



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

**IMPACTOS DA DIETA “OCIDENTALIZADA” DURANTE A GESTAÇÃO E
LACTAÇÃO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA E SUAS IMPLICAÇÕES NA
EFICÁCIA FARMACOLÓGICA DA NIMESULIDA NA PROLE ADULTA DE RATOS
WISTAR**

TAMIRES MEIRA MENEZES

Recife

2016

TAMIRES MEIRA MENEZES

**IMPACTOS DA DIETA “OCIDENTALIZADA” DURANTE A GESTAÇÃO E
LACTAÇÃO NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA E SUAS IMPLICAÇÕES NA
EFICÁCIA FARMACOLÓGICA DA NIMESULIDA NA PROLE ADULTA DE RATOS
*WISTAR***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia

Orientadora: Prof. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia (UFPE)

Co-orientadora: Prof. Dra. Elizabeth do Nascimento (UFPE)

Co-orientador: Prof. Dr. Eryvelton de Souza Franco (IBS)

Recife

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

M543i Menezes, Tamires Meira.
Impactos da dieta "ocidentalizada" durante a gestação e lactação na resposta inflamatória aguda e suas implicações na eficácia farmacológica da nimesulida na prole adulta de ratos *wistar* / Tamires Meira Menezes. – 2016.
104 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Maria Bernadete de Sousa Maia.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2016.
Inclui referências e anexos.

1. Dieta ocidental. 2. Inflamação. 3. Ação farmacológica. 4. Inflamação aguda. 5. Nimesulida. I. Maia, Maria Bernadete de Sousa (Orientadora). II. Título.

616.07 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-131)



**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
PATOLOGIA**

AUTORA: Tamires Meira Menezes

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Patologia

NOME DA DISSERTAÇÃO: **“Impacto de uma Dieta “Ocidentalizada” Durante a Gestação e Lactação na Resposta Inflamatória Aguda e Suas Implicações na Eficácia Farmacológica da Nimesulida na Prole Adulta de Ratos Wistar”**

ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia

DATA DE DEFESA E APROVAÇÃO: 25 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Profa. Dra. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Prof. Dr. Eryvelton de Souza Franco

In memoriam Carlos Fernando Meira Menezes

AGRADECIMENTOS

A Deus por me manter forte e determinada em persistir nos meus sonhos

A minha família, pelo apoio condicional para o prosseguimento da minha jornada acadêmica;

Aos meus pais: Carlos Fernando Meira Menezes e Edilene Barbosa das Neves – meus guias, patronos e inspirações!

À minha orientadora, Professora Dra. Maria Bernadete Maia, a qual possuo uma extrema admiração tanto como pessoa como profissional, por seus ensinamentos valiosos que contribuíram de forma significativa para meu amadurecimento profissional...

Aos meus co-orientadores Professora Dra. Elizabeth do Nascimento e Dr. Eryvelton Franco pela contribuição científica inestimável...

À professora Elizabeth Neves do Departamento de Anatomia – UFPE por ser tão querida e por acolher como orientanda no Estágio à Docência...

Aos amigos do laboratório e IC's, Luana Daniela, Márcia Gláucia, Renato Birlo, Larissa Caroline, Camilla Chaves, Carolina Santiago, Tiago Araújo e Priscila Aragão pela compreensão e paciência durante os procedimentos experimentais, sendo essenciais no desenvolvimento do presente trabalho....

Aos amigos da pós-graduação pela divisão e compartilhamento de conhecimentos durante todo o curso em especial: Libânia Ribeiro, Isabella Patrícia e Maria Leonilda....

Aos melhores amigos: Lidiane Cristina, Nairomberg Portela, Jéssica Nascimento, Jéssica Helena, Danielle Andrade, Nara Fernandes, Mirella Araújo, Cleidiane Vieira, Débora Cristina e Januzy Almeida pelo apoio incondicional em todos os momentos....

Aos técnicos de laboratório André e Nielson pela amizade e auxílio técnico....

Ao farmacêutico Alex do Laboratório Central do Hospital das Clínicas - UFPE pela disponibilidade....

Aos alunos do laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos-UFPE e ao laboratório de Enzimologia do Departamento de Bioquímica-UFPE pelo auxílio técnico....

Aos professores que fazem parte da PPG em Patologia da UFPE....

À secretaria da PPG em Patologia, Margareth e as estagiárias que tanto me auxiliaram no decorrer do mestrado, minha profunda gratidão....

À CAPES pelo apoio financeiro....

À todos que contribuíram para a realização deste sonho.

*“Você não pode mudar o vento,
mas pode ajustar as velas do barco
para chegar onde quer”*

Confúcio

RESUMO

Estudos epidemiológicos evidenciam que a obesidade durante a gestação prejudica o desenvolvimento fetal e predispõe a prole a maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) frequentemente coexistentes com processos inflamatórios. Dessa forma, este estudo tem como objetivo avaliar a fase aguda da resposta inflamatória e a eficácia farmacológica da nimesulida na prole adulta de ratos *Wistar* alimentados com uma Dieta Ocidentalizada durante a gestação e lactação. A partir do 1º dia de gestação, as matrizes foram divididas aleatoriamente em dois grupos: 1) DPgl – que permaneceram recebendo a DP de biotério (Presence ®) durante a gestação e lactação e 2) DOgl que passaram a receber DO durante a gestação e lactação. Em seguida, segundo a manipulação nutricional, as proles foram divididas em quatro grupos: i) DPgl-DP - prole das matrizes que receberam a DP durante a gestação e lactação e permaneceram com a mesma no pós-desmame até o 60º dia de vida; ii) DOgl-DO - prole de matrizes que receberam a DO durante a gestação e lactação e permaneceram com a mesma no pós-desmame até o 60º dia de vida; DPgl-DO - prole de matrizes que receberam DP durante a gestação e lactação, mas que passaram a consumir DO no pós-desmame até o 60º dia de vida e iv) DOgl-DP - prole das matrizes que receberam DO durante a gestação e lactação, mas que passaram a receber DP no pós-desmame até o 60º dia de vida. Nesse experimento os animais receberam Carragenina (0,1 mL, 1% w/v) na região subplantar da pata esquerda traseira para avaliar a resposta inflamatória aguda da prole e o efeito anti-inflamatório da nimesulida. No modelo de inflamação aguda nos intervalos de 120, 180 e 240 min, respectivamente, o grupo DOgl-DO ($1,66 \pm 0,61^*$; $2,06 \pm 0,62^*$ e $2,10 \pm 0,67^*$) e o grupo DOgl-DP ($1,62 \pm 0,16^*$; $1,92 \pm 0,36^*$ e $1,51 \pm 0,37^*$) exibiram aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao DPgl-DP ($0,93 \pm 0,20$; $1,11 \pm 0,26$ e $1,07 \pm 0,14$). Enquanto o DPgl-DO ($1,35 \pm 0,16^*$ e $1,55 \pm 0,23^*$) só apresentou diferença ($p < 0,05$) comparada ao DPgl-DP nos intervalos de 120 e 180 min, respectivamente. A atividade anti-edematogênica da nimesulida no grupo DPgl-DPn, foi observada nos intervalos de 120, 180 e 240 min; enquanto no grupo DOgl-DOn esse efeito foi observado apenas no intervalo de 120 min após a injeção subplantar da carragenina. Quando comparados a seus respectivos grupos controle tratados com carboximetilcelulose (DOgl-DOc *versus* DOgl-DOn ou DPgl-DPc *versus* DPgl-DPn), o efeito anti-edematogênico da nimesulida, expresso em percentual de inibição do edema, medido nos intervalos de 180 (33,98%) e 240 minutos (33,80%), após a injeção do agente edematogênico, foi significativamente ($p < 0,05$) menor em relação ao grupo

DPgl-DPn (38,73% e 38,31%, respectivamente). A partir dos dados concluímos que, a dieta ocidentalizada acentuou a intensidade da resposta inflamatória aguda e reduziu o efeito da nimesulida sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos *Wistar*.

Palavras-chave: Dieta Ocidental; Inflamação Aguda; Nimesulida.

ABSTRACT

Epidemiological studies show that obesity during pregnancy affect fetal development and predispose the offspring to higher incidence of chronic noncommunicable diseases (NCDs) often coexisting with inflammatory processes. Thus, this study aims to evaluate the acute phase of the inflammatory response and the pharmacological efficacy of nimesulide in the adult offspring of Wistar rats fed a Westernized diet during pregnancy and lactation. From the 1st day of pregnancy, the mothers were randomly divided into two groups: 1) SDgl - that were fed the SD vivarium (Presence ®) during pregnancy and lactation and 2) WDgl that have received WD during pregnancy and lactation. Then, according to nutritional manipulation, the proles were divided into four groups: i) SDgl-SD - offspring of mothers who received SD during pregnancy and lactation and kept the same post-weaning until 60 days of life; ii) WDgl-WD - offspring of mothers who received the WD during pregnancy and lactation and kept the same post-weaning until 60 days of life; SDgl-WD - offspring of mothers who received SD during pregnancy and lactation, but that began to consume WD post-weaning until the 60th day of life and iv) WDgl-SD - offspring of mothers who received WD during pregnancy and lactation but have received SD post-weaning until the 60th day of life. In this experiment the animals received carrageenan (0.1ml of 1% w / v) in the subplantar region of the left hind paw to assess acute inflammatory response of offspring and anti-inflammatory effect of nimesulide. In the model of acute inflammation in the intervals 120, 180 and 240 min, respectively, WDgl-WD group (1.66 ± 0.61 *; 2.06 ± 0.62 * and 2.10 ± 0.67 *) and WDgl-SD group (1.62 ± 0.16 *; 1.92 ± 0.36 * and 1.51 ± 0.37 *) showed a significant increase ($p < 0.05$) compared to SDgl-SD (0.93 ± 0.20 , 1.11 ± 0.26 and 1.07 ± 0.14). While SDgl-WD (1.35 ± 0.16 and 1.55 ± 0.23 * *), the only difference ($p < 0.05$) compared to SDgl-SD in the intervals 120 and 180 min, respectively. The anti-edema activity of nimesulide in SDgl-SDn group was observed at intervals of 120, 180 and 240 min; while in WDgl-WDn group this effect was only observed in the range of 120 min after subplantar injection of carrageenan. When compared to their respective control groups treated with carboxymethylcellulose (WDgl-WD vs. WDgl-WDn or SDgl-SD versus SDgl-SDn), anti-oedematogenic effect of nimesulide expressed as percentage inhibition of edema measured at the intervals of 180 (33.98%) and 240 minutes (33.80%), after injection of oedematogenic agent, was significantly ($p < 0.05$) lower in relation to SDgl-SDn group (38.73% and 38.31%, respectively). From the data we conclude that the westernized diet accentuated the intensity of the

acute inflammatory response and reduce the effect of nimesulide on the paw edema induced by carrageenan in rats.

Keywords: Western diet; Acute inflammation; Nimesulide.

Lista de ilustrações

Referencial teórico

	Página
Figura 1. Estrutura química da nimesulida (FONTE: RUELA <i>et al.</i> , 2009)	42

Material e Métodos

	Página
Figura 1. Distribuição dos grupos experimentais. CMC – Carboximetilcelulose (0,5%).	48

Artigo científico

	Página
Figure 1. Distribution of the experimental groups. CMC - carboxymethyl cellulose (0.5%).	70
Figure 2. Average daily feed intake (g) of <i>Wistar</i> rats (n = 5 animals / group) fed a standard diet (SD) or "westernized" diet (WD) in the periods of pregnancy, lactation and / or post-weaning. SDgl-SD (Control group) versus WDgl-WD or SDgl-WD or WDgl-SD (experimental groups). Values expressed as mean \pm	76

SD. Significance obtained from the two way ANOVA test followed by Bonferroni's test (* $p < 0.05$).

- Figure 3.** Average body weight (g) of Wistar rats (n = 5 animals / group) were fed with standard diet (SD) or "westernized" diet (WD) in the periods of pregnancy and lactation and / or post-weaning. SDgl-SD (Control group) versus WDgl-WD or SDgl-WD or WDgl-SD (experimental groups). Values expressed as mean \pm SD. Significance obtained from the two way ANOVA test followed by Bonferroni's test (* $p < 0.05$). **77**
- Figure 4.** Effect of nimesulide (5 mg/ kg) on the rat paw edema induced by subplantar injection of carrageenan in SDgl-SDn (A) and WDgl-WDn (B) groups. Values expressed as mean \pm SD. Significance obtained from the test two-way ANOVA followed by Bonferroni test. * $P < 0.05$ when compared to their respective control groups (SDgl-SD versus SDgl-SDn, and WDgl-WD versus WDgl- WDn). **80**
- Figure 5.** Levels IL-6 (A) and TNF- α (B) in the homogenate of the subplantar region of the treated groups (SDgl-SDn and WDgl-WDn) and their respective control groups (SDgl-SD and WDgl-WD) Six (06) hours after the carrageenan injection. Values expressed as mean \pm SD. *Significance obtained from the test one way followed by Tukey test ($p < 0.05$). **81**

Figure 6.

Activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) in the supernatant of homogenate of overcoming six Wistar rats region (04 hours) after carrageenan injection in the groups treated with nimesulide (SDgl-SDn, WDgl-WDn) and their respective control groups (SDgl-SD and WDgl-WD). Values expressed as mean \pm SD. *Significance obtained from the test one way followed by Tukey test ($p < 0.05$).

