

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**Consumo materno de dieta hiperlipídica: alteração na  
expressão do receptor de angiotensina II (AT1) e  
hipertrofia no coração da prole ao desmame**

**NATÁLIA D'ASSUMPCÃO LIMA RANGEL**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**CONSUMO MATERNO DE DIETA HIPERLIPÍDICA: ALTERAÇÃO  
NA EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE ANGIOTENSINA II (AT1) E  
HIPERTROFIA NO CORAÇÃO DA PROLE AO DESMAME**

**NATÁLIA D'ASSUMPCÃO LIMA RANGEL**

*Sob a Orientação da Professora*

**Norma Aparecida dos Santos Almeida**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Fisiológicas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração em Fisiologia e Farmacologia.

Seropédica, RJ

Março de 2018

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R196c Rangel, Natália D'Assumpção Lima, 1993-  
Consumo materno de dieta hiperlipídica: alteração na  
expressão do receptor de angiotensina II (AT1) e  
hipertrofia no coração da prole ao desmame / Natália  
D'Assumpção Lima Rangel. - 2018.  
108 f.

Orientadora: Norma Aparecida dos Santos Almeida.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de pós graduação em  
ciências fisiológicas, 2018.

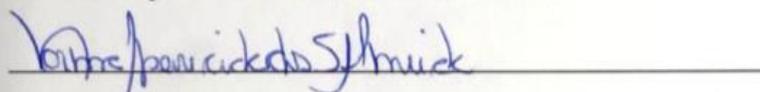
1. Dieta hiperlipídica. 2. Programação metabólica. 3.  
Hipertrofia cardíaca. I. Almeida, Norma Aparecida dos  
Santos, 1976-, orient. II Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro. Programa de pós graduação em  
ciências fisiológicas III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

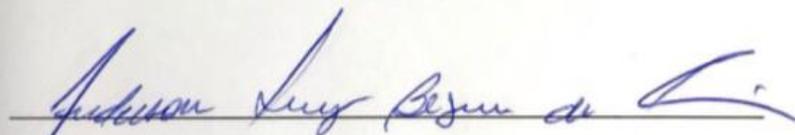
NATÁLIA D'ASSUMPÇÃO LIMA RANGEL

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

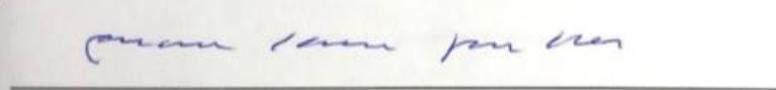
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08/03/2018



Profª Drª Norma Aparecida dos Santos Almeida (Membro Interno – Orientadora - UFRRJ)



Prof Dr Anderson Luiz Bezerra da Silveira (Membro Interno – UFRRJ)



Profª Drª Luciane Claudia Barcellos dos Santos Souza (Membro Externo – UFRJ)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família que, em toda minha vida, fez de tudo para que eu tivesse as oportunidades e apoio necessário, e assim eu alcançasse os meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, dono da vida, pois sem Ele não havia em mim esperança, fé e coragem para enfrentar as coisas ruins da vida, e apreciar as coisas boas que acontecem.

Agradeço à minha mãe, Eunice, que desde que eu nasci sempre moveu céus e terra para que eu tivesse sempre os melhores estudos e cursos. Obrigada por ser o exemplo de pessoa que nunca desiste, nunca julga, e que sempre vê o lado bom das coisas. Aprendi com você que amar é muito mais do que palavras ditas. Amor é atitude.

Agradeço a minha irmã, Letícia, que em toda minha vida foi e sempre será minha melhor amiga, meu porto seguro e minha alma gêmea. Como diz Nando Reis em uma de suas músicas: “Porque eu estou com ela, sou dela, sem ela não sou. Porque eu preciso dela, só dela, com ela eu vou!” Quem me conhece sabe o quanto sou apaixonada e orgulhosa por ser sua irmã!

Ao meu pai, Marcos, que sempre tentou arrancar risadas de mim com suas piadas, mesmo que elas fossem, em sua maioria, sem graça. Risos. Obrigada por sempre tentar fazer o melhor por mim e minha irmã. Obrigada por me ensinar coisas simples da vida que me fizeram ser quem eu sou.

Agradeço aos meus primos Ana Flávia e Felipe por sempre tentam distrair minha mente. Obrigada pelos passeios, conversas, piadas e gargalhadas.

Agradeço aos melhores e maiores presentes que a rural me deu, minhas melhores amigas e irmãs ruralinas, Bruna e Tati. Vocês são o meu escape, meu ombro amigo, minhas conselheiras, minhas cúmplices! Obrigada por me aceitarem, me amarem e me acompanharem desde o primeiro período de graduação. Para mim vocês representam a brisa em meio a um tornado, a sombra em meio a um deserto ensolarado... Obrigada por vocês serem ao mesmo tempo minha calma e meu furacão! Espero que um dia eu consiga expressar o que realmente vocês são pra mim! Amo vocês do fundo do coração!

Agradeço as minhas melhores amigas da vida, que o (nosso querido) colégio Tamandaré me deu! Manu e Tali, obrigada por me apoiarem em tudo. Que venha muitas e muitas mais histórias, viagens, saídas e gordices! Não me imagino sem a amizade de vocês, e tenho certeza que durará pra sempre. Amo vocês!

Agradeço à minha amiga e irmã ruralina, Drica, por sempre cuidar de mim como se eu fosse sua irmãzinha mais nova. Espero que você saiba o quanto eu te admiro e te quero bem.

Obrigada por me hospedar na sua casa na semana em que fiz as provas para a seleção desse mestrado. Nunca vou esquecer o quanto você cuidou de mim naqueles dias... Oferecendo-me café, fazendo meu almoço. Serei eternamente grata!

Agradeço à minha mãe científica, Norma, por sempre acreditar em mim e nunca desistir. Obrigada pela oportunidade de te acompanhar desde o primeiro período de graduação. Obrigada por você ser o exemplo de profissional competente, atenciosa, amiga, perfeccionista (risos), paciente e compreensiva. Obrigada por sempre nos escutar e por sempre tentar entender o nosso lado. Se um dia eu for metade do que você é... Você é inspiração para muita gente, inclusive para mim!

Aos meus irmãos e amigos científicos Taiane, Lincoln, Tainá, Selma, Andreia e Rebeca. Obrigada por sempre estarem ao meu lado me ajudando em todas as etapas desse trabalho. Taiane, Lincoln, Tainá, Andreia e Rebeca, vocês são os melhores ICs do mundo inteiro!!! Obrigada por tudo! Em especial agradeço a Taiane, que no finalzinho desses dois anos me acompanhou vários dias até às 22h30, finais de semana... sempre trabalhando arduamente. Obrigada!

Agradeço a minha irmã científica e amiga Suelen, por há quase sete anos me aturar e me ensinar tudo o que eu sei da forma mais gentil possível. Obrigada por toda paciência e por sempre querer me ajudar.

Agradeço aos amigos do departamento, Selma, Verônica, Samantha e Viviane, pelos momentos juntos nas aulas, pelas conversas e ajudas.

Agradeço às técnicas Raquel e Bruna por estarem sempre dispostas a ajudar. Obrigada pelas conversas, pelas mensagens e ligações de apoio, pelo socorro nos momentos difíceis.

Agradeço ao técnico Franklin pelos ‘cafezinhos’ e conversas depois do almoço. Obrigada por sempre encontrar uma solução para os problemas e pela gentileza em querer resolvê-los.

Aos professores do DCFis por todo ensinamento. Obrigada pelo cuidado e disposição em sempre passar o conhecimento da melhor forma. Em especial ao Prof. Bruno. Obrigada pelas conversas, na qual suas palavras sempre me aconselharam, acalmaram e me incentivaram a prosseguir com os meus sonhos.

Agradeço às minhas meninas, Carol, Rapha, Thais e Fran. Obrigada pelas nossas jantinhas maravilhosas, pelas gargalhadas, conversas e sociais, pelos deliciosos cafés da tarde, pelas mensagens depois de um dia exaustivo... Obrigada! Vocês são família!

Agradeço às amigas queridas do fundão, Camila e Lorraine, pela viagem maravilhosa que fizemos juntas até a FESBE (2017) em campos do Jordão, na qual estreitamos nossa amizade. Obrigada pelos conselhos, risadas e pelos “rolês” que não de vir. Risos.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pelo imenso e contínuo aprendizado.

A este Programa de Pós-Graduação, que me concedeu a oportunidade de crescer em todas as áreas da minha vida, muito além do que jamais havia imaginado.

Às instituições de fomento CAPES, CNPq e FAPERJ.

Aos membros da banca, obrigada por aceitarem o convite.

## RESUMO

RANGEL, Natália D'Assumpção Lima. **Consumo materno de dieta hiperlipídica: alteração na expressão do receptor de angiotensina II (AT1) e hipertrofia no coração da prole ao desmame.** 2018. 108p. Dissertação. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

A obesidade tornou-se um problema de saúde pública no mundo. Mulheres grávidas com sobrepeso podem causar programação metabólica na linhagem, com o surgimento de diabetes tipo2, dislipidemias e doenças cardiovasculares na fase adulta da progênie. Nosso grupo de pesquisa demonstrou anteriormente que o consumo materno de dieta hiperlipídica promoveu aumento da massa corporal, adiposidade, hiperleptinemia na prole de ratas ao desmame, além de prejuízo na função sistólica aos 30 dias de idade. O sistema renina angiotensina (SRA) expresso no coração parece desencadear hipertrofia cardíaca (HC), através da super expressão de Angiotensina II (Ang II) e ativação do seu receptor, AT1. Este estudo teve como objetivo investigar se o consumo materno de dieta hiperlipídica promove HC, e correlacionar este fenótipo à alterações ao sistema SRA cardíaco em animais machos e fêmeas da prole ao desmame. Para isso, ratas *Wistar* receberam dieta controle (9% lipídeos, grupo C) ou hiperlipídica (29% lipídeos, grupo DH) durante 8 semanas antes do acasalamento, e durante a gestação e lactação. Ao desmame, 21 dias de vida, as proles foram pesadas e eutanasiadas. O coração e os tecidos adiposos branco (retroperitoneal, inguinal e perigonadal) foram pesados. Análises histológicas (cortes corados com HE e picrossírius) foram realizadas utilizando amostras dos ventrículos e análises bioquímicas e moleculares (RIA e qPCR) foram realizadas utilizando amostras do ventrículo esquerdo (VE) e a expressão do receptor AT1 foi avaliada através da técnica de *Western Blotting*. Fêmeas e machos da prole DH, apresentaram maior massa corporal, adiposidade, hipertrofia do VE, mas não apresentaram fibrose; maior expressão do RNAm de Nppn; e menor de  $\beta$ -MHC, SERCA2a e Ryr2. A expressão do RNAm de  $\alpha$ -MHC estava reduzida somente nos machos da prole DH. Não houve diferença na dosagem de Ang II entre as proles. A expressão protéica de AT1 estava maior nas fêmeas da prole DH, mas não foi alterada nos machos. Estes resultados sugerem que o consumo materno de dieta hiperlipídica promove hipertrofia do VE em fêmeas e machos, no entanto verificamos alteração na expressão de AT1 somente nas fêmeas, o que sugere que o sistema RAS pode estar envolvido com a HC observada nas fêmeas mas não nos animais machos da prole.

**Palavras-chaves:** Dieta hiperlipídica, Programação metabólica, Hipertrofia cardíaca.

## ABSTRACT

RANGEL, Natália D'Assumpção Lima. **Maternal high fat diet consumption: change in the angiotensina II receptor expression (AT1) and left ventricular hypertrophy in the offspring at weaning.** 2018. 108p. Dissertation. Institute of Biological Sciences and Health, Graduate Program in Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2018.

Obesity has become a public health problem in the world. Overweight pregnant women can cause metabolic programming in the lineage, with the emergence of type 2 diabetes, dyslipidemias and cardiovascular diseases in the adult progeny. Our research group has previously shown that maternal consumption of a high fat diet promoted increased body mass, adiposity, hyperleptinemia in the offspring of rats at weaning, as well as impairment of systolic function at 30 days of age. The renin angiotensin system (RAS) expressed in the heart appears to trigger cardiac hypertrophy (CH), through the overexpression of Angiotensin II (Ang II) and activation of its receptor, AT1. This study aimed to investigate whether the maternal consumption of a high fat diet promotes CH, and correlate such changes to the cardiac RAS system in male and female offspring. For this, Wistar rats received control diet (9% lipids, group C) or high fat (29% lipids, HF group) for 8 weeks before mating, and during gestation and lactation. At weaning, 21 days of life, the offspring were weighed and euthanized. The heart and adipose white tissue (retroperitoneal, inguinal and perigonadal) were weighed. Histological analyzes (sections stained with HE and picosirius) were realized using samples from the ventricles and biochemical and molecular analyzes (RIA and qPCR) were performed using left ventricular (LV) samples and AT1 receptor expression was assessed by Western blotting. Females and males of the HF progeny presented higher body mass, adiposity, LV hypertrophy, but did not present fibrosis; higher mRNA expression of Nppn; and less expression of  $\beta$ -MHC, SERCA2a and Ryr2. mRNA expression of  $\alpha$ -MHC was reduced only in males of the DH offspring. There was no difference in Ang II dosage among the offspring. Protein expression of AT1 was higher in females of the HF progeny, but was not altered in males. These results suggest that the maternal consumption of high fat diet promotes LV hypertrophy in females and males of the HF offspring, however we verified alteration in the AT1 protein expression only in females of HF progeny, which suggests that the RAS system may be involved with HC observed in the females and not in the male animals of the HF offspring.

**Keywords:** High fat diet, Metabolic programming, Cardiac hypertrophy.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**μL:** Microlitro

**μm:** Micrômetro

**μg:** Micrograma

**α-MHC:** Cadeia pesada de miosina do tipo α

**βHSD-1:** β hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1

**β-MHC:** Cadeia pesada de miosina do tipo β

**Ac:** Anticorpo

**AGL:** Ácido graxo livre

**AKT:** Proteína quinase serina/treonina

**ANF:** Proteína do peptídeo natriurético atrial

**Nppn:** Gene do peptídeo natriurético atrial

**Ang I:** Angiotensina I

**Ang II:** Angiotensina II

**ATP:** Trifosfato de adenosina

**AT1:** Receptor para angiotensina II isoforma 1

**AT2:** Receptor para angiotensina II isoforma 2

**BNP:** *Brain Natriuretic Peptide protein*

**Nppb:** *Brain Natriuretic Peptide gene*

**C:** Controle

**cal:** Calorias

**cAMP:** Adenosina 3', 5'- monofosfato cíclico

**CCS:** Centro de ciências e saúde

**cDNA:** Fita de DNA complementar

**cm:** Centímetro

**DCFis:** Departamento de ciências fisiológicas

**DH:** Dieta Hiperlipídica

**DM2:** Diabetes mellitus do tipo 2

**DMG:** Diabetes mellitus gestacional

**DNA:** Ácido desoxirribonucléico

**DOHaD:** *Developmental origins of health and disease*

**ECA:** Enzima conversora de angiotensina

**ECL:** Quimioluminiscência avançada

**EDTA:** Ácido etilenodiaminotetracético

**ERK:** *Extracellular signal-related kinase*

**ET-1:** Endotelina -1

**EUA:** Estados Unidos da América

**FIOCRUZ:** Fundação Oswaldo Cruz

**g:** Grama

**GBD:** *The WHO global burden of disease*

**Gs:** Proteína G excitatória

**HC:** Hipertrofia cardíaca

**HE:** Hematoxilina e eosina

**HT:** Hormônios tireoidianos

**IBCCF:** Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

**IBGE:** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IC:** Insuficiência cardíaca

**IL:** Interleucina

**IM:** Infarto do Miocárdio

**IMC:** Índice de massa corpórea

**IR-β:** Receptor de insulina β

**IRS:** Substrato do receptor de insulina

**Kg:** Quilograma

**L:** Litro

**LEM:** Laboratório de endocrinologia molecular

**MAPK:** *mitogen activated protein kinase*

**microRNA:** Micro ácido ribonucléico

**Mir- 133:** micro RNA- 133

**Mir- 1:** micro RNA-1

**Mir- 125b:** micro RNA-125b

**Mir- 29a:** micro RNA-29a

**mg:** Miligramas

**mL:** Mililitro

**mM:** Milimolar

**mtDNA:** DNA mitocondrial

**NaCl:** Cloreto de sódio

**NADPH:** Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

**NOX2:** NADPH oxidase 2

**NOX4:** NADPH oxidase 4

**°C:** Graus Celsius

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**PA:** Puro para análise

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**RTq-PCR:** *Real time quantitative PCR*

**pH:** Potencial de hidrogênio

**PKC:** Proteína quinase C

**PMSF:** Fluoreto de fenilmetilsulfonilo

**PPAR $\alpha$ :** *Peroxisome proliferator- activated receptor  $\alpha$*

**p $_{tn}$ :** Proteína

**PRAMS:** Sistema de Monitoramento de Avaliação de Risco de Gravidez

**PVDF:** Polivinilideno

**RIA:** Radioimunoensaio

**RNA:** Ácido ribonucléico

**RNA<sub>m</sub>**: RNA mensageiro

**ROS**: Espécies reativas de oxigênio

**RT**: Transcriptase reversa

**RyR**: Receptor de rianodina

**S1P**: Esfingosina-1-fosfato

**S1PR1**: Receptor para esfingosina-1-fosfato do tipo 1

**S1PR2**: Receptor para esfingosina-1-fosfato do tipo 2

**S1PR3**: Receptor para esfingosina-1-fosfato do tipo 3

**SDS**: Dodecil sulfato de sódio

**SERCA-2**: Bomba de Ca<sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático

**SRA**: Sistema renina angiotensina

**SUS**: Sistema único de saúde

**TAE**: Tampão Tris-Acetato-EDTA

**T3**: Triiodotironina

**TBS**: tampão Tris-SDS

**TBS-T**: Tampão Tris-SDS acrescido de Tween

**TFA**: Ácido trifluoroacético

**TNF- $\alpha$** : Fator de necrose tumoral- $\alpha$

**TR $\alpha$ 1**: Isoforma  $\alpha$ 1 do receptor de hormônio tireoideano

**UFRJ**: Universidade Federal do Rio de Janeiro

**UFRRJ**: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

**V**: Volts

**VE**: Ventrículo esquerdo

**VD**: Ventrículo direito

**Vigitel**: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas pro inquirérito telefônico

**VMH**: Núcleo hipotalâmico ventromedial

**$\alpha$ -MHC**: Isoforma  $\alpha$  da cadeia pesada de miosina

**$\beta$ 1AR**: receptor  $\beta$ 1- adrenérgico

**$\beta$ -MHC:** Isoforma  $\beta$  da cadeia pesada de miosina

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Composição da dieta hiperlipídica purificada 5400 cal/Kg (Prag Soluções®) 23

**Tabela 2.** Condições padronizadas para a realização da técnica de Western Blotting 29

## LISTA DE FIGURAS

- Figura1.** Representação da separação dos grupos das progenitoras de acordo com sua dieta. 22
- Figura2.** Representação do modelo experimental. 24
- Figura 3.** Representação da obtenção das proles controle (C) e dieta hiperlipídica (DH). 25
- Figura 4.** Representação do nascimento e desmame das proles controle (C) e dieta hiperlipídica (DH). 26
- Figura 5.** Evolução do ganho de massa corporal (g) das matrizes dos grupos C e DH ao longo das oito semanas antes do acasalamento. 32
- Figura 6.** Ingestão alimentar (g/animal/dia) das matrizes dos grupos C e DH ao longo das oito semanas antes do acasalamento. 33
- Figura 7.** Evolução da massa corporal dos filhotes fêmeas das proles C (n=41) e DH (n=37), do nascimento (dia zero) ao desmame (21 dias de idade). 35
- Figura 8.** Evolução da massa corporal de filhotes machos das proles C (n=40) e DH (n=37), do nascimento (dia zero) ao desmame (21 dias de idade). 36

- Figura 9.** Massa do reservatório de tecido adiposo branco retroperitoneal (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. 37
- Figura 10.** Massa do reservatório de tecido adiposo branco inguinal (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. 37
- Figura 11.** Massa do reservatório de tecido adiposo branco perigonadal (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. 38
- Figura 12.** Massa do coração (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. 39
- Figura 13.** Massa dos ventrículos (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. 40
- Figura 14.** Análise histopatológica da parede livre do ventrículo esquerdo (VE) das proles C e DH aos 21 dias de idade. 41
- Figura 15.** Análise histopatológica da parede livre do ventrículo direito (VD) das proles C e DH aos 21 dias de idade. 42
- Figura 16.** Análise das áreas de fibrose da parede livre do ventrículo direito (VE) das proles C e DH aos 21 dias de idade. 43

- Figura 17.** Expressão gênica de Nppn na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. 44
- Figura 18.** Expressão gênica de  $\alpha$ -MHC na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. 45
- Figura 19.** Expressão gênica de  $\beta$ -MHC na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. 46
- Figura 20.** Expressão gênica de SERCA2a2 na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. 47
- Figura 21.** Expressão gênica de Ryr2 na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. 48
- Figura 22.** Dosagem de Angiotensina II na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. 49
- Figura 23.** Expressão proteica do receptor AT1 na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. 50

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A Obesidade .....	1
1.2 Obesidade e Gestação.....	4
1.3 Programação Metabólica .....	6
1.4 Programação Metabólica e o Coração .....	9
1.5 Hipertrofia Cardíaca .....	133
1.6 Sistema Renina Angiotensina e a Hipertrofia Cardíaca .....	177
2 OBJETIVO .....	211
2.1 Objetivo Geral .....	211
2.2 Objetivos Específicos .....	211
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	222
3.1 Animais.....	222
3.1.1 Modelo experimental.....	222
3.1.2 Obtenção das proles.....	244
3.2 Avaliação da Hipertrofia Cardíaca .....	266
3.3 Análise Histopatológica.....	266
3.4 Extração e Dosagem de Angiotensina II na Parede Livre do Ventrículo Esquerdo.....	277
3.5 Avaliação da Expressão Protéica do Receptor AT1 na Parede Livre do Ventrículo Esquerdo .....	28
3.6 Avaliação da Expressão Gênica .....	29
3.6.1 Extração do RNA total .....	29
3.6.2 Transcrição reversa (RT).....	300
3.6.3 PCR em tempo real.....	300
3.7 Análise Estatística .....	311
4 RESULTADOS .....	322
4.1 Evolução do Peso Corporal e Ingestão Alimentar das Matrizes Antes do Acasalamento.....	322
4.2 Obtenção das Proles C e DH .....	333
4.3 Acompanhamento da Massa Corporal da Prole do Nascimento ao Desmame .....	344
4.4 Avaliação do Peso dos Tecidos Adiposos Brancos aos 21 Dias de Idade.....	366
4.5 Avaliação da Hipertrofia no Coração das Proles aos 21 Dias de Idade .....	38

4.6 Análise histopatológica .....	440
4.7 Avaliação da Expressão Gênica de <i>Nppn</i> , $\alpha$ -MHC, $\beta$ -MHC, SERCA2a e Ryr2 na Parede livre do Ventrículo Esquerdo.....	444
4.8 Dosagem de Angiotensina II na Parede Livre do Ventrículo Esquerdo.....	48
4.9 Avaliação da Expressão Protéica do Receptor AT1 na Parede Livre do Ventrículo Esquerdo .....	49
5 DISCUSSÃO.....	511
6 CONCLUSÃO.....	58
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 A Obesidade

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece que a obesidade tem se tornado um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. A expectativa é que, em 2025, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso; e mais de 700 milhões de pessoas obesas. De acordo com OGDEN e colaboradores (2014), o aumento acentuado da obesidade é perceptível desde a infância até a fase adulta. Este grupo de pesquisadores identificou que cerca de 65% dos adultos americanos estão acima do peso, e 30% já são considerados obesos. No Brasil, os dados também são alarmantes, de acordo com o levantamento realizado pelo IBGE no ano de 2015, o índice de sobrepeso e obesidade era de 60% da população brasileira. Aproximadamente 82 milhões de pessoas apresentaram o índice de massa corporal (IMC) igual ou superior a 25, indicando sobrepeso ou obesidade. Segundo o Ministério da Saúde, o índice de obesos no país era de 11,8% em 2006 e cresceu para 18,9% em 2016, mostrando que a obesidade cresceu, aproximadamente, 7,1% nos últimos dez anos. Segundo os dados epidemiológicos, uma em cada cinco pessoas no país encontra-se acima do peso. Além disso, os dados epidemiológicos revelam prevalência de excesso de peso no sexo feminino (58,2%), quando comparado ao sexo masculino (55,6%). O atual estilo de vida sócio-econômico e tecnológico tem-se tornado um dos fatores importantes envolvidos com o alto índice de obesidade na população mundial.

As indústrias alimentícias modernas oferecem abundância de alimentos baratos e com alto teor de calorias, conhecidos como “Junk Food”. Este quadro nos hábitos alimentares combinado ao sedentarismo, garantem o perfil obesogênico atual da população na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, assim como a desregulação metabólica associada (GRUNDY, 1998; BELL et. al., 2005).

A obesidade é uma alteração clínica que pode se manifestar a partir de influências de fatores nutricionais, ambientais e genéticos (ROSSNER, 2002), os quais geram graves consequências aos indivíduos, sendo capaz de deteriorar funções corporais e prejudicar a saúde. É um transtorno caracterizado pelo acúmulo de tecido adiposo em consequência da alteração na ingestão de nutrientes, ou distúrbio do gasto energético, ou ainda, do desequilíbrio interno desses dois processos. As maiores reservas de tecido adiposo branco são encontradas no espaço subcutâneo e ao redor de vísceras (AHIMA, 2006). O tecido adiposo é

complexo e heterogêneo, formado por adipócitos, células endoteliais, mesenquimais, pré adipócitos, fibroblastos e células residentes do sistema imune (RAJALA & SCHERER, 2003; JUGE-AUBRY et al., 2005a). O tecido adiposo é considerado um órgão endócrino o qual participa da metabolização da glicose e ácidos graxos no período pós prandial. A função primária do tecido adiposo é armazenar energia na forma de lipídeos (AHIMA et al., 2005), principalmente triglicerídeos intracelulares (AHIMA, 2006).

Por outro lado, o tecido adiposo branco também sintetiza componentes que participam do sistema renina angiotensina (SRA) (CASSIS et al., 1988), como o angiotensinogênio (AHIMA, 2006), uma proteína de origem essencialmente hepática que participa do SRA (PEACH, 1977). A renina, uma enzima sintetizada e liberada pelas células justaglomerulares dos rins, fragmenta o angiotensinogênio e forma angiotensina I (Ang I) (PEACH, 1977). Além disso, o tecido adiposo branco é capaz de secretar angiotensina II (AngII), que pode estar envolvida no ciclo celular dos pré adipócitos em humanos (CRANDALL et al., 1999). Ang II é um peptídeo componente do SRA formado a partir da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) sobre angiotensina I (PEACH, 1977).

A Ang II está envolvida com a produção e liberação de prostaciclina pelos adipócitos, o que por sua vez estimula a adipogênese (SAINT-MARC et al., 2001), além de estimular a lipogênese e o aumento das reservas de triglicerídeos nos adipócitos (JONES et al., 1997). ZORAD e colaboradores (1995) trabalhando com modelos animais observaram que o tratamento com antagonistas de Ang II foi capaz de reduzir a adiposidade. MASSIERA e colaboradores (2001), por sua vez, submetem camundongos “*Knock out*” para Ang II a uma dieta hiperlipídica e demonstrou que Ang II apresenta função local no desenvolvimento do tecido adiposo branco visceral, pois esses animais encontravam-se com redução na massa corporal, peso corporal, e hipoplasia do tecido adiposo branco.

A atividade de Ang II em diversos tecidos é mediada, basicamente, por dois receptores de membrana AT1 e AT2, que são acoplados com um tipo de proteína G. O receptor AT1 é expresso em diversos tecidos, como o tecido adiposo branco (PAUSOVA et al., 2006). A cascata de sinalização desse receptor é importante na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (PAUSOVA et al., 2006). No entanto, ao interferir na diferenciação dos pré-adipócitos, a angiotensina II pode contribuir para a hipertrofia e, conseqüentemente, a disfunções no tecido adiposo, como a maior síntese de angiotensinogênio, leptina, espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias (FURUKAWA et al., 2004).

Os adipócitos também são capazes de secretar leptina e adiponectina, os quais são os mais conhecidos peptídeos bioativos. Estes fatores secretados pelos adipócitos são denominados adipocinas e participam do controle de diversos mecanismos fisiológicos, como o catabolismo de lipídeos (RAJALA & SCHERER 2003; JUGE-AUBRY et al., 2005a; GUILHERME et al., 2008b), regulação do apetite, da secreção e sensibilidade a insulina, imunidade, coagulação sanguínea, e tônus vascular (AHIMA et al., 2005; NEELS et al., 2004; CHRISTIAENS & LIJNEN 2010).

A leptina é um hormônio sintetizado essencialmente pelos adipócitos, mas também pelo intestino, placenta, músculo esquelético, epitélio mamário e cérebro (FLIER, 2004). A obesidade está relacionada com a produção exacerbada de leptina e à hiperleptinemia, enquanto que no jejum encontra-se baixa concentração de leptina no tecido adiposo branco e no plasma (FLIER, 2004; CONSIDINE et al., 1996). Contudo, já foi descrito que o aumento plasmático da leptina desencadeia resistência à ação da leptina à nível hipotalâmico e, conseqüentemente, prejuízos no controle da ingestão alimentar e no gasto energético (MUNZBERG & MYERS, 2005; FLIER, 2004; CONSIDINE et al., 1996).

A adiponectina, por sua vez, é sintetizada exclusivamente por adipócitos maduros (KADOWAKI & YAMAUCHI, 2005). Ao contrário da leptina, a adiponectina encontra-se em baixos níveis plasmáticos na obesidade (KADOWAKI & YAMAUCHI, 2005). Em contrapartida, no jejum prolongado ou em casos de perda de peso severo, a adiponectina pode estar em níveis plasmáticos elevados (KADOWAKI & YAMAUCHI, 2005). A adiponectina tem a capacidade de regular alguns processos bioquímicos e anti inflamatórios. Este hormônio, por exemplo, estimula a oxidação dos ácidos graxos, suprime a gliconeogênese hepática e inibe a adesão de monócitos, assim como a biotransformação de macrófagos (KADOWAKI & YAMAUCHI, 2005).

Uma das conseqüências da hipertrofia dos adipócitos está associada a uma disfunção endócrina e metabólica dos mesmos, o qual são pré determinados a produzir em grande escala fatores pró inflamatórios (AHIMA, 2006) e da coagulação sanguínea (SKURK & HAUNER, 2004). Já foi relatado tanto em humanos quanto em roedores obesos aumento no recrutamento dos macrófagos ativados, maior produção de citocinas, fatores de crescimento, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e interleucina (IL)-6 (WEISBERG et al., 2003; XU et al., 2003). MATSUZAWA (2005) estudando o tecido adiposo branco descreveu que o processo inflamatório desencadeado por essas adipocitocinas está associado ao aumento do risco de doenças cardiovasculares na obesidade.

