem três fases críticas: fase circunscrita ao período fetal e ao início da vida, que depende apenas da nutrição da mãe; fase de crescimento infantil, dependente de hormônios que é limitada por disponibilidade de nutrientes; e o crescimento puberal que é regulado por hormônios estróides (Dietz, 1994; Karlberg e col., 1994, Raman & Nesto, 1996).

Em estudos epidemiológicos verifica-se a prematuridade da doença, por exemplo, em estudo realizado com 813 crianças com sobrepeso, 58% destas apresentavam pelo menos um fator de risco para doença arterial coronariana (Freedman e col., 1989, Freedman e col., 1999). Sabe-se ainda que a obesidade infantil, em decorrência da presença da gordura visceral, resistência insulínica e alteração na secreção de insulina, é considerada fator de risco para o surgimento de diabetes mellittus tipo2 (Steinberger e col., 1995).

O modelo de redução da ninhada vem sendo muito utilizado em estudos experimentais de obesidade, especialmente entre os que são mais voltados para o período neonatal. Com tal modelo torna-se possível estudar as conseqüências da hipernutrição no início da vida, a curto e em longo prazo. Utilizando-se este modelo, Plagemann e col (1999) observaram aumento da disponibilidade de leite para os neonatos, desenvolvimento de hiperfagia e rapidamente a obesidade, além de hiperinsulinemia e hiperglicemia (Li e col, 2002; Basset & Craig, 1988; Fiorotto e col., 1991, Faust e col., 1980; Voits e col., 1996), sendo que a longo prazo as alterações se mantêm (Shmidt e col., 2000). Os resultados de tais estudos reforçam a contribuição do modelo experimental, permitindo hoje a diversificação e qualidade de diferentes pesquisas investigativas da relação entre variáveis nutricionais na lactação e desenvolvimento prospectivo de patologias como a obesidade e doença cardiovascular.

Os mecanismos fisiopatológicos que relacionam a obesidade com as doenças cardiovasculares não estão completamente esclarecidos. Sabe-se, entretanto, que alteração da sensibilidade insulínica, ou seja, do metabolismo energético associa-se às complicações da doença cardiovascular (Correia & Haynes, 2004; Pereira e col., 2006). Uma hipótese recente McGavock e col (2006) sugere que a gordura é cardioprotóxica. Ou seja, os autores sugerem que o acúmulo de triglicerídios e de ceramida nos cardiomiócitos apresenta um efeito tóxico, condição conhecida como esteatose cardíaca, que explicaria o aumento das mortes por doenças cardiovasculares em indivíduos obesos. O infiltrado de lipídios no coração causa apoptose celular levando ao remodelamento do ventrículo esquerdo. Com isso, ocorre um desarranjo na interação entre metabolismo e contração progredindo

para o mau funcionamento e conseqüentemente a falência cardíaca (Depre & Taegtmeyer, 2000; Ziori e col, 2002).

Em condições fisiológicas, o metabolismo cardíaco, desde o período pré-natal, é finamente controlado e dinâmico. Desta forma, talvez seja a fase em que melhor se possa estudar a relação entre a disponibilidade de nutriente e a dinâmica metabólica. Por exemplo, sabe-se que em condições fisiológicas, o miocárdio de animais neonatos tem uma alta capacidade de utilização de glicose, enquanto que o de animais adultos utiliza ácidos graxos como fonte energética primária (Lopaschuk e col., 1991). Ou seja, as modificações da dinâmica de utilização energética ocorrem numa estreita janela de tempo.

A dinâmica de utilização energética no coração é dependente da presença dos transportadores de glicose, que são responsáveis pela captação da glicose pelos cardiomiócitos. Esta etapa de transporte de glicose através da membrana plasmática é o passo inicial e limitante para utilização do substrato pelo miocárdio. O número de transportadores de glicose (GLUT) presentes no sarcolema determina a taxa de captação pela célula (Friehs e col., 2003).

Ainda em relação aos transportadores, são expressos no miocárdio o GLUT-1 e o GLUT-4 nos ratos adultos (Friehs e col., 2003; King & Opie, 1998; Stanley e col., 1997; Young e col., 1997). O primeiro corresponde a 30% dos transportadores de glicose do coração, sua função independe da insulina sendo considerado responsável pela captação basal de glicose em condição de jejum, onde as concentrações séricas de insulina estão baixas. Já o GLUT- 4 corresponde a 70% dos transportadores e é sensível à ação da insulina e está amplamente distribuído em vesículas intracelulares em condições de aporte adequado de oxigênio (Ishiki & Klip, 2005; Ramasamy e col., 2001; Bryant e col., 2002, Nguyen et al., 1997; Sun et

al., 1994; Young e col., 1997). Assim, o GLUT-1 e o GLUT-4 são transportadores críticos para a manutenção da morfologia e das funções normais do coração (Becker e col., 2001).

No coração, ambos os GLUTs são muito bem regulados, principalmente durante o período perinatal, quando ocorre uma substituição gradativa dos GLUT-1 por GLUT-4 (Friehs e col, 2003). O hormônio tireoidiano é um dos principais reguladores deste processo, promovendo indução de GLUT-4 e repressão de GLUT-1 (Castelo e col., 1994; Sugden e col., 2000; Ramos e col, 2001). Além dos hormônios tireoidianos existem outros fatores responsáveis pela translocação destes transportadores do citosol até a membrana. Este é o ponto crucial no metabolismo da glicose onde a captação de glicose é o passo limitante para a sua utilização e oxidação no coração (Abel, 2004; Medina e col, 2002).

Por exemplo, a insulina e situações de isquemia induzem a translocação do GLUT-1 e GLUT-4 mediado pela PI3K (Sun e col., 1994; Friehs e col., 2003; Nguyen e col., 1997; Egert e col, 1999, Khan & Pessin, 2002; Chang e col, 2004). O lactato é um outro estímulo a um incremento na capacidade de captação de glicose independente da PI3K (Medina e col, 2002). Este aumento é fundamental, para garantir o metabolismo e oxidação da glicose em situações de isquemia (King & Opie, 1998; Neely & Morgan, 1974; Vanoverschelde e col., 1994; Depre e col., 1999).

A figura 1 mostra algumas vias de sinalização da insulina, hormônio que estimula a translocação dos transportadores de glicose. (Belke e col., 2002; Saltiel & Kahn, 2001; Shiojima e col., 2002). A insulina age através da ligação do hormônio ao seu receptor até a ativação do transporte de glicose. A sinalização intracelular da insulina começa com a sua ligação a um receptor específico de membrana, uma

proteína heterotetramérica com atividade quinase, composta por duas subunidades, que atua como uma enzima alostérica que inibe a atividade tirosina quinase. A ligação da insulina à subunidade a permite que a subunidade b adquira atividade quinase levando a alteração conformacional e autofosforilação, que aumenta ainda mais a atividade quinase do receptor. Uma vez ativado, o receptor de insulina fosforila vários substratos protéicos em tirosina. A fosforilação em tirosina das proteínas IRS cria sítios de reconhecimento para moléculas contendo domínios com homologia a Src 2 (SH2). Dentre estas se destaca a fosfatidilinositol 3 quinase (PI 3-quinase). O receptor de insulina, além de ser fosforilado em tirosina, também pode ser fosforilado em serina, o que atenua a transmissão do sinal através da diminuição da capacidade do receptor em se fosforilar em tirosina após estímulo com insulina. A PI 3-quinase é importante na regulação da mitogênese, diferenciação celular e transporte de glicose estimulado pela insulina.

A PI-3 quinase foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A enzima catalisa fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol-3-fosfato, fosfatidilinositol-3,4-difosfato e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato. Atualmente, a PI 3-quinase é a única molécula intracelular considerada essencial para o transporte de glicose. As proteínas alvo conhecidas dessa enzima são a Akt e as isoformas atípicas da aPKC (Carvalho e Saad, 2002).

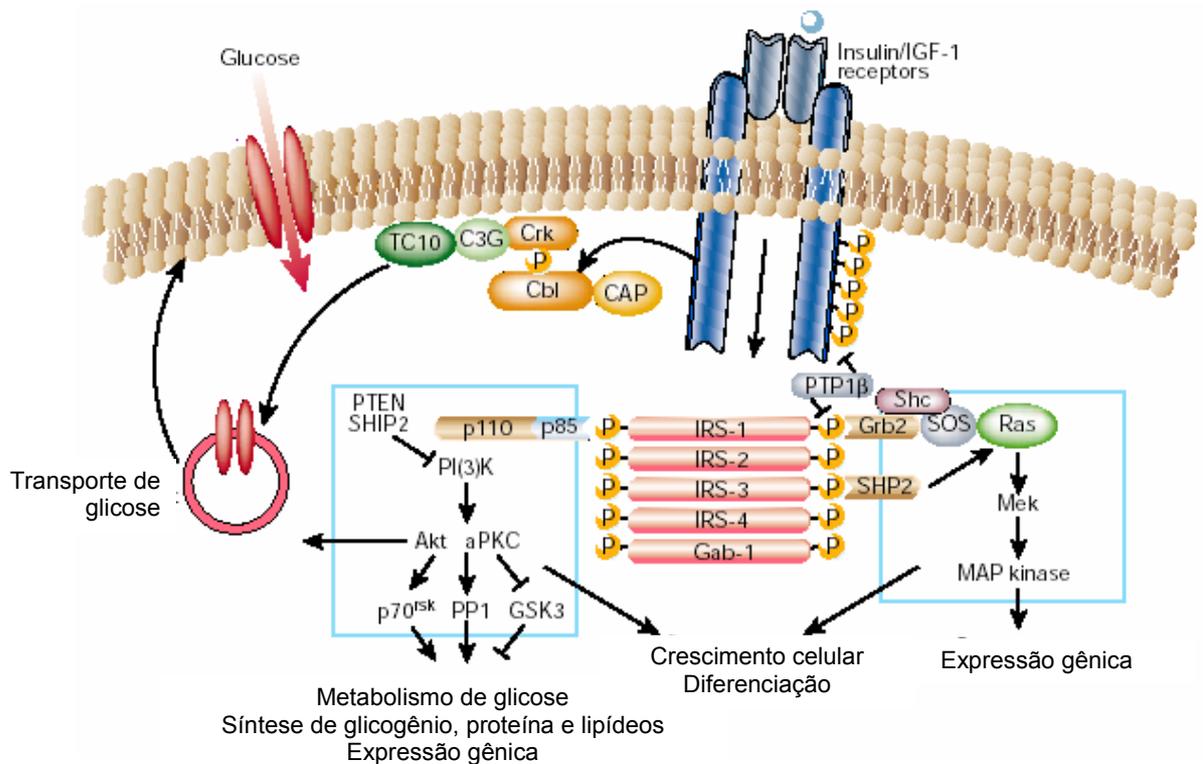


Figura 1: Cascata de sinalização da insulina (Carvalho & Saad, 2002).

A insulina tem efeitos importantes no coração como o aumento da contratilidade cardíaca e ter um efeito antiapoptótico (Aikawa e col., 2000). Pesquisadores demonstraram ainda que a hiperinsulinemia possa estimular vias que levam a hipertrofia cardíaca como a via da MEK-ERK1/2 e através da ativação da Akt (DeBosch B e col, 2006; Heineke & Molkenin, 2006). Além disso, se sabe que na hipertrofia ventricular a razão dos transportadores (GLUT-1 e GLUT-4) apresenta-se alterada (Morissete e col., 2003).

A hipertrofia cardíaca é inicialmente uma adaptação benéfica para o órgão, garantindo a manutenção do débito cardíaco em resposta ao estresse, entretanto

em longo prazo progride para a insuficiência do órgão (Morissette e col, 2003). A hipertrofia ventricular é hoje reconhecida como o maior preditor de insuficiência cardíaca.

Na hipertrofia surgem adaptações morfológicas e metabólicas. Dentre as morfológicas, mudanças no tamanho da célula (aumento), na organização dos sarcômeros e na expressão gênica de proteínas (Able e col, 1999). Em relação às metabólicas, a oxidação de ácidos graxos (substrato preferencial em condições normais que corresponde a 70% do requerimento energético) é substituída pela oxidação de glicose. Assim o coração passa a se comportar como na fase fetal, utilizando mais glicose, caracterizada por meio do aumento de GLUT-1, modificando a relação entre a razão GLUT-1 e GLUT-4 (Friehs e col., 2005).

Além da alteração na razão GLUT-1/ GLUT-4, ocorrem outras modificações metabólicas que contribuem com o mecanismo básico do desenvolvimento da hipertrofia (Heineke & Molkentin, 2006). Por exemplo, a insulina e a leptina, hormônios dependentes de nutrientes disponíveis, parecem potencializar as vias de sinalização nos cardiomiócitos induzindo a hipertrofia (Smith e col, 2006). Em estudos anteriores do nosso laboratório observamos que ocorre sinalização cooperativa dos dois hormônios no aumento da captação de glicose (Pereira e col., 2006). Outro fator chave da regulação do crescimento cardíaco é a Akt (O'Neil & Abel, 2006, Walsh, 2006, DeBosch e col, 2006), além das vias GSK3 e mTOR que desencadeiam a hipertrofia através de ativação de fatores de transcrição e tradução gênica (Chan e col, 2004; Chan e Dyck, 2005). Sendo assim, tal conjunto de resultados sugere preliminarmente que a hipertrofia cardíaca e obesidade associam-se a modificações na sensibilidade à insulina e a leptina.

estabelecida (estampagem ou “imprinting”). Ou seja, o processo de adaptação induz reprogramação que em longo prazo gera a doença.