Lista de Tabelas

Referencial teórico

		Página
Tabela 1	Macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta padrão (Presence [®]) ou ocidentalizada.	47

Artigo científico

		Página
Table 1	Macronutrients according to Total Energy Value (TEV) of the standard diet (Presence [®]) or Westernized.	69
Table 2	Body weight of mothers fed a standard diet (SD) or diet "westernized" (WD) during pregnancy and lactation and their respective offspring.	75
Table 3	Biochemical and haematological the rat offspring variables Wistar adults (n = 5 animals / group) fed with SD or WD during pregnancy, lactation and post-weaning up to 60 days (SDgl-SD and WDgl-WD respectively) or submitted to swap diets (WDgl-SD and SDgl-WD) after the post-weaning period.	78
Table 4	Mean Paw Volume in SDgl-SD, WDgl-WD, SDgl-DO and WDgl-SD groups (n = 5 animals / group) with paw edema induced by carrageenan injection supplant (0.1 mL).	79

Lista de abreviaturas e siglas

aa	Aminoácidos
AA	Ácido araquidônico
AGP	α -1-glicoproteína ácida
ASP	Proteína estimuladora de acilação
AINE's	Anti-inflamatórios não-esteroidais
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
CC	Família de receptores de quimiocinas
COX-1	Enzima cicloxigenase tipo 1
COX-2	Enzima cicloxigenase tipo 2
COX-3	Enzima cicloxigenase tipo 3
CTAB	Cetiltrimetilamônio brometo
DCNT	Doenças Crônicas Não-Transmissíveis

DMBA	9,10- dimetilbenzoantraceno
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
EROS	Espécies reativas do oxigênio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ICAM-1	Molécula de adesão celular-1
ICAM-2	Molécula de adesão celular-2
IFN-γ	Interferon- γ
IgE	Imunoglobulina E
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6

IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 12
IL-1RN	Antagonista do receptor de interleucina 1
IMC	Índice de Massa Corporal
i.p	Intraperitoneal
KC	Quimiocina derivada de queratinócito
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4

MIP 2 Proteína da inflamação do macrófago 2

MPO Mieloperoxidase

mtNOS Óxido nítrico sintase mitocondrial

NaCl Cloreto de sódio

NK Natural killer

NO Óxido Nítrico

NOS Óxido nítrico sintase

nNOS Óxido nítrico sintase neuronal

PAI-1 Inibidor do fator ativador de plasminogênio 1

PAF Fator de ativação plaquetária

PBS Tampão Fosfato Salino

PCR Proteína C Reativa

PFA's Proteínas de fase aguda

PG's Prostaglandinas

PGD2 Prostaglandina D2

PGE2 Prostaglandina E2

PGI2 Prostaglandina I2

PMN's Polimorfonucleares

RBP- 4 Proteína ligante de retinol 4

RNA_m Ácido ribonucleico mensageiro

SM Síndrome Metabólica

SSA Amiloide sérica A

sTNF-R Receptor solúvel do fator de necrose tumoral alfa

TAB Tecido Adiposo Branco

TAM Tecido Adiposo Marrom

TAV Tecido Adiposo Visceral

TAS	Tecido Adiposo Subcutâneo
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral - alfa
TXA-2	Tromboxano A2
TXS	Tromboxano sintetase
VCAM	Molécula de adesão celular-vascular
TGFβ	Fator de crescimento transformador beta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial

SUMÁRIO

	Páginas
1 APRESENTAÇÃO	25
2 REFERENCIAL TEÓRICO	27
2.1 Transição nutricional.....	27
2.2 Obesidade.....	28
2.3 O processo inflamatório.....	30
2.4 Mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória.....	31
2.5 Eventos vasculares da resposta inflamatória	36
2.6 Moléculas de adesão de membrana envolvidas na migração leucocitária.....	37
2.7 Marcadores da resposta inflamatória de fase aguda	38
2.8 Tecido adiposo.....	39
2.9 Inflamação do tecido adiposo na obesidade.....	40
2.10 Marcadores inflamatórios na obesidade.....	41
2.11 Nimesulida	42
3 JUSTIFICATIVA	44
4 OBJETIVOS	45
4.1 Objetivo Geral.....	45
4.2 Objetivos Específicos.....	45

5	MATERIAL E MÉTODOS	46
6	CONCLUSÕES	52

REFERÊNCIAS

ANEXOS

Anexo A – Parecer da Comissão de Ética no uso de Animais do Centro de Ciências da Saúde da UFPE CEUA-UFPE

Anexo B – Normas da Revista European Journal of Pharmacology

APÊNDICE

Artigo Original

1. APRESENTAÇÃO

A obesidade é uma doença metabólica crônica, caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal (ABEP, 2011) e considerada fator de risco para desenvolvimento de agravos como diabetes e doenças cardiovasculares. Atualmente a obesidade é denominada como “doença crônica não transmissível” e é considerada causa de morte de 2,8 milhões de pessoas por ano, sendo que 12% da população mundial é classificada como obesa (ABESO, 2012). Os fatores que contribuem para esta situação são os comportamentos da sociedade atual, como o alto consumo das chamadas “*junk food*”, a expansão dos “*fast food*” e o sedentarismo, que têm sido associados à prevalência da obesidade no âmbito ocidental (WHO, 2014).

A ingestão de ácidos graxos durante a gestação e lactação podem ser transmitidos para o feto e ao recém-nascido através da placenta e leite materno, respectivamente e ainda alterar a composição dos ácidos graxos dos fosfolípidios da membrana celular, podendo resultar em graves problemas na estrutura e função das células dos descendentes (KABARAN; BESLER, 2015). A dieta materna repercute de forma potencial sobre os filhotes, podendo se prolongar por várias gerações (BEAUCHAMP; MENNELLA, 2013).

Enquanto alguns estudiosos relatam que a obesidade é decorrente do desequilíbrio entre o gasto energético e ingestão alimentar, outros defendem que a obesidade pode ser resultado de padrões comportamentais alimentares que evoluíram de nossos ancestrais. Tais condutas comportamentais são vulneráveis a disponibilidade e aumento da palatabilidade dos alimentos, contribuindo dessa forma para o crescimento em nível epidêmico da obesidade (NANGUNOORI et al., 2016).

A associação entre obesidade e inflamação está relacionada ao nível elevado de citocinas e proteínas de fase aguda nesses indivíduos. Os adipócitos sintetizam uma variedade de citocinas e proteínas de fase aguda que acabam por elevar a secreção e circulação desses mediadores químicos (TRAYHURN, 2007; BULLO et al., 2003).

O tecido adiposo em excesso eleva a produção de adipocinas, resultando em impactos na fisiologia corpórea, como na pressão arterial, balanço energético, sistema imune, sensibilidade à insulina, controle da ingestão alimentar, angiogênese, metabolismo lipídico correlacionados a cardiopatias (PRADO et al., 2009). Dentre as adipocinas sintetizadas pelo tecido adiposo destacam-se a adiponectina e leptina (WEISBERG *et al.*, 2003). Também são descritos

na literatura outras como a IL-1, a IL-6, TNF- α , CCL2; (CALLE; KAAKS, 2004) e inibidores de serino-proteases (HIDA et al., 2005).

Para amenizar o desequilíbrio entre os mediadores pró e anti-inflamatórios, são aplicados na terapêutica os fármacos anti-inflamatórios. Os mais prescritos mundialmente são classificados como anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (HOWARD, 2004).

A nimesulida é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE) que possui propriedade analgésica e antitérmica. Atua como inibidor seletivo da via de ciclooxigenase-2 (DEMIRYILMAZ et al., 2014). Possui um caráter de ácido fraco atribuído à presença do grupo metanosulfonamida (PEREIRA et al., 2011). Geralmente é indicado para o tratamento de dor aguda, tratamento sintomático de osteoartrose e dismenorreia primária (RAINSFORD, 2005). Estudos mostram a ação benéfica sobre a inibição do crescimento de vários tumores (colo do útero, pâncreas, mama, pulmão) (INOUE et al., 2008; CAI et al., 2012).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Transição nutricional

A transição nutricional é um fenômeno associado ao desenvolvimento socioeconômico caracterizado pela alteração nos padrões alimentícios e estado nutricional; e ainda atrelada às doenças crônicas (diabetes, dislipidemias, hipertensão) (AMUNA; ZOTOR, 2008). Com o advento e ampliação do setor industrial e em busca de melhores oportunidades, a população da zona rural passou a migrar para as zonas urbanas, o que provocou mudanças no comportamento e nos hábitos alimentares. Junto ao crescimento populacional urbano, elevou-se o número de indivíduos que exercem atividades onde requerem poucos gastos energéticos, devido a Revolução industrial que trouxe consigo o alto grau de mecanização das atividades antes realizadas manualmente (FRENCH et al., 2001). Concomitante à mudança de ocupação demográfica de espaço físico, ocorreu uma alteração no mercado de trabalho primariamente baseado no setor primário para mão-de-obra no setor secundário e terciário (PATARRA, 2000; YUNES, 2000). Esta transição epidemiológica é caracterizada pelo aumento de doenças vinculadas a modernização e diminuição do predomínio de doenças atreladas ao subdesenvolvimento (KAC; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2003).

De acordo com inquéritos nutricionais, a predominância do déficit de peso em adultos diminuiu no sexo masculino e feminino ao longo dos anos, onde em homens em 1974-1975 representava um percentual de 8,0%, 4,4% em 1989, 3,1% em 2002-2003 e 1,8% em 2008-2009. Em mulheres, nos anos de 1974-1975 representava 11,8%, 6,4% em 1989, 5,6% em 2002-2003 e 3,6% em 2008-2009. Esses dados indicam o controle da desnutrição na população adulta nas últimas décadas. Quanto a prevalência do excesso de peso e de obesidade é observado um contínuo aumento ao longo dos quatros inquéritos realizados nos dois gêneros, correspondendo um aumento de três vezes no sexo masculino (de 18,5% para 50,1%) e aproximadamente duas vezes no sexo feminino (de 28,7% para 48,0%). Ao passo que em crianças é observado uma redução da desnutrição, desde a década de 1980, confirmado esse declínio na década de 2000, que pode ser justificado pelas melhorias quanto ao poder aquisitivo das famílias de baixa renda, na formação escolar das mães e acesso a serviços básicos de saúde e saneamento (IBGE, 2010).

Estudiosos relatam uma firme associação entre obesidade e desenvolvimento econômico. Nos países com baixo índice de desenvolvimento econômico, a obesidade é pouco presente e considerada como sinal de saúde e status sócio-econômico (KHAN; BOWMAN, 1999; VISSCHER; SEIDELL, 2001), todavia, a desnutrição é considerada um problema de saúde (LUKE *et al.*, 2001). Ao contrário de países em desenvolvimento, no qual a condição de obesidade é distribuída similarmente em todos os setores econômicos da população (KHAN; BOWMAN, 1999).

2.2. Obesidade

Nos dias atuais, o excesso de peso e a obesidade podem ser considerados um problema de saúde pública, em nível epidêmico, pois, atingem grande parte dos países independentemente do nível econômico, apesar de apresentar grandes variações em relação a sua prevalência (WHO, 2003).

A obesidade faz parte de um conjunto de fatores de risco relacionados à ocorrência de doenças crônicas não transmissíveis juntamente com níveis elevados de pressão arterial, colesterol e glicose no sangue e a projeção é de que em 2025, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos estejam com sobrepeso e mais de 700 milhões obesos. É observada uma relação positiva com o aumento do IMC e desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Isso representa um fator de risco para o desencadeamento de outras DCNT como doenças cardiovasculares, diabetes, distúrbios músculos-esqueléticos, alguns tipos de câncer. A prevalência da obesidade mais do que duplicou entre os anos 1980-2014 (ABESO, 2015).

O aumento do consumo de alimentos hipercalóricos e da inatividade física devido as mudanças no transporte e crescimento são considerados fatores predisponentes para a obesidade e excesso de peso (WHO, 2015). O consumo desenfreado de alimentos e bebidas com alto percentual de açúcar é predominante em vários países do mundo. Segundo estudo de Popkin; Hawkes (2016), os chilenos são os maiores consumidores de bebidas açucaradas; os chineses, os tailandeses e os brasileiros ocupam o décimo lugar. Foi visto que ao passo que se reduz o consumo de refrigerantes, aumenta o de sucos de frutas, bebidas energéticas e água com sabor (ABESO, 2015).

A vida corriqueira do ambiente urbano e a falta de tempo estimula o trabalhador a mudar seus padrões alimentares. Segundo o inquérito da 2ª edição da Pesquisa Alelo Hábitos

Alimentares do Trabalhador Brasileiro, realizado pela Alelo em 2015, as empresas não incentivam alimentação saudável (58%). No entanto, cerca de 75% dos trabalhadores fazem sua primeira refeição no escritório, sendo observado um aumento de 6% comparado aos dados coletados em 2014. Quanto à atividade física diária, foi relatado que 56% passam a maior parte do dia sentado, comprometendo dessa forma o gasto de energia. Cerca de 41% dos que possuem jornada de trabalho de 6-8 horas, apenas 7% opta por estabelecimentos comerciais que ofereçam alimentos saudáveis. Por outro lado, foi observado um resultado positivo quanto ao consumo de alimentos em *fast-food*, lanchonetes, bares e carros ou barracos de rua, com a diminuição do consumo alimentar nesses locais quando comparados os estudos realizados em 2014 e 2015 (ALELO, 2014; ALELO, 2015; ABESO, 2015).

A prevalência de excesso de peso e obesidade no Brasil é crescente em todas as faixas etárias a partir dos cinco anos de idade. Estudos populacionais datados nos últimos 34 anos (1974-2009) mostram que o predomínio da obesidade elevou-se em mais de seis vezes entre crianças de 5-8 anos de idade, independente do gênero. Entre os adolescentes, foi observado um crescimento de cinco vezes no sexo feminino e de 14 vezes no sexo masculino. Nos indivíduos maiores de 20 anos, verificou-se um aumento em mais de quatro vezes no sexo masculino e duas vezes entre o sexo feminino (IBGE, 2010).

De acordo com o levantamento realizado pelo IBGE, o índice de obesidade e sobrepeso alcança 60% da população, onde 82 milhões de pessoas apresentaram o IMC igual ou maior do que 25, sendo prevalente no sexo feminino (58,2%). Além disso, o estudo indica que o excesso de peso aumenta com a idade, sendo mais rápido no homem. Ainda, os dados indicaram que a obesidade atinge um em cada cinco brasileiros de 18 anos ou mais no ano de 2013 (20,8%), sendo mais alto em mulheres (24,4%) quando comparada aos homens (16,8%). O excesso de gordura abdominal está relacionado ao risco a várias doenças metabólicas (hipertensão arterial, diabetes e obesidade). A circunferência da cintura é diretamente proporcional a idade em ambos os sexos (ABESO, 2015; IBGE, 2010).

A obesidade vem ganhando maior notoriedade nas ações e iniciativas intersetoriais do Governo Federal brasileiro com a implementação de estratégias como a Política Nacional de Alimentação e Nutrição (PNAN) que promove ações preventivas e terapêuticas como uma das prioridades de atenção nutricional e o Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022, que norteia sobre metas específicas com o objetivo de diminuir a predominância da obesidade entre crianças e

adolescentes e impedir seu crescimento entre adultos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

2.3. O processo inflamatório

O processo inflamatório consiste na resposta fisiológica diante de lesão tissular ou de infecção. Esta resposta orgânica envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido agredido. Diversos estímulos exógenos e endógenos podem ocasionar a lesão da célula, que por consequência estimula uma reação complexa denominada inflamação. Papiros egípcios de 3000 anos a.C., descreveram os primeiros sinais da inflamação e Celsus, um escritor romano do primeiro século d.C., foi o primeiro a descrever os quatro sinais da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Em posterior, Virchow adicionou mais um sintoma, a *functio laesa* (perda de função) (KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005).

A reação inflamatória é um processo que ocorre no tecido conjuntivo vascularizado, que envolve leitos capilares, plasma, células circundantes e constituintes celulares e extracelulares em resposta a danos teciduais, infecções e/ou reações imunológicas. Esse processo objetiva eliminar o agente lesivo e induzir uma série de eventos que envolve uma complexa interação entre as células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos, monócitos/macrófagos), das células vasculares da musculatura lisa e de células endoteliais (TEDGUI; MALLAT, 2001), visando destruir o agente agressor e resultar em processo de cicatrização e reparação tecidual. A cascata de eventos ativada pode prolongar e induzir lesão no tecido, resultado da liberação exacerbada de enzimas, mediadores inflamatórios e espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (TRACEY, 2000; KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005).