Já foi descrito uma significativa associação entre reduzida concentração plasmática de adiponectina e o desenvolvimento de diversas doenças degenerativas e crônicas que caracterizam a síndrome metabólica, como a obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose, hiperlipidemia e aterosclerose tanto em camundongos (MAEDA et al., 2002; KUBOTA et al., 2002) quanto em primatas não humanos (HOTTA et al., 2001). Além disso, a síndrome metabólica predispõe o surgimento de doenças cardiovasculares (CROWLEY et al., 2002), incluindo a hipertensão, alterações no metabolismo cardíaco, hipertrofia ventricular esquerda, disfunção diastólica e arritmias (AYALON et al., 2014), sendo então uma das causas da crescente morbidade e mortalidade em todo o mundo.

Diversos trabalhos com modelos experimentais correlacionam perturbações na manipulação nutricional com o alto índice de obesidade, e suas consequências. O excesso da ingestão de dieta rica em gordura e carboidratos induz o acúmulo de tecido adiposo branco, sendo associado a desordens metabólicas, como a resistência à insulina, hiperglicemia em jejum, diabetes tipo 2 (DM2), além das disfunções cardiovasculares, incluindo hipertensão e remodelamento cardíaco (BUETTNER et al., 2007). Por sua vez, a dieta hipercalórica, rica em açúcar, pode desencadear distúrbios endócrinos, como por exemplo, desordens no metabolismo da glicose e insulina (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2010; POUDYAL et al., 2012), além de hipertrofia cardíaca (PINHEIRO et al., 2007; LEOPOLDO et al., 2010), presença de fibrose intersticial no miocárdio (OLIVEIRA et al., 2009), e alterações na expressão molecular de proteínas envolvidas na contratilidade cardíaca (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2010).

## **1.2 Obesidade e Gestação**

A base de dados ‘The WHO global burden of disease’ (GBD) publicou em 2016, que mais de 1,9 bilhão de adultos maiores de 18 anos tinham excesso de peso na população mundial. Destes, mais de 650 milhões de adultos eram considerados obesos, sendo que 40% eram mulheres na fase pré-menopáusia.

No Brasil, os dados encontrados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2015, demonstram que uma em cada quatro mulheres acima de 18 anos de idade (24,4%) estava com obesidade. Uma Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) realizado no ano de 2016, pelo

Ministério da Saúde do Brasil, divulgou que 16,1% das mulheres em idade fértil na região semiárida eram obesas, enquanto que 32,6% tinham sobrepeso.

Além disso, de acordo com o Sistema de Monitoramento de Avaliação de Risco de Gravidez (PRAMS), uma iniciativa do Ministério da Saúde para auxiliar gestores e profissionais do Sistema Único de Saúde (SUS), o índice de mulheres obesas antes da concepção entre os anos de 1993 e 1994 era de 13%, enquanto que nos anos de 2002 à 2003 essa porcentagem aumentou para 22% (KIM et al., 2007). Esses dados epidemiológicos demonstram aumento de 69% em 10 anos, e provam que a obesidade entre mulheres gestantes tem prevalecido na rotina obstétrica.

A obesidade materna e o excessivo ganho de peso gestacional constitui um dos maiores e mais comuns riscos obstétricos (FITZSIMONS et al., 2009), sendo então vinculado com o grande risco de morbidade e mortalidade materna (HESLEHURST et al., 2008; NELSON et al., 2010; POSTON et al., 2011). Além disso, alguns trabalhos demonstram que a síndrome metabólica pode afetar a qualidade e síntese dos oócitos e embriões, caracterizando prejuízos para a concepção (CARDOZO et al., 2012; ROBKER, 2008). O problema se estende a uma série de transtornos que podem ocorrer durante a gravidez e o nascimento em si (MEAGHAN et al., 2008), pois gestantes obesas tem maior predisposição à pré-eclâmpsia (O'BRIEN et al., 2003), aborto espontâneo, cesariana de emergência, parto prematuro e de natimorto (LYNCH et al., 2008). E, por isso, os cuidados clínicos têm aumentado durante a gestação de mulheres com sobrepeso ou obesidade.

Além disso, mulheres gestantes que encontram-se com sobrepeso ou obesidade, apresentam maiores riscos de desenvolverem diabetes gestacional (FITZSIMONS et al., 2009; LEDDY et al., 2008). O diabetes mellitus gestacional (DMG) é associado ao aumento substancial do índice de massa corpórea (IMC). A resistência à insulina durante a gestação pode desencadear implicações negativas tanto para as progenitoras quanto para a geração seguinte. Para as mulheres gestantes, há um elevado risco de manter a hiperglicemia e diabetes do tipo 2 mesmo após o parto. Já na prole, os riscos parecem ser mais graves, pois aumenta o risco de macrossomia e morte. Além disso, a prole nascida de gestantes com DMG apresenta maior predisposição a desenvolver tanto a obesidade quanto a diabetes mellitus tipo 2 na idade infantil e adulta.

REYNOLDS, em 2013, relatou que a obesidade durante a gestação pré determina o aumento do número de mortes na geração seguinte, especialmente por distúrbios cardiovasculares, como a hipertensão (LEDDY et al., 2008), pois é considerada o insulto que

modifica o desenvolvimento dos órgãos e sistemas (DE BOO et al., 2006). As características obesogênicas maternas podem ser compartilhadas para a progênie durante o período fetal através da placenta (DE BOO et al., 2006) e, portanto, predispor obesidade na progênie e distúrbios metabólicos (DESAI et al., 2014).

### **1.3 Programação Metabólica**

HALES E BARKER (2001) propuseram o conceito de programação fetal através da hipótese do "*thrifty phenotype*", em que o fenótipo do adulto é afetado através de insultos de origem ambiental, hormonal ou nutricional (SIMMONS, 2005), que podem ocorrer durante o período perinatal, conhecidos como críticos para o desenvolvimento. A fase intra uterina e a amamentação são ditas como críticas, pois caracterizam-se por intensa replicação, multiplicação e diferenciação celular, tornando-as mais sensíveis a interferências externas. Estes insultos são capazes de gerar alterações moleculares, celulares, metabólicas e neuroendócrinas durante o desenvolvimento fetal, e estes podem persistir em longo prazo, e predispor o indivíduo adulto ao surgimento de doenças crônicas e degenerativas (LUCAS, 1994), como a obesidade (SPENCER, 2012).

Diferenças no padrão de expressão dos genes fetais dentro do útero podem causar modificações epigenéticas. A epigenética é caracterizada por alterações na estrutura bioquímica dos cromossomos, e conseqüentemente modificação na expressão gênica. Essas mudanças podem ser: metilação do DNA, grau de acetilação das histonas, e/ou expressão de RNA não codificantes (NISTALA et al., 2011). O padrão epigenético do DNA de um indivíduo é herdado e passível de modificações, de tal maneira que os genes podem ser transmitidos dos progenitores para a prole, em resposta a insultos (WHITELAW & WHITELAW, 2006), e conseqüentemente predispor ao desenvolvimento da síndrome metabólica nesses indivíduos (HANSON & GLUCKMAN, 2014).

A nutrição inadequada, o sedentarismo e o tabagismo materno durante as fases de gestação e amamentação, são exemplos de fatores que aumentam o risco de doenças crônicas e degenerativas como dislipidemias, resistência à insulina, hipertensão, obesidade, hiperleptinemia (OLIVEIRA et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2010) e doenças cardiovasculares (BRUIN et al., 2007; SOMM et al., 2008, 2009; DRAKE & REYNOLDS, 2010; POSTON, 2012; O'REILLY & REYNOLDS, 2013). Sugerindo que a síndrome

metabólica é uma das consequências da programação metabólica, e o desenvolvimento da mesma começa no útero (MCMILLEN & ROBINSON, 2005).

A dieta materna pode causar impactos significativos no ambiente uterino e, conseqüentemente, no desenvolvimento da programação metabólica na geração seguinte (DE BOO et al., 2006). Tanto em casos de desnutrição quanto de hiper nutrição materna, há relatos de uma relação entre condições adversas do ambiente intra uterino e o surgimento de doenças crônicas na prole de roedores (TEIXEIRA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2009).

A má nutrição materna durante a gestação tem sido associada ao mau crescimento e desenvolvimento fetal, além de disfunções metabólicas da prole em muitas espécies (HOFFMAN et al., 2017). A má nutrição materna pode ser definida como um excesso ou restrição de macro ou micronutrientes específicos na dieta da mãe durante a gestação e amamentação (HOFFMAN et al., 2017). Tanto a subnutrição quanto a super nutrição durante as fases críticas do desenvolvimento influenciam de forma negativa no desenvolvimento fetal da prole e no crescimento pós-natal, com acúmulo de adiposidade e distúrbios metabólicos (WU et al., 2012). Modelos experimentais com roedores descreveram que tanto a subnutrição como a super nutrição durante o período perinatal podem predispor obesidade na prole (TEIXEIRA et al., 2002; RODRIGUES et al., 2009).

O consumo materno de dieta pobre em proteína, tanto na gestação quanto na amamentação, desencadearam menor ganho de peso corporal ao nascimento, e obesidade na fase adulta da prole (MARTIN-GRONERT & OZANNE, 2010), além de predispor a síndrome metabólica e suas comorbidades, como a disfunção de células  $\beta$ -pancreáticas, resistência à insulina, hipertensão e disfunção endotelial (BURDGE et al., 2007; MARTIN-GRONERT & OZANNE, 2010). Por outro lado, há trabalhos demonstrando que a prole de ratas que receberam dieta com baixo teor de proteínas (aproximadamente 8%) somente durante a lactação, apresentam o fenótipo oposto. Ou seja, os filhotes apresentam sobrepeso ao nascimento e menor ganho de peso corporal durante a fase adulta (FAGUNDES et al., 2009).

A super nutrição materna, como a dieta rica em lipídeos, durante a gravidez e a lactação, também podem levar a fenótipos semelhantes à síndrome metabólica na prole de roedores. SAMUELSSON et al. (2008), exploraram as consequências sobre a função metabólica da prole de camundongos originadas pelo consumo materno de dieta rica em açúcares (*high-sucrose*) durante os períodos críticos do desenvolvimento. Foi demonstrado que essa dieta materna promoveu hiperfagia entre a 4<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> semana de idade, diminuição da

atividade locomotora e aumento de adiposidade abdominal aos 3 meses de idade nos machos da prole. Ainda neste trabalho o aumento da adiposidade foi associado à hipertrofia dos adipócitos e modificações na expressão do RNAm de  $\beta$ - adrenoreceptor 2 e 3, 11  $\beta$ HSD-1, e PPAR- $\gamma$ . A prole apresentou distúrbios metabólicos semelhantes à síndrome metabólica, como a hiperinsulinemia aos 3 meses de idade, e hiperglicemia aos 6 meses de idade, os quais podem estar relacionados com a resistência à insulina (SAMUELSSON et al., 2008).

FRANCO e colaboradores (2012) trabalhando com ratas *Wistar*, ofereceu somente dieta hiperlipídica (DH) durante oito semanas antes do acasalamento, durante a gestação e a lactação para um grupo de matrizes e as comparou com as matrizes controles. Após as oito semanas recebendo essa dieta, as matrizes DH não apresentaram aumento na massa corporal. No entanto as fêmeas desse grupo tinham maior teor de gordura corporal total. Por outro lado, no desmame de suas proles, as matrizes DH apresentaram massa corporal e teor de gordura similar às fêmeas controles. Além disso, esse tipo de super nutrição materna também foi capaz de alterar a composição do leite materno, pois aumentou a concentração de proteínas, colesterol e triglicerídeos. Em contrapartida, não foi observada alterações na concentração de leptina no leite das matrizes. Ainda nesse estudo, foi demonstrado que o consumo materno de dieta hiperlipídica durante o período perinatal não foi capaz de modificar o peso corporal da prole ao nascimento. Porém, essa dieta materna promoveu maior adiposidade nos machos da prole ao desmame, os quais apresentaram acúmulo de massa adiposa branca encontrada no tecido adiposo branco retroperitoneal, perigonadal e inguinal. Esse aumento de adiposidade foi associado com a alta expressão de leptina no tecido adiposo inguinal e com a hiperleptinemia.

A obesidade materna e o consumo de dieta com alto teor de gordura são capazes de promover a adipogênese e estimular vias neuronais hipotalâmicas que aumentam o apetite na prole (LI et al., 2011; CHEN et al., 2009; GUPTA et al., 2009). Experimentos com roedores descreveram que as fases de gestação e lactação apresentam grande relevância na formação e maturação de áreas hipotalâmicas como o núcleo arqueado, o qual está envolvido com a regulação do balanço energético (BOURET et al., 2010). Este núcleo hipotalâmico é o principal sítio de ação da leptina, uma adipocina secretada principalmente pelo tecido adiposo branco, o qual é capaz de aumentar os peptídeos anorexigênicos e reduzir os peptídeos orexigênicos no hipotálamo, e induzir a saciedade (BJORBAEK & KAHN, 2004).

A obesidade em humanos e roedores está associada com hiperleptinemia em consequência da grande reserva de tecido adiposo branco (AHIMA & LAZAR, 2008).

FRANCO e colaboradores, em 2012, observaram que a hiperleptinemia neonatal encontrada durante a amamentação, o qual poderia ser induzida pela administração de leptina (TOSTE et al., 2006) ou pelo consumo materno de dieta hiperlipídica durante a fase perinatal, resultam em resistência à ação central da leptina na prole, contribuindo para o aumento da ingestão alimentar e surgimento da obesidade. Este hormônio é considerado um fator de risco para o aumento da obesidade em resposta das condições intra uterinas adversas (BRIFFA et al., 2015). Por outro lado, FERZOU-VIALA e colaboradores (2007) observaram que a dieta materna hipercalórica durante os períodos críticos do desenvolvimento, predispõe a resistência central à leptina na idade adulta da prole de ratas.

#### **1.4 Programação Metabólica e o Coração**

Durante vários anos, o comprometimento cardiometabólico era associado ao estilo de vida dos indivíduos adultos, como o tabagismo, o sedentarismo e a dieta. No entanto, estudos mais recentes mostraram forte relação entre os hábitos e comportamentos alimentares e a condição nutricional materna durante os períodos críticos do desenvolvimento e o aparecimento dos distúrbios fisiológicos na geração seguinte (LUCAS, 1998; VICTORA et al., 2008; WELLS, 2012). Sendo assim, o estado nutricional e metabólico materno na fase perinatal é um fator que determina a programação perinatal na progênie (LOUEY & THORNBURG, 2005; PORRELLO et al., 2009).

O desenvolvimento dos cardiomiócitos em todas as espécies é determinado durante o período intra uterino, e por isso os perfis maternos obesogênico e diabetogênico durante a gestação e lactação funcionam como insultos que predispõe obesidade, intolerância à glicose, doenças cardiovasculares, além de outras comorbidades da síndrome metabólica na prole e, que por sua vez, podem aparecer na fase adulta (CATALANO & EHRENBERG, 2006).

Em modelos de animais, a diabetes gestacional encontrada na obesidade materna pode aumentar o risco de disfunções cardiovasculares na geração seguinte, incluindo a hipertensão (KRISHNAVENI et al., 2010), sendo associada com o alto índice de mortalidade entre os indivíduos (REYNOLDS et al., 2013). SAMUELSSON e colaboradores (2008) observaram relação entre a obesidade materna durante o período perinatal e prejuízos no relaxamento dependente de acetilcolina na prole de camundongos aos 3 meses de idade, o que sugere disfunção endotelial e, conseqüentemente, esta alteração pode contribuir para a hipertensão arterial na progênie.

O consumo materno de dieta hiperlipídica promove alterações precoces e persistentes na sinalização de componentes do SRA no tecido renal e adiposo da prole, os quais estão envolvidos com o controle da pressão arterial (ARMITAGE et al., 2005), e podem contribuir para o surgimento da obesidade, diabetes tipo II e dislipidemias (SAMUELSSON et al., 2008; ELAHI et al., 2009; GUBERMAN et al., 2013; MAZZIO & SOLIMAN, 2014; TAN et al., 2015). O problema do sobrepeso e obesidade materna durante o período perinatal vai além da predisposição às doenças metabólicas já discutidas, mas também aumentam o risco de distúrbios cardiovasculares, incluindo hipertensão arterial, doenças coronárias, acidentes vasculares cerebrais, insuficiência cardíaca (LANDSBERG et al., 2013), alterações no metabolismo cardíaco, arritmias e, até mesmo, morte súbita (AYALON et al., 2014).

Já foi relatado que, além dos distúrbios metabólicos, a dieta materna hiperlipídica pode desencadear hipertrofia cardíaca patológica. Segundo estudos epidemiológicos realizados por ZIELINSKY et al. (2012), a hipertrofia do miocárdio em crianças é associada a obesidade materna e ao diabetes gestacional em mulheres. Nessa condição, é observada reprogramação na expressão do padrão de genes fetais, sendo associado a disfunções sistólica e diastólica, além da super atividade simpática no coração, os quais podem persistir até a fase adulta dos animais (TAYLOR et al., 2005; WANG et al., 2010; FERNANDEZ-TWINN et al., 2012; BLACKMORE et al., 2014). Em outro trabalho, SAMUELSSON e colaboradores (2013b) mostraram que tanto machos quanto fêmeas da prole de camundongos, que foram submetidos à dieta materna rica em açúcar durante o período de gestação e lactação, apresentaram hiperfagia, maior adiposidade, além de aumento da atividade simpática no tecido cardíaco, maior expressão de noradrenalina renal e hipertensão arterial aos 3 meses de idade. Em modelos de programação metabólica por obesidade materna, a super sinalização do sistema nervoso simpático é associada com a hipertrofia cardíaca, fibrose, prejuízo na função contrátil do coração, comprometendo a fração de ejeção, podendo desencadear a insuficiência cardíaca (ENGELHARDT et al., 1999; KUDEJ et al., 1997; LEOPOLDO et al., 2010; WOO & XIAO, 2012) e apoptose de cardiomiócitos (AKHTER et al., 1997).

Já foi descrito que a super nutrição materna durante os períodos críticos do desenvolvimento pode promover hiperleptinemia na prole (AHIMA & LAZAR, 2008; FRANCO et al. 2012). A leptina age no núcleo hipotalâmico ventro-medial (VMH), e estimula o sistema nervoso simpático (SATO et al., 1997, 1999), que por sua vez, aumenta a força de contração, a velocidade de relaxamento e a frequência cardíaca e, conseqüentemente, tem relação com as disfunções cardíacas (ZHAO et al., 1994; SIMMERMAN & JONES,

1998). A hiperleptinemia também está associada ao aumento do risco de hipertensão arterial (BRAVO et al., 2006), que ocorre através de prejuízos na vasodilatação dependente do endotélio, além dos efeitos vasoconstritores da angiotensina II estimulados por esse hormônio (WANG et al., 2013). Ademais, a leptina apresenta função parácrina e autócrina sobre a massa cardíaca, podendo estimular o depósito de colágeno através do aumento do estresse oxidativo (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ et al., 2014). As espécies reativas de oxigênio (ROS) são capazes de modular a sinalização simpática. De forma indireta, ROS contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças cardiovasculares, como a hipertensão neurogênica, induzidas pela super atividade do sistema simpático adrenérgico (CHAN et al., 2006; ESSICK & SAM, 2010), e que por sua vez, afeta de forma negativa a contratilidade dos cardiomiócitos (REN et al., 2010).

Anteriormente, foi demonstrado por um trabalho do nosso grupo de pesquisa, que o consumo materno de dieta hiperlipídica alterou o ganho de massa corporal dos animais da prole durante a amamentação. A partir do 6º dia pós-natal, foi observado que os filhotes machos da prole apresentaram aumento na massa corporal, e este aumento permaneceu até o dia do desmame (21 dias de idade). Já os filhotes fêmeas apresentaram aumento na massa corporal a partir do 9º dia pós-natal, que também persistiu até o dia do desmame. Para avaliar se o aumento de massa corporal ao desmame era consequência da maior adiposidade, alguns reservatórios de tecidos adiposos brancos foram pesados. Tanto os filhotes machos quanto as fêmeas apresentaram aumento do peso relativo dos reservatórios de tecido adiposo branco retroperitoneal, perigonadal e inguinal, demonstrando que o consumo materno de dieta hiperlipídica aumentou a adiposidade dos filhotes de ambos os sexos aos 21 dias de idade (ZECA, 2015). Ainda nesse estudo foi realizada dosagem da leptina sérica pela técnica de radioimunoensaio, com o intuito de analisar se a concentração sérica desse hormônio acompanhava o aumento de tecido adiposo branco. Os filhotes machos e fêmeas da prole apresentaram aumento na concentração sérica de leptina, demonstrando que esses animais eram hiperleptinêmicos. Além disso, a função cardíaca da prole aos 30 dias de idade foi avaliada através do ecocardiograma. As análises ecocardiográficas evidenciaram, tanto nos filhotes machos quanto nas fêmeas, redução na fração de ejeção do VE. No entanto, somente as fêmeas apresentaram aumento no volume sistólico final. Esses dados demonstram que o consumo materno de dieta hiperlipídica prejudica a função sistólica das proles, já na fase pré púbere (ZECA, 2015).

Por outro lado, há trabalhos relatando que o baixo índice de massa corporal materna durante os períodos críticos do desenvolvimento também pode promover disfunções cardiovasculares na prole, como a doença cardíaca coronária (FORSÉN et al., 1997). FERREIRA e colaboradores (2015) demonstraram que o consumo materno de dieta pobre em proteína (8%) durante o período perinatal aumentou a peroxidação lipídica e diminuiu a atividade de várias enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e atividades da glutathione reductase). Essas disfunções metabólicas foram associadas ao aumento da produção de ROS, prejuízo da atividade de agentes antioxidantes e do estado redox no tecido cardíaco de ratos imediatamente após o desmame (FERREIRA et al., 2015).

Além disso, RODFORD e colaboradores (2008) trabalharam com dieta materna com déficit de proteínas em ratas *Wistar*, e observaram que essa dieta também pode levar ao comprometimento da ação vasodilatadora do endotélio em vasos de resistência tanto nos machos quanto nas fêmeas da prole aos 120 dias de idade, além de remodelamento vascular por redução do músculo liso arterial. Essas alterações vasculares, assim como os prejuízos na angiogênese encontradas em modelos de programação metabólica por desnutrição materna, estão associadas à hipertensão na prole (CAMBONIE et al., 2007).

Além disso, a dieta materna pobre em proteínas (8%) também pode promover prejuízo no crescimento, desenvolvimento e funcionalidade de órgãos, aumento na pressão arterial sistólica, dislipidemias e aumento da concentração plasmática de insulina em jejum na maioria dos estudos em roedores (OZANNE & HALES, 2004; COSTA-SILVA et al., 2009; FALCÃO TEBAS et al., 2012; FIDALGO et al., 2013; LEANDRO et al., 2012; DE BRITO ALVES et al., 2014, 2016; FERREIRA et al., 2015; PAULINO-SILVA & COSTA-SILVA, 2016).

Dessa forma, a obesidade (LIANG et al., 2009), disfunção endotelial (GHOSH et al., 2001; FAN et al., 2013; MOREIRA et al., 2009), níveis plasmáticos elevados de colesterol (ELAHI et al., 2009); hipertensão (LIANG et al., 2009; GUBERMAN et al., 2013; ELAHI et al., 2009; SAMUELSSON et al., 2010) e hipertrofia cardíaca (FERNANDEZ-TWINN et al., 2012; MOREIRA et al., 2009) podem ser encontradas em modelos de programação metabólica por desnutrição ou obesidade materna.

## 1.5 Hipertrofia Cardíaca

O coração desempenha funções essenciais no sistema cardiovascular, garantindo a homeostase, o controle da temperatura e a comunicação humoral, além da distribuição de oxigênio e nutrientes para todos os tecidos do corpo através do bombeamento de sangue (SHIMIZU & MINAMINO, 2016). A fim de manter o funcionamento adequado do coração, o organismo apresenta mecanismos de remodelamento cardíaco que garantem a preservação dos miócitos, objetivando compensar os distúrbios cardiovasculares.

O remodelamento do tecido cardíaco é caracterizado por adaptações moleculares, celulares e intersticiais, que induz modificações no tamanho, massa, geometria e função do coração (COHN et al., 2000; FRANCIS, 2001). A hipertrofia, a angiogênese e a plasticidade metabólica são exemplos de processos de remodelamento da parede cardíaca (KEHAT et al., 2010; CONH et al., 2000), que podem ocorrer em resposta a uma elevada carga de trabalho, a fim de reduzir a tensão que a parede cardíaca pode sofrer, além de manter o débito cardíaco (KEHAT et al., 2010; CONH et al., 2000). O conceito de remodelação, remodelamento ou remodelagem cardíaca foi discutido, pela primeira vez, por HOCKMAN e BUCKEY (1982), em casos de isquemia miocárdica. Em modelos experimentais de infarto cardíaco em ratos, o remodelamento foi utilizado para caracterizar o aumento da cavidade ventricular esquerda (PFEFFER et al., 1985).

De acordo com a função do coração, a hipertrofia cardíaca pode ser classificada como fisiológica ou patológica. A hipertrofia fisiológica é uma compensação da função cardíaca que, inicialmente, não conduz à fibrose, insuficiência cardíaca ou arritmias (PERRINO et al., 2006; BEISVAG et al., 2009; KEHAT et al., 2010; SHIMIZU & MINAMINO, 2016). Este tipo de hipertrofia pode ser encontrado em casos de crescimento cardíaco normal em crianças ou durante a gravidez, bem como em atletas (SHIMIZU & MINAMINO, 2016). Os exercícios físicos são descritos como cardioprotetores (POWERS et al., 2014), através de adaptações benéficas do tecido cardíaco que mantém a homeostase cardíaca (ADAMS et al., 1981; MOCKEL & STORK T, 1996; RICHEY AND BROWN, 1998; SHAPIRO AND SMITH, 1983).

Em contraste, a hipertrofia patológica está associada à disfunção contrátil e insuficiência cardíaca (BERNARDO et al., 2010). É caracterizada pelo crescimento do músculo cardíaco induzida por fatores como o estresse hemodinâmico intermitente e anormal, e que podem promover o remodelamento cardíaco estrutural e elétrico de forma desfavorável

(KAVAZIS, 2015). As causas mais conhecidas para o desenvolvimento da hipertrofia patológica são a hipertensão sistêmica e o infarto do miocárdio (IM) (BERNARDO et al., 2010).

O IM está associado à necrose das miofibrilas e a desintegração do tecido de suporte interfibrilar, o que ocasiona a perda de tecido e o predispõe a distensão e deformações. Após o infarto, é comum ocorrer a expansão do infarto, caracterizado pela distensão das áreas musculares necróticas, com realinhamento dos miócitos na parede infartada, além da dilatação ventricular aguda (HOCKMAN, 1982; MATSUBARA & ZORNOFF, 1995). Nesse tipo de remodelamento ventricular, espera-se encontrar prejuízo na fração de ejeção associada ao aumento do volume sistólico final e diastólico final do VE, além do aumento de pré-carga e dilatação da cavidade ventricular. Porém, de acordo o mecanismo de Frank-Starling, inicialmente, as pressões de enchimento ventricular são restabelecidas. Cronicamente, o processo hipertrófico dos ventrículos tende a contribuir para a disfunção, e consequente insuficiência cardíaca (IC) e/ou morte súbita (PFEFFER et al., 1985; CONH et al., 2000; FRANCIS et al., 2001; ZORNOFF & SPADARO, 1997).

De acordo com a morfologia cardíaca, a hipertrofia pode ser classificada como excêntrica ou concêntrica. A presença de sobrecarga cardíaca pode influenciar no tipo de hipertrofia desenvolvida. BRAY (2004) associou a hipertensão arterial com o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca concêntrica em indivíduos magros; enquanto indivíduos com sobrepeso e hipertensão arterial apresentaram hipertrofia excêntrica.

A hipertrofia concêntrica é caracterizada pela disposição dos sarcômeros em paralelo, com proliferação de fibroblastos, além do aumento da matriz extracelular (fibrose intersticial), apoptose dos cardiomiócitos, necrose tecidual e, conseqüentemente, falência cardíaca (WAKATSUKI et al., 2004; WEBER, 2000). Neste tipo de hipertrofia, há aumento individual no diâmetro dos cardiomiócitos, promovendo a redução no raio interno do ventrículo (HUNTER & CHIEN, 1999; GAASCH, 1979).

Por outro lado, a hipertrofia exêntrica é caracterizada pelo aumento de tamanho do coração, além das adaptações mecânicas como o estiramento da parede ventricular que induz a replicação dos sarcômeros em série, redução da largura celular e aumento do comprimento dos cardiomiócitos, promovendo aumento do raio interno do ventrículo (FAGARD RH, 1997; RASKOFF et al., 1976), e por fim aumenta a força de contração do coração (WAKATSUKI et al., 2004).

A origem da hipertrofia é considerada complexa e pouco elucidada, contudo há mecanismos possivelmente responsáveis pelo desenvolvimento desse fenótipo. O remodelamento e disfunção ventricular está associado à redução na expressão do RNA mensageiro (RNAm) de importantes fatores para a contração do músculo cardíaco, tais como os canais do cálcio tipo L e o receptor de rianodina (Ryr2), que é um componente do retículo sarcoplasmático. Além disso, nesses casos de remodelamento cardíaco também já foi descrito redução na fosforilação da fosfolambam e na atividade de SERCA2a (COHN et al., 2000). Essas evidências sugerem que as alterações no trânsito de cálcio podem contribuir para a hipertrofia cardíaca (HASENFUUS et al., 1997).

Ademais, em situações patológicas, o processo de remodelamento cardíaco pode estar envolvido com modificações na via beta-adrenérgica do tecido cardíaco, como prejuízo na expressão protéica de receptores  $\beta_1$  e, conseqüentemente, diminuição dos níveis de proteína G estimulatória (Gs); além do aumento da expressão de receptores  $\beta_2$ , aumento da ativação da proteína G inibitória (Gi) e redução da estimulação da adenil ciclase (BARROS et al., 1999). Essas alterações sugerem comprometimento na função contrátil do miocárdio associada à hipertrofia cardíaca (BARROS et al., 1999).

BLACKMORE e colaboradores (2014), demonstraram que a dieta materna rica em lipídeos e açúcar não alterava a massa corporal de camundongos filhotes, no entanto, induziam hipertrofia ventricular esquerda entre a 3<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> semanas de vida da prole. A partir do 3<sup>o</sup> mês de vida desses animais, não foi notado mais hipertrofia cardíaca, porém foi observado redução tanto na pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, quanto na velocidade de relaxamento, e aumento na resposta simpática cardíaca (BLACKMORE et al., 2014). Por sua vez, SAMUELSSON e colaboradores (2008) constataram que a dieta materna obesogênica também é capaz de induzir aumento nas concentrações séricas de insulina associados a resistência insulínica e hipertrofia cardíaca em filhotes de camundongos com 2 meses de idade. Já foi descrito que a insulina está envolvida com o processo de hipertrofia cardíaca, na qual a regulação do crescimento dos cardiomiócitos de forma patológica é mediada pela ativação da via PI3K/AKT (CONDORELLI et al., 2002; ABEL, 2004).