Considerando o fenômeno da impressão e programação metabólica, onde insultos sofridos em períodos críticos no início da vida (gestação e lactação) induzem alteração adaptativa da secreção e ação da insulina com efeitos prospectivos patológicos, interessa-nos investigar neste trabalho, se a hiperalimentação no período pós-natal altera em curto prazo a morfometria e o metabolismo cardíaco.

2. OBJETIVO

Objetivo geral

Estudar os efeitos da hipernutrição durante a lactação no metabolismo energético cardíaco.

Objetivos específicos

Avaliar o efeito da hipernutrição:

- No ganho de peso (peso corporal/comprimento);
- Na composição corporal (percentual de gordura);
- Na ingestão de leite;
- Na bioquímica (glicose, triglicerídios, colesterol, insulina);
- Na sensibilidade à insulina (relação insulina/ glicose);
- No conteúdo de glicogênio hepático e muscular;

Avaliar a morfometria cardíaca:

- Peso do coração e ventrículos esquerdo;
- Hipertrofia ventricular esquerda;

Avaliar o metabolismo cardíaco:

- O conteúdo de GLUT-1 e GLUT-4, assim como, conteúdo de akt e pakt cardíaco.

3. METODOLOGIA

3.1 Modelo animal

Foram utilizadas ratas Wistar com 3 meses de idade criadas no Biotério do Laboratório de Fisiologia da Nutrição e do Desenvolvimento/ IBRAG/ UERJ, mantidas em temperatura média de 23° C e com ciclo de luminosidade de 12h (claro e escuro). Inicialmente foi realizado o cruzamento dos animais e após a fecundação, as fêmeas separadas dos machos e colocadas em gaiolas individuais, onde receberam ração industrializada específica para ratos com 22% de proteína e água *ad libitum* durante todo o período de gestação.

No terceiro dia após o nascimento dos filhotes, as lactantes foram divididas em grupo controle que ficaram com a ninhada completa de 10 filhotes e o grupo de ninhada reduzida que tiveram a ninhada reduzida para 4 filhotes machos, para a indução da hiperalimentação pós natal precoce.

Os lactentes foram analisados quanto a estado nutricional através do peso corporal, comprimento e a carcaça, bioquímica, GLUT-1, GLUT-4, Akt e pAkt no músculo cardíaco e quanto a presença de hipertrofia ventricular esquerda.

Os lactentes foram separados segundo os grupos das lactantes de acordo com cada dia estudado. Filhotes de lactantes controles compuseram os grupos (GC10 e GC21) e os filhotes das lactantes com ninhada reduzida os hiperalimentados (GH 10 e GH 21).

Os animais foram cuidados de acordo com o comitê do Instituto de Biologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, que é baseado nos princípios descritos pelo guia de cuidados de animais de laboratórios.

3.2 Estimativa do volume de leite

O volume de leite foi estimado a partir da técnica descrita por Russel (1980). As lactantes foram divididas em dois grupos: lactantes cujos filhotes foram amamentados normalmente e lactantes cujos filhotes foram submetidos a jejum de 24h. Os filhotes amamentados e jejuados de cada grupo (controle e hiperalimentado) foram pesados no início e no final das 24 horas. Essa análise foi realizada no 10º e 21º dia de lactação.

A produção de leite foi estimada pela seguinte fórmula:

$L = Pa2 - Pa1 \cdot (1-K)$, onde:

L: produção de leite (g/dia)

Pa1: peso dos filhotes amamentados no início das 24 horas;

Pa2: peso dos filhotes amamentados no final das 24 horas;

K: perda relativa de peso (média dos filhotes jejuados).

O fator K foi calculado da seguinte maneira:

$K = (Pj1 - Pj2) / Pj1$, onde:

Pj1: peso dos filhotes em jejum no início das 24 horas;

Pj2: peso dos filhotes em jejum no final das 24 horas.

3.3 Estado Nutricional

3.3.1 Peso corporal

Os lactentes (controle e hiperalimentados) foram acompanhados durante o período de lactação aos 4, 10, 14 e 21 dias com o controle de peso corporal utilizando balança de precisão (XP 3000).

3.3.2 Comprimento

Os lactentes (controle e obesos) aos 10 e 21 dias de idade foram realizados a mensuração do comprimento naso-anal utilizando uma fita métrica.

3.3.3 Crescimento esquelético

As tíbias dos lactentes controles e hiperalimentados foram dissecadas. Utilizando um paquímetro foi mensurado o comprimento da tíbia (Gat-Yablonski e col, 2004; Rol De Lama e col, 2000).

3.3.4 Análise do percentual de gordura na carcaça

A análise da quantidade da gordura da carcaça foi obtida através do método de separação da gordura por éter de petróleo. A partir da carcaça eviscerada e descerebrada, foi liquidificado e fração da carcaça foi mantida em banho-maria com separação da gordura pela utilização de hidróxido de potássio KOH (30%), etanol absoluto e H₂SO (6M) em etapas de 1 minutos, 2 horas e 20 minutos, respectivamente. Após este procedimento a gordura foi separada em três lavagens com éter de petróleo e seguindo a evaporação e pesagem em balança de precisão (OHAUS Analytical Standard) em relação a 100g de peso de carcaça fresca (g/100g) (Stansbie e col, 1997).

3.3.5 Análise do glicogênio hepático e muscular

Foram coletados 150mg de tecido hepático ou tecido muscular, colocados em tubo de ensaio e acrescentado 1 ml de KOH 30%. Posteriormente os tubos foram aquecidos em banho maria fervente por 1h para hidrólise do tecido. Ao retirar do banho maria, foram acrescentados Na_2SO_4 saturado e álcool absoluto e novamente os tubos foram aquecidos a 70°C por 15 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados (Centrífuga Sanyo) a 2000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante contendo lipídeos saponificados e aminoácido foi desprezado e o precipitado suspenso com 1ml de água a 70°C e álcool absoluto. Em seguida foi novamente levado ao banho Maria a 70°C por 15 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi novamente desprezado e o precipitado suspenso com 2,25 ml de água destilada a 70°C. O conteúdo do tubo de ensaio foi então transferido para um balão volumétrico e o tubo lavado várias vezes com água destilada até completar o volume de 5 ml no balão. Foi retirada uma alíquota de 1ml desta solução e resfriada em gelo. Em seguida foi adicionado o reagente antrona 50%(diluída em H_2SO_4). Os tubos foram então homogeneizados e lidos em espectrofotômetro (Beijing Purkinje General Instrument – TU 1800) com comprimento de onda de 600nm. Para curva padrão foram utilizadas soluções de glicose a 100; 50; 25; 12,5 e 6,25 mg/dl (Carroll e col, 1956).

3.4 Peso do coração

Foi mensurado o peso do coração em balança de precisão (OHAUS Analytical Standard), em seguida o ventrículo esquerdo foi isolado e pesado. Relações como: peso coração/ peso corporal; ventrículo esquerdo/ coração foram feitas. Foi realizada ainda a normalização do peso do coração e do ventrículo esquerdo pelo comprimento da tíbia.

A hipertrofia ventricular esquerda foi caracterizada através da relação do peso do ventrículo esquerdo e do comprimento da tíbia (Yin et al, 1982).

3.5 Bioquímica

Foi coletado 1ml de sangue com seringa previamente heparinizada e centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Posteriormente o plasma foi separado dos elementos figurados do sangue e mantido em freezer a -20°C até o momento das análises.

3.5.1 Análise da glicose plasmática

A dosagem plasmática de glicose foi realizada pelo método enzimático glicose – oxidase, utilizando-se um kit comercial (Gold Analisa Diagnóstica – Minas Gerais) e a leitura realizada em espectrofotômetro (Beijing Purkinje General Instrument – TU 1800) com comprimento de onda 510nm.

3.5.2 Colesterol total no plasma

O colesterol total foi determinado pelo método colorimétrico, através do kit – Gold Analisa – colesterol pp. Foram utilizadas alíquotas de 10 µl de plasma dos filhotes de cada grupo estudado e foram acrescentadas de 1ml de reagente de cor,

em seguidas agitadas e levadas ao banho maria a 37°C durante 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Beijing Purkinje General Instrument – TU 1800). A absorvância foi de 500 nm. O Colesterol total será expresso em mg/dl e suas concentrações calculadas de acordo com a fórmula do KIT.

3.5.3 Triglicerídio no plasma

O triglicerídio foi determinado pelo método colorimétrico, através do kit – Gold Analisa – triglicerídio pp. Foram utilizadas alíquotas de 10 µl de plasma dos filhotes de cada grupo estudado e foram acrescentadas de 1ml de reagente de cor, em seguidas agitadas e levadas ao banho maria a 37°C durante 10 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Beijing Purkinje General Instrument – TU 1800). A absorvância foi de 500 nm. O triglicerídio expresso em mg/dl e suas concentrações calculadas de acordo com a fórmula do KIT.

3.5.4 Análise da Insulina plasmática

O Radioimunoensaio foi realizado através de kit para diagnóstico de insulina (MP Biomedicals ¹²⁵I RIA Kit). Foram incubados 100 µl de plasma ou do padrão de insulina (0, 5,5, 15, 35, 70 175, 310 µIU/mL), em duplicata, com 900 µl de Insulina ¹²⁵ I liofilizada reconstituída com água destilada por 18 horas a temperatura ambiente, em tubos de polipropileno com anticorpo anti insulina porcina de cobaia adsorvido a parede do tubo, e em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o tubo lavado por 2 vezes com água destilada. A fração radioativa adsorvida foi mensurada em contador Gama (Packard® Cobra Auto-Gamma ®) e os valores expressos da curva padrão em contagem por minuto foram interpolados na concentração dos valores de insulina padrão em logarítimo. A obtenção dos valores de insulina

plasmática dos desconhecidos foram calculados a partir da função da regressão logarítmica através do software Microsoft Excell®.

3.5.5 Análise da sensibilidade à insulina

O indicador da sensibilidade à insulina foi obtido através da relação insulina plasmática e glicose (Plagmann e col, 1999).

3.6 Biologia Molecular

Análise do GLUT- 1, GLUT- 4, AKT e pAKT cardíaco

O tecido cardíaco foi lavado em Krebs-Heinselet gelado (NaCl 118mM, KCl 4,7 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 1,75 mM, NaHCO₃ 25 mM, EDTA 0,5 mM) com pH de 7,4 e picotado com auxílio de bisturi. Em seguida o material foi homogeneizado em solução de lise também gelada (50 mM Hepes, 1 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 1% Triton X-100 acrescentada com inibidores de proteases:1mM de fluoreto de metilsulfonil (PMSF), 1μM de aprotinina, 1 μM de leupeptina) por trituração manual com pilão até tornar-se líquido. Posteriormente foi submetido 3 vezes a ultra-som (Virtis – Virsonic 60) durante 15 segundos por 10 segundos de descanso em gelo. Foi realizada uma centrifugação a 9000rpm por 15min a 4°C para separação dos *debris* e em seguida ultra-centrifugação (ultracentrifuga Hitachi – Himac CP70G) a 40000g por 1 hora e 30 minutos. Parte do sobrenadante (20%) foi coletado para obtenção do conteúdo de GLUT 4 e a outra parte de GLUT-1.

Para dosagem do GLUT-1, o sobrenadante coletado foi submetido a uma segunda centrifugação à 200000g por 1h, o precipitado foi suspenso em tampão RIPA.

Após as centrifugações, e sua concentração de proteínas totais foi quantificada pelo método de Bradford em placa de ELISA (Jamef) utilizando a albumina bovina (SIGMA) nos padrões 0,5, 1, 2 e 4 mg/ml. Em seguida, foi realizada a desnaturação das proteínas por fervura das amostras durante 5 minutos em tampão próprio.

As amostras desnaturadas foram aplicadas sobre um gel a 12% de poliacrilamida (30% acrilamida, 1.6% bis-acrilamida, 10% APS, 5 µl Temed diluídos em tampão Tris 1,5mM, 10% de SDS) em cuba de eletroforese (Hoefer) para separação protéica, e a seguir, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond – P *Amersham Biotech*) por eletrotransferência.

A detecção protéica específica foi realizada após incubação da membrana de nitrocelulose por 1 hora e 30 minutos em albumina 2% /TTBS pH 7,4. Em seguida, a membrana de nitrocelulose, foi incubada com anticorpo primário para GLUT-4, GLUT 1, AKT, pAKT e actina (Santa Cruz Biotech) na diluição 1:1000 durante período mínimo de 12 horas. Para imunodeteccção foi incubada por mais 1 hora com anticorpo secundário antiIgG biotilado (Santa Cruz Biotech - diluição na membrana 1:1000), seguida de estreptavidina (diluição na membrana 1:1000) por mais 1 hora. A revelação final foi realizada por DAB. E as bandas foram analisadas segundo sua densidade, utilizando-se o software Image J.

3.7 Tratamento Estatístico

Os dados são expressos como média e erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através do teste Two Way ANOVA e teste -t de student usando-se um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Ingestão de leite

O modelo de redução de ninhada promove importantes alterações na ingestão de leite.

O volume de leite ingerido em 24 horas do grupo que sofreu a redução de ninhada - os hiperalimentados- foi significativamente maior em relação aos controles aos 10 dias de idade (C 10: $2,1 \pm 0,1$; H 10: $3,1 \pm 0,4$) e aos 21 dias (C 21: $6,0 \pm 0,3$; H 21: $8,7 \pm 0,3$). Os filhotes aos 21 dias ingeriram mais leite que aos 10 dias independente do tratamento. O efeito da hipernutrição foi igual nas duas idades (Figura 3).