O processo inflamatório é constituído de três fases: fase precoce da inflamação aguda, caracterizada por aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação local; fase tardia da inflamação aguda, com penetração de células leucocitárias e fagocitárias; e, fase proliferativa crônica, com degeneração tissular e fibrose.

A resposta de fase aguda da inflamação pode durar minutos, horas ou dias, e apresenta os sinais cardeais da inflamação: dor, calor, rubor, tumor e perda de função. Na fase precoce é em torno de 0-1 hora e na fase tardia de 5-6 horas posterior à lesão (ALBERTINI et al., 2004).

Durante a fase precoce da inflamação, mediadores inflamatórios como bradicinina e histamina modulam a resposta com o aumento do calibre e do fluxo vascular, característicos do calor e rubor no foco da inflamação (KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005; ALBERTINI et al., 2004). A fase tardia da inflamação aguda é caracterizada pelo predomínio de eventos celulares como a marginação, a aderência endotelial, a diapedese e a migração leucocitária para focos da inflamação, induzidos por estímulos quimiotáticos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). A fase crônica pode durar um período indeterminado, variando de acordo com os tipos de mediadores celulares e humorais associados. É um processo associado à presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (RYAN; MAJNO, 1977; ROTE, 1998; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A liberação de mediadores inflamatórios resulta em edema tissular, decorrente ao extravasamento de proteínas plasmáticas e migração hídrica para o tecido e infiltração de mediadores inflamatórios que objetivam eliminar o agente agressivo (SPINOSA et al., 2006; GILMAN et al., 2006). A migração celular ocorre como resultado da síntese local de diversos mediadores inflamatórios com atividade quimiotática e de alterações das proteínas de membrana do endotélio vascular.

Os leucócitos infiltram-se nos tecidos nas paredes dos vasos sanguíneos, por intermédio das moléculas de adesão aos respectivos receptores no endotélio e em sequência transmigração pelo endotélio. A migração leucocitária é fundamental para defesa contra antígenos estranhos ao organismo. No entanto, este mesmo processo pode resultar doenças inflamatórias, crônicas, agudas e autoimunes, derivadas da inflamação exacerbada e destruição tecidual resultante (JAAKKOLA et al., 2000).

2.4. Mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória

Para que o processo inflamatório ocorra, diversos mediadores químicos são sintetizados. Essas substâncias podem ser originadas a partir do tecido (aminas vasoativas, eicosanoides, citocinas, fator de ativação plaquetária (PAF), radicais livres, óxido nítrico (NO) e neuropeptídeos) ou do plasma (sistema de coagulação, sistema do complemento, sistema das cininas, sistema fibronolítico (RANG et al., 2007).

Os mediadores químicos são responsáveis pelos eventos vasculares como a estase vascular, vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar com promoção da migração

leucocitária para o foco inflamatório. Quando a inflamação ultrapassa níveis homeostáticos, mediadores endógenos alcançam a circulação sistêmica podendo provocar processo inflamatório denominado de resposta de fase aguda (ROTH et al., 2009). Os mediadores são divididos nos seguintes grupos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; ALBERTINI et al., 2004): 1) Aminas Vasoativas – histamina e serotonina; 2) Proteases Plasmáticas – sistema das cininas, complemento, coagulação e fibrinolítico); 3) Metabólitos do Ácido Araquidônico – cicloxigenase e lipoxigenase; 4) Proteases lisossômicas; 5) Radicais livres derivados do oxigênio; 6) Fatores das plaquetas (PAF); 7) Quimiocinas; 8) Citocinas; 9) Óxido Nítrico.

AMINAS VASOATIVAS

A histamina e serotonina são aminas vasoativas encontradas nos grânulos de células já pré-formadas. São os primeiros mediadores a serem liberados no sistema após um estímulo inflamatório (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). A histamina é um mediador proteico encontrado nos tecidos e liberado pelos mastócitos na fase precoce da resposta inflamatória (GELFAND et al., 2005). Também encontra-se presente nos basófilos e plaquetas (KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005). Atuam sobre os vasos sanguíneos e induz a contração das células endoteliais através da ligação por seus receptores específicos, formando por consequência lacunas interendoteliais. Isto resulta em dilatação dos vasos capilares, facilitando dessa forma a migração de líquido que contém células (linfócitos específicos, monócitos, neutrófilos, células “*natural killer*” e eosinófilos) e proteínas do sangue (anticorpos específicos) para o tecido circundante, ou seja, aumento da permeabilidade vascular (SHARON, 2000).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) apresenta funções similares às da histamina e encontra-se presente nas plaquetas, células enterocromafins e sistema nervoso central (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; BARMAN, 1997). Ainda, é um dos mediadores químicos responsáveis pela sensação da dor na inflamação, por meio da sua atividade sobre neurônios sensoriais (DRAY, 1995).

SISTEMA DAS CININAS

O Sistema das cininas produzem os peptídeos vasoativos bradicinina, Lys-bradicinina e Met-Lys-bradicinina, através da atividade das calicreínas sobre os cininogênios (COSTA et al., 2001). A cascata que sintetiza as cininas é promovida pela ativação do fator XII da via intrínseca da coagulação, o fator de Hageman, ativadas pelo contato desse com o colágeno ou membranas basais (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

As cininas promovem diversas ações inflamatórias, além da liberação de citocinas, radicais livres e prostanoídes a partir de variadas células. Ademais, alteram o calibre vascular através do estímulo de neurônios pós-simpáticos (DATTI et al., 2002), estimula a desgranulação de mastócitos que por consequência liberam histamina; induz a produção de prostaglandinas e o extravasamento do plasma, provocam a contração muscular e dor (ALLER et al., 2007; COSTA et al., 2001; GARRISON, 1991).

SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento é formado por um conjunto de proteínas, encontradas no soro e na superfície celular, e bem como, por proteínas reguladoras, encontradas na membrana celular ou no plasma (BERGER; DAHA, 2007; JANEWAY et al., 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Interagem entre si e com outras moléculas do sistema imune. Tem como funções: ofertar opsoninas para a fagocitose; ativar e lisar as células; erradicar imunocomplexos, ofertar fatores quimiotáticos para ativação da migração celular na inflamação e atua como mecanismo efetor da resposta imune inata e humoral (JANEWAY et al., 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A ativação do sistema complemento se dá por cascata e pode advir por três vias: clássica, alternativa e das lectinas (JANEWAY et al., 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

SISTEMA DE COAGULAÇÃO

O sistema de coagulação ocorre através da ativação proteolítica de zimógenos por proteases do plasma, levando a formação da trombina, que converte o fibrinogênio em fibrina. A ativação da cascata de coagulação pode correr por duas vias: a intrínseca e a extrínseca (MACFARLANE, 1964; DAVIE; RATNOFF, 1964).

Após um dano endotelial no vaso, a trombomodulina é liberada e a trombina se liga ao seu receptor. Esse complexo formado trombina-trombomodulina promove a ativação da Proteína C, que forma um complexo com a Proteína S no endotélio. A Proteína C ativada induz a inibição da coagulação e ativa a via fibrinolítica. Todavia, a trombina ativa a via da proteína C, provocando por *feedback negativo*, a inibição da sua produção (CICALA et al., 1998).

METABÓLITOS DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

O ácido araquidônico (AA) consiste em um ácido graxo insaturado, composto por 20 carbonos e é encontrado esterificado nos fosfolipídios da membrana plasmática (KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005). O AA liberado a partir da ativação da enzima fosfolipase A2 é metabolizado pelas vias de cicloxigenase e lipoxigenase (RANG et al., 2007). São encontradas duas isoformas de cicloxigenase: a COX-1 (constitutiva) e a COX-2 (induzida). A COX-1 é sintetizada na maioria das células e produz prostaglandinas (PGs), que possuem função fisiológica e o tromboxano A2 (TXA2) expresso nas plaquetas. A COX-2 é expressa por neutrófilos, monócitos, macrófagos, sinoviócitos e mastócitos, e induzida por promotores de citocinas ou tumor e por fatores de crescimento, gerando uma elevada quantidade de PGE2 e PGI2, que atuam no aumento da permeabilidade vascular e edema no foco inflamatório (GOMES et al., 2009). Ainda é relatado a existência de uma terceira isoforma, a COX-3, que não geraria eicosanoides pró-inflamatórios, mas produtos com ação anti-inflamatória (SCHONBECK et al., 1999).

CONSTITUINTES LISOSSOMAIS DOS LEUCÓCITOS

Leucócitos como monócitos e neutrófilos possuem grânulos lisossômicos que podem colaborar para processos inflamatórios, como proteases ácidas e básicas (KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005). Os neutrófilos, logo após a adesão ao endotélio vascular, migram para o local infectado e liberam radicais livres de oxigênio e seus constituintes internos, bem como os grânulos de proteínas azurófilos (BORREGAARD, 1997). Essas substâncias liberadas por grânulos neutrofílicos são importantes, pois, as mesmas degradam moléculas, da matriz extracelular (elastina, fibronectina, colágeno tipo IV etc) podendo resultar em danos, como destruição do tecido (RAO et al., 1991; BORREGAARD et al., 1997). A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada principalmente nos grânulos azúrofilos dos neutrófilos e em monócitos (LANZA, 1998).

RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO

As espécies reativas do oxigênio (EROS) podem ser originadas a partir de estímulos ambientais e/ou por células ativadas do processo inflamatório. Tais substâncias provocam oxidação de proteínas, podendo ocasionar insulto tanto por via direta ou indireta através da formação de metabólitos secundários reativos (RAHMAN; MARWICK; KIRKHAM, 2004).

As espécies reativas de oxigênio atuam como substâncias sinalizadoras e exerce papel sobre a secreção de quimiocinas e citocinas, na proliferação celular e quando em níveis mais elevados podem provocar dano e morte celular, pela modificação oxidativa de carboidratos e proteínas e peroxidação de lipídios (LANDER, 1997).

FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

O Fator de ativação plaquetária (PAF) é um mediador orgânico lipofílico, que, juntamente com a histamina e os leucotrienos é produzido e liberado por mastócitos e plaquetas de coelhos, cobaias e ratos (PARSLOW et al., 2001). De acordo com a literatura, o PAF é caracterizado como mediador de processos inflamatórios agudos, respostas sistêmicas ao choque e reações alérgicas (KAMINSKI et al., 1990).

QUIMIOCINAS

As quimiocinas fazem parte de um grupo de citocinas de 8 a 12kDa, com capacidade de induzir a migração celular, de influenciarem no acúmulo de leucócitos nos tecidos com processos inflamatórios em interação com as células residentes no tecido (WALLACE et al., 2008). Por isso, elas possuem a capacidade de controlar a evolução natural da resposta inflamatória. Dessa forma, a produção de citocinas de forma insistente no foco inflamatório é fundamental para o desencadeamento de uma doença crônica ou tumor (WAHL; KLEINMAN, 1998). São citocinas com alta especificidade para recrutamento de populações específicas de leucócitos e são divididas em quatro famílias de acordo com a sequência de resíduos de cisteína : CXC, CC, C e CX3C (BEN-BARUCH, 2006).

CITOCINAS

A liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α) caracteriza a fase aguda do processo inflamatório. Cada citocina apresenta papel fundamental sobre a resposta inflamatória na fase aguda. As citocinas TNF - α e a IL-1 β dão início à cascata inflamatória (UHLAR et al., 1997). As citocinas anti-inflamatórias TGF β , IL-10, IL-4, IL-5 colaboram para a homeostase na inflamação (FRANKE et al., 2002).

Carswell e colaboradores (1975) identificaram o potencial que o TNF- α tem em provocar necrose hemorrágica em certos tumores e de induzir a caquexia durante quadro de infecção crônica. É um agente quimiotático para monócitos e neutrófilos, induz a fagocitose, síntese de superóxido e adesão ao endotélio; estimula a produção de quimiocinas KC e MIP 2

e ainda é associada a promoção hipernocicepção inflamatória (CAMUSSI et al., 1991; ZHANG et al., 2001; CUNHA et al., 2007). Essa citocina pode ser sintetizada por linfócitos, monócitos ou macrófagos ativados (BINGHAM, 2002).

A interleucina-1 (IL-1 β) é sintetizada por neutrófilos e monócitos/macrófagos, atua sobre o sistema imunitário e também pode atuar em outros, como por exemplo, o sistema nervoso (SPULBER; SCHULTZBERG, 2010). Agem como um significativo desencadeador da migração de leucócitos e é uma das responsáveis pela indução da expressão da molécula de adesão ICAM – 1 e da IL-6, de forma sinérgica com o TNF - α (BENINCÁ et al., 2007; LEMAY *et al.*, 1990). Essa atuação sinérgica promove a hipernocicepção inflamatória (CUNHA et al., 2007).

ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa e com caráter lipofílico e hidrofóbico (KATAYAMA, 1995). É produzido a partir da conversão do aminoácido L-arginina em L-citrulina por processo oxidativo pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MAYER; HEMMENS, 1997). São identificadas três isoformas da enzima NOS chamadas de sintases, onde duas são expressas de forma constitutiva: endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS); e, apenas uma é induzida, chamada de iNOS (MONCADA et al., 1995; STRIJDOM; CHAMANE; LOCHNER, 2009). Alguns estudos demonstram a presença de uma NOS funcional nas mitocôndrias (mtNOS) e esta enzima é ativada de forma constitutiva e possui papel fundamental na respiração mitocondrial e metabolismo celular do oxigênio (PODEROSO et al., 1999).

2.5. Eventos vasculares da resposta inflamatória

Em condições homeostáticas, as proteínas plasmáticas e células circulantes estão presentes no interior dos vasos e no sentido do fluxo sanguíneo. Sob um estímulo inflamatório, tais vasos sofrem modificações, contribuindo dessa forma para a passagem de proteínas plasmáticas e células da circulação para o foco inflamatório (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

A fase aguda da resposta inflamatória progride a partir da etapa vascular que tem início pelas células residentes no tecido logo após o dano. Após um insulto ao endotélio, ocorrem vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar mediados por histamina,

serotonina, aminas vasoativas produzidas e liberadas por mastócitos e monócitos após a agressão (CRUVINEL et al., 2010). O aumento da permeabilidade vascular pode acontecer por diferentes mecanismos, o que dependerá dos receptores ativados no endotélio ou da agressão ocorrida no vaso sanguíneo.

Mediadores e determinadas células apresentam atuação fundamental nos eventos vasculares durante a inflamação: a histamina e leucotrienos provocam contração no endotélio; o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) possui participação na reorganização citoesquelética endotelial; o fator de crescimento *do* endotelial vascular (VEGF) provoca aumento da transcitose e neo vascularização e também extravasamento de líquidos; agente agressor ou leucócito promovem lesão vascular direta e extravasamento de líquidos.