Além da obesidade e dos distúrbios no metabolismo da glicose e insulina, que promovem resistência à insulina e diabetes tipo 2, a dieta rica em gordura e carboidrato tem desencadeado hipertensão associado ao remodelamento cardíaco (BUETTNER et al., 2000), fibrose intersticial (PINHEIRO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; LEOPOLDO et al., 2010), e alterações na expressão de proteínas envolvidas na contração cardíaca, como a

isoforma  $\beta$  da cadeia pesada de miosina ( $\beta$ -MHC) (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2010), disfunção contrátil e aumento da mortalidade (SHARMA et al., 2007, 2008; CHESS & STANLEY, 2008).

A principal proteína contrátil do coração de ratos é composta por um par de cadeias pesadas ( $\alpha$  e  $\beta$ ) que podem variar dependendo da composição das isoenzimas, e estas variações são consideradas marcadores de hipertrofia cardíaca. A isoenzima V1 é composta por duas cadeias pesadas do tipo  $\alpha$ ; V2 apresenta uma cadeia pesada do tipo  $\alpha$  e outra do tipo  $\beta$ ; e a composição da isoenzima V3 é realizada por duas cadeias pesadas do tipo  $\beta$ . A cadeia pesada de miosina do tipo  $\alpha$  ( $\alpha$ -MHC) apresenta maior atividade ATPásica quando comparado a do tipo  $\beta$  ( $\beta$ -MHC), demonstrando que a composição das isoenzimas determinam a capacidade contrátil do miócito. A hipertrofia cardíaca é caracterizada por alterações na miosina, como o aumento do homodímero beta-beta (isoforma V3) e redução da isoforma V1 (FERNANDEZ-TWINN et al., 2012), além do predomínio da forma fetal das cadeias leves da miosina (SWYNGHEDAUW, 1999). O padrão fetal pode ser considerado um mecanismo compensatório, com o objetivo de suportar à hipóxia celular, já que no coração hipertrófico e fetal os miócitos são capazes de resistir a baixos níveis de oxigênio (KORECKY et al., 1987).

Além disso, tanto na hipertrofia cardíaca quanto na IC pode-se encontrar aumento na expressão do RNAm do peptídeo natriurético cerebral (BNP) (ISO et al., 1997; REDDY, 1997; SAKAI et al., 2000). FERNANDEZ-TWINN e colaboradores (2012) avaliaram alguns marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca, inclusive genes fetais, como peptídeo natriurético atrial (Nppn) e o peptídeo natriurético cerebral (Nppb). Nesse trabalho constatou-se que a obesidade materna promoveu o aumento da expressão do RNAm para Nppb / BNP mas não para Nppn / ANF (FERNANDEZ-TWINN et al., 2012).

A origem da hipertrofia cardíaca também pode ser associada ao aumento e cronicidade do estresse oxidativo, já que este pode promover a disfunção mitocondrial e ativação das metaloproteases (GRIEVE et al., 2004; GIORDANO, 2005; SAWYER et al., 2002). As metaloproteases são enzimas latentes que apresentam atividade colagenolítica, e estas podem ser estimuladas por insultos mecânicos, isquêmicos, além da atividade de angiotensina II, endotelina 1, catecolaminas, fator de necrose tumoral e interleucina 1 (CLEUTJENS, 1996). Já foi relatado que o aumento da atividade das metaloproteases é acompanhado por dilatação ventricular em ratos com IM (SPINALE, 2002; ROHDE et al., 1999). Por outro lado, a inibição farmacológica dessas enzimas, diminui o risco de remodelamento cardíaco em animais com IM, sugerindo que a ação das metaloproteases sobre a rede de colágeno

interfibrilar pode estar envolvida com o processo hipertrófico e disfunção ventricular após o IM (SPINALE, 2002; ROHDE et al., 1999).

Outro mecanismo envolvido no processo hipertrófico do coração está relacionado com a atividade de esfingosina-1-fosfato (S1P), um mediador lipídico bioativo, que participa da proliferação, migração e diferenciação celular (TAKUWA et al., 2012) através da ativação de seus receptores S1PR1, S1PR2 e S1PR3. Estes receptores são expressos nos fibroblastos cardíacos (MEANS&BROWN, 2009). A celularidade cardíaca é, predominantemente, formada por fibroblastos, os quais representam cerca de 60 a 70% do número total de células que formam a massa cardíaca (MANABE et al., 2002). Os fibroblastos cardíacos liberam agentes (endotelina-1, Ang II, fator de necrose tumoral- $\alpha$  e interleucina-6) que atuam de forma autócrina e parácrina no coração, e participam do processo de remodelamento cardíaco (ZEISBERG&KALLURI, 2010). YUEN e colaboradores (2012) observaram que a atividade de Ang II e interleucina-6 (IL-6) promoveram o aumento na expressão do receptor S1PR1 nos miofibroblastos, além do desenvolvimento da hipertrofia cardíaca patológica, associada à fibrose intersticial.

## **1.6 Sistema Renina Angiotensina e a Hipertrofia Cardíaca**

O sistema renina angiotensina desempenha importante função na homeostase cardiovascular e renal (ROBERTSON & NICHOLLS, 1993; GARRISON & PEACH, 1990). A partir da década de 90, começaram a surgir trabalhos relatando a presença do SRA local em tecidos como o coração e vasos sanguíneos. Ao longo dos anos, descobriu-se que as células cardíacas expressam proteínas que participam da via de sinalização do SRA (NAGANO et al., 1992). O principal mediador desse sistema é o octapeptídeo Ang II, um regulador direto da homeostase cardiovascular, que age de forma parácrina e autócrina no tecido cardíaco.

A Angiotensina II é expressa tanto em miócitos, quanto em outros tipos celulares que compõe o tecido cardíaco, como os fibroblastos e miofibroblastos (LINDPAINNER & GANTEN, 1990). Este peptídeo é armazenado em vesículas citoplasmáticas nos miócitos ventriculares observados através de experimentos com cultura de células. Estudos relatam que a liberação de Ang II pode ocorrer por estímulo mecânico como o estiramento da parede cardíaca (BAKER et al., 1992; SADOSHIMA et al., 1993).

Além do seu potente efeito vasoconstritor, parece que Ang II é capaz de regular o crescimento celular de tecidos, como os vasos sanguíneos, coração e rins (BAKER & BOOZ,

1992; DZAU & PRATT, 1993; LINDPAINTNER & GANTEN, 1991; WOLF & NELSON, 1990). A Ang II é um potente agente pré-inflamatório, pré-oxidante e pré-trombótico que favorece a disfunção endotelial através do aumento de catecolaminas, endotelina-1 (ET-1) e tromboxano A<sub>2</sub>, que por sua vez levam a hipertrofia e/ou hiperplasia das células endoteliais (BARTON et al., 2000). Além disso, Ang II também altera a estrutura dos vasos modificando processos como crescimento, apoptose e migração celular da musculatura lisa dos vasos sanguíneos (MORISHITA et al., 1992; ITOH et al., 1993; WOLF et al., 1996; SCOTT-BURDEN et al., 1991), além de mudanças nos componentes da matriz extracelular (DIEP et al., 2002). Alguns trabalhos mostram que Ang II estimula a hiperplasia de células musculares lisas de vasos sanguíneos, como a aorta de ratos espontaneamente hipertensos e as arteríolas renais de ratos normotensos (PAQUET et al., 1990; DUBEY et al., 1992), sugerindo que este peptídeo, diretamente ou em combinação com outros fatores de crescimento, pode estar envolvido com os mecanismos que promovem hipertrofia vascular e elevação da resistência arterial na hipertensão (GEISTERFER et al., 1988; BERK et al., 1989; OWENS, 1989). KHAIRALLAH & KANABUS (1983) administraram doses subpressoras de Ang II por infusão crônica em ratos, e observaram que esses animais apresentaram hipertrofia ventricular sem hipertensão. Além disso, o tratamento da hipertensão com fármacos inibidores de ECA está envolvido tanto com a regressão da hipertrofia cardíaca já instalada (LINZ et al., 1989), como também impede o processo hipertrófico do VE em ratos (BAKER & ACETO, 1990).

No sistema cardiovascular os principais efeitos de Ang II dependem, essencialmente, da sua ligação e ativação do receptor AT<sub>1</sub>, o qual é acoplado à proteína G<sub>q</sub>, e que por sua vez estimula fosfolipase C e diacilglicerol (GRIENDLING et al., 1994). Já foi descrito que o coração expressa AT<sub>1</sub>, e a super ativação deste receptor pode induzir a hipertrofia cardíaca (ROSCA et al., 2013). Quando o receptor é ativado, a proteína G<sub>q</sub> se dissocia em suas subunidades G<sub>αq</sub> e G<sub>βγ</sub>, que por sua vez, iniciam uma série de eventos que culminam com a ativação da proteína quinase C (PKC) mediada por diacilglicerol (NISHIZUKA, 1984), além da ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (VAN BIESEN et al., 1995). Em alguns trabalhos notou-se que a ativação tanto de PKC (ALLO et al., 1991) quanto de MAPK (MCDERMOTT et al., 1991) estão envolvidas com o aparecimento do fenótipo hipertrófico no tecido cardíaco. Sugerindo que a super estimulação do SRA no tecido cardíaco está relacionada com o desenvolvimento da disfunção miocárdica progressiva, remodelamento (KOJIMA et al., 1994; YAMAZAKI et al., 1995) e, conseqüentemente, insuficiência cardíaca (PIERUZZI et al., 1995).

Alguns trabalhos também descrevem a participação dos receptores para Ang II, do tipo AT2, no processo hipertrófico do coração. Já foi descrito que a deleção deste receptor em camundongos levou a atenuação da hipertrofia cardíaca induzida pela sobrecarga pressórica (SENBONMATSU et al., 2000). Por outro lado, HARADA e colaboradores (1998) não observaram regressão da hipertrofia cardíaca ao bloquear os receptores AT1. A partir desses estudos pode-se sugerir que o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca pode ser induzido pela ativação dos receptores AT2.

Em diversos estudos, o bloqueio do receptor AT1 e de sua via de sinalização tem se tornado um alvo farmacológico no tratamento de comorbidades, como na hipertensão e insuficiência miocárdica induzidas pela hipertrofia cardíaca, pois reduzem os prejuízos na função cardíaca. Já foi relatado que o uso de fármacos como  $\beta$ -bloqueadores, inibidores de ECA, bloqueadores dos receptores AT1 geram benefícios clínicos significativos ao reduzir os prejuízos na função cardíaca desencadeados pelo processo hipertrófico (GARNIER et al., 2003; SCHEUBEL et al., 2002; GRIFFITHS et al., 2010; DAI et al., 2012; SCHEUBEL et al., 2010; GRIFFITHS et al., 2008; ROSCA et al., 2009).

A elevada concentração de Ang II é um estímulo potente para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de citocinas pró-inflamatórias que estimulam ainda mais o estresse oxidativo e a expressão de vários componentes do SRA, perpetuando um mecanismo de feedback negativo deletério (CHAAR et al., 2015; FELIX et al., 2007; AGARWAL et al., 2009; LO et al., 2013; MASSON et al., 2014). Nos cardiomiócitos a via de sinalização de AT1 induz a geração de espécies reativas de oxigênio através de enzimas dependente de NADPH oxidase, como NOX2 e NOX4 (SHAROV et al., 1998; SHAROV et al., 2000), nos quais apresentam participações essenciais na regulação de fatores de transcrição associados ao estresse oxidativo e indução da inflamação, lesão, depressão contrátil, hipertrofia e falência cardíaca (SHAROV et al., 1998; SHAROV et al., 2000). A super exposição de Ang II e a super ativação de AT1 no tecido cardíaco estão relacionadas com o surgimento da hipertrofia através de uma cascata de sinalização Akt-dependente, o qual é estimulado pelo aumento de radicais de superóxido liberados pela enzima NADPH oxidase (HINGTGEN et al., 2006). Ademais, acredita-se que NOX2 NADPH oxidase é a principal enzima envolvida na ativação do receptor AT1, e que está envolvido com o processo hipertrófico (DAI et al., 2011; DOENST et al., 2010).

Acredita-se que as espécies reativas de oxigênio sejam o principal fator que leva à hipertrofia cardíaca, seja ela induzida pela exposição aguda de Ang II como pela ativação

prolongada da proteína Gαq (DAI et al., 2011). Tal afirmação foi elucidada através de achados como alterações nos processos oxidativos mitocondriais, além de autofagia que estão associados tanto a hipertrofia cardíaca induzida por ang II como a insuficiência cardíaca que pode ocorrer através de Gαq (DAI et al., 2011). Modificações no DNA mitocondrial (mtDNA), assim como a diminuição da biogênese da mitocôndria são utilizados como marcadores da transição entre a hipertrofia e insuficiência cardíaca (IC) (DAI et al., 2011). Já é bem definido que as mutações e deleções de mtDNA estão presentes em casos de cardiomiopatias humanas (CORRAL-DEBRINSKI et al., 1992; ARBUSTINI et al., 1998), e são definidas como marcadores da transição entre hipertrofia fisiológica e insuficiência ventricular direita em crianças com doenças cardíacas congênitas (KARAMANLIDIS et al., 2011).

Verificou-se, ainda, que a depleção de cópias de mtDNA em ratos está associada ao remodelamento da massa cardíaca e infarto do miocárdio (IDE et al., 2001). DAI e colaboradores (2011) administraram Ang II em camundongos, e tiveram a oportunidade de observar redução no número de cópias de mtDNA e uma frequência de depleção de mtDNA dramática, além da hipertrofia cardíaca grave com sinais de disfunção sistólica e diastólica. Esses achados apontam a gravidade das mutações de mtDNA ao acelerar a transição da hipertrofia cardíaca para IC. Ainda neste trabalho, foi visto que a expressão demasiada da catalase mitocondrial reduziu a frequência da mutação de mtDNA e disfunção cardíaca, o que indica que as espécies reativas de oxigênio gerados pela oxidação da mitocôndria são os responsáveis pelo dano de mtDNA.

Nos casos de disfunção, o coração depende de mecanismos regulatórios desencadeados por sistemas fisiológicos que tentam compensar os prejuízos. Como, por exemplo, no caso das funções desempenhadas pelo SRA que garantem a homeostase cardiovascular e renal. Além da via clássica, os componentes do SRA estão expressos em diversos tecidos, como o coração. Atualmente, o SRA local tem sido um dos principais mecanismos descritos para explicar a hipertrofia cardíaca. Conhecendo a importância do SRA sobre a regulação da função cardiovascular e remodelamento cardíaco, o presente trabalho visa investigar se o consumo materno de dieta hiperlipídica é capaz de promover hipertrofia cardíaca na prole, e correlacionar este fenótipo a alterações no SRA expresso no coração desses animais.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar se o consumo materno de dieta hiperlipídica promove hipertrofia cardíaca, e correlacionar este fenótipo a alterações no sistema SRA expresso do coração de animais machos e fêmeas da prole ao desmame.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Avaliar a presença de hipertrofia ventricular, através da análise o diâmetro dos cardiomiócitos da prole, utilizando cortes histológicos corados com HE,

Analisar a presença de fibrose no coração da prole, através de cortes histológicos corados com tricossírius;

Avaliar a expressão do RNAm de marcadores moleculares de hipertrofia cardíaca, Nppn,  $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -MHC, Serca2a2 e Ryr2, na parede livre do VE da prole;

Quantificar a expressão de Ang II na parede livre do VE da prole;

Avaliar a expressão proteica do receptor de Ang II (AT1) da parede livre do VE da prole.

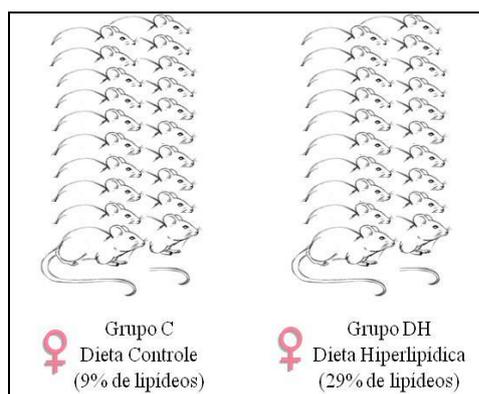
### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Ratos *Wistar*, machos e fêmeas, utilizados nos experimentos dessa dissertação foram obtidos no Biotério Central da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Estes animais foram alocados no biotério de experimentação do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), acondicionados em temperatura ( $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (7:00-19:00h) controlados. Durante todo o protocolo experimental, a água e a ração foram oferecidas *ad libitum*. O cuidado com os animais seguiu os princípios do *Guide for the Care and Use of the Laboratory Animals*, após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética Institucional (protocolo: 017/2014-CEUA/IB/UFRRJ).

#### 3.1.1 Modelo experimental

Foram utilizados quarenta ratos fêmeas e vinte machos da linhagem *Wistar*, com aproximadamente 60 dias de idade. As fêmeas foram divididas de forma aleatória em dois grupos experimentais (Figura 1): vinte fêmeas formaram o grupo controle (C), que alimentou-se somente de ração normolipídica (9% de lipídeos); e as outras vinte fêmeas formaram o grupo dieta hiperlipídica isocalórica (DH), que alimentou-se somente de ração hiperlipídica (29% de lipídeos).



**Figura 1.** Representação da separação dos grupos das progenitoras de acordo com sua dieta. Ratas *Wistar* com 60 dias de vida foram divididas em dois grupos. As matrizes do grupo experimental controle (C) receberam somente dieta controle (9% de lipídeos) e as matrizes do grupo dieta hiperlipídica (DH) receberam somente dieta hiperlipídica isocalórica (29% de lipídeos).

A ração hiperlipídica isocalórica foi produzida pelo nosso grupo de pesquisa em colaboração com o Laboratório de Endocrinologia Molecular (LEM) do Centro de Ciências e da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A composição dessa ração foi baseada no modelo experimental definido por FRANCO e colaboradores (2012), e sua descrição segue na tabela 1.

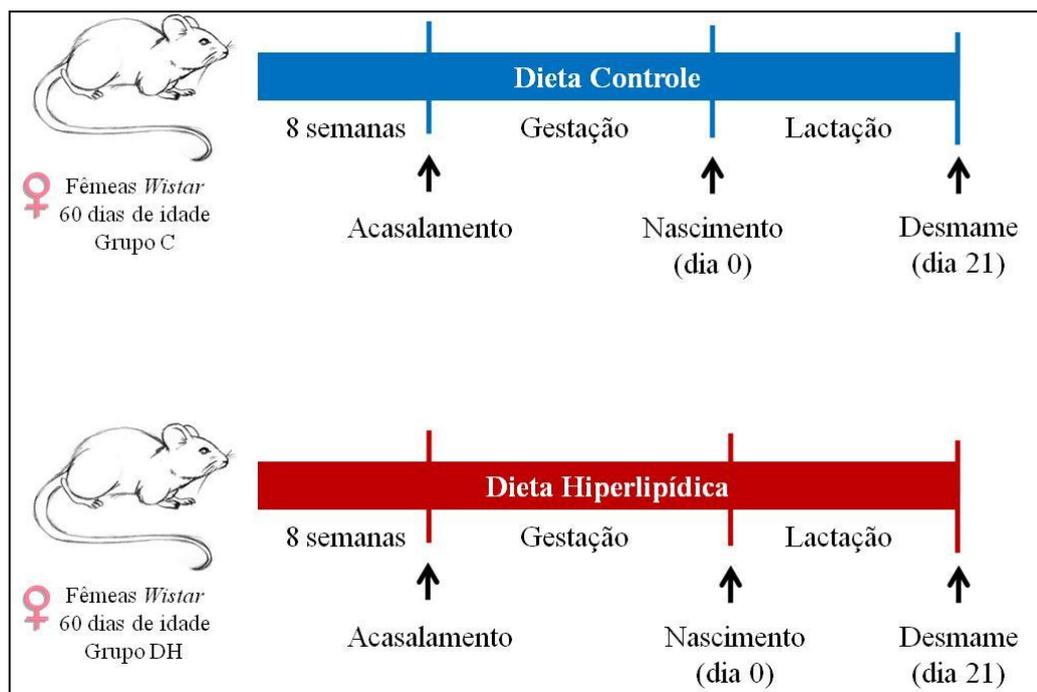
**Tabela 1.** Composição da dieta hiperlipídica purificada 5400 cal/Kg (Prag Soluções ®)

<b>Produto</b>	<b>(p/p)</b>	<b>Calorias</b>	<b>Calorias (%)</b>
Amido de milho	13,05	522	9,67
Caseína	18,70	748	13,85
Amido Dextranizado	13,20	528	9,78
Sacarose	10,00	400	7,41
Óleo de soja	4,00	360	6,67
Celulose Microcristalina	5,00	0	0,00
MIX Mineral AIN 93 G	3,50	0	0,00
MIX Vitaminas AIN 93	1,00	40	0,74
L-Cistina	0,30	12	0,22
Cloreto de Colina	0,25	0	0,00
Banha	31,00	2790	51,66
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>5400</b>	<b>100,0</b>

Com o objetivo de ambientar, as matrizes foram mantidas no biotério de experimentação do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro durante uma semana. Logo após esse período, esses animais receberam suas respectivas dietas durante oito semanas antes do acasalamento (figura 2). A partir da 6ª semana as fêmeas dos dois grupos foram submetidas à avaliação do ciclo estral através de citologia vaginal. Não foram observados alterações no ciclo estral das fêmeas do grupo C e DH. Na 8ª semana, as fêmeas de ambos os grupos foram acasaladas (com ratos que ingeriram dieta controle), na proporção de duas ratas por macho em cada gaiola. A fêmea foi

considerada gestante quando houve visualização do *plug* vaginal, e esta foi separada do macho e permaneceu em gaiola individual.

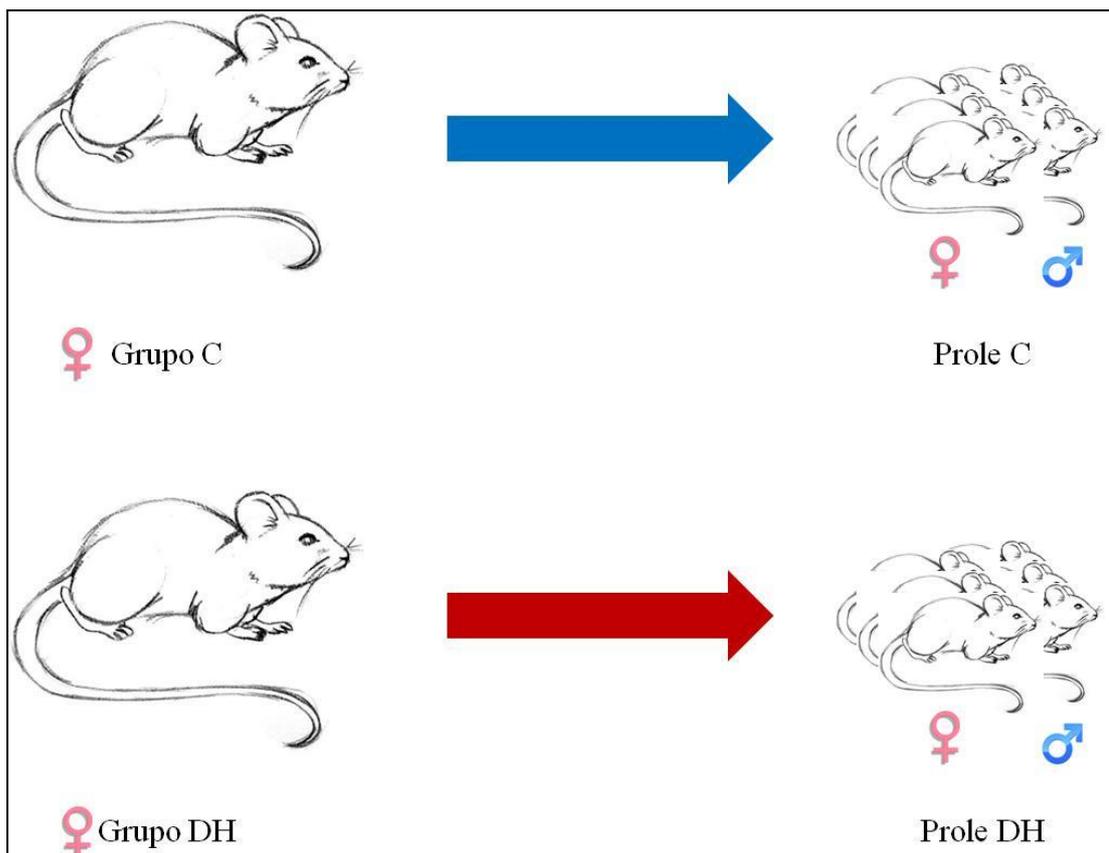
Durante a gestação e amamentação, o grupo C continuou recebendo somente a dieta normolipídica, enquanto que as fêmeas do grupo DH continuaram recebendo somente a dieta hiperlipídica isocalórica (Figura 2).



**Figura 2.** Representação do modelo experimental. Durante 8 semanas o grupo C foi submetido à dieta normolipídica (9% de lipídeos) e o grupo DH à dieta hiperlipídica (29% de lipídeos), em seguida foram acasaladas (com ratos que ingeriram dieta controle) e permaneceram em suas respectivas dietas durante a gestação e lactação.

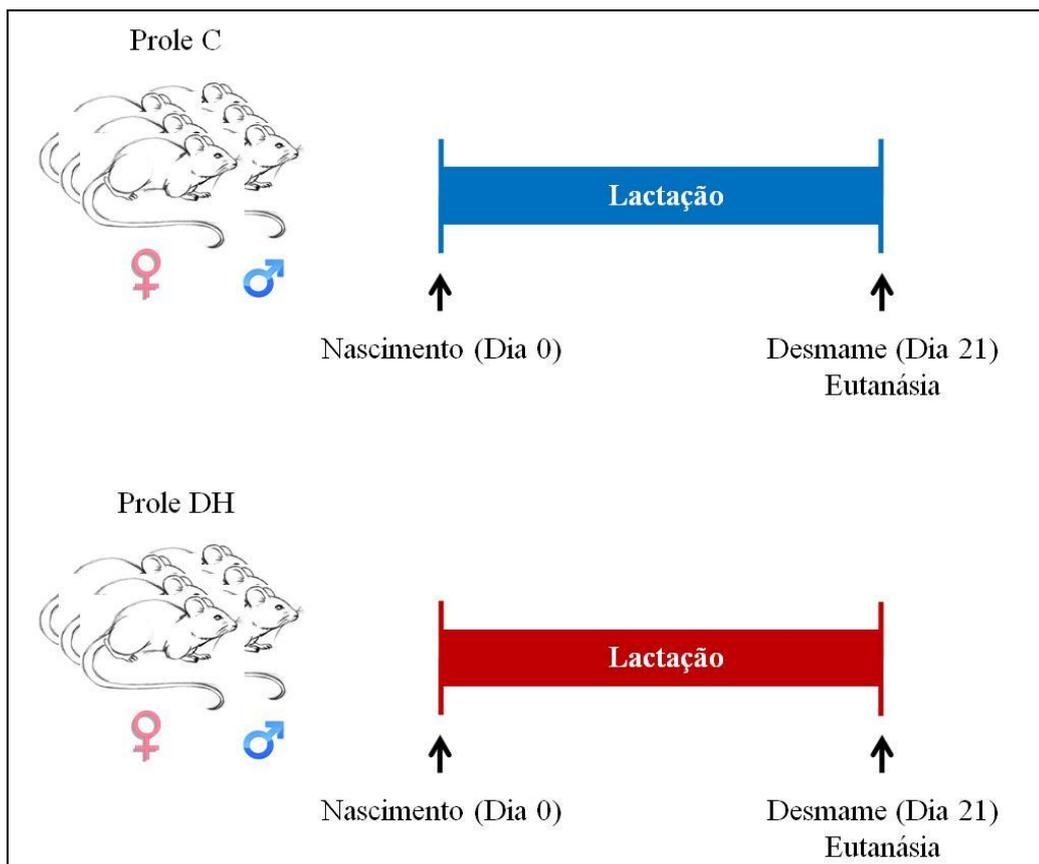
### 3.1.2 Obtenção das proles

As matrizes do grupo C deram origem aos filhotes da prole controle (C), enquanto as matrizes do grupo DH deram origem aos animais da prole dieta hiperlipídica (DH). Após o nascimento, foram separados, aleatoriamente, seis filhotes de cada ninhada, sendo três fêmeas e três machos quando possível (Figura 3). O ganho de peso corporal dos animais de ambas as proles foi acompanhado a cada três dias, desde o nascimento até o desmame aos 21 dias de idade.



**Figura 3.** Representação da obtenção das proles controle (C) e dieta hiperlipídica (DH). As progenitoras do grupo experimental C originaram a prole Controle (C) e as progenitoras do grupo DH deram origem a prole Dieta Hiperlipídica (DH).

No dia do desmame, os filhotes foram pesados e eutanasiados pelo método de guilhotina. Os mesmos foram anestesiados através da administração dos fármacos cloridrato de dextrocetamina (Ketamin<sup>®</sup>, Cristália) e cloridrato de xilasina (Xilasin<sup>®</sup>, Syntec), por via intraperitoneal, nas doses de 50-100 mg/Kg e 1-5 mg/Kg, respectivamente. Logo após a anestesia, os animais foram eutanasiados (Figura 4), e o coração e os tecidos adiposos brancos retroperitoneal, perigonadal e inguinal foram coletados e pesados. A tíbia também foi coletada, seu comprimento mensurado a fim de utilizar como um fator de normalização dos pesos dos tecidos coletados. Átrios e ventrículos foram separados, e os ventrículos foram utilizados para análises histológicas, bioquímicas e moleculares.



**Figura 4.** Representação do nascimento e desmame das proles controle (C) e dieta hiperlipídica (DH). Tanto os animais das proles C quanto os da prole DH foram eutanasiados no dia do desmame, aos 21 dias pós nascimento.

### 3.2 Avaliação da Hipertrofia Cardíaca

Após a coleta, o coração foi lavado em solução gelada de salina (NaCl 0,9%) com a finalidade de extrair qualquer resquício de sangue e coágulos. Os ventrículos foram separados dos átrios, em seguida foram secos em papel de filtro, pesados e seus valores foram normalizados pelo comprimento da tíbia (que foi obtido através de um paquímetro). O peso relativo dos ventrículos foi utilizado como um índice indireto de hipertrofia cardíaca (OTTEN et al., 1986; SJAASTAD et al., 2000; VAN DIJK-OTTENS et al., 2010).

### 3.3 Análise Histopatológica

Os corações foram cortados transversalmente ao nível dos músculos papilares de ambos os ventrículos, e os tecidos foram fixados em solução de paraformol 4%. Posteriormente, as amostras foram desidratadas por gradiente crescente de etanol (Vetec)

(80/100%), por 50 minutos cada, diafanizados em xilol (Vetec) por duas vezes e em seguida, realizamos impregnação com parafina a 60°C (parafina histológica; Pró-Cito®, Porto Alegre, RS, Brasil), durante 50 minutos cada e repetimos este processo mais uma vez. Os cortes foram obtidos com auxílio de micrótomo (RM 2125 RT, Leica Biosystems, Alemanha) em espessura de 5 µm e escalonados a uma distância de 130 µm, a fim de evitar medidas repetidas do mesmo cardiomiócito.