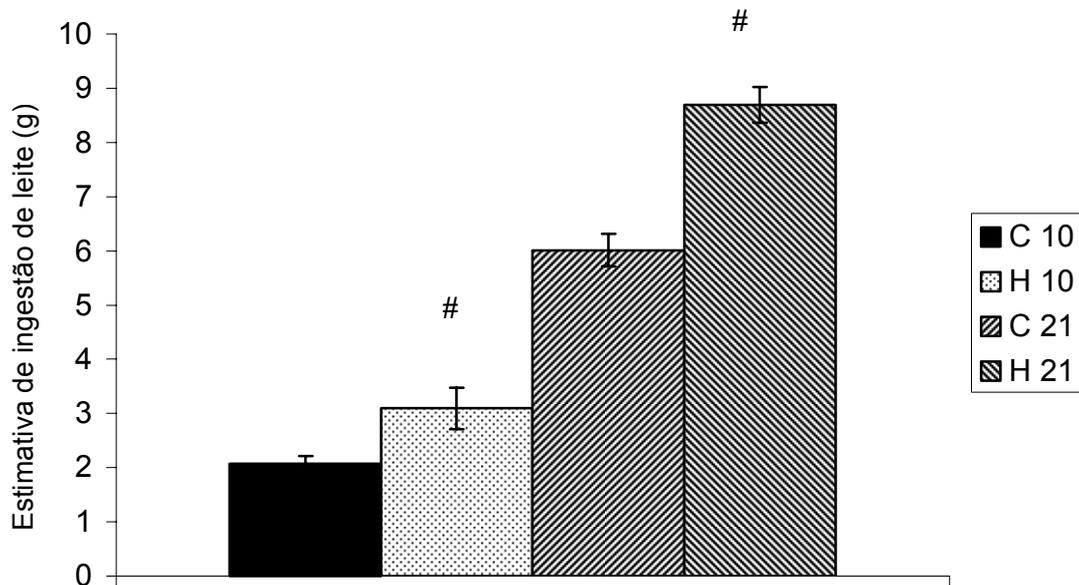


Figura 3: Estimativa de ingestão de leite de filhotes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8). #p < 0,05 H vs C no 10º e 21º dia de lactação.

4.2 Estado nutricional dos filhotes

4.2.1 Peso corporal dos lactantes

4.2.1.1 Curva de crescimento

O peso corpóreo dos lactantes hiperalimentados foi significativamente maior em comparação aos lactantes controles a partir do 10º dia de lactação, mantendo-se assim até o final da lactação (figura 4).

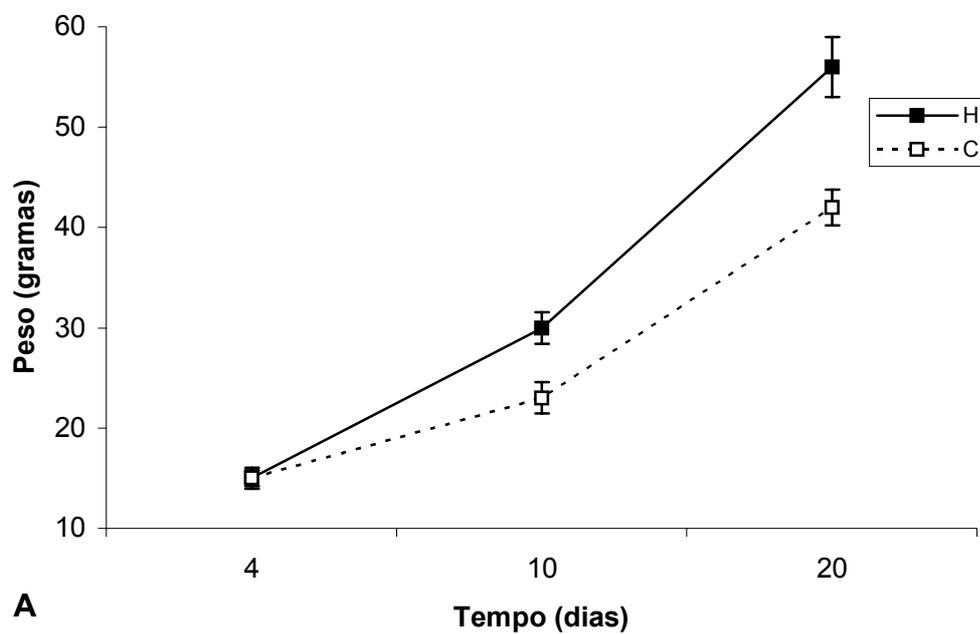


Figura 4: Curva de peso corpóreo dos lactantes machos controles (C) e hiperalimentados (H) durante o período de lactação. Os valores representam a média \pm erro padrao (n=9). # $p < 0,001$ H vs C no 10º e 21º dia de lactação

4.2.1.2 Peso corporal

O peso corporal dos lactentes hiperalimentados foi significativamente maior em comparação aos lactentes controles após o 10º dia de lactação (C 10: 18,6 ± 0,11; H 10: 20,5 ± 0,3) mantendo-se até o final da lactação (C21: 33,4 ± 1,2; H 21: 50,8 ± 1,5) (figura 5). Encontrou-se diferença entre filhotes de 10 dias e 21 dias. O efeito da hipernutrição foi diferente nas idades.

Ao se analisar a diferença percentual em relação ao peso corpóreo, os grupos obesos tiveram um incremento no peso de 10% aos 10 dias de vida e de 52% aos 21 dias de vida.

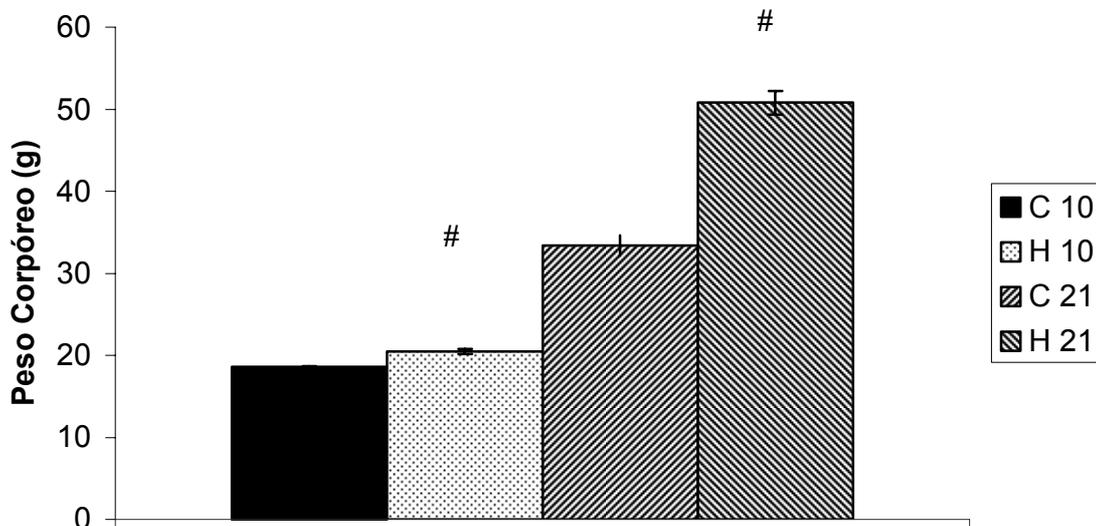


Figura 5: Peso corporal dos lactentes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n = 8). #p < 0,001 H vs C no 10º e 21º dia de lactação

4.2.2 Comprimento

O comprimento naso-anal dos lactentes não se mostrou significativamente diferente entre o C e H nos dias estudados (C 10: $7,5 \pm 0,3$; H 10: $7,7 \pm 0,1$; C 21: $11,1 \pm 0,1$; H 21: $11,5 \pm 0,3$). Encontrou-se diferença entre as idades (filhotes de 10 dias e 21 dias), o que já era esperado. O efeito da hipernutrição foi igual em ambas as idades.

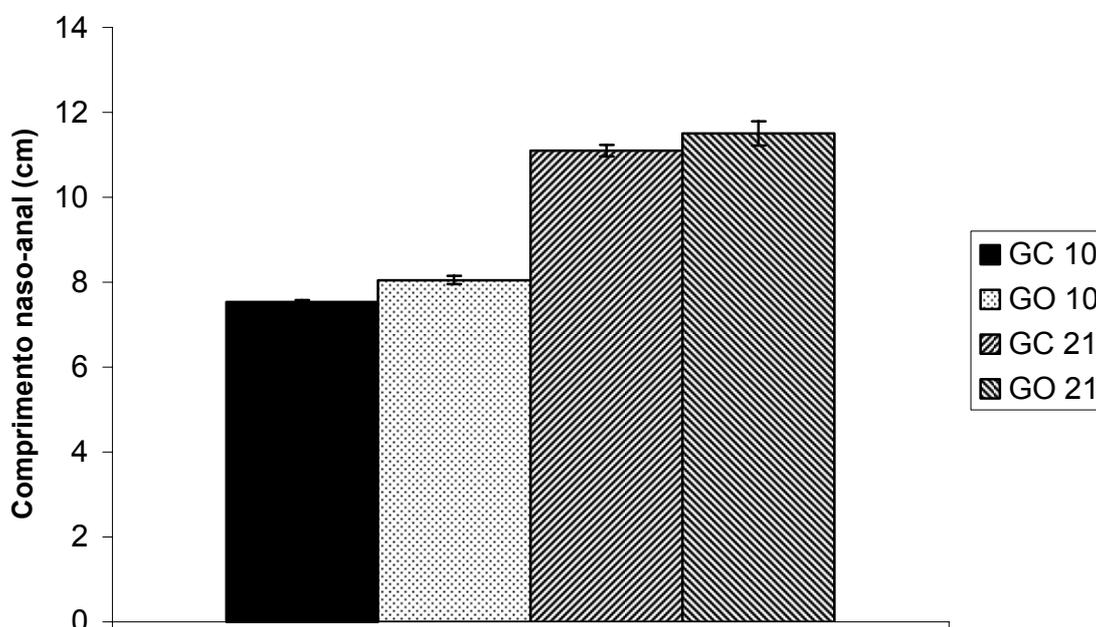


Figura 6: Comprimento naso-anal de filhotes machos controles (C) e hiperalimentados (H) aos 10^o e 21^o dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8).

4.2.3 Percentual de gordura aos 10º e 21º dia

A redução da ninhada no 4º dia de lactação provocou importantes mudanças na composição corporal dos lactantes no 10º e 21º dia de idade .

Os lactentes hiperalimentados apresentaram maior percentual de gordura quando comparados aos controles (C 10: $4,95 \pm 0,61$; H 10: $7,26 \pm 0,69$; C 21: $3,89 \pm 0,77$; H 21: $7,91 \pm 0,74$) (Figura 7). Não houve diferença quando comparou-se idades. O efeito da hipernutrição foi o mesmo nas duas idades.

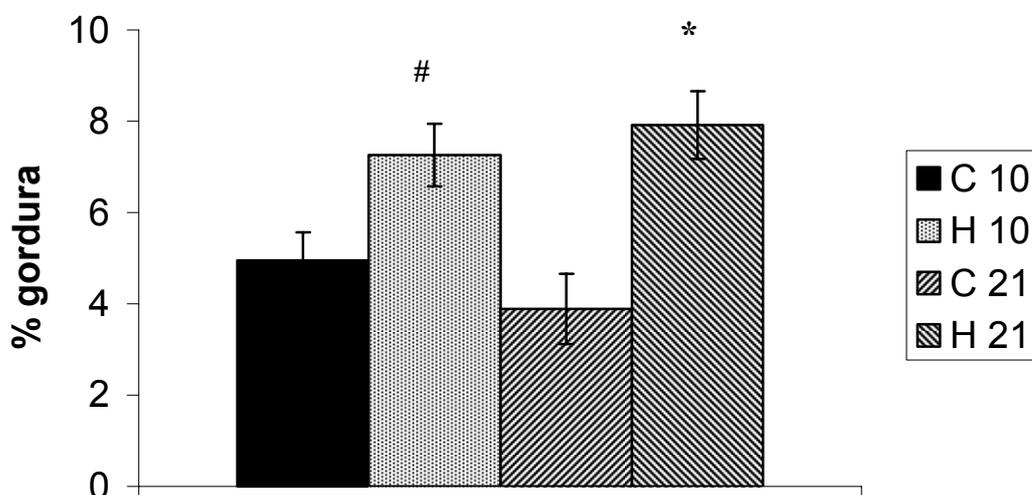


Figura 7: Relação da gordura corporal com a massa corporal (% gordura) dos lactentes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8). #p < 0,05 H vs C no 10º e * p<0,001 no 21º dia de lactação

4.2.4 Glicogênio hepático

Os valores de glicogênio hepático do grupo hiperalimentado foram maior que o controle aos 10 dias ($p < 0,05$). O mesmo não ocorreu aos 21 dias (C 10: $4,8 \pm 0,2$; H 10: $5,7 \pm 0,2$; C 21: $4,8 \pm 0,3$; H 21: $5,7 \pm 0,4$). Não houve diferença em relação as idades. Mostrando que o efeito da hiperalimentação foi diferente entre as idades.