O exsudato inflamatório é composto por vários mediadores químicos (sistema do complemento, da coagulação, fibrinolítico e das cininas) que atuam sobre células adjacentes e no próprio leito capilar (KUMAR, ABBAS; FAUSTO, 2005). Primeiramente migram do leito capilar os eletrólitos e micro-moléculas, formando o transudato e em seguida, moléculas maiores como fibrinogênio e albumina compõem o exsudato. Em seguida, ocorre a evasão de proteínas, água e alguns componentes do sistema complemento para o espaço extravascular e marginalização de leucócitos.

O endotélio ativado expressam moléculas de superfície que contribuem para a aderência leucocitária e migração para o foco. Os macrófagos residentes local lesionado liberam citocinas (IL-1 e TNF- α) e quimiocinas (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). A evolução e duração desses processos inflamatórios dependerão da tenacidade do agente agressor (ABBAS, 2008).

2.6. Moléculas de adesão de membrana envolvidas na migração leucocitária

A migração leucocitária para o sítio inflamatório se dá pela interação dos leucócitos com as células do endotélio, por meio da expressão de proteínas, chamadas moléculas de adesão. Os mediadores inflamatórios e quimiotáticos são responsáveis por promover um aumento nas interações entre células endoteliais e neutrófilos e dessa forma facilitar a migração para o foco inflamatório (MCEVER, 1991).

Normalmente, as células circulam no centro do vaso, no qual a resistência é menor e a velocidade, maior. Durante a vasodilatação, as células circulantes chocam-se com mais frequência com as células endoteliais ativadas que expressam em sua superfície moléculas adesivas. Ainda, a velocidade do fluxo sanguíneo diminui devido a vasodilatação. As células do endotélio são ativadas por subprodutos de microrganismos, histamina, leucotrieno B₄, componentes ativados do sistema complemento, citocinas, fatores da coagulação (PANÉS et al., 1999).

As selectinas são glicoproteínas encontrada em leucócitos (L-selectina), endotélio (E-selectina e P-selectina) e plaquetas (P-selectina). Elas se ligam a moléculas glicolisadas existentes na superfície celular e facilitam a fixação inicial de leucócitos às membranas endoteliais (LEY et al., 2007; LUSTER et al., 2005). Essas fracas ligações permitem a desaceleração e rolamento dos leucócitos no leito do vaso sanguíneo (RANKIN, 2004). Outras famílias de moléculas também participam do mecanismo de adesão, chamadas imunoglobulinas e integrinas (PANÉS et al., 1999). A família das imunoglobulinas (ICAM-1 e ICAM-2) e das β -integrinas (CD11a/CD18 e CD11b/CD18) são responsáveis pelo ancoramento e adesão mais firme ao endotélio (RANKIN, 2004).

As quimiocinas direcionam para o sítio inflamatório os leucócitos que por meio de pseudópodes percorrem a membrana basal e migram para o interstício (CRONSTEIN; WEISSMAN, 1993). A migração e o extravasamento dos leucócitos são dependentes de quimiocinas como IL-8 e MCP-1, que são sintetizadas nos focos de infecção e interagem com os proteoglicanos na matriz extracelular e com moléculas semelhantes na superfície das células endoteliais. Os macrófagos ativados liberam IL-8, que atrai neutrófilos que por consequência são induzidos a infiltrar o tecido inflamado. Ainda, o MPC-1 promove o recrutamento de células T, NK, dendríticas e monócitos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2003).

2.7. Marcadores da resposta inflamatória da fase aguda

As proteínas de fase aguda (PFA's) são biomoléculas presentes no sangue que podem ser utilizadas como marcadores indicadores de distúrbios sistêmicos. Sua produção ocorre nos hepatócitos e é estimulada por citocinas (CERON et al., 2005). Proteínas que têm sua concentração aumentada no plasma são denominadas proteínas de fase aguda positivas, no entanto, as que tem produção diminuída são chamadas de proteínas de fase aguda negativas, estas

objetivam disponibilizar substratos para as primeiras (CECILIANE et al., 2002; LYOUMI et al., 1998).

As proteínas da fase aguda positivas auxiliam na regulação da magnitude da inflamação das seguintes maneiras: pela remoção de microrganismos e metabólitos celulares, remodelamento celular, ação de proteases, ativação do sistema complemento, controle antitrombótico, da expressão gênica, da hemostasia estimulado pelas células inflamatórias e da atividade de enzimas proteolíticas e ativação da inflamação local (CECILIANE et al., 2002; HEINRICH et al., 1990). Com relação às proteínas de fase aguda negativa, elas podem ter sua produção diminuída devido à necessidade hepática em aumentar a produção das proteínas de fase aguda positiva, por requerer uma maior disponibilidade de aminoácidos (aa). Também sua diminuição no plasma pode estar relacionada a inibição hepática da síntese do RNAm da proteína negativa, mediada por citocinas (MARGARSON; SONI, 1998). As PFA'S podem ser classificadas em : classe I – Proteína C-Reativa (PCR), hepatoglobina, amiloide sérica A (SSA), α -1-glicoproteína ácida (AGP), Hemopexina, Hepatoglobina, que são reguladas principalmente por IL-1, ou IL-1/IL-6 e glicocorticoides; classe II – α -1 antitripsina, fibrinogênio e α -1 antiqumotripsina, regulados prioritariamente pela IL-6 e glicocorticoides (LYOUMI et al., 1998).

A injúria tecidual ativa a liberação de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e IL-6, TNF- α e IFN- γ . Elas atuam no fígado, induzindo a produção das PFA's e por consequência um aumento ou diminuição nos seus níveis séricos. Durante um processo inflamatório, uma PFA pode aumentar suas concentrações séricas em cerca de 25% (KJELGAARD-HANSEN; JACOBSEN, 2011). Durante eventos inflamatórios e infecciosos, as PFA's tem seu nível aumentado no soro e se reduzem em reposta ao tratamento.

2.8. Tecido adiposo

O tecido adiposo é um tipo de tecido conjuntivo, composto por adipócitos, pré-adipócitos, macrófagos, leucócitos, fibroblastos e células endoteliais (GUILHERME et al., 2008). É considerado o principal reservatório energético a longo prazo, contudo, ainda exerce papel como órgão endócrino secretador de proteínas chamadas adipocinas (OUCHI et al., 2011; FERNÁNZED-SÁNCHEZ et al., 2011). São classificados anatomicamente em tecido adiposo visceral (TAV) e subcutâneo (TAS).

O TAV é metabolicamente mais ativo e situa-se principalmente no interior da cavidade abdominal. Atua como promotor eficaz da lipólise e liberação de ácidos graxos, apresenta maior resistência à insulina e secreta em maior quantidades adipocinas pró-inflamatórias (angiotensina I, resistina, PAI-1, IL-6 e PCR). Representa entre 10-20% da gordura corporal total de homens e entre 5-10% de gordura total em mulheres. O TAS encontra-se localizado na região abdominal e glúteo-femoral e sintetiza maior quantidade de leptina e ASP. Representa cerca de 80% da massa de gordura total nos indivíduos em condições saudáveis (PORTER et al., 2009; KAMINSKI; RANDAL, 2010).

De acordo com sua morfologia celular, o órgão adiposo é classificado em: tecido adiposo marrom ou multilocular (TAM), tecido adiposo branco ou unilocular (TAB). O TAB é encontrado em várias regiões e tem como funções o armazenamento de energia sob forma de triglicerídeos, proteção contra choques mecânicos, manutenção da temperatura e secreção de adipocinas (FONSECA-ALANIZ et al., 2006). São compostos por adipócitos (50%) e o restante de tecido conjuntivo e nervoso, leucócitos, macrófagos, fibroblastos, nódulos linfáticos, células mesenquimais e pré-adipócitos (AHIMA; FLIER, 2000). O TAM é predominante em crianças mas também presentes em adultos. A coloração escura é justificada pela presença da enzima citocromo oxidase encontradas no interior das mitocôndrias (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Desempenha atividade termogênica e portanto, regulação da temperatura corporal (JUNQUEIRA, 2004; COSTA, 2005).

2.9. Inflamação do tecido adiposo na obesidade

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo aumento de massa adiposa e atualmente encontra-se bem descrita a correlação entre complicações metabólicas e desnível dos marcadores inflamatórios no tecido adiposo. As adipocinas são marcadores inflamatórios sintetizados no tecido adiposo possuem função hormonal, metabólica e atividade pró e anti-inflamatória (OUCHI et al., 2011). São proteínas de baixo peso molecular e participam da inflamação e resposta do sistema imune (CARVALHO et al., 2006).

Alterações nos perfis de adipocinas causadas pelo excesso de adipócitos podem desencadear doenças metabólicas como resistência à insulina, diabetes mellitus do tipo 2 e doenças cardiovasculares (LEAL Vde; MAFRA, 2013). Os adipócitos podem sofrer hiperplasia e hipertrofia, devido ao processo de remodelagem contínua, evento fisiológico, mas que de forma

desregulada pode provocar o recrutamento exacerbado de macrófagos devido ao excesso de morte celular. Os macrófagos são sinalizados por quimiocinas para o foco inflamatório com o objetivo de fagocitar restos celulares (PATEL et al., 2013; HARFORD et al., 2011; LEE et al., 2010).

A obesidade é caracterizada como um estado de inflamação crônica de baixo grau, com presença de infiltração de macrófagos no tecido adiposo. Os macrófagos do tipo M1 ou classicamente ativados possuem perfil de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-6 e IL1 β). Já os macrófagos do tipo M2 ou alternativamente ativados, apresentam fatores anti-inflamatórios (IL-10, TGF β). Estudos sugerem que a obesidade promove a alteração do fenótipo de macrófagos M2 para M1 e por consequência, aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (KALUPAHANA et al., 2012).

Concomitante ao aumento de tecido adiposo, ocorre um aumento na síntese de adipocinas inflamatórias, como TNF- α e IL-6 (CARVALHO et al., 2006). Essas proteínas são produzidas em resposta a estímulos infecciosos ou inflamatórios (MARTÍNEZ; ALVAREZ-MON, 1999). O nível circulante de muitas citocinas e proteínas de fase aguda são encontradas em níveis aumentados nos indivíduos obesos. Os adipócitos secretam diversas delas e provocam direta e indiretamente a produção e circulação de moléculas associadas à inflamação (TRAYHURN, 2007; BULLO, 2003).

2.10. Marcadores inflamatórios na obesidade

O marcador é uma variável que pode ser utilizado para medir ou avaliar o estado fisiopatológico de um indivíduo, podendo ser quantificado em uma variedade de amostras biológicas (urina, sangue, tecido) (CASELLA FILHO et al., 2003).

De acordo com sua função, as citocinas podem ser classificadas em: pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF – α , IFN, IL-2, quimiocinas) ou anti-inflamatórias IL-4, IL-10, IL-13, IL-1a (BELOTTO, 2011). Volp et al., (2008) relatam que é no tecido adiposo que ocorre a maior produção de citocinas, associando também a maior liberação dessas proteínas em indivíduos obesos. Essas citocinas são denominadas adipocinas, também produzidas em outros tecidos (COSTA; DUARTE, 2006).

Dentre as principais citocinas estão o TNF- α , a IL-6, e a leptina, classificadas como pró-inflamatórias e a adiponectina como anti-inflamatória. Essas citocinas caracterizam a obesidade como inflamação crônica (PRADO et al., 2009). A inflamação de baixo grau crônica é caracterizada pela elevação de 2-3 vezes acima do nível basal de IL-1, IL-6, IL-1RN, TNF- α , sTNF-R e proteína C-reativa (PCR) (VOLTARELLI et al., 2010).

O conceito de inflamação associado a complicações metabólicas como obesidade e resistência insulínica iniciou-se em meados de 1993, quando estudiosos demonstraram que as células do tecido adiposo sintetizava o TNF- α e que em animais obesos estava elevada e ainda que a inibição desta citocina diminuía a resistência insulínica. Outros trabalhos similares demonstram que o excesso de adipócitos resulta em uma inflamação crônica pelo aumento de IL-6, PAI-1 e TNF- α (CARVALHO et al., 2006). Este nível aumentado de IL-6 poderia estimular a síntese hepática de triacilglicerol, colaborando para a hipertrigliceridemia relacionada à obesidade visceral (GUIMARÃES et al., 2007). O TNF- α é uma citocina inflamatória, não só produzida no tecido adiposo, bem como no muscular e linfoide (MONTANI et al., 2002).

2.11. Nimesulida

A nimesulida (N-(4-nitro-2-fenoxifenil) metanossulfonamida) (Figura 1) é um anti-inflamatório não esteróide que possui atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória (DELLIS et al., 2007). É um alquilssulfonamida, protótipo da classe das metassulfonamidas (LEVAL et al., 2000). Difere quimicamente dos demais fármacos da classe de anti-inflamatórios não esteroides (AINES) devido à presença do grupamento sulfonilida (RANG; DALE; RITTER; 2000).

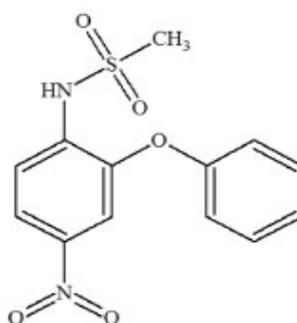


Figura 1: Estrutura química da nimesulida (FONTE: RUELA et al., 2009)

A nimesulida apresenta um caráter fracamente ácido com pKa de 6,56 (SINGH *et al.*, 1999), e baixa solubilidade em água (10 µg/mL) (PIEL, 1997). É um pó cristalino amarelado e também apresenta polimorfismo (SWEETMAN, 2007).

O mecanismo de ação da nimesulida se dá pela inibição da enzima cicloxigenase do tipo 2, devido a interação do grupo sulfonamida da molécula do medicamento com o resíduo de arginina em cavidade hidrofílica da enzima. Estudiosos sugerem que a nimesulida pode ter maior seletividade para a COX-2 em virtude do maior volume do seu grupo metilsulfonamida (MICHAUX; CHARLIER, 2004). Os AINES, bem como, a nimesulida, ligam-se a proteínas plasmáticas (95%), principalmente a albumina e se concentram principalmente no plasma sanguíneo (DAVIS; BROGDEN, 1994).

A nimesulida pode ser administrada por via oral com dose de 100mg, via retal (200mg) e via tópica sob forma de gel 3%. Também tem sido utilizada a nimesulida complexada com betaciclodextrina (CARVALHO, 2010; SWEETMAN, 2007). A absorção da nimesulida ocorre de forma rápida (2-3 horas) no trato gastrointestinal após a administração de um dose de 100mg. Por via oral, a absorção é quase completa e administrada em conjunto com alimentos há uma redução em sua velocidade, contudo o volume da absorção se mantém (BERNAREGGI, 1993).