A desparafinação e hidratação dos cortes foi realizada através de 3 banhos de xilol com duração de 15 minutos cada e álcoois em concentrações decrescentes (100/ 100/ 90 / 80 / 70%), por 5 minutos cada. As lâminas foram lavadas em água destilada por duas vezes, por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram coradas com hematoxilina (Vetec) por 8 min, posteriormente lavadas em água corrente e rapidamente em álcool clorídrico (álcool etílico a 99,5% (Vetec) 940 mL/L, ácido clorídrico PA (Vetec) 20 mL/L, água deionizada 40 mL) e depois lavadas novamente, por 5 minutos em água corrente e água destilada. As lâminas foram mergulhadas por 3 minutos em eosina (Vetec) e lavadas em água destilada e corrente por 5 minutos.

As análises do diâmetro celular foram realizadas a partir de 3 a 6 cardiomiócitos por campo, sendo 10 campos por corte, e 3 cortes escalonados por animal. Fotomicrografias foram obtidas em microscópio (modelo FWL- 1200 T, FeldmannWild Leitz, Alemanha), e analisadas utilizando o *Software Image J* (versão, 1.49, Maryland, EUA).

Com o objetivo de avaliar a presença de fibrose, após a desparafinação e hidratação outros cortes foram corados com Picrossírius (EasyPath, Brasil) durante 90 minutos. Foram analisados 10 campos por corte e 3 cortes escalonados por animal.

### **3.4 Extração e Dosagem de Angiotensina II na Parede Livre do Ventrículo Esquerdo**

Aproximadamente 50 miligramas da parede livre do ventrículo esquerdo foram homogeneizados em uma solução contendo etanol 75%, pepstatina 0,5µM, PMSF 0,01mM, HCl 1,5% EDTA 0,1%, fenantrolina 5% e albumina 0,005%. A homogeneização foi realizada com o auxílio do *potter*, até que não houvessem fragmentos visíveis. Em seguida as amostras foram centrifugadas 13000 x g por 20 minutos, a 4°C. Após centrifugação o sobrenadante foi coletado, uma alíquota foi armazenada para posterior quantificação proteica e o restante foi liofilizado. A liofilização foi realizada em liofilizador LioTop L101 (Liobrás- Brasil), à - 55°C. O liofilizado foi ressuspenso em 3 mL de TFA.

A extração de Angio II foi realizada em coluna Bond-Elut (Peninsula Laboratories, CA, EUA). Essas colunas foram submetidas a uma pré-ativação com 4 mL de uma solução de acetonitrila a 60% (Merck, EUA) diluída em TFA 0,1% seguido de 20 mL de TFA 0,1%. Após esse procedimento as amostras foram colocadas individualmente nas colunas e diluídas novamente com mais 20 mL de TFA 0,1%. Os peptídeos absorvidos foram então diluídos em 3 mL de uma solução a 60% de acetonitrila em TFA 0,1%, sendo coletados em tubos com dimensões 12 x 75 mm.

Em seguida, a dosagem hormonal para Ang II ocorreu através da técnica de radioimunoensaio específico (BOTELHO et al. 1994).

### **3.5 Avaliação da Expressão Protéica do Receptor AT1 na Parede Livre do Ventrículo Esquerdo**

A homogeneização do ventrículo esquerdo e a extração de proteínas realizadas para a análise da expressão protéica de AT1 através da técnica de *Western Blot*, foi baseada no método descrito por TOLMACHOV e colaboradores (2006).

O primeiro passo foi realizar a homogeneização de aproximadamente 70 mg do ventrículo esquerdo em 250µL de solução gelada de pH 6,4, contendo Hepes 50mM, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 10mM, Triton X 1% e 10% de coquetel de inibidores de proteases (Complete, Roche®, Alemanha). Para homogeneizar o tecido foi utilizado o processador Ultra-Turrax T25 basic (IKA Werke, Staufen, Alemanha). Em seguida o homogenato foi centrifugado a 16100 x g por 30 minutos, a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e este foi utilizado para a dosagem da concentração de proteínas em cada amostra, através do Kit comercial Pierce® BCA Protein Assay (Thermo Scientific®, Brasil).

Foi utilizado gel de poliacrilamida a 10% contendo 10% de SDS, 30% de acrilamida mix, 10% de persulfato de amônio e 0,02% de TEMED, para realização da eletroforese a 150 V, que ocorreu entre uma hora a uma hora e trinta minutos. As concentrações proteicas utilizadas estão descritas na tabela 2

Após a corrida, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (*Polyvinylidene Difluoride*), em sistema úmido com tampão de transferência de pH 8,3, contendo 0,6% de Tris Base, 0,3 % de glicina, 20% de metanol, durante 1 hora e trinta minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com o corante Ponceau (0,5% vermelho de Ponceau e 1% de ácido acético) e digitalizada para usar o carregamento de

proteína como controle interno. Após essa etapa, a membrana foi bloqueada em albumina comercial 5% em tampão TBS-T 0,1% por 2 horas em temperatura ambiente.

Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário por aproximadamente 18 horas (*overnight*), a 4°C. Foi utilizado o anticorpo monoclonal para AT1 (AT1 mouse antibody), o qual foi diluído em TBS-T 0,1% de acordo com a padronização descrita na tabela 2. Por conseguinte, a membrana foi lavada 5 vezes com TBS-T 0,1%, por cinco minutos cada lavagem. Posteriormente, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário durante 2 horas à temperatura ambiente e agitação. A diluição do anticorpo secundário está descrita na tabela 2. Após essa etapa, a membrana foi lavada novamente com TBS-T 0,1%, sendo cinco lavagens por 5 minutos cada. Após esta etapa, foi realizado a revelação da membrana através do método de quimioluminescência não-radioativa utilizando o reagente Clarity Western ECL Substrate (Biorad<sup>®</sup>, CA, EUA) em *Gel Imaging Systems*- Chemiodoc (Biorad<sup>®</sup>, CA, EUA) e análise densiométrica com Software Image Lab 5.2.1.

**Tabela 2.** Condições padronizadas para a realização da técnica de *Western Blotting*

Ac primário e diluição	Ac secundário e diluição	Concentração de ptn (machos)	Concentração de ptn (fêmeas)
<sup>2</sup> Anti AT1 1:500	<sup>1</sup> Anti Mouse IgG HRP 1:2000	20µg	40µg

<sup>1</sup> Cell Signaling<sup>®</sup>, (MA, EUA); <sup>2</sup> Anticorpo monoclonal sintetizado como descrito por FREI e colaboradores (2001).

### 3.6 Avaliação da Expressão Gênica

#### 3.6.1 Extração do RNA total

O RNA total da parede livre do VE foi obtido utilizando o reagente TRIZOL (INVITROGEN), uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. No tecido, foi adicionado 1 mL de TRIZOL, em seguida este foi homogeneizado usando um processador Ultra-Turrax T25 basic (IKA Werke, Staufen, Alemanha) e incubado, por 10 minutos, à temperatura ambiente.

Após a incubação foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma-Aldrich) a cada uma das amostras, e estas foram incubadas por 5 minutos, e então centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubos tipo *eppendorf*, novos, e o RNA precipitado com 0,5 mL de isopropanol (Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas por 10 minutos a 12000 xg. O precipitado de RNA, resultante da centrifugação, foi lavado com 1 mL de etanol 70 % (Sigma-Aldrich), seco à temperatura ambiente e solubilizado em água tratada com DEPC (Sigma-Aldrich).

A concentração do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 nm (NanoDrop, ThermoFisher Scientific, EUA) e sua integridade foi confirmada por visualização do RNA em gel de agarose 1 % em TAE 1x. As amostras contendo RNA íntegro foram armazenadas a -20°C para posterior obtenção do cDNA.

### **3.6.2 Transcrição reversa (RT)**

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen, EUA) e oligo (dT) (PROMEGA, EUA) em um volume final de 20 µL conforme o protocolo do fabricante. Nesta reação 1 µg do RNA total de cada amostra foi incubado com oligo(dT), dNTPs (10 mM de cada - dATP, dCTP, dGTP, dTTP- PROMEGA, EUA) e água tratada com DEPC a 65°C por 5 minutos em um termociclador MWG Biotech-Primus. Foram acrescentados a reação, tampão first strand, 5 mM DTT e 50 U/µL da enzima Superscript III, e incubados novamente a 42°C por 50 minutos. A reação foi finalizada incubando a 70°C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

### **3.6.3 PCR em tempo real**

O cDNA foi adicionado a uma placa de reação junto com uma mistura contendo os iniciadores específicos, água deionizada autoclavada e tampão SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), que contém 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 U/mL Taq DNA polimerase, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, SYBR Green I e 20 nM fluoresceína. As amostras foram analisadas em duplicata.

A quantificação da expressão dos genes foi realizada na máquina de Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA), que detecta mudanças na concentração das amostras por fluorescência. Após desnaturação inicial a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, a

reação foi seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60° C. Os seguintes iniciadores foram usados:  $\alpha$ -MHC direto 5' -CACCAGAATCCAGGCTCAAG- 3'  $\alpha$ -MHC reverso 5' -TCATCCACGGCCAATTCTTG - 3',  $\beta$ -MHC direto 5' -CCATCAACGACCCCTTCATT- 3'  $\beta$ -MHC reverso 5' - GACCTGTCAGCTTGTAATG - 3', Ryr2 direto 5' -TCACTGAGAAGCCAAGACCG- 3' Ryr reverso 5' - TCCGTGGGTGGTATGGTAGA-3', SERCA2a direto 5' - ATGTAAGGGTGTTCGGGTGC- 3', SERCA2a reverso 5' - ACATCACACAGTGAGCTGGG-3'. Os iniciadores para os genes  $\beta$ -actina, *Nppn* e *Hrpt* foram desenhados pela empresa ThermoFisher Scientific, portanto a sequência não foi fornecida.

Neste trabalho utilizamos o método de quantificação relativa das amostras que descreve as mudanças na expressão do gene alvo no grupo experimental em relação à expressão do grupo controle, que foi considerado como 1. Os níveis relativos de RNAm foram determinados pela comparação do limiar (threshold) dos ciclos (Ct, do inglês cycle threshold) de PCR entre os grupos. A normalização pelo controle interno, cuja expressão não se altera nas diferentes manipulações do estudo, foi feita subtraindo o valor do Ct do gene em estudo do valor do Ct dos genes  $\beta$ -actina (para as fêmeas) e *Hrpt* (para os machos) e esses valores obtidos foram submetidos à fórmula  $2^{\Delta Ct}$  (CORDEIRO et al., 2013) e em seguida às análises estatísticas.

### 3.7 Análise Estatística

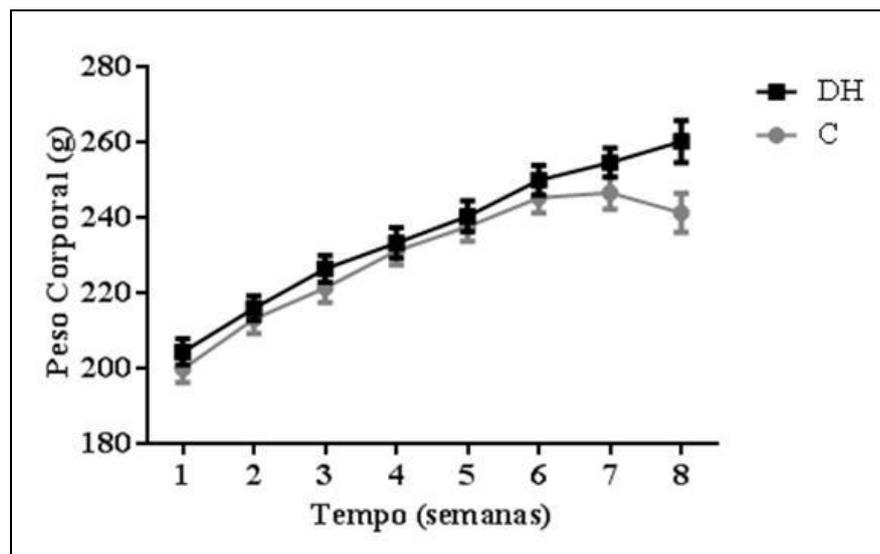
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para avaliar se os dados seguem a distribuição normal, foi feito o teste de normalidade Shapiro-Wilk com o software *Past* versão 3.4 (disponível em <http://folk.uion.no/ohammer/past/>). Para a identificação de dados com grande dispersão (outliers) foi feito o teste de Grubbs. Em seguida foram utilizados o Teste t –Student não pareado (até dois grupos) e ANOVA Bi-variada (mais de dois grupos, duas variáveis) quando os dados apresentaram distribuição normal, seguido de pós teste de Sidak. Estas análises estatísticas foram realizadas com o Software *GraphPad Prism*<sup>®</sup> versão 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Evolução do Peso Corporal e Ingestão Alimentar das Matrizes Antes do Acasalamento

O peso corporal das progenitoras dos grupos C e DH, assim como a sua ingestão alimentar, foram acompanhados semanalmente a fim de verificar as possíveis influências do consumo de dieta hiperlipídica sobre esses índices.

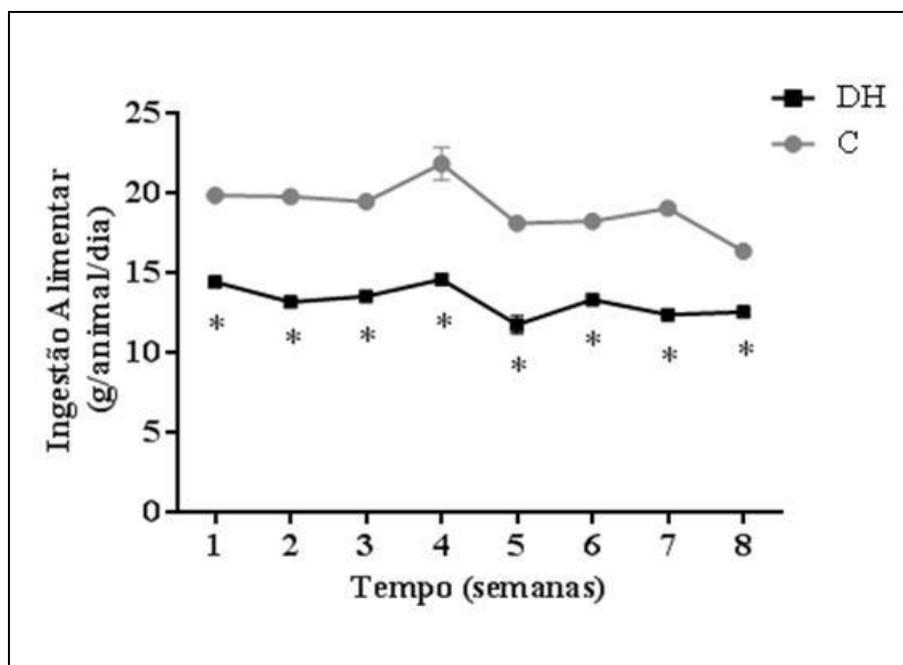
Observamos que as fêmeas C e DH não apresentaram diferenças significativas na massa corporal durante as oito semanas em que receberam dieta normolipídica e hiperlipídica, respectivamente (Figura 5).



**Figura 5.** Evolução do ganho de massa corporal (g) das matrizes dos grupos C e DH ao longo das oito semanas antes do acasalamento. Ratas *Wistar* foram separadas nos grupos C (n=20) e DH (n=20) e receberam somente dieta normolipídica e hiperlipídica, respectivamente. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste two-way ANOVA, seguido de pós-teste Sidak.

Ao analisarmos a ingestão alimentar das matrizes (através da diferença entre a quantidade inicial e final de ração fornecida semanalmente para cada rata), observamos que as ratas que receberam dieta hiperlipídica apresentaram menor ingestão durante as 8 semanas

que precederam o acasalamento. Na primeira semana, foi observado que as fêmeas DH ingeriram menos ração, cerca de 37%, em comparação com as progenitoras do grupo C. Na segunda e terceira semana, essa ingestão manteve-se reduzida, 50% e 43% respectivamente. As matrizes do grupo DH continuaram ingerindo menos ração na quarta (50%) e quinta (54%) semana. Já na sexta semana, a diferença na ingestão alimentar entre as fêmeas do grupo C e DH foi de, aproximadamente, 38%. Esta diferença foi de aproximadamente 54% na sétima semana, e 30% na oitava semana (Figura 6).



**Figura 6.** Ingestão alimentar (g/animal/dia) das matrizes dos grupos C e DH ao longo das oito semanas antes do acasalamento. Ratas *Wistar* foram separadas nos grupos C (n=20) e DH (n=20). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste two-way ANOVA, seguido de pós-teste Sidak, \*  $p < 0,05$ .

#### 4.2 Obtenção das Proles C e DH

Como demonstrado na figura 3, a prole C foi formada pelos filhotes nascidos das progenitoras do grupo C, enquanto a prole DH foi formada pelos filhotes nascidos das matrizes do grupo DH. No dia do nascimento, seis filhotes de cada ninhada foram

selecionados de forma aleatória, tentando permanecer, quando possível, a mesma proporção entre machos e fêmeas.

O grupo C era formado por 20 ratas, porém, somente 15 ninhadas foram obtidas, totalizando 90 filhotes da prole C, sendo 45 fêmeas e 45 machos. Durante o período de amamentação, quatro filhotes dessa prole, 2 machos e 2 fêmeas, apresentaram discrepância no crescimento em comparação aos demais animais, e por isso não foram utilizados no experimento. E por fim, no dia do desmame haviam 86 filhotes da prole C, sendo 43 fêmeas e 43 machos.

Em relação à prole DH, esta foi formada por 108 filhotes, sendo 64 fêmeas e 54 machos. Esses filhotes nasceram de 18 matrizes do grupo DH, pois das 20 progenitoras desse grupo, duas não ficaram gestantes. Após a parturição, algumas progenitoras desse grupo apresentaram sinais de canibalismo, possivelmente estabelecido por estresse. Além disso, alguns filhotes machos e fêmeas apresentaram prejuízo no seu desenvolvimento e ganho de peso corporal, sendo por este motivo descartados dos experimentos. Portanto, ao desmame haviam 59 filhotes fêmeas e 45 machos.

Para a realização de cada análise histológica, bioquímica ou molecular foi usado apenas um animal macho e uma fêmea de cada prole.

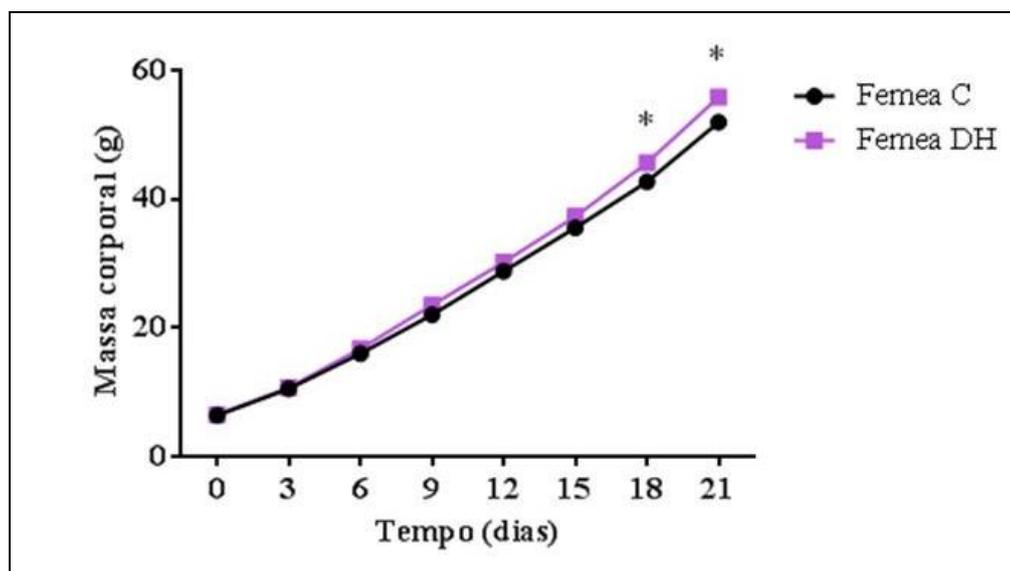
#### **4.3 Acompanhamento da Massa Corporal da Prole do Nascimento ao Desmame**

A fim de avaliar a possível influência do consumo materno de dieta hiperlipídica sobre o ganho de massa corporal dos filhotes, acompanhamos o peso dos animais das proles a cada três dias, desde o nascimento até aos 21 dias de idade, quando houve o desmame e eutanásia desses animais.

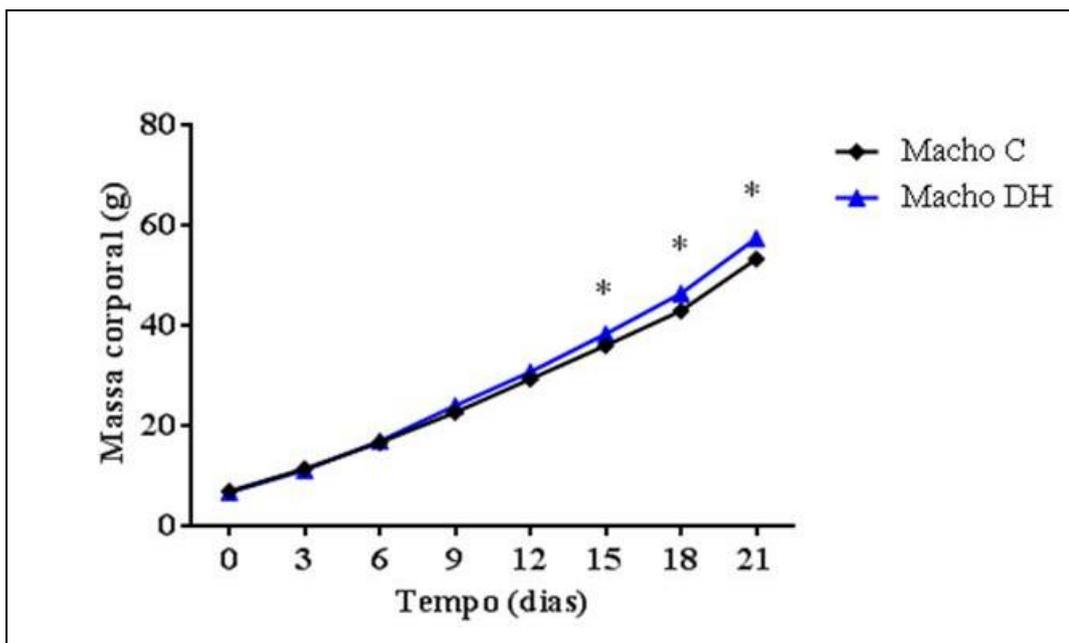
No dia do nascimento (dia 0), pesamos os animais de ambas as proles, e não foram observadas diferenças significativas entre os animais machos e fêmeas das proles C e DH (Dia 0: fêmeas C=6,4 ±0,1g; DH=6,5±0,1g, machos C=6,9±0,1g; DH=6,7 ±0,1g). No dia 3 também não foram encontradas diferenças significativas no ganho de massa corporal entre os animais das proles (Dia 3: fêmeas C=10,5±0,2g; DH=10,7±0,2g, machos C=11,4 ±0,2g; DH=11,1±0,2g). Nenhuma diferença significativa foi encontrada no sexto dia pós nascimento das proles (Dia 6: fêmeas C=16,0±0,3g; DH=16,7±0,3g, machos C=16,6±0,3g; DH=16,9±0,4g). O mesmo perfil foi observado no nono dia de vida dos animais (Dia 9: fêmeas C=22,0±0,6g; DH=23,5±0,3g, machos C=22,6±0,4g; DH=24,0±0,4g). Também não

foram encontradas diferenças significativas entre o ganho de peso de machos e fêmeas das proles C e DH no dia 12 (Dia 12: fêmeas C=28,8±0,6g; DH=30,2±0,5g, machos C=29,3±0,5g; DH=30,7±0,7g). No décimo quinto dia após o nascimento, os filhotes machos da prole DH apresentaram aumento de aproximadamente 7% no peso corporal quando comparados aos machos da prole C, porém nenhuma diferença foi observada entre as fêmeas das proles C e DH (Dia 15: fêmeas C=35,5±0,6g; DH=37,3±0,5g, machos C=35,9±0,6g; DH=38,3±0,8g). A partir do dia 18, tanto os machos quanto as fêmeas DH apresentaram maior de massa corporal, cerca de 8% e 7% respectivamente, em comparação com os animais da prole C (Dia 18: fêmeas C=42,7±0,6g; DH=45,6±0,7g, machos C=42,9±0,7g; DH=46,4±0,9g). Esse aumento de 8% e 7% no peso corporal dos animais machos e fêmeas, respectivamente, da prole DH manteve-se até o dia do desmame, (Dia 21: fêmeas C=51,9±0,8g; DH=55,8±0,7g, machos C=53,2±0,7g; DH=57,4 ±1,0g).

A evolução da massa corporal das fêmeas e machos das proles C e DH são demonstradas nas figuras 7 e 8, respectivamente.



**Figura 7.** Evolução da massa corporal dos filhotes fêmeas das proles C (n=41) e DH (n=37), do nascimento (dia zero) ao desmame (21 dias de idade). Dados expressos como média ± erro padrão da média, \* p<0,05. Teste t-Student.



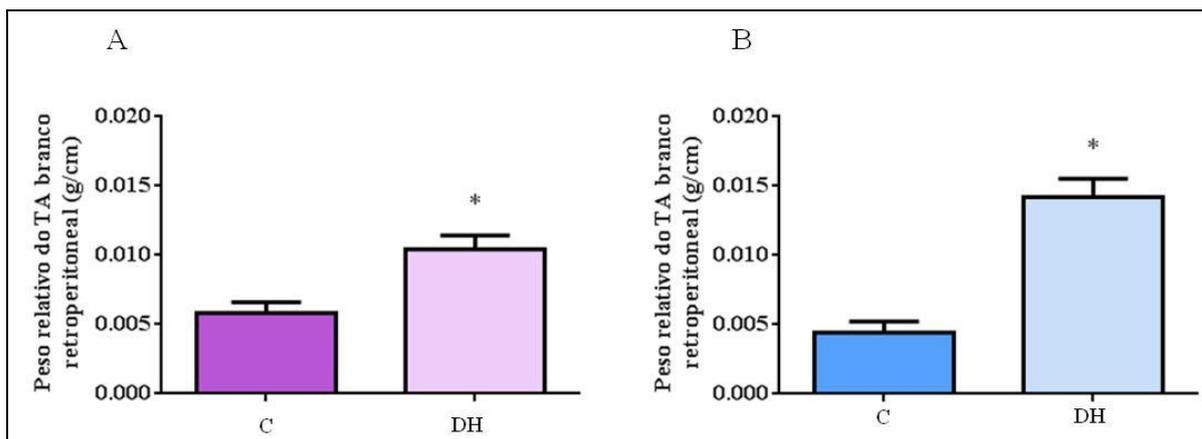
**Figura 8.** Evolução da massa corporal de filhotes machos das proles C (n=40) e DH (n=37), do nascimento (dia zero) ao desmame (21 dias de idade). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ . Teste t-Student.

Esses dados indicam que o consumo materno de dieta hiperlipídica proporciona maior ganho de massa corporal.

#### 4.4 Avaliação do Peso dos Tecidos Adiposos Brancos aos 21 Dias de Idade

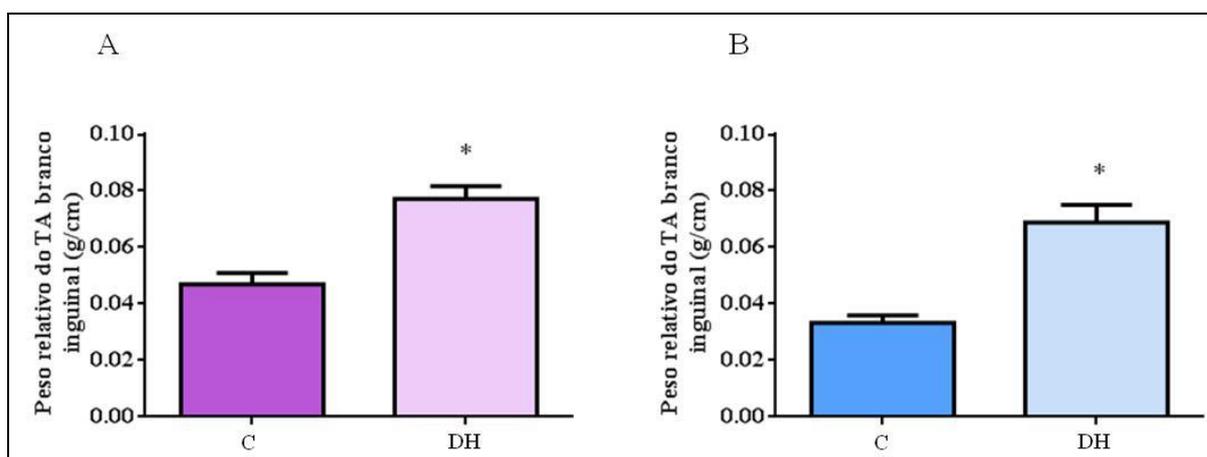
Aos 21 dias de idade, logo após a eutanásia, os tecidos adiposos brancos viscerais (retroperitoneal e perigonadal) e subcutâneo (tecido inguinal) foram coletados e pesados, com o objetivo de verificar se o aumento de massa corporal da prole DH ocorreu devido ao aumento de adiposidade. Para isso o peso dos tecidos adiposos foi corrigido pelo comprimento da tíbia.

Ao analisar o reservatório de tecido adiposo retroperitoneal, foi observado aumento na massa do tecido adiposo branco retroperitoneal, em torno de 80% nas fêmeas e 2,9 vezes nos machos da prole DH quando comparados aos seus controles (fêmeas C=0,0058  $\pm$  0,0007g/cm; DH=0,0104  $\pm$  0,001g/cm, machos C=0,0049  $\pm$  0,0006g/cm; DH=0,0142  $\pm$  0,0013g/cm) (Figura 9).



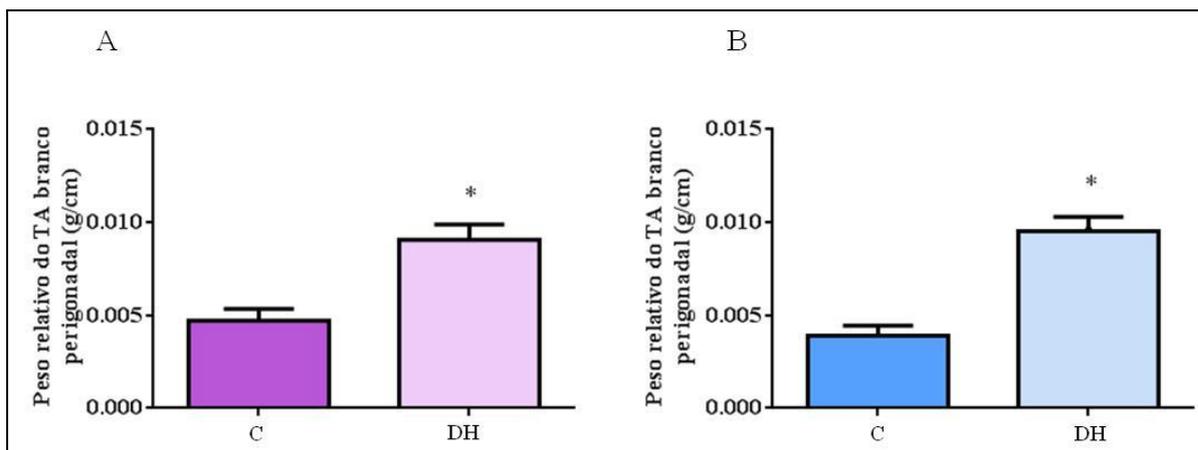
**Figura 9.** Massa do reservatório de tecido adiposo branco retroperitoneal (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal (g/cm) de fêmeas das proles C (n=11) e DH (n=20). B) Peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal (g/cm) de machos das proles C (n=10) e DH (n=11). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ . Teste t-Student.