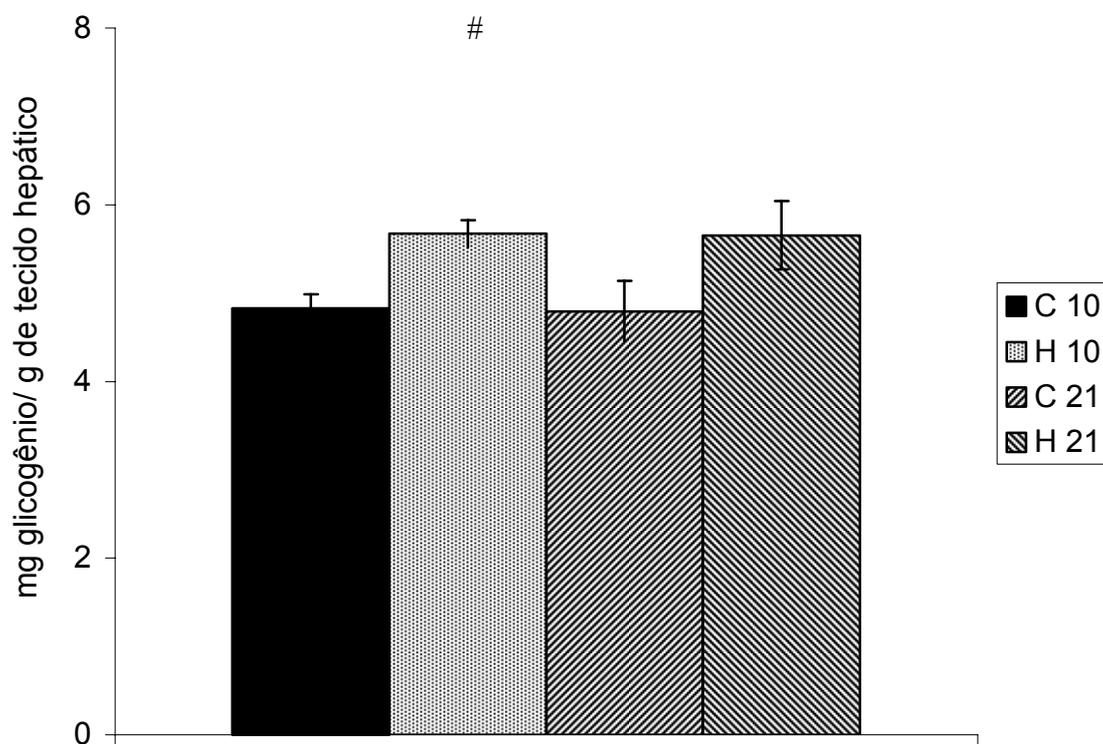


Figura 8: Glicogênio hepático de lactentes machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média ($n = 10$).

$p < 0,05$ H vs C no 10º dia de lactação

4.2.5 Glicogênio muscular

Os valores de glicogênio muscular do grupo hiperalimentado foram maior que o controle aos 10 dias (C 10: $5,7 \pm 0,1$; H 10: $7,9 \pm 0,7$). Os filhotes aos 10 dias apresentaram maior conteúdo de glicogênio do que aos 21 dias. O mesmo não ocorreu aos 21 dias (C 21: $4,3 \pm 0,2$; H 21: $4 \pm 0,3$). O efeito da hipernutrição foi diferente entre as idades.

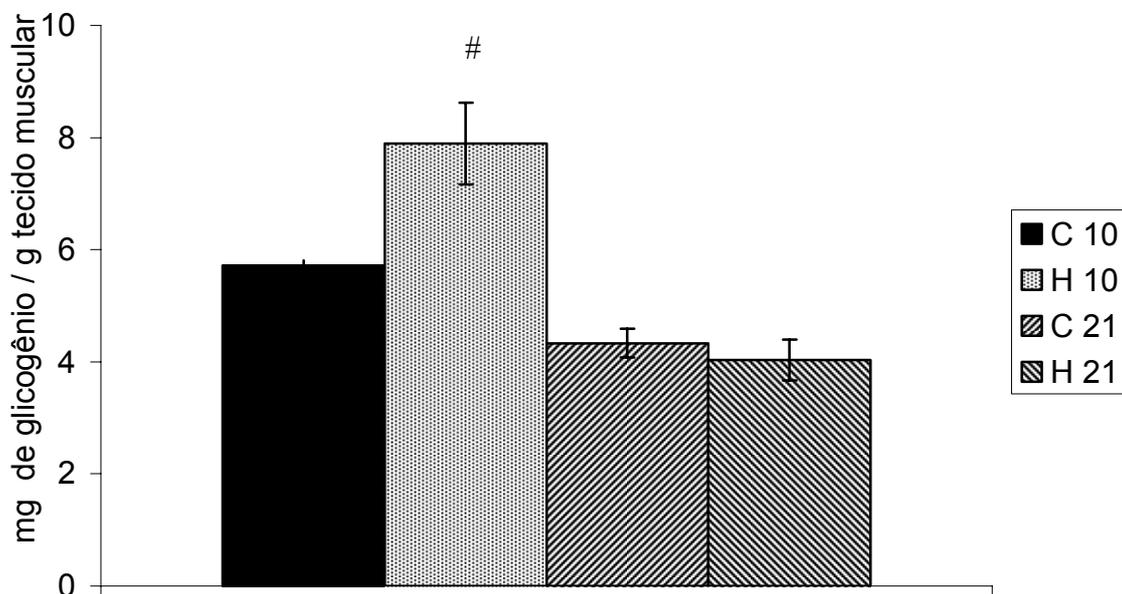


Figura 9: Glicogênio muscular de lactentes machos controle e hiperalimentados aos 10 e 21 dias de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 10).

#p < 0,05 H vs C no 10º dia de lactação

Tabela Resumo 1- Dados antropométricos e composição corporal .

	PC (g)	NA (cm)	T (mm)	Lee	Lip T(g)	Lip T/PC	GM	GH	IL (g)
10 dias									
Controle	18,6±0.1	7.5 ± 0.3	10±0,3	0,301± 0,003	0,97 ±0,5	4,95 ±0,6	5,7±0,01	4,8±0,2	2,1±0,1
Hiperlim.	20,5± 0.3*	7.7± 0.1	9,75±0,25	0,336 ±0,007*	1,93 ±0,6#	7,26 ±0,7#	7,8±0,7#	5,6±0,2#	3,1±0,4#
21 dias									
Controle	33,4 ± 1,2	11,1 ± 0.1	21,2 ± 1,5	0,336 ±0,001	1,1 ±0,2	3,89 ±0,8	4,3 ±0,2	4,7 ±0,7	6±0,3
Hiperlim	50,8± 1.5*	11,5± 0.3	18,3 ± 0,5	0,357 ± 0,034*	5,46 ± 0,3*	7,91 ± 0,7*	4,0 ± 0,3	5,6±0,4	8,7±0,3#
TWO WAY ANOVA									
Tratamento	<0.001	ns	ns	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<0.001
Idade	<0.001	<0.001	<0,001	<0.001	ns	ns	<0.001	ns	<0.001
Interação	<0.001	ns	ns	<0.001	ns	ns	<0.05	ns	<0.05

Valores representados como media+ erro padrão com número de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados usando Two Way ANOVA, com p valor significativo de <0.05.

* p<0,001 hiperalimentado x controle ; # p<0,05 overfed x control.

PC = peso corporal; NA= comprimento nasoanal, T= comprimento da tíbia, Lee= Índice de Lee x10⁻³; Lip T= lipídeos totais; Lip. T./PC = lipídeos totais/ peso corporal; GM= glicogênio muscular; GH= Glicogênio Hepático; IL = Ingestão de leite.

4.3 Bioquímica

A redução da ninhada promoveu importantes alterações bioquímicas no plasma dos lactentes.

O colesterol plasmático dos H foi significativamente maior nas duas idades analisadas quando comparado aos controles (C 10: $66,3 \pm 10,2$; H 10: $98,8 \pm 3,5$; C 21: $95,95 \pm 9,9$; H 21: $136,1 \pm 3,7$; $p < 0,05$) (Figura 10). Os lactentes aos 21 dias apresentaram maiores concentrações de colesterol que os lactentes aos 10 dias.

Além de apresentarem maiores níveis de triglicerídios plasmáticos em ambas as idades ($p < 0,05$) (C 10: $49,5 \pm 3,1$; H 10: $110,5 \pm 14,1$ $p < 0,001$) (C 21: $74,6 \pm 12,8$; H 21: $144,3 \pm 18,0$; $p < 0,05$) (Figura 11). Os lactentes aos 21 dias apresentaram maiores concentrações de triglicerídios que os lactentes aos 10 dias.

A glicose plasmática também foi maior nos animais hiperalimentados aos 10^o e 21^o dias de idade (C 10: $94,4 \pm 7,6$; H 10: $136,9 \pm 7,55$; C 21: $138,6 \pm 12,5$ H 21: $195,9 \pm 12,1$; $p < 0,05$) (Figura 12). Os lactentes aos 21 dias apresentaram maiores concentrações de glicose que os lactentes aos 10 dias.

A insulina plasmática mostrou-se significativamente superior no hiperalimentados (H) quando comparado ao grupo controle (C) (C 10: $25,22 \pm 1,2$; H 10: $32,5 \pm 3,1$; C 21: $19,6 \pm 0,8$; H 21: $31,0 \pm 0,61$; $p < 0,001$) (Figura 13). Ao compararmos idades, os valores de insulina plasmática são maiores nos 21 dias, o efeito da hipernutrição foi diferente entre as idades.

O grupo hiperalimentado aos 21 dias apresentou valores de relação insulina/glicose significativamente superiores ao grupo controle (C 21: $1,92 \pm 0,08$; H 21: $3,2 \pm 0,2$; $p < 0,001$). O mesmo não ocorreu aos 10 dias (C 10: $2,8 \pm 0,2$; H 10: $2,8 \pm 0,2$) (Figura 14). Mostrando que o efeito da hipernutrição foi diferente entre as idades.

4.3.1 Colesterol Plasmático

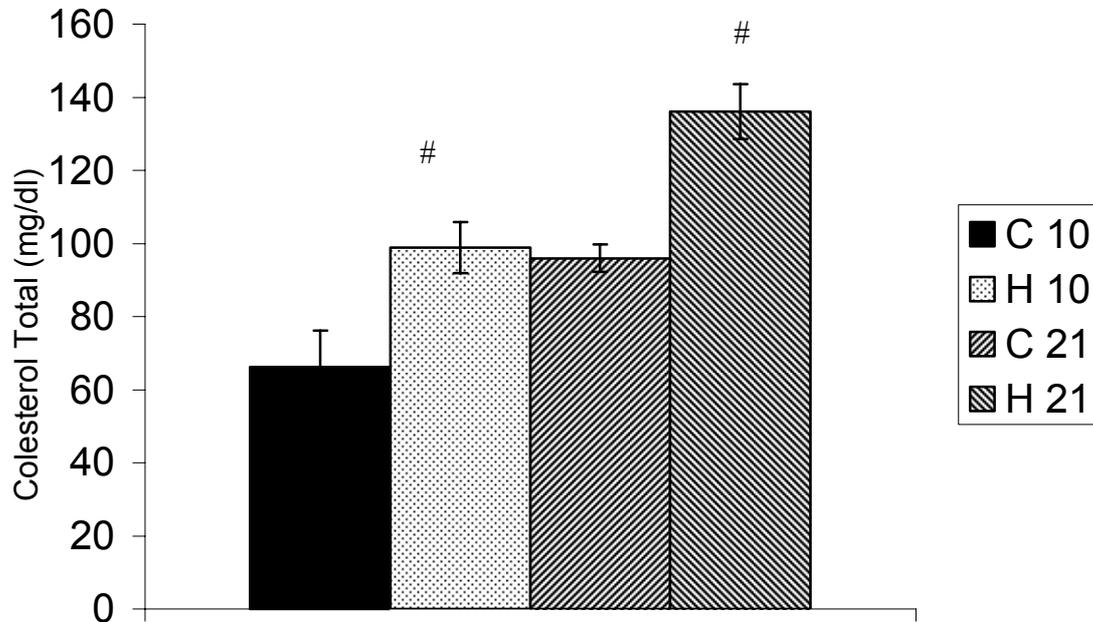


Figura 10: Colesterol total plasmático de filhotes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10^o e 21^o dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 6). #p < 0,05 H vs C no 10^o e 21^o dia de lactação.