É indicado para o tratamento de processos inflamatórios osteo-articulares e músculo-esqueléticos associados com a liberação de prostaglandinas (CARVALHO, 2010). Como efeitos adicionais, a nimesulida ainda reduz a produção de citocinas; aumento do cAMP intracelular; diminui a produção de enzimas de degradação e casualmente a ativação de receptores glicocorticoides, inibe a liberação de histamina, elastase e metaloproteinase e síntese do fator de ativação plaquetária (PAF) por neutrófilos, induz a apoptose de condrócitos e entre outras células do tecido conjuntivo nos casos de osteoartrite, ativa receptores de glicocorticoides, inibe a adesão e função de neutrófilos; apresenta atividade antioxidante (BRUNTON *et al.*, 2008; KULKARNI, 2002; SULEYMAN *et al.*, 2008; RAINSFORD, 2006; ROBERTS; MORROW, 2005).

3. JUSTIFICATIVA

A epidemia da obesidade é um problema global que vem aumentando substancialmente nas últimas décadas. O *marketing* exacerbado de alimentos hipercalóricos e o desequilíbrio entre o consumo e gasto energético são supostos fatores responsáveis pela problemática mundial. Ainda, encontra-se bem relatado na literatura as implicações negativas que a ingestão de alimentos hipercalóricos durante a gestação e lactação pode provocar na saúde da sua prole, pois, o ambiente intrauterino exerce papel crucial na programação metabólica dos órgãos dos descendentes. Devido a condição de inflamação crônica de baixo grau, os indivíduos obesos apresentam maior nível de mediadores pró-inflamatórios que se, ultrapassa o limiar da normalidade pode desencadear processos inflamatórios graves. Para neutralizar o nível desses mediadores pró-inflamatórios, os anti-inflamatórios atuam na terapêutica pela sua atividade analgésica e antipirética, sendo a classe dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) os mais utilizados mundialmente, como por exemplo a Nimesulida.

Nesse contexto, os resultados da presente pesquisa poderão ser utilizados como base científica para melhor entendimento sobre o impacto que a dieta ocidentalizada administrada em períodos cruciais de desenvolvimento (gestação, lactação e pós-desmame) pode provocar na fase aguda da resposta inflamatória e na eficácia farmacológica da Nimesulida visando uma melhor compreensão acerca do tema, construção de novas estratégias terapêuticas, com ampliação da atenção à saúde de indivíduos obesos, especialmente das gestantes e articulação de políticas públicas que objetivem qualificar o sistema de saúde.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a fase aguda da resposta inflamatória e a eficácia farmacológica da nimesulida na prole adulta de ratos *Wistar* proveniente de matrizes alimentadas com a dieta ocidentalizada durante a gestação e lactação e/ou pós-desmame.

4.2. Objetivos específicos

- Determinar nos ratos alimentados com dieta padrão ou “ocidentalizada” do desmame até 60 dias:

- Consumo alimentar a cada dois dias;
- Evolução ponderal semanal.

- Avaliar a partir do 60º dia vida dos nos ratos alimentados com dieta padrão ou “ocidentalizada”:

- A severidade da resposta inflamatória aguda;
- Os níveis de TNF- α e IL-6;
- Atividade da mieloperoxidase (MPO);
- O efeito da nimesulida sobre o edema de pata induzido por carragenina.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local de estudo

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Produtos Bioativos (LFPB) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia e no Laboratório de Nutrição Experimental e Dietética do Departamento de Nutrição, localizados na Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, no campus Recife.

5.2. Modelo experimental

Foram utilizadas 20 ratas albinas primíparas da linhagem *Wistar* e sua prole composta por 30 ratos machos oriundos da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram acasalados na proporção de um macho (n=10) para duas fêmeas (n=20), mantidos em biotério de experimentação e alojados em gaiolas de polipropileno com dimensões de 46x31x21 cm (CxLxA) em um ambiente com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo claro-escuro invertido de 12/12 horas e água filtrada e ração *ad libitum*.

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Protocolo nº 23076.003.845/2015-63).

5.3. Dieta

A dieta “ocidentalizada” (DO), caracterizada por possuir maiores valores de lipídios saturados que a dieta padrão (DP), foi elaborada a partir da mistura de alimentos hipercalóricos triturado, formando *pellets*. A composição da DO já se encontra descrita em estudos anteriores do grupo (FERRO CAVALCANTE et al., 2013; FERRO CAVALCANTE et al., 2014) e desenvolvida a partir da pesquisa de orçamento familiar (POF) (IBGE, 2011). Também foi utilizado o Mix de mineral AIN-93G-MX (Rhoster®) essencial para a etapa de crescimento do desmame até os 60 dias de vida. A composição percentual centesimal dos macronutrientes das dietas utilizadas encontra-se descrita na tabela 1.

Tabela 1: Macronutrientes segundo o Valor Energético Total (VET) da dieta padrão (Presence®) ou ocidentalizada.

	Proteína (% kcal VET)	Carboidrato (% kcal VET)	Lipídio (% kcal VET)	VET (kcal/g)
Ocidentalizada*	20	49	32	4,2
Presence **	26	63	11	3,6

*Os cálculos da composição centesimal de macronutrientes foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos e na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO).

**Determinado pelo Instituto Adolfo Lutz, 1985.

5.4. Direcionamento nutricional

A partir do 1º dia de gestação (confirmada pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal), as matrizes foram divididas aleatoriamente em dois grupos: 1) DPgl - que permaneceram recebendo a DP de biotério (Presence®) durante a gestação e lactação e 2) DOgl que passaram a receber DO durante a gestação e lactação. No 21º de lactação, somente os filhotes machos (n=30) permaneceram no experimento. Em seguida, segundo a manipulação nutricional, as proles foram divididas de forma aleatória em quatro grupos: *i*) DPgl-DP - prole das matrizes que receberam a DP durante a gestação e lactação e permaneceram com a mesma no pós-desmame até o 60º dia de vida; *ii*) DOgl-DO - prole das matrizes que receberam DO durante a gestação e lactação e continuaram com a mesma no pós-desmame até o 60º dia de vida; *iii*) DPgl-DO - prole de matrizes que receberam DP durante a gestação e lactação, mas que passaram a consumir DO no pós-desmame até o 60º dia de vida e *iv*) DOgl-DP - prole das matrizes que receberam DO durante a gestação e lactação, mas que passaram a receber DP no pós-desmame até o 60º dia de vida. Aos 60 dias de vida, as proles foram subdivididas em grupos (n=5), de acordo com a manipulação nutricional, para avaliação da intensidade da resposta inflamatória e do efeito anti-inflamatório da nimesulida, conforme esquema apresentado a seguir:

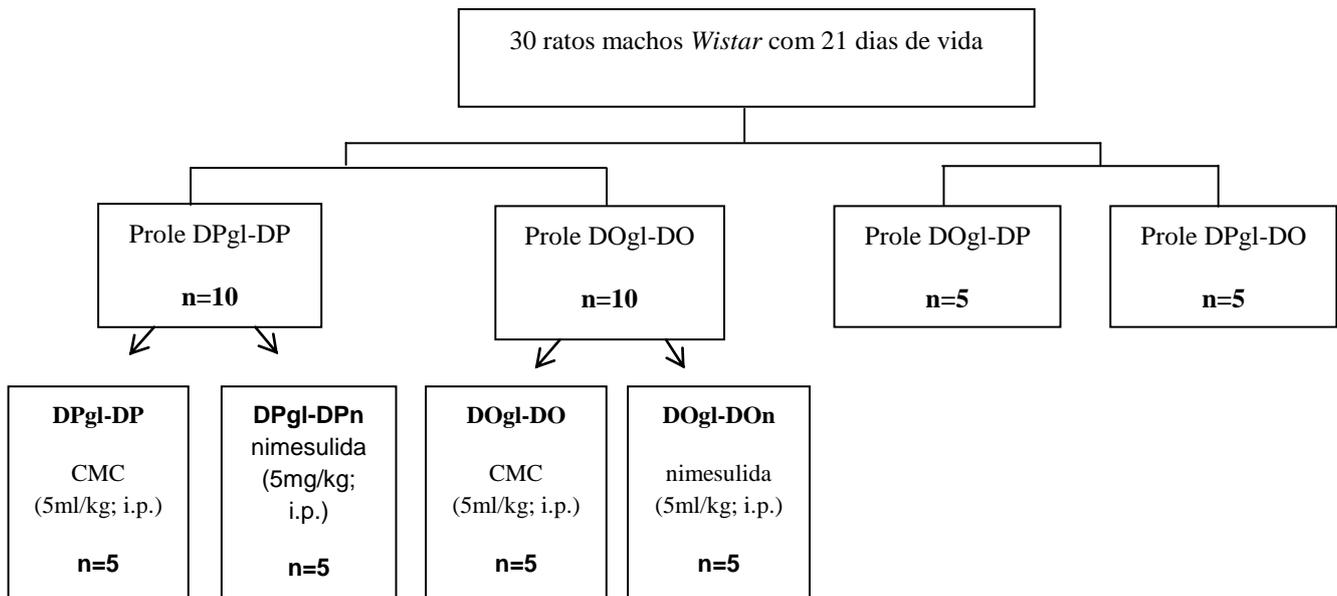


Figura 1: Distribuição dos grupos experimentais. CMC – Carboximetilcelulose (0,5%).

Avaliação da resposta inflamatória aguda e do efeito anti-inflamatório da nimesulida na prole adulta de ratas alimentadas com DP ou DO durante a gestação e lactação – Edema de pata induzido por Carragenina (Winter et al., 1962)

Para o estudo da resposta inflamatória aguda, os grupos DPgl–DP, DOgl–DO, DPgl–DO e DOgl-DP foram subdivididos em seis grupos (n=5): 1) controles - (DPgl–DP, DOgl–DO, DPgl–DO e DOgl-DP) e 2) tratados com nimesulida, (DPgl–DPn, DOgl- DOn). Em seguida, dois experimentos foram realizados: **No experimento A**, os animais dos grupos DPgl–DP, DOgl–DO, DOgl-DP e DPgl–DO receberam uma injeção subplantar de carragenina tipo IV (0,1 mL - 1% w/v em salina) na pata traseira esquerda. **No experimento B**, os grupos DPgl–DPn e DOgl–DOn, foram submetidos aos mesmos procedimentos descritos acima, porém, ao invés de uma solução de carboximetilcelulose (0,5% w/v em água destilada), os grupos foram previamente tratados com nimesulida (5mg/kg, i.p) 45 min antes da injeção subplantar do agente edematogênico (carragenina). O volume da pata injetada foi medido em pletismômetro digital (Panlab – Harvard Apparatus, Modelo LE 7500) antes (0 min) e 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após a injeção da carragenina. A variação do volume das patas foi expressa em mililitros pela diferença registrada no volume das patas antes (0 min.) e após a injeção do agente edematogênico ao final de cada intervalo de tempo. A intensidade da resposta inflamatória (volume do edema) exibida pelos grupos DOgl-DO, DOgl-DP e DPgl-DO foi comparada à do grupo DPgl-DP. A atividade anti-edematogênica da

nimesulida nos grupos DPgl–DPn e DOgl–DON foi calculada de acordo com a fórmula abaixo, em termos de porcentagem de inibição:

Porcentagem de inibição = $1 - V_t/V_c \times 100$, onde V_t e V_c correspondem à média das diferenças resultantes das medidas das patas nos grupos tratados com nimesulida (DPgl–DPn e DOgl–DON) e controle (DPgl–DP e DOgl–DO). No final dos experimentos, foram coletadas amostras de sangue para avaliação das variáveis bioquímicas e hematológicas e a região subplatar da pata esquerda dos animais para a quantificação das citocinas (IL-6 e TNF- α) e da mieloperoxidase (MPO).

Determinação do consumo alimentar

O consumo alimentar das matrizes durante a gestação e lactação e de suas proles no período pós-desmame até os 60 dias de vida foi avaliado a cada 2 dias e calculado através da subtração do peso inicial da alimentação ofertada pela sobra da gaiola no período de 48 horas.

Determinação da evolução ponderal

A aferição do peso corporal foi realizada semanalmente nas matrizes durante a gestação e lactação e em suas respectivas proles ao nascimento e aos 21^a dia vida até 60^a dia de vida.

Determinação do perfil bioquímico e hematológico

Aos 60^a dia de vida, os animais foram colocados em jejum por 10 horas e submetidos à indução do edema de pata. Após o término da realização dos experimentos, os animais foram anestesiados com tiopental (30mg/kg) para obtenção de amostras de sangue (5mL) durante a decapitação por guilhotina para determinação de variáveis bioquímicas (Albumina sérica e Proteína C Reativa (PCR)) e hematológicas (contagem total e diferencial dos leucócitos). A amostra foi centrifugada para obtenção do soro e armazenado em freezer -20°C para posterior análise das proteínas de fase aguda. A determinação de albumina foi realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e para Proteína C Reativa foi utilizado kit comercial específico para ratos (Boster Biological Technology Co., Ltd., Fremont, Califórnia, EUA).

Para a determinação do número total de leucócitos e contagem diferencial, foi utilizado o método automatizado, realizados no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

5.5 Avaliações *Post mortem*

Dosagem de IL-6 e TNF- α em homogenato da região subplantar

Após a eutanásia dos animais, foi realizada a retirada de tecido da região plantar das patas dos ratos após 4 horas de injeção do agente edematogênico Carragenina e homogeneizadas 500 μ L de solução tampão. Para a caracterização dos níveis de TNF- α e IL-6 foi empregado o método ELISA sanduíche indireto utilizando-se kits comerciais específicos (Boster Biological Technology Co., Ltd., Fremont, Califórnia, EUA). As amostras foram testadas em duplicata e os resultados gerados através da comparação da absorbância com as curvas padrões.

Atividade da Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como marcador para quantificação de migração de neutrófilos em processos inflamatórios em diversos tecidos. Para avaliar a infiltração celular para o sítio inflamatório através da quantificação da mieloperoxidase (MPO), foram utilizadas amostras da região subplantar da pata edemaciada dos animais, coletadas e armazenadas em 500 μ L de tampão HTAB (brometo de hexadeciltrimetilamônio pH 6,0, 1g/ml) à 0,5% em um freezer de -80°C. Para análise, as amostras foram homogeneizadas em um Politron (Teclab®) com tampão HTAB. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado. A atividade da mieloperoxidase por mL de tecido foi mensurada através da técnica descrita por BRADLEY *et al.*, (1982). Foram distribuídos 7 μ L de sobrenadante em placa de 96 poços. A seguir, foi adicionado 200 μ L de solução de o-dianisidina por poço (16,7mg de o-dianisidina; 90mL de água MilliQ; 10 mL de tampão fosfato de potássio). Foi utilizado como substrato para MPO o peróxido de hidrogênio a 1%. A unidade da atividade de MPO foi definida como aquela capaz de converter 1 μ mol de peróxido de hidrogênio em água em 1 minuto a 22°C. A medida que o peróxido de hidrogênio é degradado, ocorre a produção de ânion superóxido que converte a o-dianisidina em um composto de cor marrom. Os resultados foram expressos como atividade de MPO/mL.