Como demonstrado na figura 10, a massa adiposa branca inguinal estava elevada tanto nas fêmeas (70%) quanto nos machos (100%), em relação aos seus controles (fêmeas C =  $0,0446 \pm 0,0043$ g/cm; DH =  $0,0773 \pm 0,0044$ g/cm, machos C =  $0,0332 \pm 0,0026$ g/cm; DH =  $0,0688 \pm 0,0062$ g/cm).



**Figura 10.** Massa do reservatório de tecido adiposo branco inguinal (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Peso relativo do tecido adiposo inguinal (g/cm) de fêmeas das proles C (n=11) e DH (n=20). B) Peso relativo do tecido adiposo inguinal (g/cm) de machos das proles C (n=10) e DH (n=11). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ . Teste t-Student.

Ao analisarmos o tecido adiposo perigonadal, observamos aumento de aproximadamente 90% nas fêmeas DH em relação às fêmeas da prole C (fêmeas C=0,0047 ±0,006g/cm; DH=0,009 ±0,008g/cm). Além disso, os machos da prole DH também apresentaram aumento significativo, cerca de 2,4 vezes quando comparados aos machos da prole C (machos C=0,0039 ±0,005g/cm; DH=0,0095 ±0,007g/cm), conforme demonstrado na figura 11.



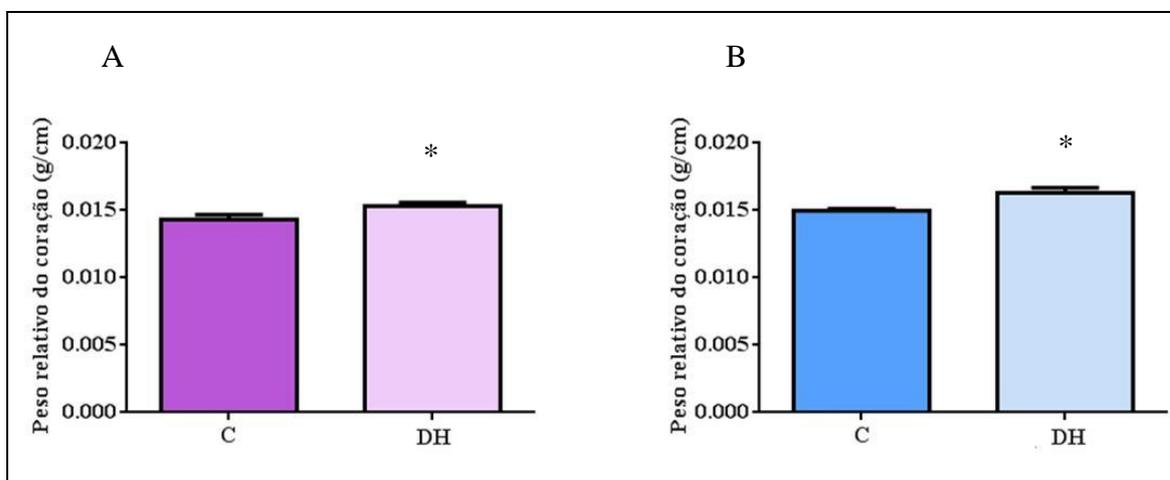
**Figura 11.** Massa do reservatório de tecido adiposo branco perigonadal (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Peso relativo do tecido adiposo perigonadal (g/cm) de fêmeas das proles C (n=11) e DH (n=20). B) Peso relativo do tecido adiposo perigonadal (g/cm) de machos das proles C (n=10) e DH (n=11). Dados expressos como média ± erro padrão da média, \* p<0,05. Teste t-Student.

Esses dados indicam que o consumo materno de dieta hiperlipídica proporciona maior adiposidade na prole.

#### 4.5 Avaliação da Hipertrofia no Coração das Proles aos 21 Dias de Idade

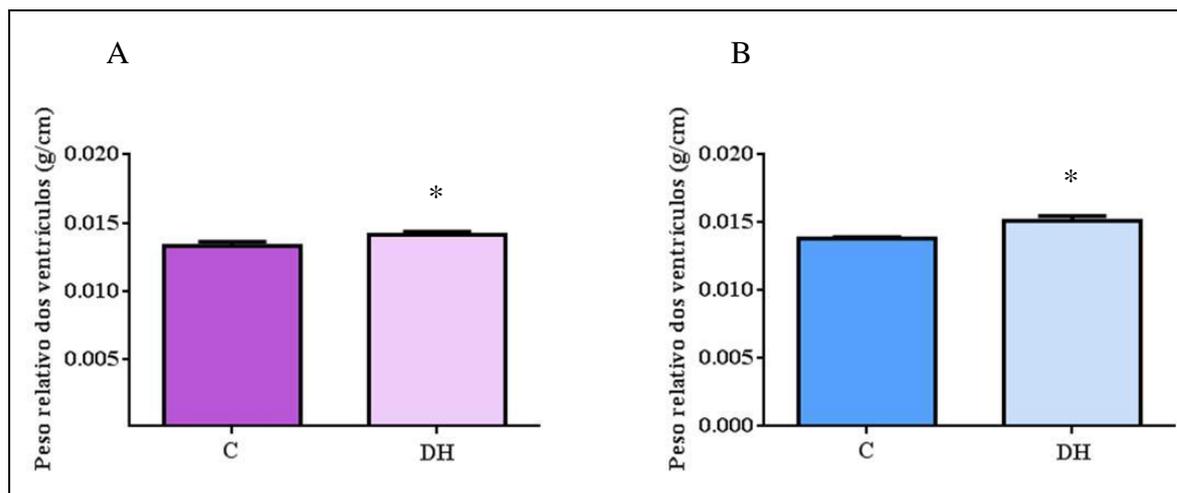
Com o objetivo de analisar se a ingestão materna de dieta hiperlipídica é capaz de modificar a massa do coração, assim como sua estrutura, este órgão foi coletado e seu peso mensurado. O peso relativo do coração foi utilizado como uma medida indireta de hipertrofia.

Foi verificado aumento em torno de 7% e 8% na massa cardíaca tanto dos filhotes fêmeas (fêmeas C=0,0143 ±0,003g/cm; DH=0,0153 ±0,002g/cm) quanto dos machos (machos C=0,0150 ±0,001g/cm; DH=0,0163 ±0,003g/cm) da prole DH, respectivamente, em relação aos seus controles. Esses dados são demonstrados na figura 12.



**Figura 12.** Massa do coração (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Peso relativo do coração (g/cm) das fêmeas das proles C (n=12) e DH (n=20). B) Peso relativo do coração (g/cm) dos machos das proles C (n=10) e DH (n=11). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ . Teste t-Student.

Ao analisar o peso dos ventrículos, constatamos que a massa ventricular das fêmeas da prole DH era aproximadamente 18% maior que as fêmeas da prole C (fêmeas C =  $0,0133 \pm 0,003$  g/cm; DH =  $0,0141 \pm 0,002$  g/cm) (Figura 13). Enquanto que os animais machos apresentaram aumento de, aproximadamente, 21% em relação aos machos da prole C (machos C =  $0,0138 \pm 0,001$  g/cm; DH =  $0,0151 \pm 0,003$  g/cm) (Figura 13).



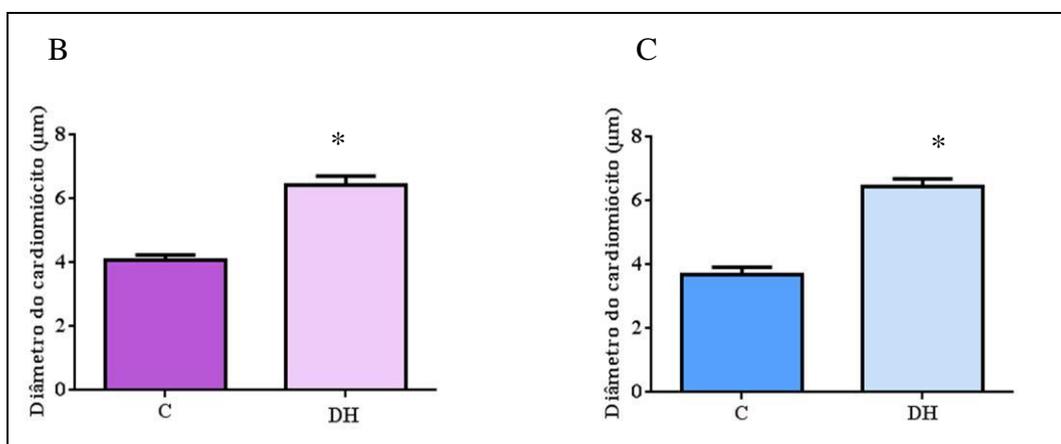
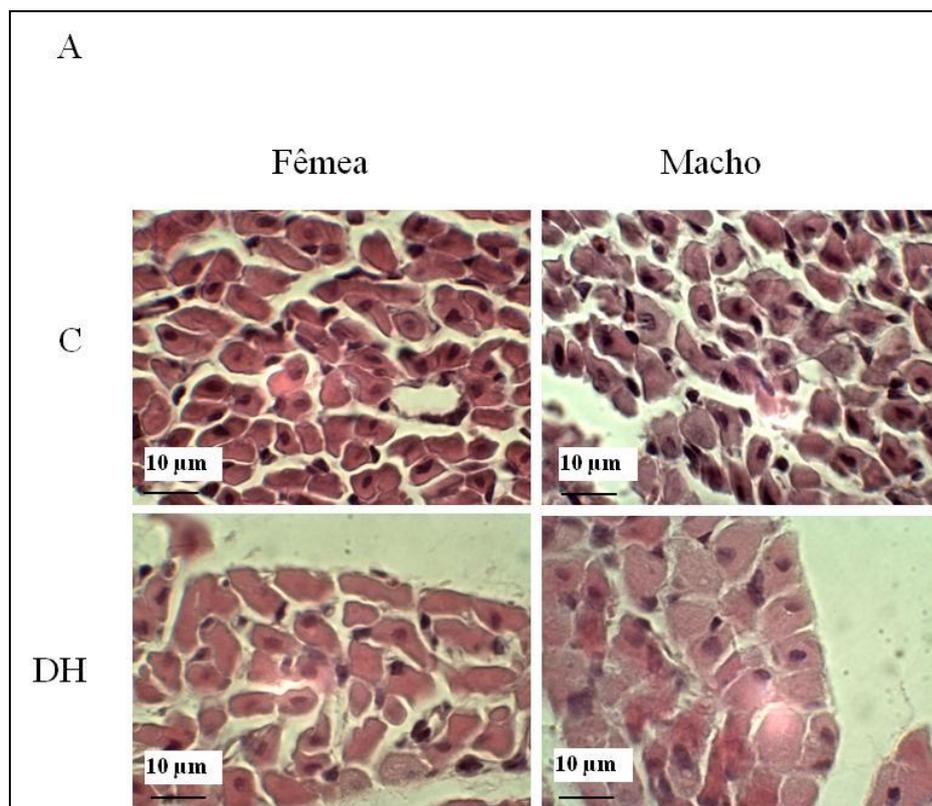
**Figura 13.** Massa dos ventrículos (g), corrigida pelo comprimento da tíbia (cm), das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Peso relativo dos ventrículos (g/cm) das fêmeas das proles C (n=12) e DH (n=20). B) Peso relativo dos ventrículos (g/cm) dos machos das proles C (n=10) e DH (n=11). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \*  $p < 0,05$ . Teste t-Student.

#### 4.6 Análise Histopatológica

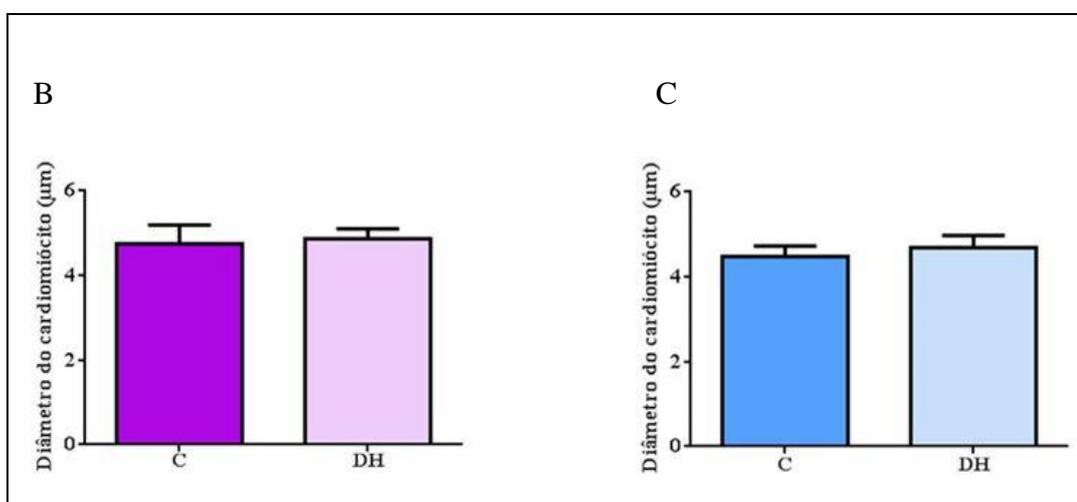
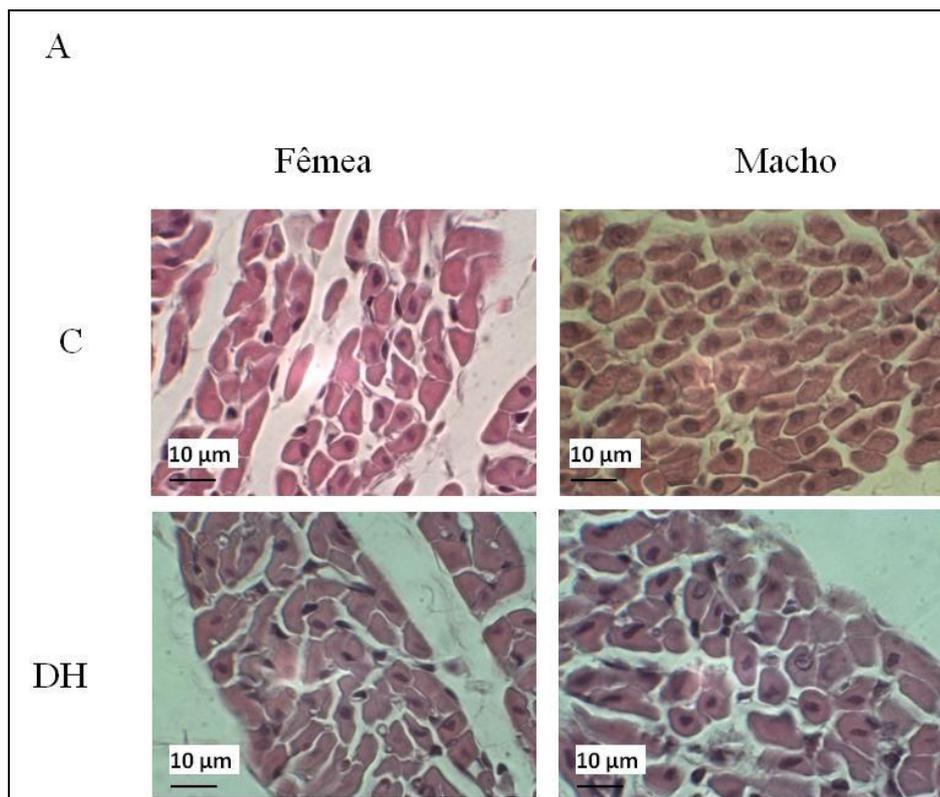
Após utilizarmos o peso relativo do coração como uma medida indireta de hipertrofia cardíaca, foram realizados cortes histológicos para avaliarmos o diâmetro dos cardiomiócitos. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e avaliamos o diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e direito.

As análises realizadas no ventrículo esquerdo demonstraram que tanto os filhotes fêmeas quanto os machos da prole DH apresentaram aumento, aproximadamente, de 60% e 77%, respectivamente, no diâmetro dos cardiomiócitos (fêmeas C=4,750  $\pm$  0,1665 $\mu$ m DH=6,429 $\pm$ 0,1063 $\mu$ m; machos C=3,688086 $\pm$ 0,08332 $\mu$ m DH=6,457 $\pm$ 0,08959 $\mu$ m), quando comparados aos animais da prole C (figura 14).

Não observamos diferença no diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo direito entre os animais das proles C e DH de ambos os sexos (fêmeas C=4,750  $\pm$  0,1665 $\mu$ m DH=4,871  $\pm$  0,0865 $\mu$ m; machos C=4,479 $\pm$ 0,09377 $\mu$ m DH=4,686  $\pm$  0,1100 $\mu$ m), conforme representado na figura 15.



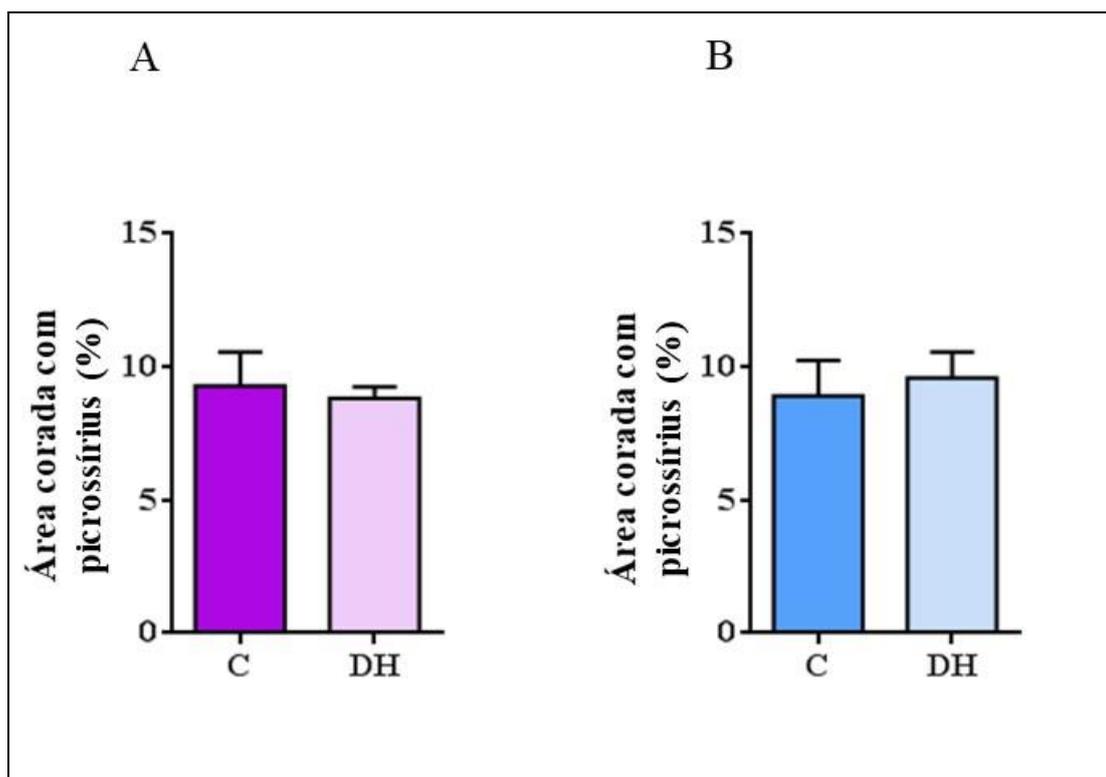
**Figura 14.** Análise histopatológica da parede livre do ventrículo esquerdo (VE) das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Fotomicrografias representativas da parede livre do VE dos animais fêmeas e machos das proles C e DH, coradas com Hematoxilina-Eosina (objetiva de 40x, barra de calibração: 10 µm). B) Representação gráfica do diâmetro dos cardiomiócitos dos animais fêmeas das proles C (n=6) e DH (n=7). C) Representação gráfica do diâmetro dos cardiomiócitos dos animais machos das proles C (n=5) e DH (n=7). Dados expressos como média ± erro padrão da média, \* p<0,05. Teste t-Student.



**Figura 15.** Análise histopatológica da parede livre do ventrículo direito (VD) das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Fotomicrografias representativas da parede livre do VD dos animais fêmeas e machos das proles C e DH, coradas com Hematoxilina-Eosina (objetiva de 40x, barra de calibração: 10 µm). B) Representação gráfica do diâmetro dos cardiomiócitos dos animais fêmeas das proles C (n=6) e DH (n=7). C) Representação gráfica do diâmetro dos cardiomiócitos dos animais machos das proles C (n=5) e DH (n=7). Dados expressos como média ± erro padrão da média.

Esses resultados sugerem que a hipertrofia é predominantemente nos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo.

Após observarmos a hipertrofia, outros cortes foram corados com picrossírius, no entanto, não observamos áreas de fibrose no coração de animais machos e fêmeas da prole DH (Figura 16).

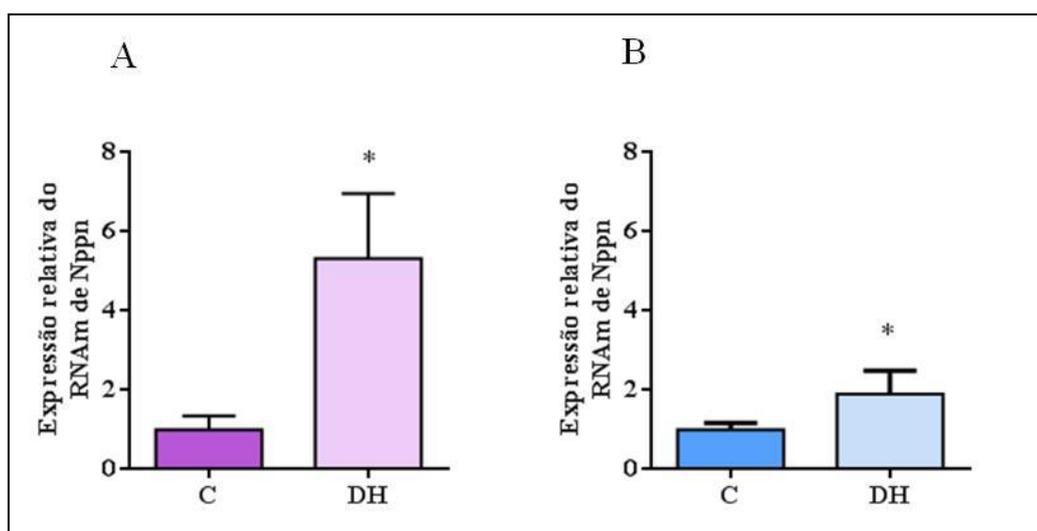


**Figura 16.** Análise das áreas de fibrose da parede livre do ventrículo direito (VD) das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Representação gráfica da porcentagem de área de fibrose da parede livre do ventrículo esquerdo das fêmeas das proles C (n=16) e DH (n=9). B) Representação gráfica da porcentagem de área de fibrose da parede livre do ventrículo esquerdo dos machos das proles C (n=13) e DH (n=8). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.7 Avaliação da Expressão Gênica de *Nppn*, $\alpha$ -MHC, $\beta$ -MHC, SERCA2a e Ryr2na Parede livre do Ventrículo Esquerdo

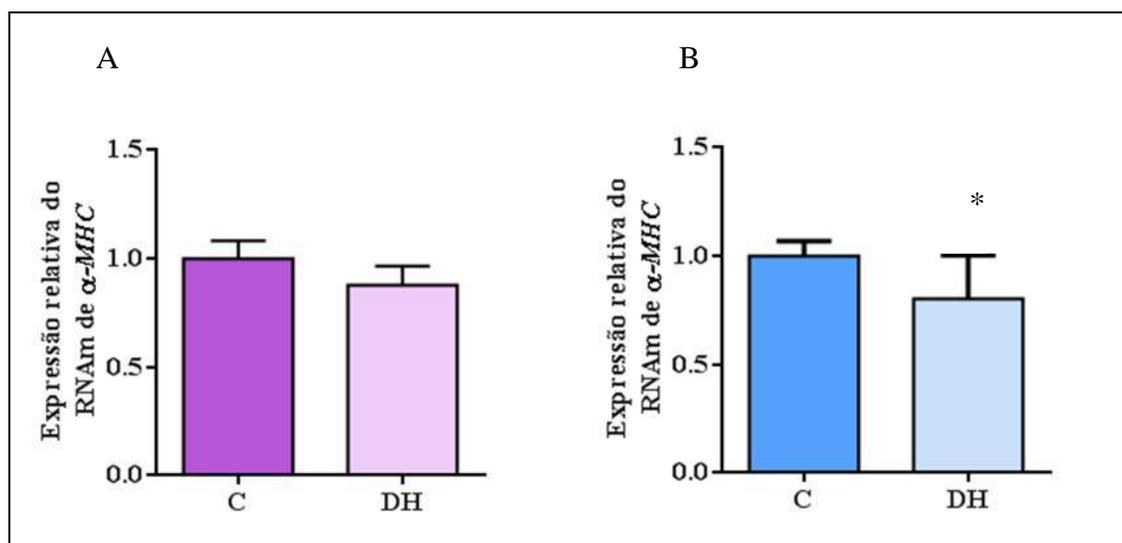
Avaliamos a expressão do RNAm de genes que possuem sua expressão alterada durante o processo de hipertrofia, *Nppn*,  $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -MHC, SERCA2a e Ryr2. Para esta análise foi realizado a extração do RNA total da parede livre do VE dos animais das proles C e DH e a avaliação da expressão dos genes foi realizada através da técnica de PCR em tempo real.

A análise da expressão do RNAm de *Nppn* no VE das fêmeas da prole DH demonstrou que este, estava aproximadamente 5 vezes maior em comparação as fêmeas da prole C (fêmeas C=1,000  $\pm$ 0,3480; DH=5,322 $\pm$ 1,639) (Figura 17). Enquanto que os machos da prole DH apresentaram aumento de aproximadamente 90% em relação aos machos da prole C (machos C=1,000 $\pm$ 0,1677; DH=1,901 $\pm$ 0,5917) (Figura 17).



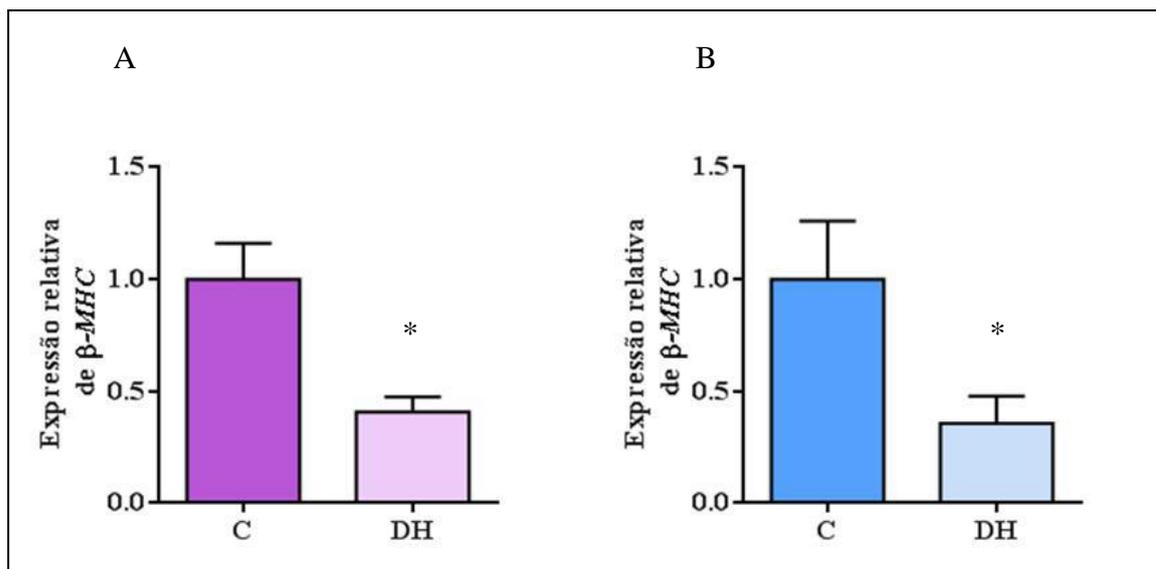
**Figura 17.** Expressão gênica de *Nppn* na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Expressão gênica de *Nppn* na parede livre do VE dos animais fêmeas das proles C (n=7) e DH (n=8). B) Expressão gênica de *Nppn* na parede livre do VE dos animais machos das proles C (n=6) e DH (n=4). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \*p<0,05. Teste t-Student.

Ao compararmos a expressão do RNAm de  $\alpha$ -MHC entre os animais das proles C e DH, não observamos diferença significativa entre as fêmeas (fêmeas C=0,9999±0,08344; DH=0,8787±0,08781) (Figura 18), no entanto, os animais machos da prole DH apresentaram redução, em torno de 20% , quando comparados aos machos da prole C (machos C=1,000±0,06903; DH=0,8025 ±0,2002) (Figura 18).



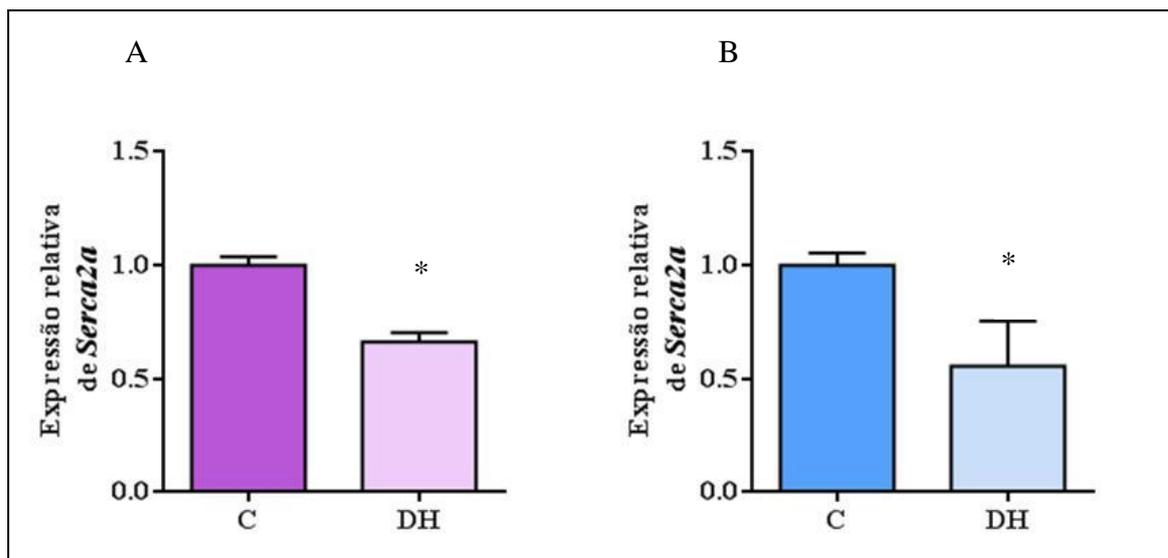
**Figura 18.** Expressão gênica de  $\alpha$ -MHC na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Expressão gênica de  $\alpha$ -MHC na parede livre do VE dos animais fêmeas das proles C (n=7) e DH (n=8). B) Expressão gênica de  $\alpha$ -MHC na parede livre do VE dos animais machos das proles C (n=6) e DH(n=6). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \*p<0,05. Teste t-Student.