4.3.2 Triglicerídios Plasmáticos

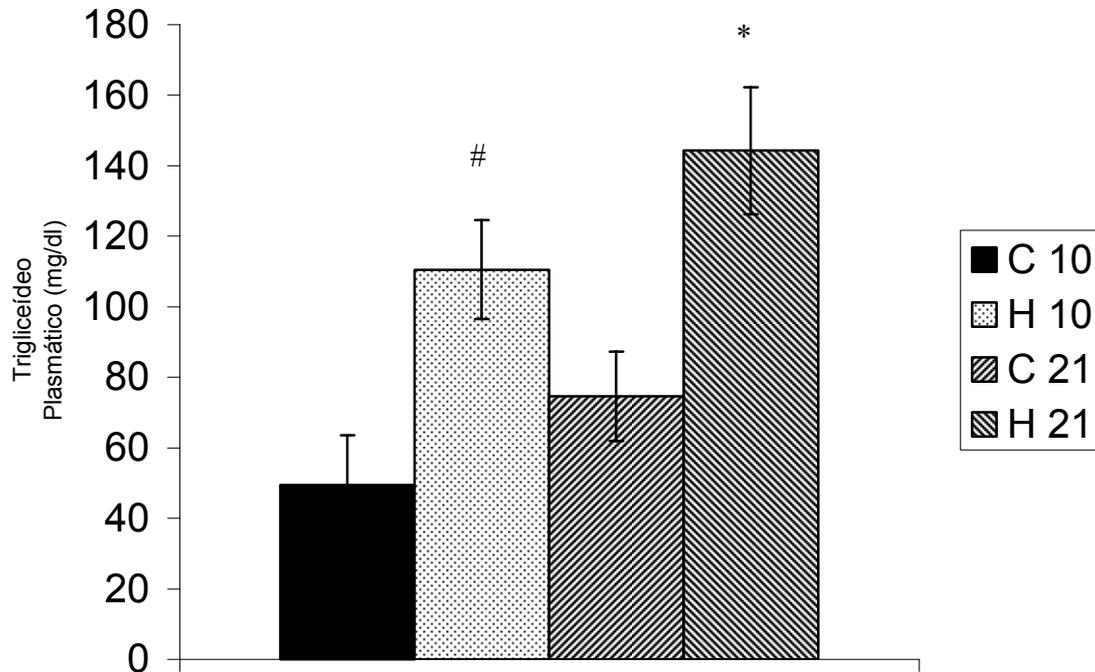


Figura 11: Triglicerídios sérico de filhotes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8). #p < 0,001 H vs C no 10º e *p < 0,05 H vs C no 21º dia de lactação

4.3.3 Glicose Plasmática

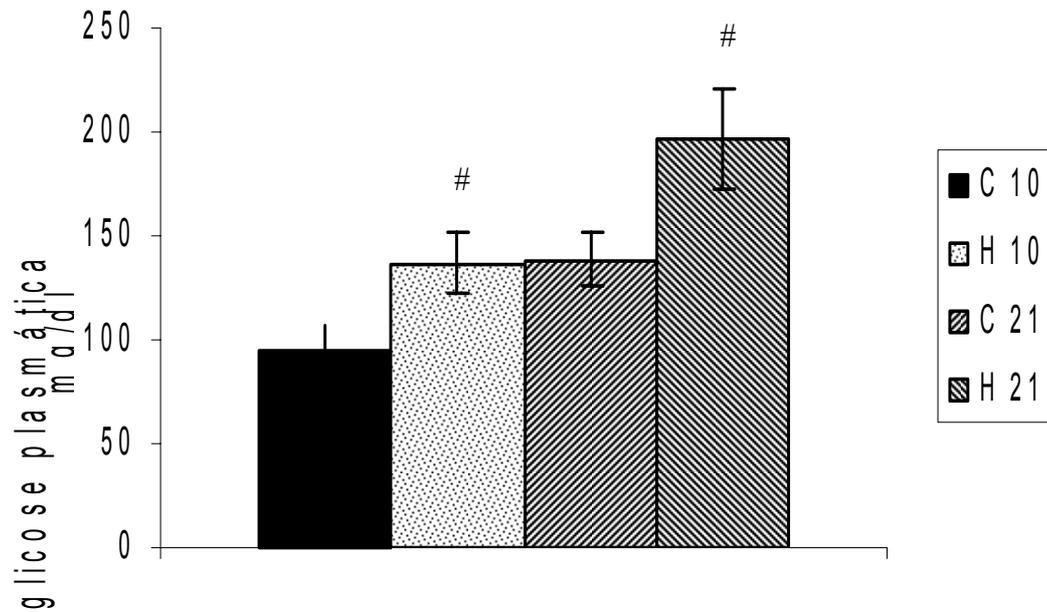


Figura 12: Glicose plasmática de lactentes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 6). #p < 0,05 H vs C no 10º e 21º dia de lactação.

4.3.4 Insulina Plasmática

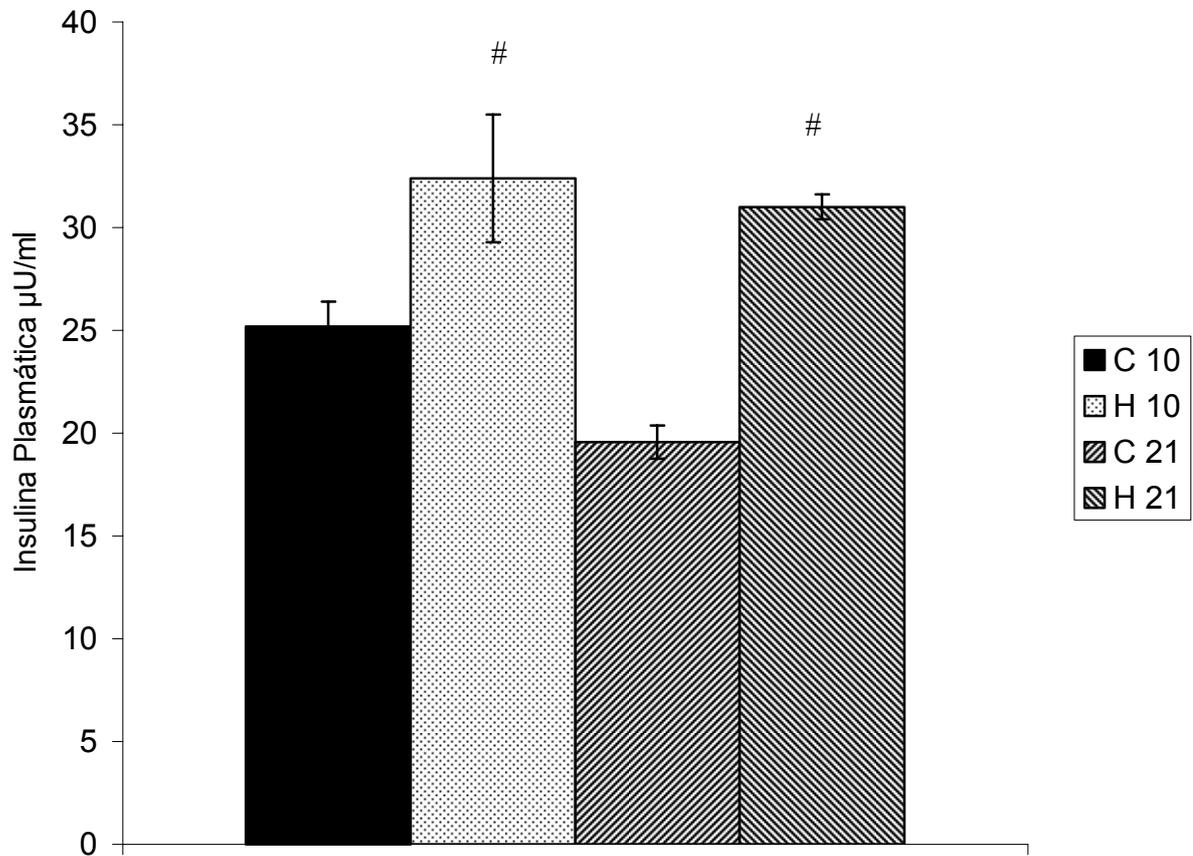


Figura 13: Insulina plasmática de lactentes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8). #p < 0,001 H vs C no 10º e 21º dia de lactação

4.3.5 Relação Insulina/glicose plasmática

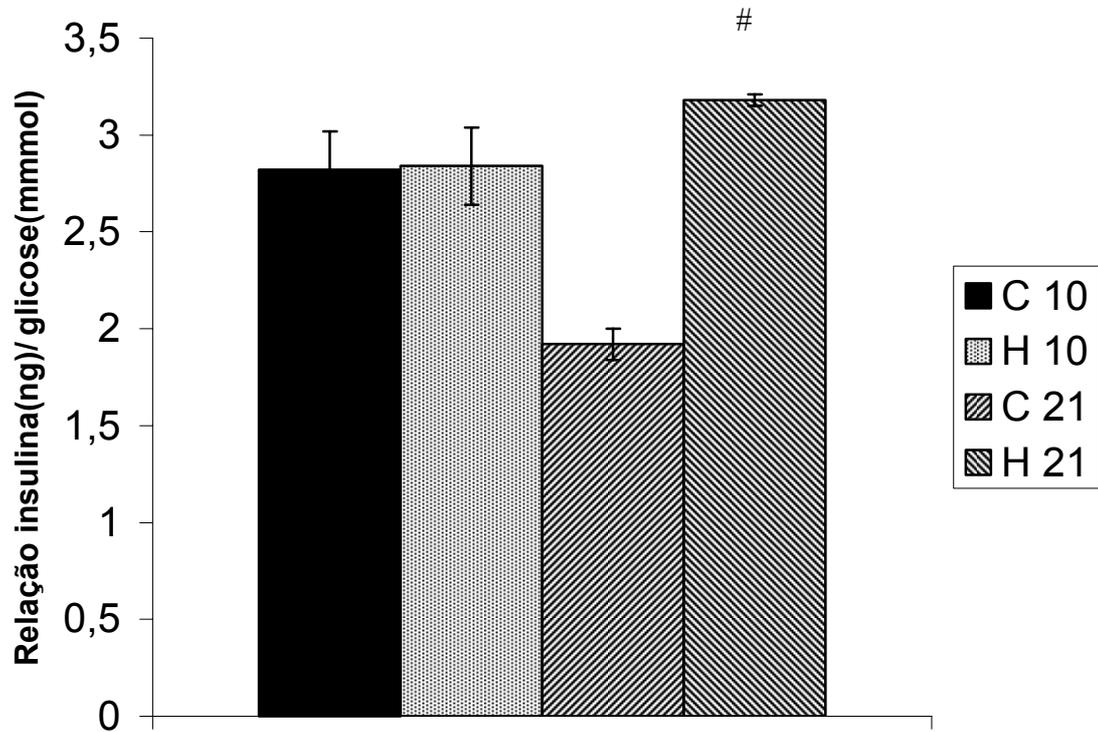


Figura 14: relação insulina/glicose de controle (C) e hiperalimentados (H) aos 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n=8). [#]p < 0,001 H vs C no 10º e 21º dia de lactação

Tabela Resumo 2 - Dados Bioquímicos

	Glicose Plasmática (mg/dl)	insulina Plasmática (µU/ml)	Razão Insulina/ Glicose	Colesterol Plasmático (mg/dl)	Triglicerídios Plasmático (mg/dl)
10 dias					
Controle	94.4± 7.6	25.22±1.2	2.82± 0.2	66.3±10	49.5±3.1
Hiperlim.	136.9± 7.5 *	32.48 ± 3.1*	2.84±0.2	98.8±3.5#	110.5±14#
21 dias					
Controle	138.6± 12.4	19.56 ± 0.8	1.92±0.08	96±9	74.6±12.7
Hiperlim	196± 12.3 *	31.03±0.61 *	3.18 ± 0.27*	136±3.7#	144.3±18#
TWO WAY ANOVA					
Tratamento	<0.001	<0.001	ns	<0.001	<0.001
Idade	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05
Interação	Ns	<0.05	ns	Ns	ns

Valores representados como media+ erro padrão com número de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados usando Two Way ANOVA e teste-t de student, com p valor significativo de <0.05.

* p<0,001 hiperalimentado x controle ; # p<0,05 hiperalimentado x controle

4.4 Morfometria

A redução da ninhada promoveu importantes alterações na morfometria do coração.

O peso do coração dos hiperalimentados aos 21 dias foi significativamente maior quando comparado ao controle (C 21: $179,4 \pm 10,2$; H 21: $264,7 \pm 4,9$; $p < 0,001$) (Tabela 3). O mesmo não pode ser visto aos 10 dias. O peso do coração é maior aos 21 dias quando comparados com de 10 dias. O efeito da hipernutrição foi diferente entre as idades.

O mesmo resultado foi encontrado em relação ao peso do ventrículo esquerdo (tabela 3).

Não foi observada diferença ao comparar lactentes controles com hiperalimentados em relação a razão ventrículo esquerdo/ coração e na razão ventrículo esquerdo/ peso corporal, aos 10 e 21 dias (figura 15; tabela 3).

Porém, quando foi realizada a razão peso do ventrículo esquerdo/ comprimento da tíbia e a razão peso do coração/comprimento da tíbia, foi visto que as razões foram maiores nos lactentes hiperalimentados aos 21 dias do que nos controles. O mesmo não pode ser verificado aos 10 dias, já que não foi verificada diferença no peso dos corações, dos ventrículos e no comprimento da tíbia (tabela 3).

Tabela resumo 3 - Dados Cardíacos

	Cor (mg)	VE(mg)	VE/ Cor	VE/ PC	VE/T	Cor/ T
10 dias						
Controle	95.1±2.4	61.3 ±2.4	0.64±0.2	3.3±0.1	6.7± 1.6	9.7 ±0.62
Hiperlim.	97 ±4.7	65.8±3.8	0.67±0.01	3.3±0.2	6,7± 0,7	9.4±0.4
21 dias						
Controle	179.4±10.2	117.5±10.6	0.65±0.03	3.6±0.2	5.6±0.05	8.5± 0.5
Hiperlim	264.7 ± 4.9*	174.7± 6*	0.66±0.03	3.7±0.1	9.6±0.02*	14.5±0.4*
TWO WAY ANOVA						
Tratamento	<0.001	<0.001	ns	ns	<0.001	<0.001
Idade	<0.001	<0.001	ns	ns	<0.001	<0.001
Interação	<0.001	<0.001	ns	ns	<0.001	<0.001

Valores representados como media+ erro padrão com número de 6 animais por grupo. Os dados foram analisados usando Two Way ANOVA e teste t de student, com p valor significativo de <0.05.