5.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média \pm desvio padrão. Para avaliação do peso corporal, volume do edema, intensidade da resposta inflamatória aguda e percentagem de inibição de edema pela nimesulida foram utilizados o teste ANOVA *two-way*, seguido de teste de Bonferroni. Foi utilizado o teste *t-Student* para avaliação do peso das mães durante a gestação e lactação. Para comparação entre os grupos e análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos, quantificação de citocinas e da atividade da mieloperoxidase foram utilizados o teste ANOVA *one-way* seguido do teste de Tukey. A análise estatística foi realizada no software *Graphpad Prism Software Prisma*® 5.0. Foi considerado para fins estatísticos o nível de significância $p \leq 0,05$ (5%).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que:

- A dieta ocidentalizada provocou redução no consumo alimentar e aumento no ganho de peso corporal dos ratos *Wistar*;
- A dieta ocidentalizada consumida por matrizes durante a gestação e lactação não induziu aumento no peso corporal do nascimento da prole, bem como no seu peso aos 22^a dia de vida, verificado pela similaridade de pesos entre os grupos;

O consumo da dieta ocidentalizada durante períodos cruciais de desenvolvimento (gestação, lactação e pós-desmame) promoveu alteração na intensidade da resposta inflamatória aguda;

As concentrações séricas de PCR e albumina não são alteradas com o consumo da dieta ocidentalizada;

O número total e diferencial de leucócitos não foram afetados nos grupos de prole provenientes de matrizes alimentadas com DP ou DO durante a gestação, lactação e pós-desmame até o 60^a dia de vida (DPgl-DP e DOgl-DO), tal como daqueles submetidos à permuta de dietas (DOgl-DP e DPgl-DO);

Os níveis de TNF- α e IL-6 estão elevados nas proles de matrizes alimentadas com dieta ocidentalizada no período da gestação e lactação, e no pós-desmame dos filhotes até 60^a dia de vida;

A atividade da mieloperoxidase (MPO) é mais exacerbada nas proles de matrizes alimentadas com dieta ocidentalizada no período da gestação e lactação, e/ou no pós-desmame dos filhotes até 60^a dia de vida (DOgl-DO, DOgl-DP e DPgl-DO);

O efeito anti-inflamatório da nimesulida foi menos eficaz na prole de matrizes que consumiu a dieta ocidental no período da gestação, lactação e pós-desmame até 60 dias (DOgl-DOn).

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. **Imunologia Celular e Molecular**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 267-302, 2008
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6 ed. Philadelphia: Saunders, 2003.
- ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F.S.C.; CORREA, F.I.; RIBEIRO, W.; COGO, J.C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, A.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; ZANGARO, R.A.; LOPES-MARTINS, R.A.B. Effects on different protocol doses of low power galliumm aluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema. **The Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 74, p.101-107, 2004.
- ALLER, M.A. ARIAS, J.L.; ARIAS, J.I.; SANCHEZ-PATAN, F. ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n.1, p. 202-209, 2007.
- ALELO. **Pesquisa Hábitos Alimentares do trabalhador brasileiro – 2014**. Disponível em: <http://www.alelopesquisa.com.br/Alelo_Pesquisa_Habitos_Alimentares_Brasil_2014.pdf>. Acesso em: 12 dez 2015.
- ALELO. **Pesquisa Hábitos Alimentares do trabalhador brasileiro - 2015**. Disponível em: <<http://www.alelopesquisa.com.br/Alelo-Habitos-Alimentares-2015.pdf>>.
- AMUNA, P.; ZOTOR, F.B. Epidemiological and nutritional transition in developing countries: impact on human health and development. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.67, n. 1, p.82-90, 2008
- Associação brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica (ABESO), 2012.
- Obesidade mata 28 milhões por ano**. Disponível em: <<http://www.abeso.org.br/enoticia/876/oms+obesidade+mata+28+milhoes+por+ano.shtml>>. (Acesso em 12.12.2014)>.
- BARMAN, S.A. Pulmonary vasoreactivity to serotonin during hypoxia is modulated by ATP-sensitive potassium channels. **Journal of Applied Physiology**, v. 83, p. 569-574, 1997.
- BELOTTO, M.F. Efeito do exercício físico sobre o estado inflamatório de diabéticos. Disponível em:<<http://www.efdeportes.com/efd159/efeito-do-exercicio-fisico-sobre-diabeticos.html>>. Acesso em: 28 dez 2015.

- BEN-BARUCH, A. Inflammation-associated immune suppression in cancer: The roles played by cytokines, chemokines and additional mediators. **Seminars in Cancer Biology**, v. 16, n.1, p. 38-52, 2006.
- BENINCÁ, J.P.; MONTANHER, A.B.; ZUCOLOTTO, S.M.; SCHENKEL, E.P.; FRODE, T.S. Evaluation of the anti-inflammatory efficacy of *Passiflora edulis*. **Food Chemistry**, v. 104, n.3, p. 1097-1105, 2007.
- BERGER, S.P.; DAHA, M.R. Complement in glomerular injury. *Semin. Immunopathology*, v. 29, p. 375-384, 2007.
- BERNAREGGI, A. The pharmacokinetics profile of nimesulide in healthy volunteers. **Drugs**, v. 46, suppl. 1, p. 64-72, 1993.
- BINGHAM, C.O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. **The Journal of Rheumatology**, v. 29, suppl. 65, p. 3-9, setembro, 2002.
- BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, 2005.
- BRUNTON, L.; PARKE, K.; BLUMENTHAL, D. Et al., **Goodman & Gilman's manual of pharmacology and therapeutics**, McGraw Hill, p. 455, 2008.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood**, v. 89, p. 3503-3521, 1997.
- BOSTROM, P.; WU, J.; JEDRYCHOWSKI, M.P.; KORDE, A.; YE, L.; LO, J.C.; et al. A PGC1 α -dependent myokine that drives browning of white fat and thermogenesis. **Nature**. v.481, n.7382, p.463-8, 2012.
- BULLO, M.; GARCIA-LORDA, P.; MEGIAS, I.; SALAS-SALVADO, J. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. **Obese Research & Clinical Practice**, v.11, p.525-531, 2003.
- CAMUSSI, G.; ALBANO, E.; TETTA, C.; BUSSOLINO, F. The molecular action of tumor necrosis factor- α . **European Journal of Biochemistry**, v. 202, n. 1, p. 3-14, 1991.
- CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiology Reviews**, v.84, n. 1, p.277-359. 2004.

CARSWELL, E.A.; OLD, L.J.; KASSEL, R.L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Immunology**, v. 72, n.9, p. 3666-3670, 1975.

CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z.B. Citocinas, disfunção endotelial e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n.2, p. 304-312, 2006.

CASELLA FILHO, A.; ARAUJO, R.G.; GALVÃO, T.G.; CHAGAS, A.C.P. Inflamação e aterosclerose: integração de novas teorias e valorização dos novos marcadores. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v.11, n. 3, p. 14-19, 2003

CÉRON, J.J.; ECKERSALL, P.D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, p. 85-99, 2005.

CECILIANE, F.; GIORDANO, A.; SPAGNOLO, V. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins. **Protein & Peptide Letters**, v.9, n.3, 211-23, 2002.

CICALA, C.; CIRINO, G. Linkage between inflammation and coagulation: and update on molecular basis of the crosstalk. **Life Sciences**, v. 62, p. 1817-1824, 1998.

COSTA, S.K.P.; ESQUISATTO, L.C.M.; CAMARGO, E.; GAMBERO, A.; BRAIN, S.D.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. Comparative effect of Phoneutria nigriventer spider venom and capsaicin on the rat paw oedema. **Life Sciences**, v. 69, p. 1573-1585, 2001.

COSTA, J.V.; DUARTE, J.S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Médica Portuguesa**, v.19, p. 251-256, 2006.

CRONSTEIN, B.N.; WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheumatology**, v. 136, p. 147-157, 1993.

CRUVINEL, W.M.; MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, E.C. Sistema Imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **The Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 50, n.4, p. 434-61, 2010.

CUNHA, T.; VERRO, W. TNF-alpha and IL-1 beta mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B1 but not B2 kinin receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 573, n.1-3, p. 221-229, 2007.

DAVIE, E.W.; RATNOFF, O.D. Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. **Science**, v. 145, n. 3638, p. 1310-1312, 1964.

- DATTI, F.; DATTI, M.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, N.A. Influence of chronic unpredictable stress on the allergic responses in rats. **Physiology & Behavior**, v. 77, p. 79-83, 2002.
- DAVIS, R.; BROGDEN, R.N. Nimesulide: Update of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Efficacy. *Drugs*, v. 48, n.3, p.431-454, 1994.
- DELLIS, D.; GIAGINIS, C.; TSANTILI-KAKOULIDOU, A.;J. Physicochemical profile of nimesulide: exploring th interplay of lipophilicity, solubility and ionization. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, n. 1, p.57-62, 2007.
- DONKIN, I. VERSTEYHE, S.; INGERSLEV, L.R.; WORKMAN, C.T.; ZIERATH, J.R.; BARRÈS, R. Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans. **Cell Metabolism**, n. 23, p. 1-10, 2016.
- DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, n.2, p. 125-131, 1995.
- DREWNJOWSKI, A. & POPKIN, B.M. The nutrition transition: new trends in the global diet. **Nutrition Review**, 55:1905-1916, 1997.
- FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL, SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SORO, J.; MORALES-GONZÁLES, A.; ESQUIVEL-CHIRINO, C., et al. Inflammation, oxidative stress and obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v.12, n.5, p. 3117-32, 2011.
- FONSECA-ALANIZ, M.H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M.I.; LIMA, F.B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p.216-29, 2006.
- FRANKE, A.; LANTE, W.; FACKELDEY, V.; BECKER, H.P.; THODE, C.; KUHLMANN, W.D.; MARKEWITZ, A. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 74, n.2, p. 363-371, 2002.
- FRENCH, S.A.; STORY, M.; JEFFERY, R.W.. Environmental Influences on eating and Physical activiy. **Annual Review of Public Health**, v.22, p. 309-335, 2001
- FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, v. 4, p. 281-8, 2005.
- GARRISON, J.C. Histamina, bradicinina, 5-hidrotriptamina e seus antagonistas. In: GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da Terapêutica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 378-394, 1991.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A.M.S.; SANTOS, C.M.M.; PINTO, D.C.G.A.; CAVALEIRO, J.A.S.; LIMA, J.L.F.C. Anti-inflammatory potential of 2-styrychromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. **Biochemical Pharmacology**. v. 78, n.2, p. 171-177, 2009.

GELFAND, E.W. The role of histamine in immune regulation. **Med Pulmonary Medicine**, 2005.

GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p.2021, 2006

GUILHERME, A.; VIRBASIUS, J.; PURI, V.; CZECH, M.P.. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. v. 9, p.367-377.

GUIMARAES, D.E.D.; SARDINHA, F.L.C.; MIZURINI, D.M.; CARMO, M.G.T. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, v.20, n.5, p. 549-59, 2007.

HARFORD, K.A.; REYNOLDS, C.M.; MCGILLICUDDY, F.C.; ROCHE, H.M. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.70, n.4, p. 408-17, 2011.

HEINRICH, P.C.; CASTELL, J.V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v.265, p. 621-36, 1990.

IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografica e Estatística), 2010. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil.<<http://www.ibge.gov.br>> Acesso em 18 de Novembro 2015.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografica e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 – Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. Rio de Janeiro; 2010.

JAAKKOLA, K.; NIKULA, T. Et al. In vivo detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation. **The American Journal of Pathology**, v. 157, p. 463-471, 2000.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunidade inata**. In: Janeway CA, editor. *Imunobiologia*. 5A ed. Porto Alegre: Artmed; p.55-111, 2002.

JUNQUEIRA, LC.; CARNEIRO, J. Tecido adiposo. In: **Histologia Básica**, Junqueira, LC, Carneiro, J. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 125-9, 2004.

KAC, G.; VELÁSQUEZ-MELENDEZ, G. A transição nutricional e a epidemiologia da obesidade na América Latina. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.1, p. 4-5, 2003.

KALUPAHANA, N.S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K.J. Immunity as a link between obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n.1, p.26-34, 2012.

KAMINSKI, D.L.; ANDRUS, C.H.; GERMAN, D.; DESHPANDE, Y.G. The role of prostanoids in the production of acute acalculous cholecystitis by platelet-activating factor. **Annals of Surgery**, v. 212, p. 455-461, 1990

KAMINSKI, D.A.; RANDALL, T.D. Adaptive immunity and adipose tissue biology. **Trends Immunology**, v.31, n.10, p. 384-90, 2010.

KATAYAMA, Y. Nitric Oxide: Mysterius Messeger. Dojindo NewNSLetter. 1995.

KHAN, L.K; BOWMAN, B.A. Obesity: a major global public health problem. **Annual Review of Nutrition**, 19: XIII – XVII, 1999.

KJELGAARD-HANSEN, M.; JACOBSEN, S. Assay Validation and diagnostic applications of major acute phase protein testing in companion animals. **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 31, p.51-70, 2011.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara**. v. 1, 16 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

KULKARNI, S.K. On the safety of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor. **Current Science**. v.83, n.12, p.1442-1443, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. São Paulo: Elsevier; 2005.

LAGES, A. S.; ROMEIRO, N. C.; FRAGA, C. A. M; BARREIRO, E. J. Inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido sintase-2 (PGHS-2): nova estratégia para o tratamento da inflamação. **Quimica Nova**, v.21, n. 6, p 761, 1998.

LANDER, H.M. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. **FASEB J.**, v.11, p. 118-124, 1997.

LANZA, 1998 - LANZA, F. Clinical manifestation of myeloperoxidase deficiency. **Journal of Molecular Medicine**, v. 6, p. 676-681, 1998.

LEAL, Vde, O.; MAFRA, D. Adipokines in obesity. **Clinica Chimica Acta**, v. 419, p. 87-94, 2013.

LEE, M.J.; WU, Y. Et al. Adipose tissue remodeling in pathophysiology of obesity. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.13 n. 4, p. 371-6, 2010.