Ao analisarmos a expressão gênica do RNAm de  $\beta$ -MHC observamos diminuição na expressão deste RNAm no VE de fêmeas e machos da prole DH, aproximadamente 50% nos 2 grupos experimentais quando comparados aos seus respectivos controles (fêmeas C=0,9999±0,1614 DH=0,4064±0,06784; machos C=1,000±0,2609 DH=0,3564±0,1225) (Figura 19).



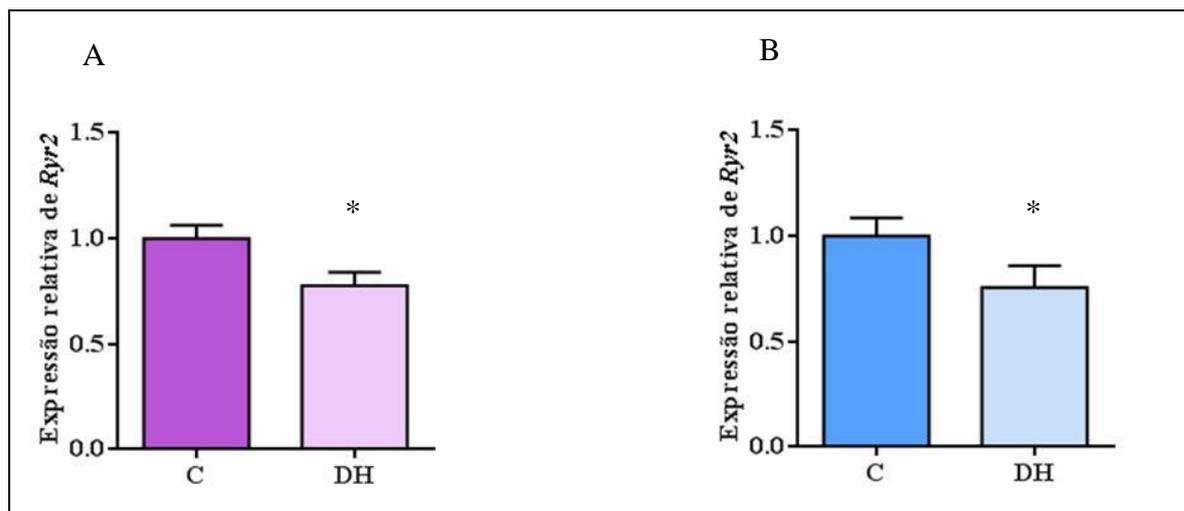
**Figura 19.** Expressão gênica de  $\beta$ -MHC na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Expressão gênica de  $\beta$ -MHC na parede livre do VE dos animais fêmeas das proles C (n=7) e DH (n=8). B) Expressão gênica de  $\beta$ -MHC na parede livre do VE dos animais machos das proles C (n=7) e DH (n=6). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$ . Teste t-Student.

A análise da expressão gênica de *SERCA2a2*, demonstrou diminuição de 40% desse RNAm na parede livre do VE das fêmeas da prole DH em relação as da prole C (fêmeas C=1,000 $\pm$ 0,03860 DH=0,6614 $\pm$ 0,04335). Também observamos diminuição na expressão deste RNAm no VE dos machos da prole DH, aproximadamente 50% (machos C=1,000 $\pm$ 0,05496 DH=0,5561 $\pm$ 0,1989) (Figuras 20).



**Figura 20.** Expressão gênica de *SERCA2a2* na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Expressão gênica de *SERCA2a2* na parede livre do VE dos animais fêmeas das proles C (n=7) e DH (n=8). B) Expressão gênica de *SERCA2a2* na parede livre do VE dos animais machos das proles C (n=6) e DH (n=4). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$ . Teste t-Student.

Ao analisarmos a expressão do *Ryr2*, observamos que as fêmeas e machos da prole DH apresentaram menor expressão do RNAm, cerca de 28% e 42% respectivamente, quando comparados aos seus controles (fêmeas  $C=0,9999 \pm 0,06445$   $DH=0,7771 \pm 0,06337$ ; machos  $C=1,000 \pm 0,08531$   $DH=0,7553 \pm 0,1038$ ) (Figura 21).

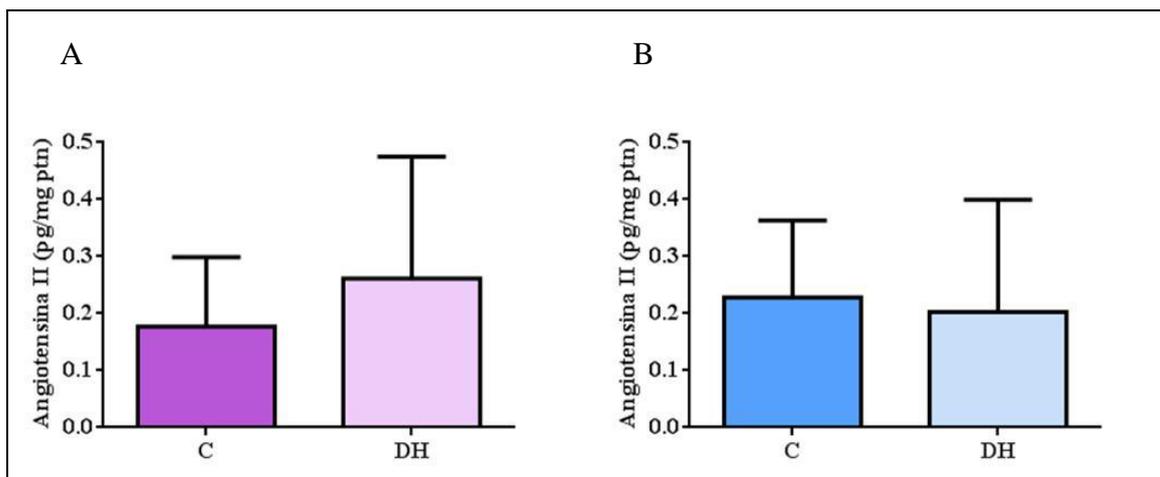


**Figura 21.** Expressão gênica de *Ryr2* na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Expressão gênica de *Ryr2* na parede livre do VE dos animais fêmeas das proles C (n=8) e DH (n=8). B) Expressão gênica de *Ryr2* na parede livre do VE dos animais machos das proles C (n=7) e DH(n=6). Dados expressos como média ± erro padrão da média, \*p<0,05. Teste t-Student.

#### 4.8 Dosagem de Angiotensina II na Parede Livre do Ventrículo Esquerdo

Com a finalidade de investigar se a dieta hiperlipídica das progenitoras influenciou nos níveis de Ang II no VE das proles, foi realizada extração e dosagem dessa proteína na parede livre do VE dos animais das proles.

A avaliação do conteúdo de Ang II na parede livre do VE das proles C e DH não demonstrou diferença significativa entre os grupos (fêmea C= 0,1774pg/mg ptn± 0,04; DH= 0,2615pg/mg ptn ±0,07, macho C= 0,2282 pg/mg ptn ± 0,04; DH= 0,2028 pg/mg ptn ± 0,06) (Figura 22).

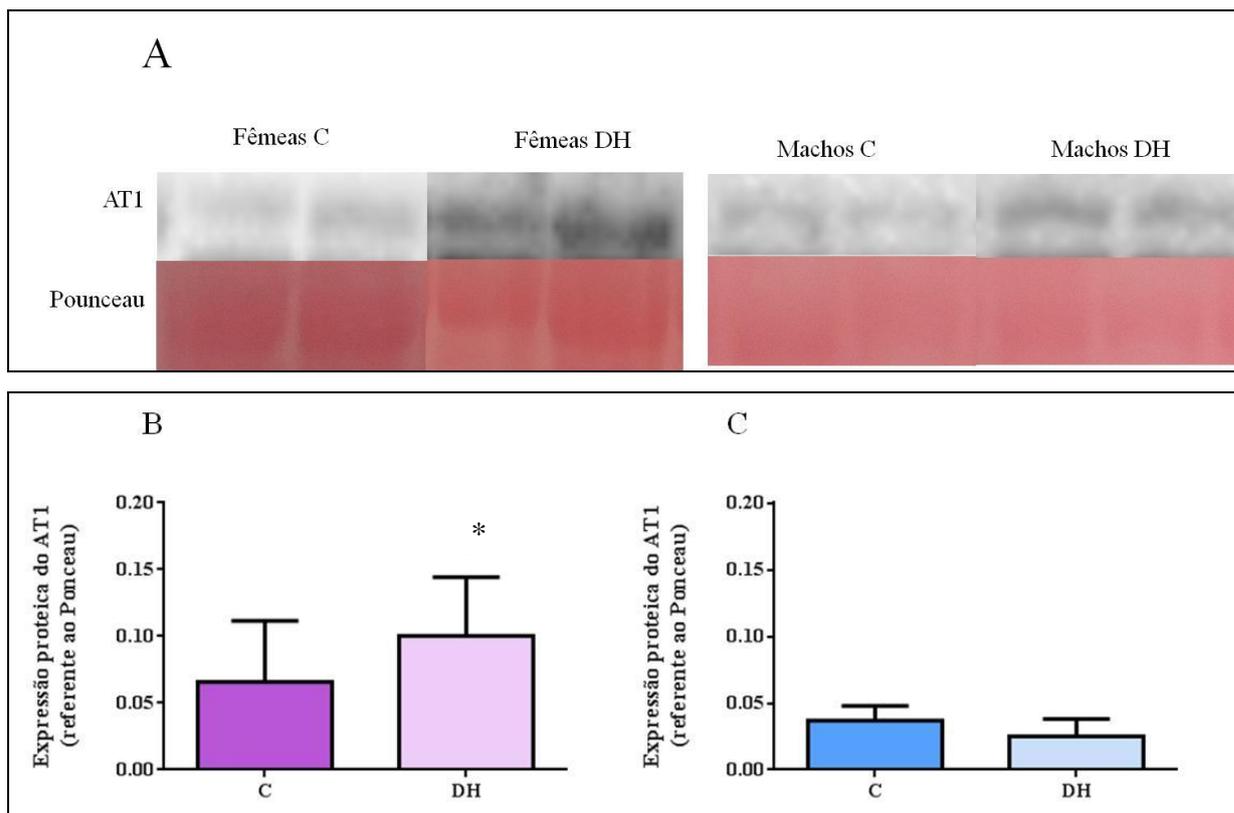


**Figura 22.** Dosagem de Angiotensina II na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Dosagem de Angiotensina II na parede livre do VE dos filhotes fêmeas das proles C (n=8) e DH (n=8). B) Dosagem de Angiotensina II na parede livre do VE dos filhotes machos das proles C (n=8) e DH (n=8). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.

#### 4.9 Avaliação da Expressão Protéica do Receptor AT1 na Parede Livre do Ventrículo Esquerdo

As análises da expressão protéica do receptor AT1 foram realizadas a partir de amostras do VE dos animais das proles através da técnica de *Western blotting*.

Ao analisarmos a expressão de AT1 no VE das fêmeas da prole DH, observamos aumento de, aproximadamente, 66% em comparação ao VE das fêmeas da prole C (fêmea C=  $0,06571 \pm 0,01733$ ; DH=  $0,1003 \pm 0,01665$ ). No entanto, ao compararmos os animais machos das proles C e DH, não observamos diferença significativa na expressão protéica de AT1 (macho C=  $0,0370 \pm 0,004158$ ; DH=  $0,0250 \pm 0,004971$ ) (Figura 23).



**Figura 23.** Expressão proteica do receptor AT1 na parede livre do VE das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Imagens da membrana de PVDF da expressão proteica do receptor AT1 na parede livre do VE dos filhotes fêmeas e machos das proles C e DH (fêmeas C=7; DH=7; machos C=7; DH=7). A coloração Ponceau foi utilizada para normalizar os dados. B) Análise densitométrica da expressão proteica do receptor AT1 na parede livre do VE dos filhotes fêmeas das proles C e DH. C) Análise densitométrica da expressão proteica do receptor AT1 na parede livre do VE dos filhotes machos das proles C e DH. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, \* $p < 0,05$ . Teste t-Student.

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados desse trabalho demonstram que o consumo materno de dieta hiperlipídica ocasionou, ao desmame (21 dias de idade), maior ganho de peso corporal, maior adiposidade, aumento no diâmetro dos cardiomiócitos da parede livre do ventrículo esquerdo (VE) dos animais machos e fêmeas da prole. Essa dieta materna também promoveu modificações moleculares de componentes envolvidos no processo contrátil do coração, alguns usados como marcadores de hipertrofia, como na expressão do RNAm de Nppn, das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  da cadeia pesada de miosina ( $\alpha$  e  $\beta$ -MHC), SERCA2a2 e Ryr2 na parede livre do VE dos animais da prole. Além disso, houve alteração na expressão proteica do receptor para angiotensina II (AT1) na parede livre do VE dos animais fêmeas da prole de progenitoras que receberam dieta hiperlipídica durante os períodos críticos do desenvolvimento.

O desenvolvimento de doenças crônicas são associadas ao estilo de vida dos indivíduos, como o tabagismo, o sedentarismo e a dieta (BARKER, 2007). Os desequilíbrios nutricionais maternos durante o período perinatal são fortemente associados ao aparecimento de comorbidades que caracterizam a síndrome metabólica, como resistência a insulina, hipertensão, dislipidemias e disfunções cardiovasculares (BARKER, 2007; MOURA & PASSOS, 2005). O consumo materno de dieta hiperlipídica e/ou hipercalórica antes da concepção, e durante o estágio fetal e pós natal pode desencadear programação metabólica na prole (SIMMONS, 2005; MINGRONE et al., 2008), e prejuízos de forma persistente (HALES & BARKER, 2011; ROSS & DESAI, 2013).

FRANCO e colaboradores (2012) observaram que a dieta materna hiperlipídica durante a gestação e lactação não alterou a massa corporal da prole ao nascimento. Contudo, no desmame (21 dias de idade), a massa corporal dos filhotes machos da prole estava maior. Outro trabalho demonstrou que o consumo materno de dieta hiperlipídica promoveu maior ganho de peso corporal a partir da 3<sup>o</sup> semana pós nascimento independente do sexo da prole (DESAI et al. 2014). Assim como observado por FRANCO e colaboradores, em nosso trabalho, o consumo materno de dieta hiperlipídica não alterou a massa corporal dos filhotes fêmeas e machos ao nascimento, porém, ao acompanhar o ganho de peso corporal, observamos que as fêmeas começaram a ter maior massa corporal a partir da 18<sup>o</sup> dia de vida, e os machos a partir da 15<sup>o</sup> dia de vida. Sendo que o aumento de peso corporal persistiu até o

dia do desmame (aos 21 dias de idade). Esse aumento no ganho de peso corporal na prole, pode ser consequência de alterações na composição do leite materno (aumento nos níveis de triacilglicerol e redução nas taxas de colesterol), como foi verificado anteriormente (FRANCO et al., 2012).

O aumento na massa corporal pode ser atribuído ao aumento da adiposidade, observado através do aumento dos reservatórios adiposos brancos. Os nossos resultados demonstraram que o consumo materno de dieta hiperlipídica promoveu maior peso relativo do tecido adiposo branco retroperitoneal, inguinal e perigonadal. Nas fêmeas, o tecido adiposo branco retroperitoneal foi o reservatório que mais aumentou, seguido do perigonadal; Ao passo que, nos animais machos o reservatório que mais variou foi o tecido adiposo perigonadal, seguido do retroperitoneal.

A obesidade é caracterizada pelo desequilíbrio entre a ingestão alimentar e o gasto energético, e resulta no excesso de tecido adiposo (JUNG & CHOI, 2014), e possíveis alterações cardiovasculares (MITTENDORFER, 2011). O tecido adiposo branco apresenta importante função no metabolismo energético, pois os adipócitos secretam adipocinas que participam de diversos mecanismos fisiológicos, como o catabolismo lipídico (RAJALA & SCHERER 2003; JUGE-AUBRY et al., 2005a; GUILHERME et al., 2008b), regulação do apetite, secreção e sensibilidade a insulina (AHIMA et al., 2005; NEELS et al., 2004; CHRISTIAENS & LIJNEN 2010). A produção de leptina é diretamente proporcional ao conteúdo de massa adiposa branca tanto em humanos quanto em roedores (AHIMA, 2011; COSIDINE et al., 1996). Portanto, a obesidade está associada a hiperleptinemia, além de resistência central deste hormônio, aumento da ingestão alimentar e prejuízo no metabolismo energético (FRANCO et al., 2012). Essas condições supracitadas já foram relacionadas com o aumento do risco do comprometimento cardíaco (WALLACE et al., 2001).

Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o consumo materno de dieta hiperlipídica induziu maior peso corporal, adiposidade, hiperleptinemia, aumento da massa cardíaca em fêmeas e machos da prole ao desmame. Além disso, foi observado prejuízo na função sistólica (diminuição da fração de ejeção e aumento do volume sistólico final) desses animais aos 30 dias de idade.

De acordo com WILLETT (1994), o consumo de dieta rica em gordura pode aumentar substancialmente o risco de mortalidade por alterações cardiovasculares, como a hipertensão, disfunção endotelial (SAMUELSSON et al. 2008), remodelamento cardíaco (BUETTNER et

al., 200) e fibrose intersticial (PINHEIRO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; LEOPOLDO et al., 2010).

A hipertrofia cardíaca é um tipo de remodelamento, na qual é caracterizada pelo espessamento da parede do coração, aumento da massa cardíaca e diminuição no tamanho das câmaras do coração, especialmente do ventrículo esquerdo (MARON et al., 1981; YAMAGUSHI, et al., 1979). Tal condição predispõe a redução na fração de ejeção pelo VE (MARON, 1981; YAMAGUSHI, 1979; HENRY et al., 1973) e, conseqüentemente, ao prejuízo na função do coração (KAVAZIS et al., 2015).

Já foi descrito que o consumo materno de dieta rica em açúcar e gordura promoveu a obesidade materna em camundongos, além do aumento da massa cardíaca nos animais machos da prole, observada na 8<sup>o</sup> semana de vida (FERNANDEZ-TWINN et al., 2012), e aumento na concentração sérica de insulina com resistência insulínica e hipertrofia cardíaca em ratos (SAMUELSSON et al., 2008). Enquanto que BLACKMORE e colaboradores (2014) verificaram que a dieta materna rica em lipídeos e açúcar não alterava a massa corporal da prole, no entanto verificaram hipertrofia ventricular esquerda tanto ao desmame quanto na fase adulta da prole de camundongos. Esses trabalhos demonstram que independente de alterações na massa corporal na prole, os modelos de dieta materna induzem hipertrofia cardíaca. Em nosso modelo, o consumo materno de dieta hiperlipídica foi capaz de promover aumento na massa cardíaca e no diâmetro dos cardiomiócitos da parede livre do VE tanto nas fêmeas quanto nos machos da prole de ratas ao desmame. Contudo, não observamos alterações no diâmetro dos cardiomiócitos da parede livre do VD da prole DH. Essas características encontradas no coração das fêmeas e machos da prole DH, indicam hipertrofia ventricular esquerda.

Os miócitos representam apenas 30% do número total de células miocárdicas, sendo que em sua maioria o tecido cardíaco é formado por células musculares lisas, endoteliais, fibroblastos e células nervosas (MANABE et al., 2002). Além disso, há uma complexa e organizada rede de colágeno (matriz extracelular) que sustenta a celularidade miocárdica e modula tanto a função diastólica quanto a sistólica (WEBER et al., 1999). Os estímulos hipertróficos, quando mantidos, podem desencadear mecanismos patológicos que levam a proliferação dos fibroblastos e conseqüente aumento da matriz extracelular (fibrose intersticial), apoptose dos cardiomiócitos, e que por sua vez resultam na falência cardíaca (WEBER et al., 2000; MORISCO et al., 2003; WAKATSUKI et al., 2004). Sabendo disso, nesse trabalho avaliamos a presença de fibrose cardíaca na parede livre do VE dos animais da

prole DH através de cortes histológicos corados com Picrossírius. Contudo, não observamos diferença significativa entre as proles C e DH.

Os dados já discutidos são interessantes, pois mostram um fenótipo parecido entre fêmeas e machos da prole DH. SENGUPTA (2013) correlacionou a idade de vida de ratos de laboratório com as fases de um ser humano. Este pesquisador relatou que as ratas fêmeas atingem a puberdade entre 32° a 34° dia pós nascimento, enquanto que os machos atingem entre 45° a 48° dia de vida. Porém a maturidade sexual ocorre somente após a 8° semana de vida. Sendo assim, aos 21 dias de idade (desmame), roedores não apresentam produção hormonal dos esteróides sexuais, como o estrógeno que é sintetizado por uma via comum utilizando acetato e colesterol, na qual forma 17 $\beta$ -estradiol. Este hormônio apresenta diversas funções de proteção no sistema cardiovascular sendo através do seu efeito direto sobre o coração, a parede vascular ou sobre o metabolismo lipídico (STEVENSON et al., 2000; WALSH et al., 1991). Já foi descrito que o estrogênio atenua os efeitos de agentes vasoconstritores, como as espécies reativas de oxigênio, angiotensina II, e endotelina-1 (GALLAGHER et al., 1999; PROUDLER et al., 1995). SIMON (2001) considerou que mulheres na fase pós-menopáusia possuem maiores riscos de apresentarem comprometimento no sistema cardiovascular, como insuficiência cardíaca congestiva (ICC), infarto do miocárdio, doenças coronárias e hipertrofia ventricular esquerda.

Na caracterização da hipertrofia cardíaca, já foram descritos alterações na expressão gênica dos peptídeos natriuréticos atrial e cerebral (Nppn e Nppb, respectivamente) (ISO et al, 1997; REDDY, 1997; SAKAI et al, 2000), e das isoformas  $\alpha$  e  $\beta$  da cadeia pesada de miosina ( $\alpha$ -MHC e  $\beta$ -MHC) (OLIVEIRA JUNIOR et al. 2010). Além disso, ZAK em 1995, relatou que corações que apresentam falência secundária à hipertrofia, apresentam diminuição dos níveis do RNAm de importantes componentes do retículo sarcoplasmático, como o receptor Ryr2, fosfolambam e SERCA2a (COHN et al. 2000).

FERNANDEZ-TWINN e colaboradores (2012) demonstraram que a obesidade materna desencadeou aumento na expressão gênica de Nppb, mas não de Nppn no coração da prole de camundongos machos com 8 semanas de vida. Além disso, nesse mesmo trabalho constataram aumento na razão entre as isoformas  $\beta$  e  $\alpha$  da cadeia pesada de miosina nesses mesmos animais. Os resultados descritos por FERNANDEZ-TWINN e colaboradores (2012) corroboram com diversos trabalhos que sugerem que o perfil obesogênico materno durante o período perinatal está intimamente ligado a desvantagem cardíaca na progênie (KRISHNAVENI et al., 2010; LEE et al., 2007; MILLS et al., 2010).

Os nossos resultados demonstram que o consumo materno de dieta hiperlipídica levou ao aumento da expressão do RNAm de *Nppn* tanto na parede livre do VE de fêmeas quanto de machos da prole de ratos ao desmame; redução na expressão gênica da isoforma  $\alpha$  da cadeia pesada de miosina ( $\alpha$ -MHC) somente nos machos; e redução na expressão de RNAm de *SERCA2a2* e *Ryr2* em ambos os sexos da prole. Essas alterações moleculares já foram descritas na hipertrofia cardíaca (CLARK et al. 1994). Por outro lado, em nosso modelo experimental, observamos redução na expressão gênica da isoforma  $\beta$  da cadeia pesada de miosina ( $\beta$ -MHC) nesses mesmos filhotes. Esse dado é interessante já que no processo hipertrófico, com frequência, a expressão do RNAm de  $\beta$ -MHC está aumentada (CHIEN et al., 1991; IZUMO et al., 1988).

Uma das causas mais prevalentes de sobrecarga funcional para o coração é a hipertensão arterial. Inicialmente, a hipertrofia cardíaca é uma adaptação fisiológica do coração contra o aumento da carga de trabalho para manter a função cardíaca normal. No entanto, quando sustentada, a cardiomiopatia hipertrófica pode aumentar o risco de arritmias, morte súbita (KOWEY et al., 1984; MCKENNA et al., 1984; SAVAGE et al., 1979), insuficiência cardíaca (BERNARDO et al., 2010; LEVY et al., 2002), angina e infarto do miocárdio (RUBIN et al., 1979; PITCHER et al., 1980).

Além do estresse ocasionado pela sobrecarga cardíaca, diversos fatores neuro-humorais promovem a hipertrofia cardíaca através da ativação de receptores acoplados à proteína G como, por exemplo, Ang II, endotelinas e catecolaminas (HEINEKE & MOLKENTIN, 2006), os quais atuam de forma parácrina e autócrina no tecido cardíaco. Esses fatores agem sobre os cardiomiócitos, células inflamatórias e os próprios fibroblastos, e contribuem para o remodelamento cardíaco (ZEISBERG & KALLURI, 2010).

WANG (2005) relatou que o sistema renina-angiotensina pode desencadear alterações na estrutura e função do coração, levando ao desenvolvimento e a progressão da doença cardiovascular. Todos os componentes do sistema renina-angiotensina são expressos localmente no coração, e a sinalização sustentada desse sistema está associada à hipertensão em indivíduos obesos através da super atividade de Ang II, e estas respostas são acompanhadas de fibrose e hipertrofia miocárdica (CROWLEY et al., 2006; KUMAR et al., 2009).

Neste trabalho tentamos correlacionar a hipertrofia observada com alterações em componentes do sistema RAS expressos no coração da prole.

Ao dosarmos Ang II da parede livre do VE das proles, não observamos alterações significativas nas taxas de Ang II nos animais fêmeas e machos da prole de ratas que receberam dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação.

No entanto, em nosso modelo experimental, o consumo materno de dieta hiperlipídica aumentou a expressão proteica de AT1 no VE de fêmeas da prole ao desmame, mas o mesmo não foi observado nos machos. Embora, machos e fêmeas da prole DH apresentem o mesmo fenótipo de hipertrofia ventricular esquerda, acreditamos que os mesmos apresentam diferentes mecanismos de sinalização que levam a hipertrofia da parede livre do VE. A alteração na expressão do receptor AT1 encontrada nas fêmeas da prole DH sugere que o SRA possa estar envolvido com a hipertrofia do VE, porém é importante investigar a expressão das proteínas da sua via de sinalização para elucidar os mecanismos envolvidos nesse processo.

Já nos machos da prole, outros mecanismos podem estar envolvidos com a promoção da hipertrofia ventricular esquerda, como por exemplo, a atividade da insulina pela via MAPK. FERNANDEZ-TWINN e colaboradores (2012) sugeriram que o consumo materno de dieta rica em açúcar e gordura promoveu aumento da insulina plasmática em jejum associado com resistência à insulina, além da redução na expressão do receptor de insulina (IR- $\beta$ ) nos ventrículos dos camundongos machos da prole. No entanto, nesse mesmo trabalho, os animais da prole de progenitoras obesas apresentaram aumento na expressão proteica de MAPK, sugerindo que a via de sinalização da insulina estava estimulada. POORNIMA e colaboradores (2006) associaram a hiperinsulinemia com o processo hipertrófico do coração como consequência do aumento das ações mitógenas. A proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) é um regulador importante da fosforilação de ERK1/2, que por sua vez participa da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, além de promover a hipertrofia cardíaca (MOLKENTIN & ROBBINS, 2009).

Por outro lado, a superexpressão do  $\beta$ 1-AR também estar associada ao surgimento de hipertrofia dos cardiomiócitos do VE encontrada nos machos da prole. KLEIN & OJAMAA, 2001 relataram que o hormônio triiodotironina (T3) é capaz de aumentar a sensibilidade das células cardíacas às catecolaminas, pois este hormônio induz maior expressão dos receptores  $\beta$ 1-adrenérgicos (BASSO et al., 1991) no tecido cardíaco, e de forma indireta promove o aumento do inotropismo, cronotropismo e, conseqüentemente aumento do débito cardíaco (KLEIN & OJAMAA, 2001). Nosso grupo de pesquisa, em resultados anteriores, demonstraram que a dieta materna hiperlipídica induziu aumento da expressão proteica do

receptor para HT, do tipo TR $\alpha$ 1, em machos da prole aos 21 dias de idade (ZECA, 2015). Portanto, é necessário desenvolver novos estudos a fim de desvendar quais mecanismos estariam estimulando a hipertrofia ventricular esquerda nesses animais.

As alterações observadas nesse estudo, assim como o surgimento de algumas doenças crônicas e degenerativas não transmissíveis podem ser caracterizados como consequência da programação metabólica proveniente pelos hábitos alimentares maternos. Em geral, o consumo materno de alimentos ricos em lipídeos de forma exagerada tem predisposto a maiores riscos de defeitos congênitos, disfunções metabólicas, obesidade e doenças cardiovasculares na prole. Sabendo disso, torna-se necessário ampliar o conhecimento do impacto da nutrição materna sobre a prole, e assim desenvolver medidas terapêuticas e preventivas dos distúrbios cardiovasculares.

## 6. CONCLUSÃO

Os nossos resultados demonstram que o consumo materno de dieta hiperlipídica durante a fase de gestação e lactação, promove aumento da massa corporal, maior adiposidade, aumento da massa cardíaca e hipertrofia ventricular esquerda nas fêmeas e machos da prole ao desmame, além de mudanças na expressão gênica de Nppn,  $\alpha$ -MHC,  $\beta$ -MHC, Serca2a2 e Ryr2, os quais são importantes marcadores de hipertrofia cardíaca e atuam no processo de contração do miocárdio. Essa dieta materna contribui para o aumento na expressão do receptor para Ang II (AT1) nos filhotes fêmeas da prole, o que não é observado nos filhotes machos. Desta forma, este trabalho demonstra que o consumo materno de dieta hiperlipídica é capaz de desencadear hipertrofia no coração da prole, no entanto estes mesmos resultados também sugerem que distintos mecanismos estabelecem o remodelamento cardíaco em machos e fêmeas.