* p<0,001 hiperalimentado x controle ; # p<0,05. hiperalimentado x controle

Cor= peso do coração; VE= peso do ventrículo esquerdo; PC=peso corporal; T= comprimento da tibia

Hipertrofia Ventricular

A relação peso do ventrículo esquerdo (VE) em mg e comprimento da tíbia em mm foi significativamente maior nos animais hiperalimentados em comparação com os controles aos 21 dias (C 10: $4,85 \pm 0,24$; H 10: $6,74 \pm 0,34$; C 21: $5,57 \pm 0,5$ H 21: $9,57 \pm 0,24$). O mesmo não pode ser visto aos 10 dias. Mostrando que o efeito da hipernutrição foi diferente entre as idades

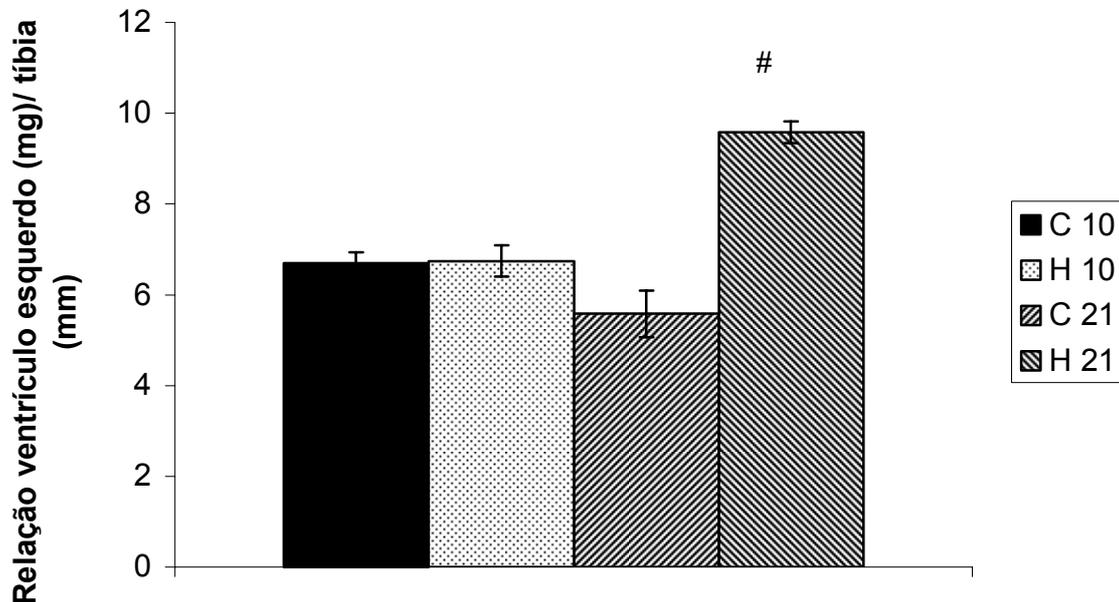


Figura 15: Relação do peso do ventrículo esquerdo e comprimento da tíbia caracterizando a hipertrofia ventricular esquerda em filhotes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8). #p < 0,001 H vs C no 21º dia de lactação

4.5. Biologia Molecular

4.5.1 Conteúdo de GLUT-1

Os grupos hiperalimentados apresentaram redução significativa de GLUT 1 cardíaco quando comparado com os controles . A hipernutrição promoveu modificações importantes de maneira similar nas duas idades.

Aos 10 dias de idade a redução foi de 42% (C 10: 82 ± 6 ; H 10: $48 \pm 5,9$).

Aos 21 dias de idade a redução foi de 36% (C 21: 98 ± 2 ; H 21: $63 \pm 0,1$).

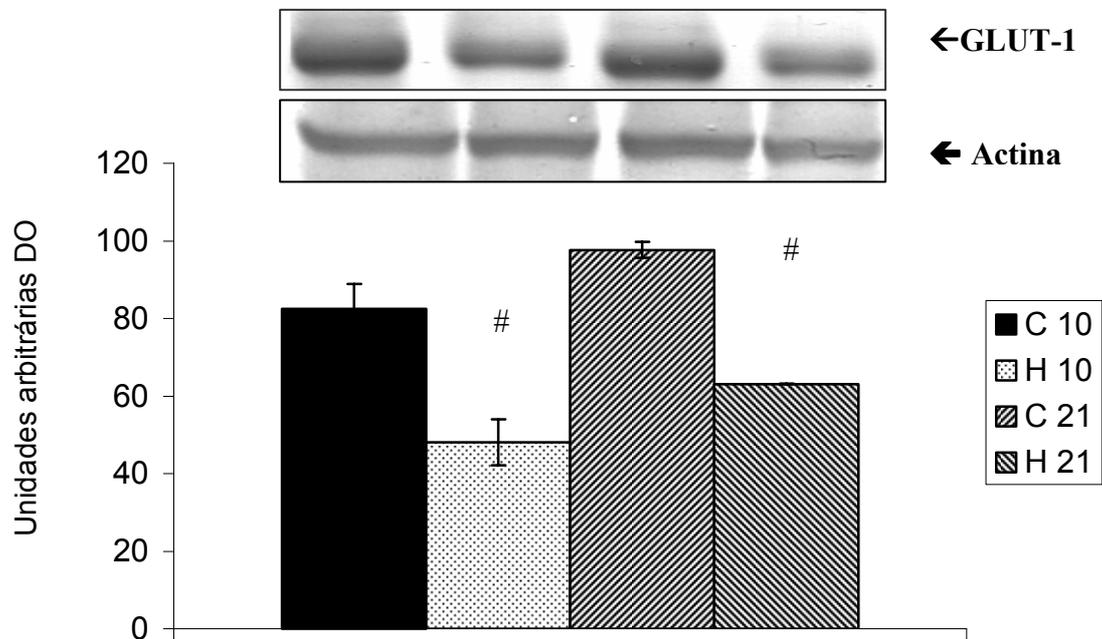


Figura 16: GLUT-1 de lactentes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 4).

#p < 0,05 H vs C no 10º dia e #p < 0,001 H vs C no 21º dia de lactação.

4.5.2 Conteúdo de GLUT-4

Os grupos hiperalimentados apresentaram aumento significativo de GLUT 4 cardíaco quando comparado com os controles . A hipernutrição promoveu acréscimo no conteúdo de GLUT-4 de forma similar nas duas idades.

Aos 10 dias de idade o aumento foi de 30%.

Aos 21 dias de idade o aumento foi de 31%.

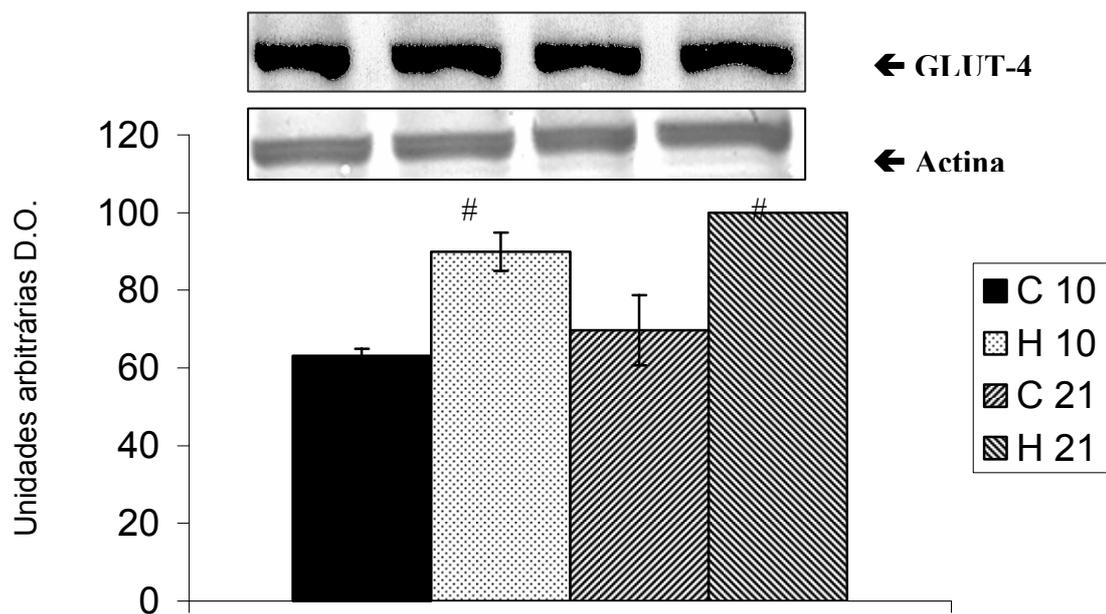


Figura 17: GLUT-4 de filhotes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8). [#]p < 0,05 H vs C no 10º e 21º dia de lactação..

4.5.3 Conteúdo de AKT

Os grupos hiperalimentados apresentaram aumento significativo de AKT cardíaca quando comparado com os controles. O efeito da hipernutrição foi igual nas duas idades.

Aos 10 dias de idade o aumento foi de 31%.

Aos 21 dias de idade o aumento foi de 50%.

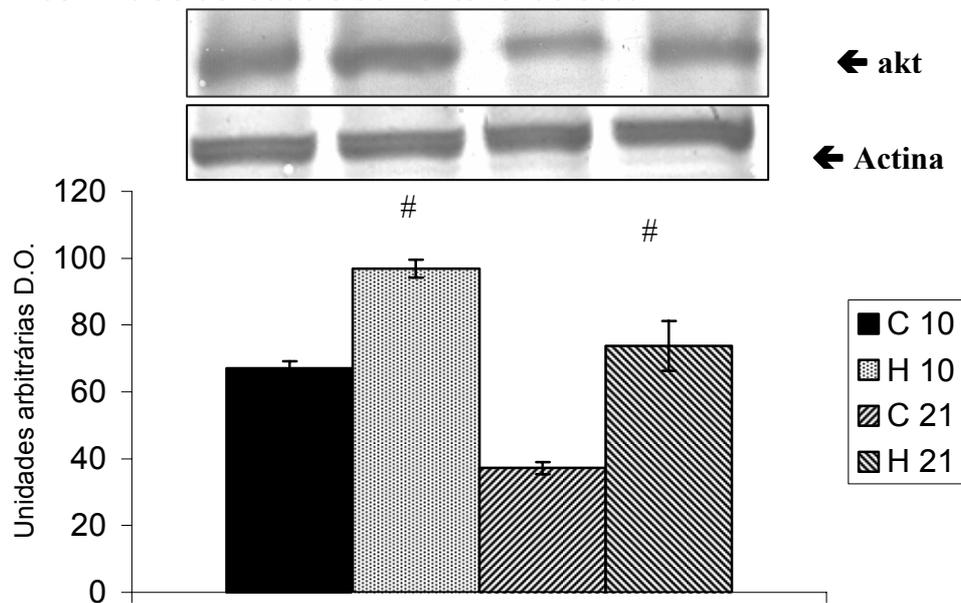


Figura 18: AKT de filhotes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média \pm erro padrão da média (n = 8). #p < 0,05 H vs C no 10º e 21º dia de lactação..

4.5.4 Relação pAKT/AKT

Os grupos hiperalimentados apresentaram aumento significativo na relação pAKT/akt cardíaca quando comparado com os controles.

Aos 10 dias de idade o aumento foi de 70%.

Aos 21 dias de idade o aumento foi de 35%.

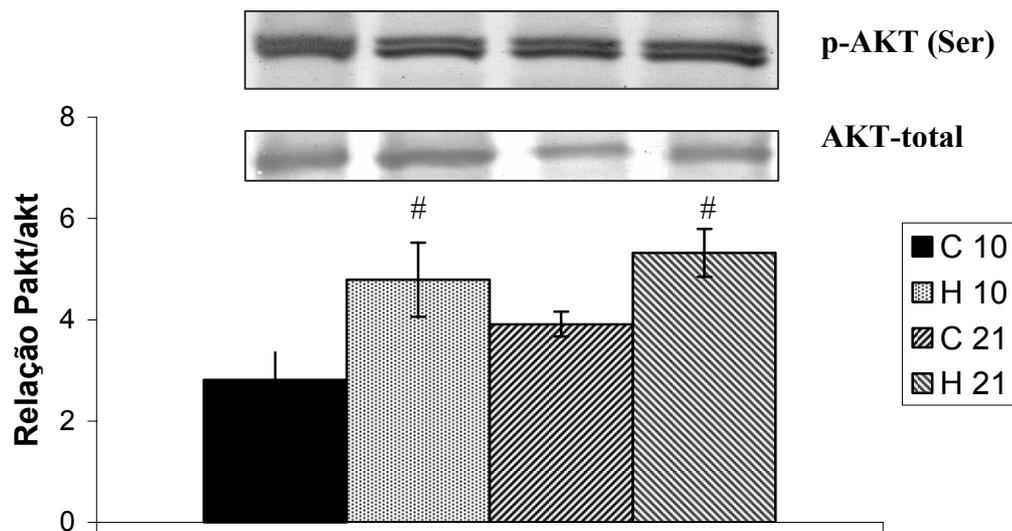


Figura 19: Relação pAKT/AKT de filhotes machos controles (C) e hiperalimentados (H) ao 10º e 21º dia de idade. Valores expressos em média ± erro padrão da média (n = 8). #p < 0,05 H vs C no 10º e 21º dia de lactação..

5.DISCUSSÃO

Em relação à obesidade o modelo experimental utilizado gerou resultados similares aos originalmente obtidos por Plagmann e col (2000) confirmando que através da redução da ninhada (após o 4º dia de lactação), foi possível gerar hiperalimentação com ganho ponderal a partir dos 10 dias se mantendo até o final da lactação as custas de aumento no percentual de gordura. Os lactentes hiperalimentados apresentam o percentual de gordura significativamente maior que os controles ($p < 0,001$). Outros pesquisadores, usando o mesmo modelo, também verificaram aumento de gordura em locais como: epidídimo, retroperitônio, perirenal e mesenquimal (Boullu- Ciocca e col, 2005; Bassett & Craig, 1988).

Observou-se também que o grupo hiperalimentado, apresenta precocemente alterações no metabolismo glicídico (aos 10 dias), com elevação dos valores de insulina plasmática e glicose plasmática. Curiosamente, neste período a relação insulina/glicose manteve-se normal. Porém, no final da lactação, os filhotes hiperalimentados já apresentam resistência à insulina. Ou seja, em breve período de tempo relevantes modificações metabólicas ocorrem. Paralelamente, também neste período ocorrem modificações do metabolismo lipídico refletidas no aumento de colesterol e de triglicerídeo.