- LEMAY, L.G.; VANDER, A.J.; KLUGER, M.J. Role of interleukin 6 in fever in rats. **AJP – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 258, n. 3, p. 798-R803, 1990.
- LEVAL, X.; DELARGE, J.; SOMERS, F.; TULLIO, P.; HENROTIN, Y.; PIROTTE, B.; DOGNE, J.M. Recent advances in inducible cyclooxygenase (COX-2) inhibition. **Current Medical Chemistry**, v. 7, n.10, p.1041-62, 2000.
- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M.I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 679-689, 2007.
- LUKE, A.; COOPER, R.S.; PREWITT, T.E.; ADEYEMO, A.A.; FORRESTER, T. Nutritional consequences of African Diaspora. **Annual Review of Nutrition**, v.21, p.47-71, 2001.
- LUSTER, A.D.; ALON, R.; VON ADRIAN, U.H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, p. 1190-1198, 2005.
- LYOUMI, S.; TAMION, F.; PETIT, J.; DECHELOTTE, P.; DAUGUET, C.; SCOTTE, M.; et al. Induction and Modulation of Acute-phase response by protein malnutrition in rats: comparative effect of systemic and localized inflammation on Interleukin-6 and acute-phase protein synthesis. **Journal of Nutrition**, v.128, p. 166-174, 1998.
- MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. **Nature**, v. 202, p. 498-499, 1964.
- MARGARSON, M.P.; SONI, N. Serum albumin: touchstone or totem? **Anaesthesia**. v. 53, n. 8, p. 789-803, 1998.
- MARTINEZ, A.C.; ALVAREZ-MON, M. El sistema immune (I): Conceptos generales, adaptacional, ejercicio físico e implicaciones clínicas. **Archivos de Medicina del Deporte**, v.69, p.47-54, 1999.
- MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. Trends of Biochemistry Science. v. 22, n. 12, p. 477-481, 1997.)
- MCEVER, R.P. Leukocyte interactions mediated by selectins. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 66, p. 80-87, 1991.
- MICHAUX, C.; CHARLIER, C. Structural Approach for COX-2 Inhibition. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, Namur, v.4, p. 603-615, 2004. KOROLKOVAS, A.; CARVALHO, W.A. Antiinflatórios não esteróides, analgésicos, antipiréticos e drogas utilizadas no tratamento da gota. In: SILVA, P. **Farmacologia**, 8 ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 439-466, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Alimentação e Nutrição. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 84p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília: Ministério da Saúde; 2011.

MONCADA, S.; HIGGS, E.A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, v. 9, p. 1319-1330, 1995.

MONTANI, J.P.; ANTIC, V.; YANG, Z.; DULLOO, A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triagle. **International Journal of Obesity**, v.26, p. S28:S38, 2002.

NATHAN, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? **Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 10, p. 2417-2423, 1997.

OUCHI, N.; PARKER, J.L.; LUGUS, J.J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Reviews Immunology**, v.11, n. 2, p.85-97, 2011.

PARSLOW, T.G.; STITES, D.P.; TERR, D.P.; IMBODEN, J.B. **Medical immunology**, 10th. Connecticut: Appleton & Lange, cap. 10, p. 127, 2001.

PATEL, P.S.; BURAS, E.D. Et al. The role of the immune system in obesity and insulin resistance. **Journal of Obesity**. v. 2013, p.616193, 2013.

PIEL, G.; PIRROTE, B.; DELNEUVILLE, I.; NEVEN, P.; LLABRES, G.; DELARGE, J.; DELATTRE, L. Study of the influence of both cyclodextrins and L-lysine on the aqueous solubility of nimesulide: isolation and characterization of nimesulide-L-lysine-cyclodextrin complexes. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 86, n.4, p. 475-480, 1997.

PANÉS, J.; PERRY, M.; GRANGER, N. Leukocyte-endothelial cell adhesion: avenues for therapeutic intervention. **British Journal of Pharmacology**, v. 126, p. 537-550, 1999.

PATARRA, L.P. Mudanças na dinâmica demográfica. In: Velhos e Novos Males da Saúde no Brasil (C.A. Monteiro, org.), p. 61-78, 2.ed., São Paulo: Editora Hucitec, 2000.

PODEROSO, J.J., LISDERO, C., SCHOPFER, F., RIOBO, N., CARRERAS, M.C., CADENAS, E., BOVERIS, A. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J Biol. Chem.*, n. 274, p. 37709-16

POPKIN, B.M.; HAWKES, C. Sweetening of the global diet, particularly beverages: patterns, trends, and policy responses. **The Lancet**. v. 4, n.2, 2016.

PORTER, S.A.; MASSARO, J.M.; HOFFMAN, U.; VASAN, R.S.; O'DONNELL, C.J.; FOX, C.S. Abdominal subcutaneous adipose tissue: a protective fat depot? **Diabetes Care**. v.32, n. 6, p.1068-75, 2009.

PRADO, W.L.; LOFRANO, M.C.; OYAMA, L.M.; DAMASO, A.R. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição do exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.15, n.5, 2009.

RAINSFORD, K.D. And members of the Consensus Report Group on Nimesulide (United Kingdom). Nimesulide – a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus. **Librafarm Limited: Current Medical Research and Opinion**, v.22, n.6, p. 1161-1170, 2006.

RAHMAN, I.; JOHN MARWICK, J.; KIRKHAM, P. Redox modulation of chromatin remodeling: impact on histone acetylation and deacetylation, NF- kappa B and pro-inflammatory gene expression. **Biochem Pharmacol**, v. 68, p. 1255-1267, 2004

RANKIN, J.A. Biological mediators of acute inflammation. **AAOHN Clin. Issues**. v. 15, n.1, p. 3-17, 2004.

RAO, R. N.; MEENA, S.; RAO, A. R.;J. An overview of the recent developments in analytical methodologies for determination of COX-2 inhibitors in bulk drugs, pharmaceuticals and biological matrices. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, p.349-367, 2005.

RAO, N.V.; WEHNER, N.G.; MARSHALL, B.C.; GRAY, W.R.; GRAY, B.H.; HOIDAL, J.R. Characterization of proteinase-3 (PR-3), a neutrophil serine proteinase. Structural and functional properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 9540-9548, 1991.

RIBBONS, K.A.;CURRIE, M.G.; CONNOR, J.R.; MANNING, P.T.; ALLEN, P.C.; DIDIER, P.; RATTERREE, M.S.; CLARK, D.A.; MILLER, M.J. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase in chronic colitis in the rhesus monkey. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 280, p. 1008-1115, 1997.

ROBERTS II, L.J.; MORROW, J.D. Analgésico-antipiréticos agentes anti-inflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G. **Goodman e Gilman, as bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005. p. 538.

ROTE, N. S. **Inflammation**. In: McCANCE, K.L.; HUETHER, S.E. Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children. 3ed. St. Louis: Mosby, p. 205-236, 1998.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HUBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunology and allergy clinics of north america**, v. 29, p. 229-245, 2009.

RUELA, A.L.M.; ARAUJO, M.B.; PEREIRA, G.R. Development and validation of a rapid analytical method by HPLC for determination of nimesulide in release studies. **Química Nova**, v. 32, n.1, 2009.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute inflammation. A review. **The American Journal of Pathology**, v. 86, n.1, p.183-276, 1977.

SCHONBECK, U.; SUKHOVA, G.K.; GRABER, P.; COULTER, S.; LIBBY, P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in Human atherosclerotic lesions. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1281-1291, out de 1999.

SHARON, J. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SINGH, S.; SHARDA, N.; MAHAJAN, L.; Spectrophotometric determination of pKa of nimesulide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 176, n.2, p. 261-264, 1999.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; ARROYO, M.T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.24, n. 2, p. 121-132, 2010.

SPINOSA, H.S.; GORNIK, S.L.; BERNARDI, M.M.; **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 4a. ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan, p.918, 2006.

SPULBER, S.; SCHULTBERG, M. Connection between inflammatory process and transmitter function – modulatory effects of interleukin-1. **Progress in Neurobiology**, v. 90, n.2, p. 256-26, 2010.

STRIJDOM, H.; CHAMANE, N.; LOCHNER, A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. **Cardiovascular Journal African**. v.20, n.5, p. 303-310, 2009

SULEYMAN, H.; CADIRCIM E.; ALBAYRAK, A.; HALICI, Z. Nimesulide is a selective COX-2 Inhibitory, atypical non-steroidal anti-inflammatory Drug. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 13, p. 278-283, 2008.

SWEETMAN, S.C. **Martindale: the complete drug reference**. 35 ed. London: Pharmaceutical, 2007.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Circulation Research**; 11:877-887, 2001.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v.420, n.6917, p.853-859, Dec 2000.

TRAYHURN, P. Adipocyte biology. **Obesity Reviews**, v. 8, suppl 1, p.41-4, 2007.

ULJASZEK, S.J. & LOFINK, H. Obesity from a Biocultural Perspective. **The Annual Review of Anthropology**, v.35, p.337-360, 2006.

VISSCHER, T.L.S.; SEIDELL, J.. The public health impact of obesity. **The Annual Review of Public Health**, v.22, p.355-375, 2001.

VOLP, A.C.P.; ALFENAS, R.C.G.; COSTA, N.M.B.; MINIM, V.P.R.; STRINGUETA, P.C.; BRESAN, J. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a Síndrome Metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.11, n.80, p.24-30, 2008.

VOLTARELLI, F.A.; GARCIA, A.; ARAUJO, M.B.; MOURA, L.P. Exercício e processos inflamatórios. **Revista da educação física/UEM**, v. 21, n.4, p.721-729, 2010.

WHO – World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva: WHO; 2003. (WHO – Technical Report Series, 916).

WHO (World Health Organization). **Obesidad y sobrepeso** Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>>. Acesso em: 05 nov 2015.

WHO (World Health Organization). **World Health Statistics**. Disponível em:<http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2012/en/> Acesso em: 13 fev 2016.

YUNES, R.C. Mudanças no cenário econômico. In: Velhos e Novos Males da Saúde Brasil (C.A. Monteiro, org.), pp. 33-60, 2ed., São Paulo: Editora Hucitec, 2000.

UHLAR, C.M.; GREHAN, S.; STEEL, D.M.; STEINKASSERER, A.; WHITEHEAD, A.S. Use of the acute phase serum amyloid A2 – SAA2/Gene promoter in the analysis of pro- and anti-inflammatory mediators: differential kinetics of SAA2 promoter induction by IL-1 β and TNF – α compared to IL-6. **Journal of Immunological Methods**, v. 203, n. 2, p.123-130, 1997.

WAHL, L.M., KLEINMAN, H.K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. **The Journal of the National Cancer Institute**, v.90:1583–1584, 1998.

WALLACE, G.R.; CURNOW, S.J.; WLOKA, K.; SALMON, M.; MURRAY, P.I. The role of chemokines and their receptors in ocular disease. **Progress in Retinal Eye Research**, v. 23, p. 435-448, 2004. **Cancer Institute**, v.90, p. 1583-1584, 1998.

ZHANG, X.W.; WANG, Y.; LIU, Q.; THORLACIUS, H. Redundant function of macrophage inflammatory protein-2 and KC in tumor necrosis factor- α induced extravasation of neutrophils in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 427, n. 3, p. 277-283, 2001.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

Impacts of a diet "westernized" during pregnancy and lactation in acute inflammatory response and its implications in the drug nimesulide effectiveness in adult offspring of rats
Wistar

To be submitted to European Journal of Pharmacology

(ISSN: 0014-2999)

Fator de Impacto: 2.532

Qualis CAPES em Farmácia: B1

Author Guidelines Disponível em:

<https://www.elsevier.com/journals/european-journal-of-pharmacology/0014-2999/guide-for-authors>

Tamires Meira Menezes^a, Renato Birlo de Araújo^a, Eryvelton Franco Souza^a, Elizabeth do Nascimento^b, Maria Bernadete de Sousa Maia^{a1}

^a Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos (LFPB), Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-910 Recife, Pernambuco, Brazil.

^b Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, 50670-910 Recife, Pernambuco, Brazil.

¹ Corresponding author. Tel.:+55 81 21268530; Fax:+55 81 21268976

E-mail addresses: mbsm@ufpe.br (M.B.S. Maia).

Abstract

In this experiment the animals received carrageenan (0.1ml of 1% w / v) in the subplantar region of the left hind paw to assess acute inflammatory response of offspring and anti-inflammatory effect of nimesulide. In the model of acute inflammation in the intervals 120, 180 and 240 min, respectively, WDgl-WD group (1.66 ± 0.61 *; 2.06 ± 0.62 * and 2.10 ± 0.67 *) and WDgl-SD group (1.62 ± 0.16 *; 1.92 ± 0.36 * and 1.51 ± 0.37 *) showed a significant increase ($p < 0.05$) compared to SDgl-SD (0.93 ± 0.20 , 1.11 ± 0.26 and 1.07 ± 0.14). While SDgl-WD (1.35 ± 0.16 and 1.55 ± 0.23 * *), the only difference ($p < 0.05$) compared to SDgl-SD in the intervals 120 and 180 min, respectively. The anti-edema activity of nimesulide in SDgl-SDn group was observed at intervals of 120, 180 and 240 min; while in WDgl-WDn group this effect was only observed in the range of 120 min after subplantar injection of carrageenan. When compared to their respective control groups treated with carboxymethylcellulose (WDgl-WD vs. WDgl-WDn or SDgl-SD versus SDgl-SDn), anti-oedematogenic effect of nimesulide expressed as percentage inhibition of edema measured at the intervals of 180 (33.98%) and 240 minutes (33.80%), after injection of oedematogenic agent, was significantly ($p < 0.05$) lower in relation to SDgl-SDn group (38.73% and 38.31%, respectively). From the data we conclude that the westernized diet accentuated the intensity of the acute inflammatory response and reduce the effect of nimesulide on the model paw edema.

Keywords: Western diet; Acute inflammation; Nimesulide.

1. Introduction

Obesity is a chronic metabolic disease characterized by excessive accumulation of body fat (ABEP, 2011) and considered a risk factor for developing diseases such as diabetes and cardiovascular disease. Currently obesity is termed as "non-transmissible chronic disease" and is considered the cause of 2.8 million people annually death, and 12% of the population is classified as obese (WHO, 2012). Factors contributing to this situation are the behaviors of today's society, such as the high consumption of so-called "junk food", the expansion of "fast food" and physical inactivity, which have been linked to the prevalence of obesity in the western part (WHO 2015).

Maternal diet affects potential way about the puppies, and may continue for several generations (Beauchamp and Mennella, 2013).

While some scholars have reported that obesity is the result of an imbalance between energy expenditure and food intake, others argue that obesity can result from dietary behavioral patterns that evolved from our ancestors. Such behavioral pipelines are vulnerable to availability and increase the palatability of foods, thereby contributing to the growing epidemic levels of obesity (Nangunoori et al., 2016).

The association between obesity and inflammation is related to the high level of cytokines and acute phase proteins in these individuals. Adipocytes synthesize a variety of cytokines and acute phase proteins that ultimately raise the secretion and circulation of these chemical mediators (Trayhurn, 2007; Bullo et al., 2003). Excess fat increases the production of adipokines, resulting in impacts on body physiology, such as blood pressure, energy balance, immune system, insulin sensitivity, control of food intake, angiogenesis, lipid metabolism related to heart disease (Prado et al., 2009). Among the adipokines synthesized by adipose tissue stand out adiponectin and leptin (Weisberg et al., 2003). They are also described

in other literature as IL-1, IL-6, TNF- α , CCL2; (Calle and Kaaks, 2004) and serine proteases inhibitors (Hida et al., 2005).