Por fim, sugere-se que o consumo materno de dieta hiperlipídica é capaz de desencadear alterações no SRA, e este por sua vez esteja envolvido com o desenvolvimento da hipertrofia ventricular esquerda somente nos filhotes fêmeas da prole.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS TD, YANOWITZ FG, FISHER AG, RIDGES JD, LOVELL K, AND PRYOR TA. Noninvasive evaluation of exercise training in college-age men. *Circulation*. V. 64, p. 958–965, 1981.
- AGARWAL D, HAQUE M, SRIRAMULA S, MARIAPPAN N, PARIAUT R, FRANCIS J. Role of proinflammatory cytokines and redox homeostasis in exercise-induced delayed progression of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. V.54, p. 1393±1400, 2009.
- AHIMA RS, LAZAR MA. Adipokines and the peripheral and neural control of energy balance. *Mol Endocrinol*. V.22, p.1023-31, 2008.
- AHIMA RS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Obesity (Silver Spring)*. Aug;14 Suppl. V.5, p.242S-249S, 2006.
- AHIMA, R. S. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab*, AHIMA, R. S. Central actions of adipocyte hormones. *Trends Endocrinol Metab*, v.16, p. 307-313, 2005.
- AKHTER SA, SKAER CA, KYPSON AP, MCDONALD PH, PEPPEL KC, GLOWER DD, Lefkowitz RJ and Koch WJ. Restoration of  $\beta$ -adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *PNAS*. V. 94, p. 12100-12105, 1997.
- ALLO SN, MCDERMOTT PJ, CARL LL, MORGAN HE. Phorbol ester stimulation of protein kinase C activity and ribosomal DNA transcription. Role in hypertrophic growth of cultured cardiomyocytes. *The Journal of biological chemistry*. V. 266, p. 22003–22009, 1991.
- ARBUSTINI E, DIEGOLI M, FASANI R, GRASSO M, MORBINI P, BANCHIERI N, et al. Mitochondrial DNA mutations and mitochondrial abnormalities in dilated cardiomyopathy. *The American journal of pathology*. V. 153, p. 1501–1510, 1998.
- ARMITAGE JA, LAKASING L, TAYLOR PD, BALACHANDRAN AA, JENSEN RI, DEKOU V, et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J. Physiol*. V.565, p.171–184, 2005.

ASHRAFIAN H, FRENNEAUX MP, OPIE LH. METABOLIC MECHANISMS IN HEARTFAILURE. CIRCULATION. V.116, P. 434-48, 2007.

ASHRAFIAN H, FRENNEAUX MP. Metabolic modulation in heart failure: the coming of age. Cardiovasc Drugs Ther. V.21, p.5–7, 2007.

AYALON N, GOPAL DM, MOONEY DM, SIMONETTI JS, GROSSMAN JR, DWIVEDIA, DONOHUE C, PEREZ AJ, DOWNING J, GOKCE N, MILLER EJ, LIANG CS, APROVIAN CM, COLUCCI WS, HO JE. Preclinical left ventricular diastolic dysfunction in metabolic syndrome. Am J Cardiol. V.114, p.838–842, 2014.

BAKER KM, ACETO JF. Angiotensin II stimulation of protein synthesis and cell growth in chick heart cells. Am J Physiol. V.259, p. H610-H618, 1990.

BAKER KM, BOOZ GW. DOSTAL DE. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. Annu Rev Physiol. V.54, p.227-241, 1992.

BARKER DJ, OSMOND C, FORSEN TJ, KAJANTIE E, ERIKSSON JG. Maternal and social origins of hypertension. Hypertension. V.50, p.565–571, 2007.

BARROS RA, OKOSHI MP, CICOGNA AC. Via beta-adrenérgica em corações normais e hipertrofiados. Arq Bras Cardiol. V.72, p. 641-8, 1999.

BARTON M, CARMONA R, MORAWIETZ H, D'USCIO LV, GOETTSCHE W, HILLEN H, HAUDENSCHILD CC, KRIEGER JE, MÜNTER K, LATTMANN T, LÜSCHER TF, SHAW S. Obesity is associated with tissue-specific activation of renal angiotensin-converting enzyme in vivo: evidence for a regulatory role of endothelin. Hypertension. V.35, p.329-360, 2000.

BEISVAG V, KEMI OJ, ARBO I, LOENNECHEN JP, WISLOFF U, LANGAAS M, SANDVIK AK, ELLINQSEN O. Pathological and physiological hypertrophies are regulated by distinct gene programs. Eur J Cardiovasc Prev Rehabil. V.16, p. 690- 697, 2009.

BELL CG, WALLEY AJ, FROGUEL P. The genetics of human obesity. Nat.Rev. Genet, v. 6, p. 221–23, 2005.

BERK BC, VEKSHTEIN V, GORDON HM, TSUDA T. Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. Hypertension. V.13, p. 305-314, 1989.

BERNARDO BC, WEEKS KL, PRETORIUS L, MCMULLEN JR. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: experimental findings and therapeutic strategies. *Pharmacol Ther.* V. 128, p. 191-227, 2010.

BJORBAEK C, KAHN BB. Leptin signaling in the central nervous system and the periphery. *Recent Prog Horm Res*, v.59, p. 305–33, 2004.

BLACKMORE HL, NIU Y, FERNANDEZ- TWINN, TARRY- ADKINS JL, GIUSSANI DA, OZANNE SE. Maternal Diet-induced Obesity Programs Cardiovascular Dysfunction in Adult Male Mouse Offspring Independent of Current Body Weight. *Endocrinology.* V. 155, p. 3970- 3980, 2014.

BOTELHO LM, BLOCK CH, KHOSLA MC, SANTOS RA. PLASMA ANGIOTENSIN(1-7)IMMUNOREACTIVITY IS INCREASED BY SALT LOAD, WATER DEPRIVATION, AND HEMORRHAGE.PEPTIDES. V. 15, P. 723-729, 1994.

BOURET SG. Neurodevelopmental Actions of Leptin. *Brain research.* V. 1350, p. 2-9, 2010.

BRAVO P.E., MORSE S., BORNE D.M., AGUILAR E.A., REISIN E. Leptin and hypertension in obesity. *Vascular Health Risk Management.* V. 2, p. 163–169, 2006.

BRAY, GA. Medical consequences of obesity. *J clinical endocrinol metabolism*, V. 89, p. 2583- 2589, 2004.

BRIFFA JF, MCAINCH AJ, ROMANO T, WLODEK ME, HRYCIW DH. Leptin in pregnancy and development: a contributor to adulthood disease? *Am J Physiol Endocrinol Metab.* V. 308, p. E335–E350, 2015.

BRUIN JE, KELLENBERGER LD, GERSTEIN HC, MORRISON KM, HOLLOWAY AC. Fetal and neonatal nicotine exposure and postnatal glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure. *J Endocrinol.* V.194, p.171–178, 2007.

BUETTNER R, SCHÖLMEIRICH J, BOLLHEIMER LC.High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* V.15, p.798-808, 2007.

BURDGE GC, SLATER-JEFFERIES JL, TORRENS C, PHILLIPS ES, HANSON MA, LILLYCROP KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces

altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr.* V.97, p.435–9, 2007.

CAMBONIE G, COMTE B, ZYDORCZYK C, NTIMBANE T, GERMAIN N, LE NL, PLADYS P, GAUTHIER C, LAHAIE I, ABRAN D, LAVOIE JC, NUYT AM. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol.* V.292, p.R1236–R1245, 2007.

CARDOZO ER, NEFF LM, BROCKS ME, et al. Infertility patients' knowledge of the effects of obesity on reproductive health outcomes. *American journal of obstetrics and gynecology.* V.207, p.509.e1-509.e10, 2012.

CARÈ A, CATALUCCI D, FELICETTI F, BONCI D, ADDARIO A, GALLO P, BANG ML, SEGNALINI P, GU Y, DALTON ND, ELIA L, LATRONICO MV, et al. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med.* V. 13, p. 613–618, 2007.

CARREÓN-TORRES, E.; DÍAZ-DÍAZ, E.; GUARNER-LANS, V. Angiotensin II and 1-7 during aging in Metabolic Syndrome rats. Expression of AT1, AT2 and Mas receptors in abdominal white adipose tissue. *Peptides.* V. 57, p. 101-8, 2014.

CASSIS LA, LYNCH KR, PEACH MJ. Localization of angiotensinogen messenger RNA in rat aorta. *Circ Res.* V.62, p.1259-62, 1988.

CATALANO PM, EHRENBERG HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *Bjog.* V.113, p. 1126–1133, 2006.

CHAAR LJ, ALVES TP, BATISTA JUNIOR AM, MICHELINI LC. Early Training-Induced Reduction of Angiotensinogen in Autonomic Areas-The Main Effect of Exercise on Brain Renin-Angiotensin System in Hypertensive Rats. *PLoS ONE.* V.10, p. e0137395, 2015.

CHAN SH, TAI MH, LI CY, CHAN JY. Reduction in molecular synthesis or enzyme activity of superoxide dismutases and catalase contributes to oxidative stress and neurogenic hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Free Radic. Biol. Med.* V.40, p. 2028–2039, 2006.

CHEN H, SIMAR D, MORRIS MJ. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS One.* V.4, p. e6259, 2009.

CHENG Y, JI R, YUE J, YANG J, LIU X, CHEN H, DEAN DB, ZHANG C. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am. J. Pathol.* V.170, p. 1831-1840, 2007.

CHESS DJ, STANLEY WC. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc Res.* V.79, p.269–278, 2008.

CHESS DJ, STANLEY WC. Role of diet and fuel overabundance in the development and progression of heart failure. *Cardiovasc Res.* V.79, p.269–278, 2008.

CHIEN KR, KNOWLTON KU, ZHU H, et al. Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiological response. *FASEB J.* V.5, p. 3037-46, 1991.

CHRISTIAENS V, LIJNEN HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* V.318, p.2-9, 2010.

CLARK WA, RUDNICK SJ, ANDERSEN LC, LAPRES JJ. Myosin heavy chain synthesis is independently regulated in hypertrophy and atrophy of isolated adult cardiac myocytes. *J Biol Chem.* V. 269, p. 25562–25569, 1994.

CLEUTJENS JPM. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res.* V, 32, p. 816-21, 1996.

COELHO MS, LOPES KL, FREITAS RDE A, DE OLIVEIRA-SALES EB, BERGASMASCHI CT, CAMPOS RR, CASARINI DE, CARMONA AK, ARAÚJO MDA S, HEIMANN JC, DOLNIKOFF MS. High-sucrose intake in rats is associated with increased ACE2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. *Regul Pept.* V.162, p.61–67, 2010.

COHN JN, FERRARI R, SHARPE N. Cardiac remodeling-concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. *J Am Coll Cardiol.* V.35, p. 569-82, 2000.

CONSIDINE RV, SINHA MK, HEIMAN ML, et al. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med.* V.334, p. 292–5, 1996.  
controversies. *Trends Endocrinol Metab*, v. 16, p. 390-394, 2005.

CORDEIRO A, DE SOUZA LL, OLIVEIRA LS, FAUSTINO LC, SANTIAGO LA, BLOISE FF, ORTIGA-CARVALHO TM, ALMEIDA NA, PAZOS-MOURA CC. Thyroid hormone

regulation of Sirtuin 1 expression and implications to integrated responses in fasted mice. *Journal of Endocrinology*, V. 216, n. 2, p. 181-193, 2013.

CORRAL-DEBRINSKI M, SHOFFNER JM, LOTT MT, WALLACE DC. Association of mitochondrial DNA damage with aging and coronary atherosclerotic heart disease. *Mutation research*. V. 275, p. 169–180, 1992.

COSTA-SILVA JH, SILVA PA, PEDI N, LUZARDO R, EINICKER-LAMAS M., LARA LS, et al. Chronic undernutrition alters renal active Na<sup>+</sup> transport in young rats: potential hidden basis for pathophysiological alterations in adulthood? *Eur. J. Nutr.* V.48, p. 437–445, 2009.

CRANDALL DL, ARMELLINO DC, BUSLER DE, MCHENDRY-RINDE B, KRAL JG. Angiotensin II receptors in human preadipocytes: role in cell cycle regulation. *Endocrinology*. V.140, p.154–158, 1999.

CROWLEY SD, GURLEY SB, HERRERA MJ, RUIZ P, GRIFFITHS R, KUMAR AP, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. V.103, p. 17985±17990, 2006.

CROWLEY VE, YEO GS, O'RAHILLY S. OBESITY THERAPY: ALTERING THE ENERGY INTAKE-AND-EXPENDITURE BALANCE SHEET. *NAT REV DRUG DISCOV*, V. 1, N. 4, P. 276-86, 2002.

DAI DF, HSIEH EJ, LIU Y, CHEN T, BEYER RP, CHIN MT, et al. Mitochondrial proteome remodelling in pressure overload-induced heart failure: the role of mitochondrial oxidative stress. *Cardiovascular research*. V.93, p.79–88, 2012.

DAI DF, JOHNSON SC, VILLARIN JJ, CHIN MT, NIEVES-CINTRON M, CHEN T, et al. Mitochondrial oxidative stress mediates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and Galphaq overexpression-induced heart failure. *Circulation research*. V. 108, p. 837–846, 2011.

DASSOULI A, SULPICE J-C, ROUX S, et al. Stretch-induced inositol triphosphate and tetrakisphosphate production in rat cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*. V.25, p. 973-82, 1993.

DE BOO HA, HARDING JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J ObstetGynaecol*. V.46, p. 4-14, 2006.

DE BRITO ALVES J. L., DE OLIVEIRA J. M., FERREIRA D. J., DE BARROS M. A., NOGUEIRA V. O., ALVES D. S., ET AL. Maternal protein restriction induced-hypertension is associated to oxidative disruption at transcriptional and functional levels in the medulla oblongata. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* V. 43, p.1177-1184, 2016

DE BRITO ALVES JL, NOGUEIRA VO, DE OLIVEIRA GB, DA SILVA GS, WANDERLEY AG, LEANDRO CG, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *Br. J. Nutr.* V.111, p.606–615, 2014.

DE MOURA EG, PASSOS MC. Neonatal programming of body weight regulation and energetic metabolism. *Biosci Rep.* V. 25, p.251-69, 2005.

DESAI M, JELLYMAN JK, HAN G. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J ObstetGynecol.* V. 211, p. 237.e1-13, 2014.

developmental origins of cardiovascular disease. *J Physiol.* V. 19, p. 4709- 4720, 2008.

DHALLA AK, HILL MF, SINGAL PK. Role of oxidative stress in transition of hypertrophy to heart failure. *J Am Coll Cardiol.* V. 28, p. 506–514, 1996.

DIEP QN, EL MABROUK M, COHN JS, ENDEMANN D, AMIRI F, VIRDIS A, NEVES MF, SCHIFFRIN EL. Structure, endothelial function, cell growth, and inflammation in blood vessels of angiotensin II-infused rats: role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Circulation.* V. 105, p. 2296-302, 2002.

DOENST T, PYTEL G, SCHREPPER A, AMORIM P, FARBER G, SHINGU Y, et al. Decreased rates of substrate oxidation ex vivo predict the onset of heart failure and contractile dysfunction in rats with pressure overload. *Cardiovascular research.* V. 86, p. 461–470, 2010.

DRAKE AJ, REYNOLDS RM. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. *Reproduction*, v. 140, p. 387–398, 2010.

DUBEY RK, ROY A, OVERBECK HW. Culture of renal arteriolar smooth muscle cells: mitogenic responses to angiotensin II. *Circ Res.* V.71, p. 1143-1152, 1992.

DZAU VJ, PRATT RE. Cardiac, vascular and intrarenal renin angiotensin system in normal physiology and disease. In: Robertson JIS, Nicholis MG, eds. *The Renin-Angiotensin System.* London, England: Gower Medical Publishing. V.42, p.1-42, 1993.

ELAHI MM, CAGAMPANG FR, MUKHTAR D, ANTHONY FW, OHRI SK, HANSON MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr.* V. 102, p. 514–519, 2009.

ENGELHARDT, S, HEIN L, WIESMAN F, LOHSE MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in  $\beta$ 1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* V. 96, p. 7059 – 7064, 1999.

ESSICK EE, SAM F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. *Oxid. Med. Cell Longev.* V. 3, p. 168–177, 2010.

experimental study. *Circulation.* V.65, p. 1446-50, 1982.

FAGARD RH. Impact of different sports and training on cardiac structure and function. *CardiolClin.* V. 15, p. 397–412, 1997.

FAGUNDES AT, MOURA EG, PASSOS MC, SANTOS-SILVA AP, DE OLIVEIRA E, TREVENZOLI IH, CASIMIRO-LOPES G, NOGUEIRA-NETO JF, LISBOA PC. Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation. *Horm Metab Res.* V.41, p.866-73, 2009.

FALCÃO-TEBAS F, BENTO-SANTOS A, FIDALGO MA, DE ALMEIDA MB, DOS SANTOS JA, LOPES DE SOUZA S, et al. Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. *Br. J. Nutr.* V. 107, p. 372–377, 2012.

FAN L, LINDSLEY SR, COMSTOCK SM, et al. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. *Int J Obes (Lond).* V. 37, p. 254–262, 2013.

FAN L, LINDSLEY SR, COMSTOCK SM, et al. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. *Int J Obes (Lond).* V.37, p. 254–262, 2013.

FELIX JVC, MICHELINI LC. Training-induced pressure fall in spontaneously hypertensive rats is associated with reduced angiotensinogen mRNA expression within the nucleus tractus solitarii. *Hypertension.* V.50, p. 780±785, 2007.

FEREZOU-VIALA J, ROY AF, SEROUGNE C, et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. V. 293, p. R1056–R1062, 2007.

FERNANDEZ-TWINN DS, BLACKMORE HL, SIGGENS L, GIUSSANI DA, CROSS CM, FOO R, OZANNE SE. The Programming of Cardiac Hypertrophy in the Offspring by Maternal Obesity Is Associated with Hyperinsulinemia, AKT, ERK, and mTOR Activation. *Endocrinology*. V. 153, p. 5961–5971, 2012.

FERREIRA DS, LIU Y, FERNANDES MP, LAGRANHA CJ. Perinatal low-protein diet alters brainstem antioxidant metabolism in adult offspring. *Nutr Neurosci*. V. 19, p. 369-375, 2016.

FIDALGO M., FALCÃO-TEBAS F., BENTO-SANTOS A., DE OLIVEIRA E., NOGUEIRA-NETO J. F., DE MOURA E. G., et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. *Br. J. Nutr*. V. 109, p. 449–456, 2013.

FILIPOWICZ, W., BHATTACHARYYA, S.N., SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet*. V.9, p.102-114, 2008.

FITZSIMONS KJ, MODDER J, GREER IA. Obesity in pregnancy: risks and management. *Obstetric Medicine*. V. 2, p. 52–62, 2009.

FLIER JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. V.23, p. 116:337–50, 2004.

FORSÉN T, ERIKSSON JG, TUOMILEHTO J, TERAMO K, OSMOND C, BARKER DJ. Mother's weight in pregnancy and coronary heart disease in a cohort of Finnish men: Follow up study. *BMJ*. V.315, p.837–840, 1997.

FRANCIS GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med*. V.110, p. 37S-46S, 2001.

FRANCO JG, FERNANDES TP, ROCHA CPD, CALVIÑO C, PAZOSMOURA CC, LISBOA PC, MOURA EG, TREVENZOLI IH. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *J Physiol*, v. 590, n.21, p. 5503–5518, 2012.

FURUKAWA S, FUJITA T, SHIMABUKURO M, IWAKI M, YAMADA Y, NAKAJIMA Y, NAKAYAMA O, MAKISHIMA M, MATSUDA M, SHIMOMURA I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*, V. 114, p.1752–1761, 2004.

GAASCH WH. Left ventricular radius to wall thickness ratio. *Am J Cardiol*, V 43, p.1189-1194, 1979.

GALLAGHER PE, et al. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzyme mRNA. *Hypertension*. V. 33, n. II, p. 323–328, 1999.

GARNIER A, FORTIN D, DELOMENIE C, MOMKEN I, VEKSLER V, VENTURA-CLAPIER R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *The Journal of physiology*. V.551, p.491–501, 2003.

GARRISON JC, PEACH MJ. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Pergamon Press, Inc. p.749-763, 1990.

GEISTERFER AAT, PEACH MJ, OWENS GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*. V.62, p. 749-756, 1988.

GHOSH P, BITSANIS D, GHEBREMESKEL K, CRAWFORD MA, POSTON L. Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. *J Physiol*. V.533, p. 815–822, 2001.

GIORDANO FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *J Clin Invest*. V.115, p. 500-8, 2005.

GRIENGLING KK, LASSEGUE B, MURPHY TJ, ALEXANDER RW. Angiotensin II receptor pharmacology. *Adv Pharmacol*. V.28, p. 269-306, 1994.

GRIENGLING KK, LASSEGUE B, MURPHY TJ, ALEXANDER RW. Angiotensin II receptor pharmacology. *Adv Pharmacol*. V.28, p. 269-306, 1994.

GRIEVE DJ, BYRNE JA, CAVE AC, SHAH AM. Role of oxidative stress in cardiac remodeling after myocardial infarction. *Heart Lung Circ*. V.13, p. 132-8, 2004.

GRIFFITHS ER, FRIEHS I, SCHERR E, POUTIAS D, MCGOWAN FX, DEL NIDO PJ. Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes

cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. V.139, p.1609–1617, 2010.

GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J Clin Nutr*, V. 67, n.3, p.563S-72S, 1998.

GUBERMAN C, JELLYMAN JK, HAN G, ROSS MG, DESAI M. Maternal high-fat diet programs rat offspring hypertension and activates the adipose renin-angiotensin system. *Am J Obstet Gynecol*. V.209, p. 262.e261–e268, 2013.

GUILHERME A, VIRBASIVUS JV, PURI V, CZECH MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* V.9, p. 367–377, 2008.

GUPTA A, SRINIVASAN M, THAMADILOK S, PATEL MS. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J Endocrinol*. V. 200, p. 293-300, 2009.

HALES CN, BARKER DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. V. 60, p. 5-20, 2011.

HALES, C. N. AND D. J. BARKER. The thrifty phenotype hypothesis. *Br. Med. Bull*. V.60, p. 5-20, 2001.

HANSON MA, GLUCKMAN PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol Rev*. V. 94, p. 1027–1076, 2014.

HARADA K, KOMURO I, SHIOJIMA I, HAYASHI D, KUDOH S, MIZUNO T, KIJIMA K, MATSUBARA H, SUGAYA T, MURAKAMI K, YAZAKI Y. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation*. V.97, p.1952-9, 1998.

HASENFUUS G, MEYER M, SCHILLINGER W, PREUS M, PIESKE B, JUST H. CALCIUM HANDLING PROTEINS IN THE FAILING HUMAN HEART. *BASIC RES CARDIOL*. V.92, P.87-93, 1997.

HEINEKE J, MOLKENTIN JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. V.7, p. 589±600, 2006.

HENRY WL, CLARK CE, EPSTEIN SE. Asymmetric septal hypertrophy. Echocardiography identification of the pathognomonic anatomic abnormality of IHSS. *Circulation*. V. 47, p. 225-33, 1973.

HESLEHURST N, SIMPSON H, ELLS LJ, et al. The impact of maternal BMI status on pregnancy outcomes with immediate short-term obstetric resource implications: a meta-analysis. *Obes Rev*. V.9, p.635–683, 2008.

HINGTGEN SD, TIAN X, YANG J, DUNLAY SM, PEEK AS, WU Y, SHARMA RV, ENGELHARDT JF, DAVISSON RL. Nox2-containing NADPH oxidase and Akt activation play a key role in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Physiol Genomics*. V. 26, p. 180-91, 2006.

HOCKMAN JS, BULKLEY BH. Expansion of acute myocardial infarction: an experimental study. *Circulation*. V.65, P. 1446-50, 1982.

HOFFMAN ML, REED SA, PILLAI SM, JONES AK, MCFADDEN KK, ZINN SA, GOVONI KE. The effects of poor maternal nutrition during gestation on offspring postnatal growth and metabolism. *J Anim Sci*. V.95, p. 2222-2232, 2017.

HORIE T, ONO K, NISHI H, IWANAGA Y, NAGAO K, KINOSHITA M, KUWABARA Y, TAKANABE R, HASEGAWA K, KITA T, KIMURA T. MicroRNA-133 regulates the expression of GLUT4 by targeting KLF15 and is involved in metabolic control in cardiac myocytes. *BiochemBiophys Res Commun*. V. 389, p. 315–320, 2009.

HOTTA K, FUNAHASHI T, BODKIN NL, ORTMAYER HK, ARITA Y, HANSEN BC, MATSUZAWA Y. Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*. V.50, p.1126-33, 2001.

HUNTER JJ, CHEIN KR. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med*. V.341, p. 1276- 1283, 1999.

IDE T, TSUTSUI H, HAYASHIDANI S, KANG D, SUEMATSU N, NAKAMURA K, et al. Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction. *Circulation research*. V. 88, p. 529–535, 2001.

ISO T, ARAI M, WADA A, KOGURE K, SUZUKI T, AND NAGAI R. Humoral factor(s) produced by pressure overload enhance cardiac hypertrophy and natriuretic peptide expression. *Am J Physiol Heart CircPhysiol* V. 273, p. H113–H118, 1997.

ITOH H, MUKOYAMA M, PRATT RE, GIBBONS GH, DZAU VJ. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest.* V. 91, p. 2268-74, 1993.

IZUMO S, NADAL-GINARD B, MAHDAVI V. Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc Natl Acad Sci USA.* V.85, p. 339-43, 1988.

JONES BH, STANDRIDGE MK & MOUSTAID N. Angiotensin II increases lipogenesis in 3T3-L1 and human adipose cells. *Endocrinology.* V.138, p. 1512–1519, 1997.

JUGE-AUBRY CE, HENRICHOT E, MEIER CA. Adipose tissue: a regulator of inflammation. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* V.19, p.547-66, 2005.

JUNG UJ, CHOI MS. Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and relationship between obesity inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Sci.* V. 15, p. 6184- 6223, 2014.

KADOWAKI T, YAMAUCHI T. Adiponectin and adiponectin receptors. *Endocr Rev.* V.26, p. 439 –51, 2005.

KARAMANLIDIS G, BAUTISTA-HERNANDEZ V, FYNN-THOMPSON F, DEL NIDO P, TIAN R. Impaired mitochondrial biogenesis precedes heart failure in right ventricular hypertrophy in congenital heart disease. *Circ Heart Fail.* V. 4, p. 707–713, 2011.

KAVAZIS, AN. Pathological vs. physiological cardiac hypertrophy. *J Physiol* V. 593, p 3767, 2015.

KEHAT I, MOLKENTIN JD. Molecular pathways underlying cardiac remodeling during pathophysiological stimulation. *Circulation.* V. 122, p. 2727- 2735, 2010.

KHAIRALLAH PA, KANABUS J. Angiotensin and myocardial protein synthesis. *Perspect Cardiovasc Res.* V.8, p. 337-347, 1983.

KIM SY, DIETZ PM, ENGLAND L. Trends in pre-pregnancy obesity in nine states, 1993–2003. *Obesity.* V. 15, p. 986-993, 2007.

KLEIN I, OJAMAA K. Mechanisms of disease: thyroid hormone and the cardiovascular system. *N Engl J Med*, V. 344, n. 7, p. 501-509, 2001.

KOJIMA M, SHIOJIMA I, YAMAZAKI T, KOMURO I, ZOU Y, WANG Y, MIZUNO T, UEKI K, TOBE K, KADOWAKI T, NAGAI R, AND YAZAKI Y. Angiotensin II receptor antagonist TCV-116 induces regression of hypertensive left ventricular hypertrophy in vivo and inhibits the intracellular signaling pathway of stretch-mediated cardiomyocyte hypertrophy in vitro. *Circulation*. V. 89, p. 2204–2211, 1994.

KORECKY B, ZAK R, SCHWARTZ K, et al. Role of thyroid hormone in regulation of isomyosin composition, contractility, and size of heterotopically isografted rat heart. *Circ Res*. V.60, p.824-30, 1987.

KOWEY PR, EISENBERG R, ENGEL TR. Sustained arrhythmias in hypertrophic obstructive cardiomyopathy. *N Eng J Med*. V. 310, p. 1566-69, 1984.

KRISHNAVENI GV, VEENA SR, HILL JC, KEHOE S, KARAT SC, FALL CH. Intrauterine exposure to maternal diabetes is associated with higher adiposity and insulin resistance and clustering of cardiovascular risk markers in Indian children. *Diabetes Care* V.33, p.402–404, 2010.

KUBOTA N, TERAUCHI Y, YAMAUCHI T, et al. Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*. V.277, p. 25863– 6, 2002.

KUDEJ RK, IWASE M, UECHI M., VATNER DE, OKA N, ISHIKAWA Y, SHANNON RP, BISHOP SP, VATNER SF. Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *J Mol Cell Cardiol*. V. 10, p. 2735-46, 1997.7

KUMAR R, SINGH VP, BAKER KM. The intracellular renin-angiotensin system in the heart. *Curr Hypertens Rep*. V.11, p. 104±110, 2009.

LANDSBERG L, ARONNE LJ, BEILIN LJ, BURKE V, IGEL LI, LLOYD-JONES D, ET AL. Obesity-related hypertension: pathogenesis, cardiovascular risk, and treatment—a position paper of the obesity society and The American Society of Hypertension. *Obesity (Silver Spring)* V.21, p. 8–24, 2013.

LEANDRO CG, DA SILVA RIBEIRO W, DOS SANTOS JA, BENTO-SANTOS A, LIMA-COELHO CH, FALCÃO-TEBAS F, et al. Moderate physical training attenuates muscle-

specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. *Eur. J. Nutr.* V. 51, p. 807–815, 2012.

LEDDY MA, POWER ML, SCHULKIN J. The Impact of Maternal Obesity on Maternal and Fetal Health. *Reviews in Obstetrics and Gynecology.* V.1, p.170-178, 2008.

LEE H, JANG HC, PARK HK, CHO NH. Early manifestation of cardiovascular disease risk factors in offspring of mothers with previous history of gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract.* V.78, p.238–245, 2007.

LEOPOLDO AS, SUGIZAKI MM, LIMA-LEOPOLDO AP, DO NASCIMENTO AF, LUVIZOTTO RDE A, CAMPOS DHS, OKOSHI K, DAL PAI-SILVA M, PADOVANI CR, CICOGNA AC. Cardiac remodeling in a rat model of diet-induced obesity. *Can J Cardiol.* V.26, p.423–429, 2010.

LEVY D, KENCHIAIAH S, LARSON MG, BENJAMIN EJ, KUPKA MJ, HO KK, et al. Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med.* V.347, p. 1397±402, 2002.

LI M, SLOBODA DM, VICKERS MH. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. *Exp Diabetes Res.* V.2011, p. 9, 2011.

LIANG C, OEST ME, PRATER MR. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* V.86, p. 377–384, 2009.

LINDENMAYER GE, SORDAHL LA, HARIGAYA S, ALLEN JC, BESCH HR JR, SCHWARTZ A. Some biochemical studies on subcellular systems isolated from fresh recipient human cardiac tissue obtained during transplantation. *The American journal of cardiology.* V. 27, p. 277–283, 1971.

LINDPAINTNER K, GANTEN D. The cardiac renin-angiotensin system: an appraisal of present experimental and clinical evidence. *Circ Res.* V.68, p. 905-921, 1991.

LINZ W, SCHOELKENS BA, GANTEN D. Converting enzyme inhibition specifically prevents the development and induces regression of cardiac hypertrophy in rats. *Clin Exp Hypertens.* V.11, p. 1325-1350, 1989.

LO J, PATEL VB, WANG Z, LEVASSEUR J, KAUFMAN S, PENNINGER JM, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 antagonizes angiotensin II-induced pressor response and NADPH oxidase activation in Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Exp Physiol*. V.98, p. 109±122, 2013.

LOUEY S, THORNBURG KL. The prenatal environment and later cardiovascular disease. *Early Hum Dev*. V.81, p.745-51, 2005.

LUCAS A. Programming by early nutrition: an experimental approach. *J. Nutr*. V.128, p. 401S–406S, 1998.

LUCAS A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. *Arch Dis Child*, v. 71, p. 288-290, 1994.