Ou seja, o aumento da disponibilidade de nutriente ao neonato gera alterações na homeostase glicêmica, hiperinsulinemia e dislipidemia, que são características da síndrome metabólica (Voits e col, 1996; Plageman e col, 1999, Kahn & Flier, 2000). Esses resultados contribuem no entendimento dos efeitos das variações nutricionais durante o período perinatal provocando alterações metabólicas adaptativas que resultam nos efeitos deletérios em longo prazo. Tais

adaptações (impressão metabólica) necessárias no momento crítico do desenvolvimento, ao perdurarem na idade adulta (programação metabólica), promovem uma reprogramação orgânica gerando desequilíbrio e conseqüentemente o aparecimento de patologias, como das doenças crônico-degenerativas (Moura e col., 2004).

Estudos mostram que a primeira semana de lactação é um momento crítico para a geração de modificações na homeostase glicêmica de ratos (janela crítica) sendo capaz de gerar uma programação metabólica indutora de distúrbios da homeostase orgânica como tem sido observado em crianças prematuras (Lucas, 1994; Waterland e col., 1999; Moura e col., 2004). Assim sendo, os nossos resultados sugerem que a nutrição no período pós-natal determina os distintos perfis da homeostase glicêmica na idade adulta (Basset & Craig, 1998; Fiorotto e col, 1991; Plagemann e col, 1999, Faust e col, 1980; Voits e col., 1996).

Outro resultado encontrado em nosso estudo que alerta para uma possível sensibilização dos receptores de insulina do hepatócito e no músculo nos lactentes hiperalimentados aos 10 dias. O alto provimento energético no início da vida elevou a glicemia e a insulina plasmática, mas com manutenção da relação insulina/glicose. Assim, o aumento da insulina circulante estimula a glicogênio sintase e conseqüentemente aumenta a síntese do glicogênio justificando o estoque de glicogênio hepático e muscular aumentados aos 10 dias de idade ($p < 0,05$) (Pilkis & Granner, 1992).

Contudo no final da lactação, apesar o quadro de hiperglicemia e hiperinsulinemia, os filhotes hiperalimentados apresentaram aumento da relação insulina/ glicose caracterizando um quadro de redução da sensibilidade à insulina, e conseqüentemente os estoques de glicogênio não se apresentavam aumentados

($p > 0,05$). A possível explicação para tal achado é que, em decorrência da impressão metabólica induzida pela hiperalimentação nesses animais, há uma redução da sensibilidade sistêmica à insulina com conseqüente prejuízo no metabolismo glicídico e a não estimulação da glicogênio sintase. Mas esta não foi capaz de levar a redução do conteúdo de glicogênio hepático e nem muscular.

Dados publicados recentemente (Pereira e col, 2006) evidenciam que além da insulina, a leptina também se encontra aumentada nos lactentes hiperalimentados. Além disso, em outra série de estudos de nosso laboratório observou-se uma inter-relação das cascatas de sinalização da insulina e da leptina e são capazes de controlar o metabolismo energético cardíaco, sendo que a leptina também aumentou nos filhotes desnutridos (Moura e col 2002). Provavelmente a resposta da leptina decorra de algum tipo de alteração nutricional no início da vida, ou seja, no caso da desnutrição ou da hipernutrição sugerindo um mecanismo adaptativo inespecífico.

As dislipidemias e a resistência à ação da insulina estão associadas, e são consideradas como os principais fatores para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Kahn & Flier, 2000). Ademais o resultado bioquímico encontrado reforçou as alterações nos fatores predisponentes da geração de distúrbios cardiovasculares, com o aumento das triglicérides e do colesterol total nos hiperalimentados durante a lactação ($p < 0,05$).

De forma mais específica esse trabalho além de demonstrar a potencialidade do modelo de Plagemman o utilizou no estudo do desenvolvimento e metabolismo energético do coração.

No que diz respeito especificamente ao miocárdio, sabemos que existem dois transportadores que são expressos nos cardiomiócitos, o GLUT-1 (não dependente de insulina) e o GLUT-4 (dependente de insulina). No coração do neonato, há uma

maior expressão de GLUT-1 comparado ao GLUT-4, que com o desenvolvimento do músculo cardíaco o GLUT-4 substitui o GLUT-1 (Friehs e col., 2003).

Estudos realizados por Vanoverschelde e col (1994), estudando o GLUT-4, observaram em corações de coelhos adultos que o aumento da glicólise durante a isquemia reduziu o dano isquêmico ao miocárdio e melhorou a recuperação da função contrátil após reperfusão. Reforçando tal conceito, Tian & Abel (2001) utilizando ratos *knockout*, para GLUT4 cardíaco, verificaram que durante a isquemia, estes corações exibiram redução da utilização de glicose e desenvolveram profunda e irreversível disfunção sistólica e diastólica associado a uma acelerada depleção de ATP, demonstrando claramente que o GLUT-4 é um importante mediador do aumento da glicólise durante a isquemia e representa um mecanismo protetor contra lesões isquêmicas, além de ter desenvolvido hipertrofia. Diversos outros autores também têm encontrado resultados nesse sentido (Friehs e col., 2003; Ramasamy e col., 2001).

No nosso estudo notamos que os filhotes hiperalimentados estabeleceram um novo equilíbrio em relação aos transportadores de glicose no músculo cardíaco, com redução de GLUT-1 e aumento de GLUT-4, expressando uma antecipação da dependência à insulina do músculo cardíaco. Este resultado reveste-se de particular importância, tendo em vista que esta precocidade na dependência de insulina pode levar a prejuízos para o funcionamento futuro do coração.

Como conseqüência das alterações metabólico-nutricionais e de expressão gênica, resulta no desenvolvimento da hipertrofia cardíaca (Li e col, 2002, Hannan e col, 2003, Rajapurohitam e col., 2003). A hipertrofia cardíaca é uma adaptação do coração a uma nova condição de trabalho. Esta adaptação é coordenada por hormônios, citocinas e fatores de crescimento (Dorn & Force, 2005; Heineke &

Molkentin, 2006). Inicialmente a hipertrofia pode ser considerada um mecanismo adaptativo, mas em longo prazo altera o metabolismo cardíaco (Proud, 2004; DeBosch e col, 2006). Sabe-se ainda que a hipertrofia ventricular esquerda é considerada uma doença complexa representada por interações genéticas e ambientais (Belke e col, 2002; DeBosch e col, 2006; Heineke & Molkentin, 2006).

Em humanos, Sinvanadan e col (2006) em estudo longitudinal com 132 crianças saudáveis, verificaram a associação entre hipertrofia ventricular e obesidade em crianças. Os autores observaram que a associação da hipertrofia ventricular com a resistência a insulina dependia da obesidade. Sugerem ainda como prevenção da hipertrofia cardíaca o controle do ganho de peso na infância. Kankäänpää e col (2006) demonstraram que depósitos de triglicerídeo no miocárdio precedem o aparecimento da hipertrofia ventricular, sendo os depósitos maiores em obesos.

Existem diferentes vias de regulação da hipertrofia cardíaca (Heineke & Molkentin, 2006). As modificações das vias metabólicas constituem o mecanismo básico (Heineke & Molkentin, 2006) e, a insulina e a leptina, hormônios dependentes de nutrientes disponíveis, parecem potencializar as vias de sinalização nos cardiomiócitos induzindo a hipertrofia (Smith e col, 2006).

Um fator chave na regulação do crescimento cardíaco é a Akt (O'Neill & Abel, 2006, Walsh, 2006, DeBosch e col, 2006). Além disso, é considerado um fator comum de diferentes vias de sinalização que desencadeia a hipertrofia, como das vias da GSK3 e do mTOR por meio de ativação de fatores de transcrição e tradução gênica (Chan e col, 2004; Chan & Dyck, 2005).

Em nosso estudo, os lactentes hiperalimentados, no final da lactação, apresentaram aumento do peso do coração e dos ventrículos ($p < 0,01$), quando tais

valores foram corrigidos pelo comprimento da tibia verificamos que estes apresentavam hipertrofia ventricular esquerda. Complementarmente verificamos que a akt está mais fosforilada (mais estimulada) nos animais hiperalimentados tanto aos 10 dias quanto aos 21 dias (pakt/akt).

O cardiomiócito ao desenvolver a hipertrofia adapta-se restabelecendo perfil metabólico similar ao encontrado em estágios precoces de seu desenvolvimento. Mas os estudos ainda são controversos em relação à escolha do substrato energético e as diferentes vias de sinalização durante o desenvolvimento do músculo cardíaco (principalmente em condições nutricionais anormais). Pesquisadores sugerem algumas adaptações em resposta a hipertrofia como a ativação das vias da Akt, mTOR e da MAPK e redução da AMPK e PPAR α (Luptak, 2005).

Desta forma, tanto os resultados apresentados, quanto os dados da literatura, indicam que a hiperalimentação na lactação seja um importante fator responsável pelas doenças cardiovasculares, sendo essa uma linha de pesquisa relevante na tentativa de prevenir os possíveis efeitos deletérios à saúde por eles provocados.

CONCLUSÃO

- ⌘ A hiperalimentação durante a lactação levou ao aumento da ingestão de leite pelos neonatos durante toda a lactação. O ganho de peso e o percentual de gordura foram maiores nos hiperalimentados.

- ⌘ Os lactentes hiperalimentados apresentaram alteração no metabolismo glicídico com aumento de colesterol, triglicéridio, glicose e insulina plasmática. O alto provimento energético levou ao aumento dos estoques de glicogênio hepático e muscular aos 10 dias.

- ⌘ A hiperalimentação provocou hipertrofia cardíaca nos lactentes e induziu ao aumento da sinalização da proteína AKT (via de hipertrofia).

- ⌘ A hiperalimentação provoca antecipação na dependência dos cardiomiócitos por insulina devido à redução do conteúdo de GLUT-1 juntamente ao aumento do conteúdo de GLUT-4. Tal antecipação da utilização da insulina é fator indutor do crescimento cardíaco e pode refletir a precipitação de futuras desordens no metabolismo energético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel ED Kaulbach HC, Tian R, Hopkins JC, Duffy J, Doetschman T, Minnemann T, Boers ME, Hadro E, Oberste-Berghaus C, Quist W, Lowell BB, Ingwall JS, Kahn BB. Cardiac hypertrophy with preserved contractile function after selective deletion of GLUT4 from the heart. *Clin Invest*. 1999; 104(12):1703-14.

Abel ED. Glucose transport in the heart. *Front Biosci*. 2004; 9:201-15.

Aikawa R, Nawano M, Gu Y, Katagiri H, Asano T, Zhu W, Nagai R, Komuro I. Insulin prevents cardiomyocytes from oxidative stress-induced apoptosis through activation of PI3 kinase/Akt. *Circulation*. 2000; 102(23):2873-9.

Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life, *BMJ*. 1990; 301(6746):259-62.

Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *BMJ*. 1995; 25:457-463.

Basset DR & Craig BW. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *J Appl Physiol*. 1988; 64(3): 1249-56.

Becker C, Sevilla L, Tomàs E, Palacin M, Zorzano A, Fischer Y. The endosomal compartment is an insulin-sensitive recruitment site for GLUT4 and GLUT1 glucose transporter in cardiac myocytes. *Endocrinology*. 2001; 142: 5267-76.

Belke DD, Betuing S, Tuttle MJ, Graveleau C, Young ME, Pham M, Zhang D, Cooksey RC, McClain DA, Litwin SE, Taegtmeyer H, Severson D, Kahn CR, Abel ED. Insulin signaling coordinately regulates cardiac size, metabolism, and contractile

protein isoforms expression. *The Journal Clin Invest.* 2002; 109(5):629-639.

Boullu-Ciocca S, Dutour A, Guillaume V, Achard V, Oliver C, Grino M. Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood. *Diabetes.* 2006; 54:197-203.

Bryant N J., Govers R and James D E. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 2002; 3: 267-177.

Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K, Thun MJ. Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. : *N Engl J Med.* 2003; 348(17):1625-38.

Carroll NV, Longley RW, Roe JH. The determination of glycogen in liver and muscle by use anthrone reagent. *The Journal of Biological Chemistry.* 1956; 220(2):583-593.

Carvalho JBC & Saad MJA. Vias de sinalização de insulina. *Arq Bras Endocr. Metabol.* 2002; 46(4): 419-425.

Castello A, Rodriguez-Manzaneque JC, Camps M, Perez-Castillo A, Testar X, Palacin M, Santos A, Zorzano A. Perinatal hypothyroidism impairs the normal transition of GLUT4 and GLUT1 glucose transporters from fetal to neonatal levels in heart and brown adipose tissue. Evidence for tissue-specific regulation of GLUT4 expression by thyroid hormone. *J Biol Chem.* 1994; 69(8):5905-12.

Chan A & Dyck J. Activation of AMP-activated protein kinase (AMPK) inhibits protein synthesis: a potential strategy to prevent the development of cardiac hypertrophy1 *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005; 83: 24–28.

Chang L, Chiang S, Saltiel A R. Insulin Signaling and the Regulation of Glucose Transport. *Molecular Medicine*. 2004. 10 (7):65-71.

Charron MJ & Katz EB. Metabolic and therapeutic lessons from genetic manipulation of GLUT4. *Mol Cell Biochem*. 1998;182: 143–152.

Correia MLG & Haynes WG. Leptin, obesity and Cardiovascular disease. *Current Opin Nephrol Hypertens*. 2004; 13:215-223.

DeBosch B, Treskov I, Lupu TS, Weinheimer C, Kovacs A; Courtois M; Muslin AJ. Akt1 Is Required for Physiological Cardiac Growth Circulation. 2006; 113:2097-2104.

Depre C & Taegtmeyer. Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart. *Cardiovascular Research*. 2000; 45: 538-548.

Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H. Glucose for the heart. *Circulation*. 1999; 99(4):578-88.

Desai M & Hales CN. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 1997;72(2):329-48.

Dietz WH. Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59:955-959.

Dorn G W & Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. *The Journal of Clinical Investigation*. 2005; 115(3):527-537.

Egert S, Nguyen N and Schwaiger M. Myocardial Glucose Transporter GLUT1: Translocation Induced by insulin and Ischemia. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31: 1337–1344

Faust Im, Johson PR, and Hirsch J. Long-term effects of early nutritional experience on the development of obesity in rats. *J Nutr.* 1980; 110:2027-2031.

Fiorotto ML, Burrin DG, Perez M, and Reeds Pj. Intake and use of milk nutrients by rats pups suckled in small, medium, or large litters. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 1991; 260:R1104-1113.

Freedman DS, Dietz WH, Srinivanan SR, Berenson GS. Relation of overweight to cardiovascular risk factors among children and adolescents: The Bogalusa Heart Study. *Pediatrics.* 1999; 103:1175-1182.

Freedman DS, Dietz WH, Srinivanan SR, Harsha DW. Relation of body fat patterning to lipid and lipoprotein concentration in children and adolescents: The Bogalusa Heart Study. *Am J Clin Nutr.* 1989; 50:930-939.

Friehs I, Cao-Danh H, Nathan M, McGowan FX, Nido PJ. Impaired insulin- signaling in hypertrophied hearts contributes to ischemic injury. *Biochemical and Biophysical Research Communication.* 2005; 331: 15-22.

Friehs I, Cao-Danh H, Stamm C, Cowan DB, McGowan FX, del Nido PJ. Postnatal increase in insulin-sensitive glucose transporter expression is associated with improved recovery of postischemic myocardial function. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2003; 126(1):263-71.

Gat- Yablonski G, Ben-Ari T, Shtaif B, Pohevshy O, Moran O, Eshet R, Maor G, Segev Y, Phillip M. Leptin reverses the inhibitory effect of caloric restriction on longitudinal growth. *Endocrinology.* 2004; 145(1):343–350.

Godfrey K & Robinson S. Maternal nutrition, placental growth and fetal programming. *Proc Nutr Soc.* 1998; 57(1):105-11.

Hannan RD, Jenkins A, Jenkins AK, Brandenburger Y. Cardiac hypertrophy: a matter of translation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30:517– 27.

Heineke J & Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nature Reviews.* 2006; 7:589-560.

Hoet JJ & Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *Journal of Physiology.* 1999; 514(3): 617-627.

Holness MJ, Langdown ML, Sugden MC, Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. *Biochem J.* 2000; 349(3):657-65.

Kahn BB & Flier JS. Obesity and Insulin Resistance. *The Journal of Clinical Investigation.* 2000; 106(4): 473-480.

Kankäänpää M, Leht HR, Pärkkä J P, Komu M, Viljanen A, Ferrannini E, Knuuti J, Nuutila P, Parkkola R, Iozzo P. Myocardial triglyceride content and epicardial fat mass in human obesity: relationship to left ventricular function and serum free fatty acid levels. *J Clin Endocrin Metab.* Ahead of print August, 2006

Kaput J & Rodriguez RL. Nutritional Genomics: the next frontier in the postgenomic era. *Physiol. Genomics.* 2004; 16:166-177.

Karlberg J, Jalil F, Larsson B, Low L, Yeung CY. Linear growth retardation in relation to

the three phases of growth. *Eur J Clin Nutr.* 1994; 48:25S-44S.

Khan A. H., Pessin J. E. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways *Diabetologia.* 2002; 45:1475–1483.

King LM and Opie LH. Glucose and glycogen utilization in myocardial ischemia. Changes in metabolism and consequences for the myocyte. *Mol Cell Biochem.* 1998; 180:3–26.

Lawlor DA & Chaturvedi N. Treatment and prevention of obesity--are there critical periods for intervention? *Int J Epidemiol.* 2006;35(1):3-9.

Li Y, Plagemann A, Davidowa H. Increased inhibition by agouti-related peptide of ventromedial hypothalamic neurons in rats overweight due to early postnatal overfeeding. *Neuroscience Letters.* 2002; 330 33–36.

Loizzo A, Loizzo S, Galieta G, Caiola, SP, Ampinato S, Campana G, Seghieri G, Ghirlanda G, Franconi F. Overweight and Metabolic and Hormonal Parameter Disruption Are Induced in Adult Male Mice by Manipulations During Lactation Period. *Pediatric Research.* 2006; 59(1):111-115.

Lopaschuk GD, Spafford MA, Marsh DR. Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth. *Am J Physiol.* 1991; 261:1698-705.

Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 1991; 156:38-50.

Lucas A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis*

Child. 1994; 71(4):288-90.

Luptak I, Balschi JA, Xing Y, Leone TC, Kelly DP, Tian R. Decreased contractile and metabolic reserve in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-null hearts can be rescued by increasing glucose transport and utilization. *Circulation*. 2005; 112(15):2339-46.

Ishiki M & Klip A. Minireview: Recent Developments in the Regulation of Glucose Transporter-4 Traffic: New Signals, Locations, and Partners. *Endocrinology* 146(12):5071–5078.

McGavock JM.; Victor RG.; Unger R H.; Szczepaniak L S. Adiposity of the Heart, Revisited. *Ann Intern Med*. 2006; 144:517-524.

Medina R A., Southworth R, Fuller Wi, Garlick PB. Lactate-induced translocation of GLUT1 and GLUT4 is not mediated by the phosphatidylinositol- 3-kinase pathway in the rat heart. *Basic Res Cardiol*. 2002; 97:168 – 176.

Morissette MR, Howes AL, Zhang T, Brown JH. Upregulation of GLUT1 expression is necessary for hypertrophy and survival of neonatal rat cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 2003; 35:1217–1227.

Moura AS, Carpinelli AR, Barbosa FB, Gravena C, Mathias PC. Undernutrition during early lactation as an alternative model to study the onset of diabetes mellitus type II. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 1996; 92(1):73-84

Moura AS, Franco de Sa CC, Cruz HG, Costa CL. Malnutrition during lactation as a metabolic imprinting factor inducing the feeding pattern of offspring rats when adults.

The role of insulin and leptin. *Braz J Med Biol Res.* 2002a; 35 (5):617-22.

Moura AS, Franco de Sá CCN, Costa CL, Vicente LL, Guerreiro SM, Pinto MAS. Association between nutrition and gender during lactation influencing glucose homeostasis and blood pressure of the adult offspring. *Biology of Neonate.* 2002b; 82: 263-270.

Moura AS, Gomes PF, Mandarim de Lacerda C, Gender determines long-lasting effects on adult offspring heart after early life malnourishment. *Biol of Neonate.* 2004; 85(4):256-262.

Moura EG & Passos MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* 2005; 25(3-4):251-69.

Neely JR & Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annu Rev Physiol.* 1974; 36:413–459.

Nguyen N, Brosius FC, and Schwaiger M. Effects of wortmannin on insulin- and ischemia-induced stimulation of GLUT4 translocation and FDG uptake in perfused hearts. *Cardiovasc Res.* 1997; 35: 283–293.

O'Neill B T and Abel E D. Akt1 in the cardiovascular system: friend or foe? *The Journal of Clinical Investigation.* 2005; 115 (8): 2059-2064

Pereira RO, Moreira ASB, de Carvalho L, Moura AS. Overfeeding during lactation modifies insulin and leptin signaling cascade in rats' hearts. *Regulatory Peptides.* 2006; 136: 117-121

Pilkis, S. J., & Granner, D. K. Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. *Annual Review of Physiology,* 1992;54, 885–909.

Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, and Dörner G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin acquired malformation of hypothalamic galanergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.* 1999; 836:146-155.

Plagemann A. Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. *Physiology & Behavior.* 2005; 86:661 – 668.

Plagemann, A, Schmidt I, Schoelch C, Ziska T, Schneider D, Simon E. Interaction of genetic programming of the leptin system and of obesity disposition. *Physiol Genomics.* 2000; 3(2):113-20.

Proud CG. Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovascular Research.* 2004; 63:403– 413.

Rajapurohitam V, Gan XT, Kirshenbaum,, Karmazyn M. The Obesity-Associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circulation Research.* 2003; 93(4):277.

Raman M, Nesto RW. Heart disease in diabetes mellitus. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996; 25(2): 425-38.

Ramasamy R, Hwang YC, Whang J, Bergmann SR. Protection of ischemic hearts by high glucose is mediated, in part, by GLUT-4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281(1):290-297.

Ramos S, Goya L, Alvarez C, Martín MA, Agote M, Escrivá F, Pascual- Leoni AM. Different role of insulin in GLUT-1 and -4 regulation in heart and skeletal muscle during perinatal hypothyroidism *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 281:1073-

1081.

Rasmussen KM. The "fetal origins" hypothesis: challenges and opportunities for maternal and child nutrition. *Annu Rev Nutr.* 2001; 21:73-95.

Ravelli ACJ, Meulen J HP, Osmond C, Barker D JP, Bleker O P. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70:811–16.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976; 295(7):349-53.

Rol De Lama M A, Pe´rez-Romero A, Tresguerres J A F, Hermanussen1 M , Ariznavarreta C. Recombinant human growth hormone enhances tibial growth in peripubertal female rats but not in males. *European Journal of Endocrinology* .2000; 142: 517–523.

Russel JA. Milk yield, suckling behavior and milk ejection in the lactating rat nursing litters of different sizes. *Journal of Physiology London, Cambridge.* 1980; 303: 403-415.

Saltiel AR & Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature.* 2001;414:799-806.

Shiojima I, Yefremashvili M, Luo Z, Kureishi Y, Takahashi A, Tao J, Rosenzweig A, Kahn CR, Abel ED, Walsh K. Akt signaling mediates postnatal heart growth in response to insulin and nutritional status. *J Biol Chem.* 2002; 277(40):37670-7.

Sichieri R, Dietary patterns and their associations with obesity in the Brazilian city of

Rio de Janeiro. *Obes Res.* 2002;10(1):42-8.

Sichieri R, Siqueira KS, Moura AS. Obesity and abdominal fatness associated with undernutrition early in life in a survey in Rio de Janeiro. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2000a; 24(5):614-8.

Sichieri R, Siqueira KS, Pereira RA, Ascherio A. Short stature and hypertension in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Public Health Nutr.* 2000b;3(1):77-82

Sivanandam S, Sinaiko AR, Jacobs DR, Steffen L, Moran A, Steinberger J.

Relation of Increase in Adiposity to Increase in Left Ventricular Mass from Childhood to Young Adulthood. *Am J Cardiol.* 2006; 98:411– 415.

Smith CC, Mocanu MM, Davidson SM, Wynne AM, Simpkin JC, Yellon DM. Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects. *Br J Pharmacol.* 2006;149(1):5-13.

Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL, and McCormack JG. Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions. Potential for pharmacological interventions. *Cardiovasc Res.* 1997; 33:243–257.

Stansbie D, Brownsey RW, Cretaz M, Denton RM. Acute effects in vivo of anti-insulin serum on rates of fatty acid synthesis and activities of acetyl-coenzyme A carboxylase and pyruvate dehydrogenase in liver and epididymal adipose tissue of fed rats. *Biochem J.* 1976; 160:413-416.

Steinberger J, Moorehead C, Katch V, Rocchini AP. Relationship between insulin resistance and abnormal lipid profile in obese adolescents. *J Pediatr.* 1995; 126:690-

695.

Sugden MC, Langdown M L., Harris R A, Holness M J. Expression and regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms in the developing rat heart and in adulthood : role of thyroid hormone status and lipid supply *Biochem. J.* 2000; 352:731-738.

Sun D, Nguyen N, DeGrado TR, Schwaiger M, and Brosius FC. Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT-4 to the plasma membrane of cardiac myocytes. *Circulation.* 1994;89: 793–798.

Tian R & Abel ED. Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis. *Circulation.* 2001;103(24):2961-6.

Toste FP, Alves SB, Dutra SC, Bonomo IT, Lisboa PC, Moura EG, Passos MC. Temporal evaluation of the thyroid function of rats programmed by leptin treatment on the neonatal period. *Horm Metab Res.* 2006;38(12):827-31.

Vanoverschelde JLJ, Janier MF, Bakke JE, Marshall DR, and Bergmann SR. Rate of glycolysis during ischemia determine extent of ischemic injury and functional recovery after reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1994; 267:1785-1794.

Voits M, Förster S, Rödel S, Voigt JP, Plagemann A, Fink H. Obesity induced by unspecific early postnatal overfeeding in male and female rats: hypophagic effects of CCK-8S. *Naunyn-Schmiede berg's Arch Pharmacol* 1996; 354:374-378.

Walsh K. Akt Signaling and Growth of the Heart *Circulation.* 2006;113:2032-2034.

Waterland R & Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *American Journal of Clinical Nutrition.* 1999; 69: 179-197.

Waterland RA & Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition*. 2004; 20(1):63-8

Yin FCP, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG. Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: application in the aging rats. *Am J Physiol*. 1982; 246(6): H941-947.

Young LH, Renfu Y, Russell R, Hu X, Caplan M, Ren J, Shulman GI, and Sinusas AJ. Low-flow ischemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation*. 1997; 95: 415–422.

Ziori CC, Zioris CT, Kyriakidis MK. Apoptosis in heart failure. *Hellenic Journal of Cardiology*. 44:56-70, 2003.