LYNCH CM, SEXTON DJ, HESSION M, MORRISON JJ. Obesity and mode of delivery in primigravid and multigravid women. *Am J Perinatol*. V. 25, p. 163-167, 2008

MAEDA N, SHIMOMURA I, KISHIDA K, et al. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med*. V.8, p. 731–7, 2002.

MANABE I, SHINDO T, NAGAI R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. V.91, p. 1103±13, 2002.

MARON BJ, GOTTDIENER JS, EPSTEIN SE. Patterns and significance of distribution of left ventricular hypertrophy in hypertrophic cardiomyopathy. A wide angle, two dimensional echocardiographic study of 125 patients. *Am J Cardio*. V. 48, p. 418-28, 1981.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ E, JURADO-LÓPEZ R, VALERO-MUÑOZ M, BARTOLOMÉ MV, BALLESTEROS S, LUACES M, BRIONES AM, LÓPEZ-ANDRÉS N, MIANA M, CACHOFEIRO V. Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: potential role in obesity. *Journal of Hypertension*. V. 5, p. 1104–1114, 2014.

MARTIN-GRONERT MS, OZANNE SE. Mechanisms linking suboptimal early nutrition and increased risk of type 2 diabetes and obesity. *J. Nutr*. V.140, p.662–666, 2010.

MASSIÉRA F, BLOCH-FAURE M, CEILER D, MURAKAMI K, FUKAMIZU A, GASC JM, QUIGNARD-BOULANGE A, NEGREL R, AILHAUD G, SEYDOUX J, et al. Adipose angiotensinogen is involved in adipose tissue growth and blood pressure regulation. *FASEB Journal* V.15, p. 2727–2729, 2001..

MASSON GS, COSTA TSR, YSHII L, FERNANDES DC, SOARES PPS, LAURINDO FR, et al. Time-Dependent Effects of Training on Cardiovascular Control in Spontaneously Hypertensive Rats: Role for Brain Oxidative Stress and Inflammation and Baroreflex Sensitivity. *PLoS One*. V.9, p. e94927, 2014.

MATSUBARA BB, ZORNOFF LAM. Matriz colágena intersticial e sua relação com a expansão miocárdica no infarto agudo. *Arq Bras Cardiol*. V.64, p. 559-63, 1995.

MATSUZAWA Y. White adipose tissue and cardiovascular disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. V.19, p.637– 47, 2005.

MAZZIO EA, SOLIMAN KF. Epigenetics and nutritional environmental signals. *Integr. Comp. Biol*. V.54, p.21–30, 2014.

MCDERMOTT PJ, CARL LL, CONNER KJ, ALLO SN. Transcriptional regulation of ribosomal RNA synthesis during growth of cardiac myocytes in culture. *The Journal of biological chemistry*. V. 266, p. 4409–4416, 1991.

MCKENNA WJ, KRIKLER DM, GOODWIN JF. Arrhythmias in dilated and hypertrophic cardiomyopathy. *Cardiac Arrhythmias. I. Med Clin N Am*. V. 68, p. 983-1000, 1984.

MCMILLEN IC, ROBINSON JS. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol Rev*. V.85, p.571-633, 2005.

MEAGHAN A. LEDDY, MICHAEL L. POWER, JAY SCHULKIN. THE IMPACT OF MATERNAL OBESITY ON MATERNAL AND FETAL HEALTH. *Rev Obstet Gynecol*. V.1, p.170-178, 2008.

MEANS CK, BROWN JH. Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovasc Res*. V.82, p. 193±200, 2009.

*Metab Disord*, v. 26, s.04, p. 2-4, 2002.

MILLS JL, TROENDLE J, CONLEY MR, CARTER T, DRUSCHEL CM. Maternal obesity and congenital heart defects: a population-based study. *Am J Clin Nutr* 91:1543–1549, 2010.

MINGRONE G, MANCO M, MORA ME, GUIDONEC, IACONELLIA, GNIULI D, LECCESI L, CHIELLINI C, GHIRLANDA G. Influence of maternal obesity on insulin sensitivity and secretion in offspring. *Diabetes Care*, V. 31, p. 1872–1876, 2008.

miocárdio: conceitos, fisiopatologia e abordagem terapêutica. *Arq Bras Cardiol.* V.68, p. 453-60, 1997.

MITTENDORFER B. Origins of metabolic complications in obesity: adiposity tissue and free fatty acid trafficking. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* V. 14, p. 535- 541, 2011.

MIZUNO K, NAKAMARU M, HIASHIMORI K, INAGAMI T. Local generation and release of angiotensin II in peripheral vascular tissue. *Hypertension.* V.11, p. 223-229, 1988.

MOCKEL M AND STORK T. Diastolic function in various forms of left ventricular hypertrophy: contribution of active Doppler stress echo. *Int J Sports Med.* V. 17, p. S184–S190, 1996.

MOLKENTIN JD, ROBBINS J. With great power comes great responsibility: using mouse genetics to study cardiac hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol* V. 46, p. 130–136, 2009.

MOREIRA AS, TEIXEIRA TEIXEIRA M, DA SILVEIRA OSSO F, et al. Left ventricular hypertrophy induced by overnutrition early in life. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* V.19, p. 805–810, 2009.

MORISCO C, SADOSHIMA J, TRIMARCO B, ARORA R, VATNER DE, VATNER SF. Is treating cardiac hypertrophy salutary or detrimental: the two faces of Janus. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* V. 284, p. H1043±7, 2003.

MORISHITA R, HIGAKI J, MIYAZAKI M, OGIHARA T. Possible role of the vascular renin-angiotensin system in hypertension and vascular hypertrophy. *Hypertension.* V. 19, p. II62-7, 1992.

MUNZBERG H, MYERS MG JR. Molecular and anatomical determinants of central leptin resistance. *Nat Neurosci.* V.8, p. 566 –70, 2005.

NAGANO M, HIGAKI J, NAKAMURA F, HIGASHIMORI K, NAGANO N, MIKAMI H, et al. Role of cardiac angiotensin II in isoproterenol-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertension.* V. 19, p. 708–712, 1992.

NAKAJIMA Y, NAKAYAMA O, MAKISHIMA M, MATSUDA M, SHIMOMURA I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* V. 114, p.1752–1761, 2004.

NEELS J, THINNES T, LOSKUTOFF D. Angiogenesis in an in vivo model of adipose tissue development. *FASEB J.* V.18, p.983-5, 2004.

NELSON SM, MATTHEWS P, POSTON L. Maternal metabolism and obesity: modifiable determinants of pregnancy outcome. *Hum Reprod Update.* V.16, p.255–275, 2010.

NEUBAUER S. The failing heart--an engine out of fuel. *The New England journal of medicine.* V.356, p.1140–1151, 2007.

NISHIZUKA Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science.* V. 225, p. 1365–1370, 1984.

NISHIZUKA Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. *Science.* V.225, p.1365–1370, 1984.

NISTALA R, HAYDEN MR, DEMARCO VG, HENRIKSEN EJ, LACKLAND DT, SOWERS JR. Prenatal Programming and Epigenetics in the Genesis of the Cardiorenal Syndrome. *Cardiorenal Med.* V. 1, p. 243–254, 2011.

O'BRIEN TE, RAY JG, CHAN W-S. Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. *Epidemiology.* V. 14, p. 368 –74, 2003.

O'REILLY JR, REYNOLDS RM. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 78, p. 9–16, 2013.

OGDEN C, CARROLL M. Prevalence of Obesity Among Children and Adolescents: United States, Trends 1963–1965 Through 2007–2008. *CDC-NCHS Health E-Stat.* 2010. Available:[http://www.cdc.gov/nchs/data/hestat/obesity\\_child\\_07\\_08/obesity\\_child\\_07\\_08.htm](http://www.cdc.gov/nchs/data/hestat/obesity_child_07_08/obesity_child_07_08.htm).

OGDEN, C. L.; CARROLL, M. D.; KIT, B. K.; FLEGAL, K. M. Prevalence of Childhood and Adult Obesity in the United States, 2011-2012. *JAMA*, V. 311, n. 8, p. 806- 814, 2014.

OLIVEIRA E, MOURA EG, SANTOS-SILVA AP, FAGUNDES AT, RIOS AS, ABREU-VILLACA Y, et al. Short- and long-term effects of maternal nicotine exposure during lactation on body adiposity, lipid profile, and thyroid function of rat offspring. *J Endocrinol.* V.202, p.397–405, 2009.

OLIVEIRA E, MOURA EG, SANTOS-SILVA AP, PINHEIRO CR, LIMA N, NOGUEIRA-NETO J, et al. Neonatal nicotine exposure causes insulin and leptin resistance and inhibits hypothalamic leptin signaling in adult rat offspring. *J Endocrinol.* V.206, p.55–63, 2010.

OLIVEIRA JUNIOR SA, DAL PAI-SILVA M, MARTINEZ PF, CAMPOS DH, LIMA-LEOPOLDO AP, LEOPOLDO AS, NASCIMENTO AF, OKOSHI MP, OKOSHI K, PADOVANI CR, CICOGNA AC. Differential nutritional, endocrine, and cardiovascular effects in obesity-prone and obesity-resistant rats fed standard and hypercaloric diets. *Med Sci Monit.* V.16, p.BR208–BR217, 2010.

OLIVEIRA SA JR, OKOSHI K, LIMA-LEOPOLDO AP, LEOPOLDO AS, CAMPOS DH, MARTINEZ PF, OKOSHI MP, PADOVANI CR, PAI-SILVA MD, CICOGNA AC. Nutritional and cardiovascular profiles of normotensive and hypertensive rats kept on a high fat diet. *Arq Bras Cardiol.* V.93, p.526–533, 2009.

OTTEN JV, FITCH CD, WHEATLEY JB, FISCHER VW. Thyrotoxic myopathy in mice: accentuation by a creatine transport inhibitor. *Metabolism*, V. 35, n. 6, p. 481-4, Jun 1986.

OWENS GK. Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol.* V.257, p. H1755 -H1765, 1989.

OZANNE SE, HALES CN. Lifespan: catch-up growth and obesity in male mice. *Nature* V.427, p.411–412, 2004.

PAQUET J-L, BAUDOUIN-LEGROS M, BRUNELLE G, MEYER P. Angiotensin II-induced proliferation of aortic myocytes in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* V.8, p. 565-572, 1990.

PAULINO-SILVA K. M., COSTA-SILVA J. H. Hypertension in rat offspring subjected to perinatal protein malnutrition is not related to the baroreflex dysfunction. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* V.43, p.1046–1053, 2016.

PAUSOVA, Z. From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* V. 15, p. 173–178, 2006.

PEACH MJ. Renin-Angiotensin System: Biochemistry and Mechanisms of Action. *Physiological Reviews.* V. 57, No 2, 1977.

PERRINO C, NAGA PRASAD SV, MAO L, NOMA T, YAN Z, KIM HS, SMITHIES O, ROCKMAN HA. Intermittent pressure overload triggers hypertrophy- independent cardiac dysfunction and vascular rarefaction. *J Clin Invest.* V. 116, p. 1547- 1560, 2006.

PFEFFER JM, PFEFFER MA, BRAUNWALD E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res.* V.57, p. 84-95, 1985.

PIERUZZI F, ABASSI ZA, AND KEISER HR. Expression of reninangiotensin system components in the heart, kidneys, and lungs of rats with experimental heart failure. *Circulation.* V. 92, p. 3105– 3112, 1995.

PINHEIRO AR, CUNHA AR, AGUILA MB, MANDARIM-DE-LACERDA CA. Beneficial effects of physical exercise on hypertension and cardiovascular adverse remodeling of diet-induced obese rats. *Nutr Metab Cardiol Dis.* V.17, p.365–375, 2007.

PITCHER D, WAINWRIGHT R, MAISEY M, CURRY P, SOWTON E. Assessment of chest pain in hypertrophic cardiomyopathy using exercise thallium-201 myocardial scintigraphy. *Br Heart J.* V. 44, p. 650-56, 1980.

POORNIMA IG, PARIKH P, SHANNON RP. Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis. *Circ Res* V. 98, p. 596–605, 2006.

PORRELLO ER, D'AMORE A, CURL CL, ALLEN AM, HARRAP SB, THOMAS WG, DELBRIDGE LM. Angiotensin II type 2 receptor antagonizes angiotensin II type 1 receptor-mediated cardiomyocyte autophagy. *Hypertension.* V.53, p.1032-40, 2009.

POSTON L, HARTHOOTN L, VAN DER BEEK EM, DAMM P. Obesity in pregnancy: implications for the mother and lifelong health of the child. A consensus statement. *Pediatric Research*, Vol. 2011, No. 69, p. 175-180, 2011.

POUDYAL H, PANCHAL SK, WARD LC, WAANDERS J, BROWN L. Chronic high-carbohydrate, high-fat feeding in rats induces reversible metabolic, cardiovascular, and liver changes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* V.302, p.1472–E1482, 2012.

POWERS SK, SMUDER AJ, KAVAZIS AN & QUINDRY JC. Mechanisms of exercise-induced cardioprotection. *Physiology (Bethesda).* V. 29, p. 27–38, 2014.

programmed by leptin treatment on the neonatal period. *Horm Metab Res*, v. 38, p. 827–831, 2006a.

PROUDLER AJ, et al. Hormone replacement therapy and serum angiotensin-converting-enzyme activity in postmenopausal women. *Lancet*. V. 346, p. 89–90, 1995.

RAJALA MW, SCHERER PE. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. *Endocrinology*. V.144, p.3765-73, 2003.

RASKOFF WJ, GOLDMAN S, AND COHN K. The “athletic heart.” Prevalence and physiological significance of left ventricular enlargement in distance runners. *JAMA*. V. 236, p. 158–162, 1976.

REDDY DS. Cellular and molecular biology of cardiac hypertrophy. *Curr Sci*. V. 72, p. 13–30, 1997.

REN J, PULAKAT L, WHALEY-CONNELL A, et al. Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease. *J. Mol. Med. (Berl)*. V. 88, p. 993–1001, 2010.

REYNOLDS RM, ALLAN KM, RAJA EA, et al. Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: Follow-up of 1 323 275 person years. *BMJ*. V.347, p. f4539, 2013.

RICHEY PA AND BROWN SP. Pathological versus physiological left ventricular hypertrophy: a review. *J Sports Sci*. V. 16, p. 129–141, 1998

ROBERTSON JIS, NICHOLLS MG, et al. *The Renin-Angiotensin System*. London, England: Gower Medical Publishing; V. 42, p. 102, 1993.

ROBKER RL. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology*. V. 15, p. 115–121, 2008.

RODFORD JL, TORRENS C, SIOW RC, MANN GE, HANSON MA, CLOUGH GF. Endothelial dysfunction and reduced antioxidant protection in animal model of developmental origins of cardiovascular disease. *J Physiol*. V. 19, p. 4709- 4720, 2008.

RODRIGUES AL, DE MOURA EG, PASSOS MC, DUTRA SC & LISBOA PC. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol* V.587, p. 2647–2661, 2009.

ROHDE LE, DUCHARME A, ARROYO LH, AIKAWA M, HOUCK WC, LOPEZ-ANAYA A, et al. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates early left ventricular enlargement after myocardial infarction in mice. *Circulation*. V.99, p. 3063-70, 1999.

ROSCA MG, HOPPEL CL. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. V.41, p. 107–112, 2009.

ROSCA MG, HOPPEL CL. New aspects of impaired mitochondrial function in heart failure. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. V.41, p.107–112, 2009.

ROSCA MG, TANDLER B, HOPPEL CL. Mitochondria in cardiac hypertrophy and heart failure. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. V.55, p.31–41, 2013.

ROSS MG, DESAI M. Developmental programming of offspring obesity, adipogenesis, and appetite. *ClinObstetGynecol*. V. 56, p. 529-36, 2013.

ROSSNER, S. Obesity: the disease of the twenty-first century. *Int J Obes Relat*

RUBIN KA, MORRISON J, PADNICK MB, BINDER AJ, CHIARAMIDA S, MARGOULEFF D, et al. Idiopathic hypertrophic subaortic stenosis evaluation of anginal symptoms with thallium-201 myocardial imaging. *Am J Cardiol*. V. 44, p. 1040-45, 1979.

RUBIO-RUÍZ, M. E.; DEL VALLE-MONDRAGÓN, L.; CASTREJÓN-TELLEZ, V.;

SADOSHIMA J, XU Y, SLAYTER HS, et al. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. V.75, p. 977-84, 1993.

SAINT-MARC P, KOZAK LP, AILHAUD G, DARIMONT C, NEGREL R. Angiotensin II as a Trophic Factor of White Adipose Tissue: Stimulation of Adipose Cell Formation. *Endocrinology*. V.142, p.487-92, 2001.

SAKAI S, MIYAUCHI T, AND YAMAGUCHI I. Long-term endothelin receptor antagonist administration improves alterations in expression of various cardiac genes in failing myocardium of rats with heart failure. *Circulation*. V. 101, p. 2849–2853, 2000.

SAMUELSSON AM, MATTHEWS PA, ARGENTON M, CHRISTIE MR, MCCONNELL JM, JANSEN EH, PIERSMA AH, OZANNE SE, TWINN DF, REMACLE C, ROWLERSON A, POSTON L, TAYLOR PD. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, v. 51, p. 383–392, 2008.

SAMUELSSON AM, MATTHEWS PA, JANSEN E, TAYLOR PD, POSTON L. Sucrose feeding in mouse pregnancy leads to hypertension, and sex-linked obesity and insulin resistance in female offspring. *Front Physiol.*, v. 4, p. 14, Feb-2013a.

SAMUELSSON AM, MORRIS A, IGOSHEVA N, et al. Evidence for sympathetic origins of hypertension in juvenile offspring of obese rats. *Hypertension*. V.55, p. 76–82, 2010.

SANDVIK AK, ELLINQSEN O. Pathological and physiological hypertrophies are

SATOH N, OGAWA Y, KATSUURA G, HAYASE M, TSUJI T, IMAGAWA K, YOSHIMASA Y, NISHI S, HOSODA K, NAKAO K. The arcuate nucleus as a primary site of satiety effect of leptin in rats. *Neurosci Lett*. V. 224, p. 149–152, 1997.

SATOH N, OGAWA Y, KATSUURA G, NUMATA Y, TSUJI T, HAYASE M, EBIHARA K, MASUZAKI H, HOSODA K, YOSHIMASA Y, NAKAO K. Sympathetic activation of leptin via the ventromedial hypothalamus: leptin-induced increase in catecholamine secretion. *Diabetes*. V. 48, p. 1787–93, 1999.

SAVAGE DD, SEIDES SF, MARON BJ, MYERS DJ, EPSTEIN SE. Prevalence of arrhythmias during 24 hour electrocardiographic monitoring and exercise testing in patients with obstructive and nonobstructive hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation*. V. 59, p. 866-75, 1979

SAWYER DB, SIWIK DA, XIAO J, PIMENTEL DR, SINGH K, COLUCCI WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*. V.34, p. 379-88, 2002.

SAYED D, HONG C, CHEN IY, LYPOWY J, ABDELLATIF M. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ. Res*. V.100, p. 416-424, 2007.

SCHEUBEL RJ, TOSTLEBE M, SIMM A, ROHRBACH S, PRONDZINSKY R, GELLERICH FN, et al. Dysfunction of mitochondrial respiratory chain complex I in human failing myocardium is not due to disturbed mitochondrial gene expression. *Journal of the American College of Cardiology*. V.40, p.2174–2181, 2002.

SCHUNKERT H, DANSER AH, HENSE HW, DERKX FH, KÜRZINGER S, RIEGGER GA. Effects of Estrogen Replacement Therapy on the Renin-Angiotensin System in Postmenopausal Women. *Circulation Volume*. V.95, p.39-45, 1997.

SCOTT-BURDEN T, RESINK TJ, HAHN AW, VANHOUTTE PM. Induction of endothelin secretion by angiotensin II: effects on growth and synthetic activity of vascular smooth muscle cells. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. V. 7, p. S96-100, 1991.

SENBONMATSU T, SAITO T, LANDON EJ, et al. A novel angiotensin II type 2 receptor signaling pathway: possible role in cardiac hypertrophy. *The EMBO Journal*. V.22, p.6471-6482, 2003.

SENGUPTA P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. V.4, p.624-30, 2013.

SHAPIRO LM AND SMITH RG. Effect of training on left ventricular structure and function: an echocardiographic study. *Br Heart J*. V. 50, p. 534–539, 1983

SHARMA N, OKERE IC, BARROWS BR, LEI B, DUDA MK, YUAN CL, PREVIS SF, SHAROV VG, AZIMZADEH AM, ERNSBERGER P, HOIT BD, SABBAH H, STANLEYWC. High- sugar diets increase cardiac dysfunction and mortality in Hypertension compared to low-carbohydrate or high-starch diets. *J Hypert*. V.26, p.1402–1410, 2008.

SHARMA N, OKERE IC, DUDA MK, CHESS DJ, O'SHEA KM, STANLEY WC: Potential impact of carbohydrate and fat intake on pathological left ventricular hypertrophy. *Cardiovasc Res*. V.73, p.257–268, 2007.

SHAROV VG, GOUSSEV A, LESCH M, GOLDSTEIN S, SABBAH HN. Abnormal mitochondrial function in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology*. V.30, p.1757–1762, 1998.

SHAROV VG, TODOR AV, SILVERMAN N, GOLDSTEIN S, SABBAH HN. Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *Journal of molecular and cellular cardiology*. V.32, p.2361–2367, 2000.

SHIMIZU I, MINAMINO T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, V. 97, p. 245- 262, 2016.

SHIMIZU I, MINAMINO T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, V. 97, p. 245- 262, 2016.

SILVA-ANTONIALI MM, TOSTES RC, FERNANDES L, FIOR-CHADI DR, AKAMINE EH, CARVALHO MH, FORTES ZB, NIGRO D. A lower ratio of AT1/AT2 receptors of

angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* V.62, p.587-93, 2004.

SIMMERMAN HK, JONES LR. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev.* V. 78, p. 921–947, 1998. SIMMONS R. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. *Trends Endocrinol Metab*, V. 16, p. 390-394, 2005.

SIMON JA, HSIA J, CAULEY JA, RICHARDS C, HARRIS F, FONG J, BARRETT-CONNOR E, HULLEY SB. Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke: The Heart and Estrogen-progestin Replacement Study (HERS). *Circulation.* V.103, p. 638-42, 2001.

SJAASTAD I, SEJERSTED OM, ILEBEKK A & BJORNERHEIM R. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol.* V. 89, p. 1445–1454, 2000.

SKURK T, HAUNER H. Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord.* V.28:, p. 1357– 64, 2004.

SOMM E, SCHWITZGEBEL VM, VAUTHAY DM, AUBERT ML, HUPPI PS. Prenatal nicotine exposure and the programming of metabolic and cardiovascular disorders. *Mol Cell Endocrinol.* V.304, p.69–77, 2009.

SOMM E, SCHWITZGEBEL VM, VAUTHAY DM, CAMM EJ, CHEN CY, GIACOBINO JP, et al. Prenatal nicotine exposure alters early pancreatic islet and adipose tissue development with consequences on the control of body weight and glucose metabolism later in life. *Endocrinology.* V.149, p.6289–6299, 2008.

SPINALE FG. Matrix metalloproteinases: regulation and dysregulation in the failing heart. *Circ Res.* V.90, p. 520-30, 2002.

STEVENSON JC. Cardiovascular effects of estrogens. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.* V. 74, p. 387–393, 2000.

SWYNGHEDAUW B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* V.79, p. 215-62, 1999.

TAKUWA Y, OKAMOTO Y, YOSHIOKA K, TAKUWA N. Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases. *Biofactors.* V.38, p. 329±37, 2012.

TAN HC, ROBERTS J, CATOV J, KRISHNAMURTHY R, SHYPAILO R, BACHA F. Mother's pre-pregnancy BMI is an important determinant of adverse cardiometabolic risk in childhood. *Pediatr. Diabetes* V.16, p.419–426, 2015.

TATSUGUCHI M, SEOK HY, CALLIS TE, THOMSON JM, CHEN JF, NEWMAN M, ROJAS M, HAMMOND SM, WANG DZ. Expression of microRNAs is dynamically regulated during cardiomyocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* V.42, p. 1137-1141, 2007.

TAYLOR PD, MCCONNELL J, KHAN IY, HOLEMANS K, LAWRENCE KM, ASARE-ANANE H, et al. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* V.288, p.23, 2005.

TEIXEIRA C, PASSOS M, RAMOS C, DUTRA S & MOURA E. Leptin serum concentration, food intake and body weight in rats whose mothers were exposed to malnutrition during lactation. *J Nutr Biochem* V.13, p. 493, 2002.

THUM T, GALUPPO P, WOLF C, FIEDLER J, KNEITZ S, VAN LAAKE LW, DOEVENDANS PA, MUMMERY CL, BORLAK J, HAVERICH A, GROSS C, ENGELHARDT S, ERTL G, BAUERSACHS J. MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation.* V.116, p. 258-267, 2007.

TOLMACHOV O, MA YL, THEMIS M, PATEL P, SPOHR H, MACLEOD KT, et al. Overexpression of connexin 43 using a retroviral vector improves electrical coupling of skeletal myoblasts with cardiac myocytes in vitro. *BMC Cardiovasc. BMC Cardiovasc Disord.* V. 6, p. 25, 2006.

TOSTE FP, ALVES SB, DUTRA SC, BONOMO IT, LISBOA PC, MOURA EG, PASSOS MC. Temporal evaluation of the thyroid function of rats

TOSTE FP, DE MOURA EG, LISBOA PC, FAGUNDES AT, DE OLIVEIRA E, PASSOS MC. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. *Br J Nutr*, v. 95, p. 830-7, 2006b.

VAN BIESEN T, HAWES BE, LUTTRELL DK, KRUEGER KM, TOUHARA K, PORFIRI E, et al. Receptor-tyrosinekinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature.* V. 376, p. 781–784, 1995.

VAN DIJK-OTTENS M, VOS IH, CORNELISSEN PW, DE BRUIN A & EVERTS ME. Thyroid hormone-induced cardiac mechano growth factor expression depends on beating activity. *Endocrinology* V.151, p.830–838, 2010.

VAN ROOIJ E, SUTHERLAND LB, LIU N, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* V.103, p. 18255-18260, 2006.

VICTORA CG, ADAIR L, FALL C, HALLAL PC, MARTORELL R., RICHTER L, et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *Lancet*. V.371, p. 340–357, 2008.

WAKATSUKI T, SCHLESSINGER J, ELSON EL. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci.* V.29, p. 609-17, 2004.

WALSH BW, et al. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med.* V. 325, p. 1196–1204, 1991.

WANG B; LIAO Y; ZHOU Z; LI L; WEI F; WANG M; WEI Y Arterial structural changes in rats immunized by AT1-receptor peptide. *Heart Vessels.* V.20, p. 153-8, 2005.

WANG J, GUO T. Metabolic remodeling in chronic heart failure. *Journal of Zhejiang University Science B.* V.14, p.688-695, 2013.

WANG J, MA H, TONG C, ZHANG H, LAWLIS GB, LI Y, et al. Overnutrition and maternal obesity in sheep pregnancy alter the JNK-IRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. *FASEB J.* V.24, p.2066–2076, 2010.

WEBER KT, SUN Y, GUNTAKA RV. Rebuilding and remodeling following myocardial infarction: the good, the bad, and the ugly of tissue repair. *Dialogues in Cardiovascular Medicine.* V.4, p. 3-19, 1999.

WEBER KT. Targeting pathological remodeling: concepts of cardioprotection and reparation. *Circulation.* V.102, p. 1342-5, 2000.

WEISBERG SP, MCCANN D, DESAI M, ROSENBAUM M, LEIBELRL, FERRANTE AW JR. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest.* V.112, p. 1796–808, 2003.

WELLS JC. Obesity as malnutrition: the role of capitalism in the obesity global epidemic. *Am. J. Hum. Biol.* V.24, p. 261–276, 2012.

WHITELAW NC, WHITELAW E. How lifetimes shape epigenotype within and across generations. *Hum Mol Genet.* V. 15, p. R131–R137, 2006.

WHO, 2017: <http://www.who.int/topics/obesity/en/>.

WILLETT WC. Diet and health: what should we eat? *Science.* V.22, p.532-7, 1994.

WOLF G, NELSON EG. Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *Am J Physiol.* V.259, p. F768 -F777, 1990.

WOLF G, ZIYADEH FN, ZAHNER G, STAHL RA. Angiotensin II is mitogenic for cultured rat glomerular endothelial cells. *Hypertension.* V. 27, p. 897-905, 1996.

WOO AYH, XIAO RP.  $\beta$ -Adrenergic receptor subtype signaling in heart: From bench to bedside. *Acta Pharmacologica Sinica.* V.33, p. 335–341, 2012.

XIAO J, LUO X, LIN H, ZHANG Y, LU Y, WANG N, ZHANG Y, YANG B, WANG Z. MicroRNA miR-133 represses HERG K<sup>+</sup> channel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. *J Biol Chem.* V. 282, p. 12363–12367, 2007.

XU C, LU Y, PAN Z, CHU W, LUO X, LIN H, XIAO J, SHAN H, WANG Z, YANG B. The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci.* V. 120, p. 3045–3052, 2007.

XU H, BARNES GT, YANG Q, et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* V.112, p.1821–30, 2003.

YAMAGUSHI H, ISHIMURA T; NISHIYAMA S, NAGASAKI F, NAKANISHI S, TAKOTSU F, et al. Hypertrophic nonobstructive cardiomyopathy with giant negative T-waves (apical hypertrophy): Ventriculographic and echocardiographic features in 30 patients. *Am J Cardio.* V. 44, p. 401-12, 1979.

YAMAZAKI T, KOMURO I, KUDOH S, ZOU Y, SHIOJIMA I, MIZUNO T, TAKANO H, HIROI Y, UEKI K, TOBE K, KADOWAKI T, NAGAI R, AND YAZAKI Y. Angiotensin II partly mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res.* V. 77, p. 258– 265, 1995.

YUEN CY, WONG SL, LAU CW, TSANG SY, XU A, ZHU Z, et al. From skeleton to cytoskeleton: osteocalcin transforms vascular fibroblasts to myofibroblasts via angiotensin II and Toll-like receptor 4. *Circ Res.* V.111, p. e55±66, 2012.

ZEISBERG EM, KALLURI R. Origins of cardiac fibroblasts. *Circ Res.* V.107, p. 1304±12, 2010.

ZHAO Y, RANSOM JF, LI A, VEDANTHAM V, VON DREHLE M, MUTH AN, TSUCHIHASHI T, MCMANUS MT, SCHWARTZ RJ, SRIVASTAVA D. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2. *Cell.* V. 129, p. 303–317, 2007.

ZIELINSKY P, PICCOLI AL. Myocardial hypertrophy and dysfunction in maternal diabetes. *Early Hum Dev.* V.88, p.273–278, 2012.

ZORAD S, FICKOVA M, ZELEZNA B, MACHO L, KRAL JG. The role of angiotensin II and its receptors in regulation of adipose tissue metabolism and cellularity. *Gen. Physiol. Biophys.* V.14, p.383—391, 1995.

ZORNOFF LAM, SPADARO J. REMODELAÇÃO VENTRICULAR APÓS INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO: CONCEITOS, FISIOPATOLOGIA E ABORDAGEM TERAPÊUTICA. *ARQ BRAS CARDIOL.* V.68, P. 453-60, 1997.