To ease the imbalance between pro-inflammatory and anti-mediators, they are applied to the therapeutic anti-inflammatory drugs. The most commonly prescribed worldwide are classified as non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Howard, 2004).

Nimesulide is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) having analgesic and antipyretic property. Acts as a selective inhibitor of cyclooxygenase-2 pathway (Demiryilmaz et al., 2014). Has a weak acid character attributed to the presence of methanesulfonamide group (Pereira et al., 2011). It is usually indicated for the treatment of acute pain, symptomatic treatment of osteoarthritis and primary dysmenorrhoea (Rainsford, 2005). Studies show the beneficial effect on the inhibition of growth of various tumors (cervix, pancreas, breast, lung) (Inoue et al., 2008;. Cai et al., 2012.).

2. Materials and methods

2.1. Location of study

This work was carried out on Bioactive Products Laboratory (LFPB) of the Department of Physiology and Pharmacology and Experimental Nutrition Laboratory and Dietetics Department of Nutrition, located at the Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife campus.

2.2. Experimental model

They were used 20 gilts albino female *Wistar* rats and their offspring consisting of 30 male rats coming from the colony of creation of the Department of Nutrition at the Federal University of Pernambuco. The animals were mated at the ratio of male (n = 10) Two females (n = 20) were kept in vivarium experimentation and housed in polypropylene cages with di-

mensions 46x31x21 cm (LxWxH) in a 22 temperature environment ± 1 ° C, inverted light-dark cycle of 12/12 hours and filtered water and feed ad libitum.

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Experiments of Biological Sciences Center, Federal University of Pernambuco (Protocol 23076.003.845 / 2015-63).

2.3. Diet

The "westernized" diet (WD), characterized by having higher values of saturated lipids than the standard diet (SD), was prepared from a mixture of crushed calorie foods, forming pellets. The WD of the composition is already described in previous studies group (Ferro Cavalcante et al, 2013;. Ferro Cavalcante et al, 2014.). It was also used the mineral Mix AIN-93G-MX (Rhoster®) essential to the growth stage of weaning until 60 days of life. The chemical composition of the percentage of used macronutrient diet is described in Table 1.

Table 1: Macronutrients according to Total Energy Value (TEV) of the standard diet (Presence®) or Westernized.

Diet	Protein (% kcal TEV)	Carbohydrate (% kcal TEV)	Lipid (% kcal TEV)	TEV (kcal/g)
Westernized *	20	49	32	4,2
Presence **	26	63	11	3,6

* Calculations of the chemical composition of macronutrients were based on nutritional information sent by the supplier of products and the Brazilian Table of Food Composition (TACO).

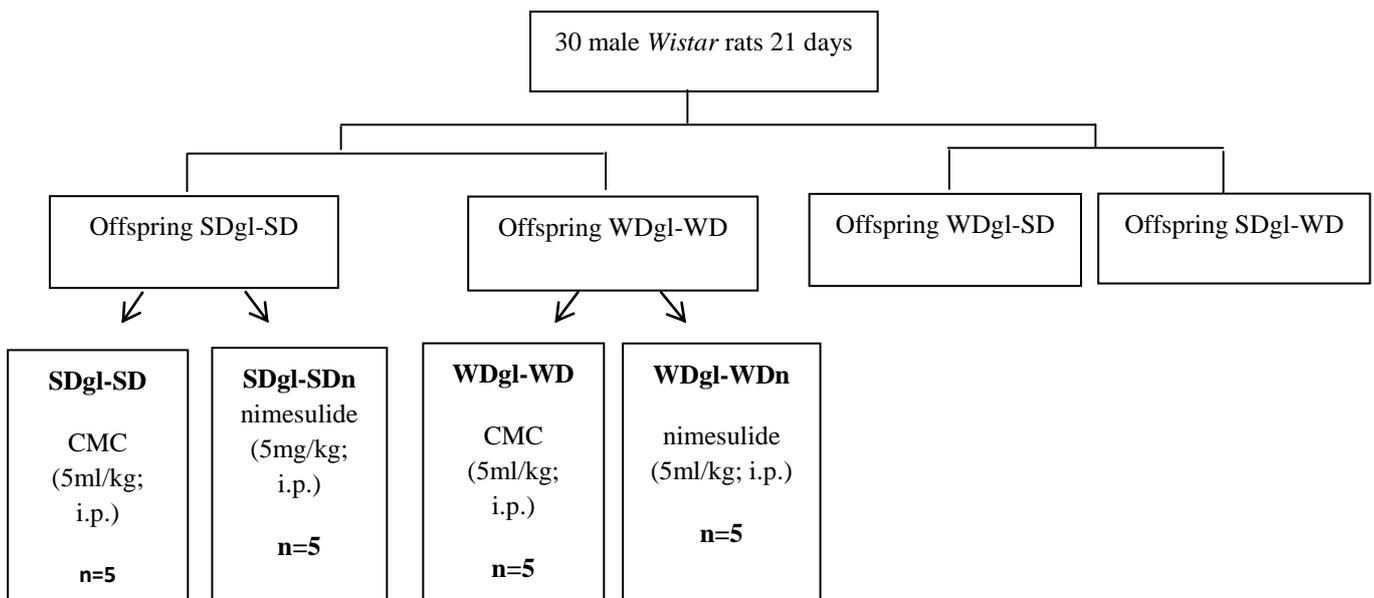
** Determined by the Adolfo Lutz Institute, 1985.

2.4. Nutritional guidance

From the 1st day of gestation (confirmed by the presence of sperm in the vaginal smear), the arrays were randomly divided into two groups: 1) SDgl - that were fed the SD vivarium (Presence®) during pregnancy and lactation and 2) WDgl that have received WD during pregnancy and lactation. With 21 of lactation, only male offspring (n = 30) remained

in the experiment. Then, according to nutritional manipulation, the offspring were divided into four groups: i) SDgl-SD - offspring of mothers who received SD during pregnancy and lactation and kept the same post-weaning until 60 days of life; ii) WDgl-WD - offspring of mothers who received WD during pregnancy and lactation and continued with the same post-weaning until 60 days of life; iii) SDgl-WD - offspring of mothers who received SD during pregnancy and lactation, but that began to consume WD post-weaning until the 60th day of life and iv) WDgl-SD - offspring of mothers who received WD during pregnancy and lactation, but they began receiving SD in the post-weaning until the 60th day of life. At 60 days of life, the offspring were divided into groups (n = 5), according to the nutritional manipulation, for evaluating the intensity of the inflammatory response and anti-inflammatory effect of nimesulide as shown below scheme:

Figure 1: Distribution of the experimental groups. CMC - carboxymethyl cellulose (0.5%).



2.5. Reviews *in vivo*

2.5.1. Assessment of acute inflammatory response and anti-inflammatory effect of nimesulide in the adult offspring of rats fed with SD or WD during pregnancy and lactation – (Winter et al, 1962) paw edema induced by carrageenan

For the study of the acute inflammatory response, SDgl-SD, WDgl-WD, WDgl-SD and SDgl-WD groups were divided into six groups (n = 5): 1) control - (SDgl-SD, WDgl-WD, WDgl-SD and SDgl-WD and; 2) treated with nimesulide (SDgl-SDn and WDgl-WDn). Then two experiments were conducted: In experiment A, the animal SDgl-SD, WDgl-WD, WDgl-SD and SDgl-WD groups received a subplantar injection of carrageenan type IV (0.1 mL - 1% w / v in saline) into the left hind paw. In experiment B the SDgl-SDn and WDgl-WDn groups underwent the same procedures described above, however, instead of a carboxymethyl cellulose solution (0.5% w / v in distilled water), the groups were pretreated with nimesulide (5mg / kg, ip) 45 min prior to subplantar injection of oedematogenic agent (carrageenan). The volume of the injected foot was measured in digital plethysmometer (Panlab - Harvard Apparatus, Model LE 7500) before (0 min) and 30, 60, 120, 180 and 240 minutes after injection of carrageenan. The change in paw volume was expressed in ml registered by the difference in paw volume before (0 min.) After injection of the agent oedematogenic the end of each time interval. The intensity of the inflammatory response (edema volume) exhibited by WDgl-WD, WDgl-SD and SDgl-WD groups was compared to the SDgl-SD group. The anti-edema activity of nimesulide in SDgl-SDn and WDgl-WDn groups was calculated according to the formula below, in terms of percentage of inhibition:

Percent inhibition = $1 - \frac{V_t}{V_c} \times 100$, where V_c and V_t correspond to the average of the resulting differences in the measures of the legs in the groups treated with nimesulide (SDgl-SDn and WDgl-WDn) and control (SDgl-SD and WDgl-WD). At the end of the experiments,

blood samples were collected for evaluation of the biochemical and haematological variables and the subplantar region of the left paw of the animal the quantification of the cytokine (IL-6 and TNF- α) and myeloperoxidase (MPO).

2.5.2. Determination of food consumption

Dietary intake of dams during pregnancy and lactation and their offspring in the post-weaning period up to 60 days of life was evaluated every 2 days and calculated by subtracting the initial weight of the food offered by cage left the 48 period hours.

2.5.3. Determination of weight gain

The measurement of body weight was performed weekly at the dams during pregnancy and lactation and in their offspring at birth and the 21th day life until the 60th day of life.

2.5.4. Determination of biochemical and hematological profile

At 60th day of life, the animals were fasted for 10 hours and subjected to induction of paw edema. After completion of the experiments, the animals were anaesthetized with thio-pental (30 mg / kg) for obtaining blood samples (5ml) for decapitation by guillotine for determination of biochemical variables (serum albumin and C-reactive protein (CRP)) and hematologic (total and differential counts of leukocytes). The sample was centrifuged to separate serum and stored in a freezer at -20 ° C for subsequent analysis of acute phase proteins. The determination of albumin was performed at the Clinical Hospital, Federal University of Pernambuco Central Laboratory and C-reactive protein (CRP) was used specific commercial kit for rats (Boster Biological Tecnology Co., Ltd., Fremont, California, USA).

To determine the total number of leukocytes and differential count, we used the automated method, performed in Hospital das Clínicas of the Central Laboratory of the Federal University of Pernambuco.

2.6. Reviews *Post mortem*

2.6.1. Dosing of IL-6 and TNF- α in the subplantar region of the homogenate

After euthanasia of the animals was carried out the removal of tissue from the plantar region of the paws of rats after 4 hours of injection edematogenic agent Carrageenan and homogenized 500 μ L buffer. For the characterization of levels TNF- α and IL-6 occurred using sandwich indirect ELISA method using specific commercial kits (Boster Technology Biological Co., Ltd., Fremont, California, USA). Samples were tested in duplicate and the results generated by comparing the absorbance with the standard curve.

2.6.2. Myeloperoxidase Activity

Myeloperoxidase (MPO) is an enzyme present in the azurophilic granules of neutrophils and has been used as a marker for neutrophil migration into inflammatory processes quantification in various tissues. To assess cell infiltration into the inflammatory site by myeloperoxidase (MPO), the subplantar region of edematous paw of animals used samples were collected and stored in 500 μ L of cap CTAB (Cetytrimethylammonium bromide) pH 6.0, 1g / ml) at 0.5% in a freezer at -80 ° C. For analysis, samples were homogenized in a Polytron (Teclab®) with cap CTAB. Then, the homogenate was centrifuged at 14,000 rpm for 10 minutes at 4 and the supernatant collected.

The activity of myeloperoxidase per ml of tissue was measured by the technique described by Bradley et al., (1982). 7 μ L supernatant were distributed into 96 wells plate. The following was added 200 μ L solution per well o-dianisidine (16,7mg o-dianisidine, 90 ml of MilliQ water, 10 ml of potassium phosphate buffer). It was used as substrate for MPO hydrogen peroxide at 1%.

The unit of MPO activity was defined as one capable of converting 1 μ mol water into hydrogen peroxide in 1 minute at 22°C. As hydrogen peroxide is degraded, it occurs in superoxide anion production which converts the o-dianisidine in a brown colored compound. The results were expressed as MPO/ml activity.

2.6.3. Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard deviation. For assessment of body weight, swelling volume, intensity of the acute inflammatory response and percentage of edema inhibition by nimesulide were used to test two-way ANOVA followed by Bonferroni test. Student's t-test to evaluate the weight of the mothers was used during pregnancy and lactation. For comparison between groups and analysis of hematological and biochemical parameters, quantification of cytokines and myeloperoxidase activity were used the test one-way ANOVA followed by Tukey test. Statistical analysis was performed using Graphpad Prism Software Prisma® 5.0 software. It was considered for the purposes of statistical significance level of $p = 0.05$ (5%).

3. Results

3.1. Body weight of mothers fed with SD or WD and their respective offspring

Table 2 record the weight of the matrices fed standard diet (SD) or diet "westernized" (WD) during pregnancy and lactation and their respective offspring. As can be seen, the body weight in late pregnancy or lactation of mothers fed with SD or WD not different. Moreover, consumption of WD by the mothers during pregnancy and lactation, caused no change in body weight of offspring at birth and the 22th days of life. However, at 60 days of life, WDgl-WD, WDgl-SD and SDgl-WD groups showed statistically significant differences ($p < 0.05$) when compared to the group fed with SD (SDgl-SD).

Table 2: Body weight of mothers fed a standard diet (SD) or diet "westernized" (WD) during pregnancy and lactation and their respective offspring.

DAMS	SD		WD	
	(n=10)		(n=10)	
Pregnancy of final	297,60 ± 18,36		305,6 ± 29,74	
Lactation final	288,60 ± 46,81		281,8 ± 20,9	
OFFSPRING	SDgl-SD	SDgl-WD	WDgl-WD	WDgl-SD
	(n=10)	(n=10)	(n=5)	(n=5)
At birth	6,50 ± 0,70	7,30 ± 0,60	6,80 ± 0,50	7,10 ± 0,30
On weaning (22 dias)	53,40 ± 8,99	57,80 ± 2,48	51,90 ± 4,04	49,10 ± 4,77
On the 60 th day	229,70 ± 16,34	276,00 ± 26,44*	291,80 ± 24,29*	275,30 ± 12,61*

Values expressed as mean ± SD. Significance obtained from the two-way ANOVA followed by Bonferroni test $p < 0.05$ when compared SD versus WD or SDgl-SD versus WDgl-WD, WDgl-SD or SDgl-WD (n = 5 animals / group).

3.2. Food consumption

Food intake (g) daily of the groups fed with SD or WD during pregnancy, lactation and / or post-weaning is shown in Figure 2. As can be seen, the animals WDgl-WD group had a reduction in consumption food in the 3rd and 4th week of diet supply (figure 2) in relation to SDgl-SD group. Groups that had dietary exchanged in the periods of pregnancy, lactation and / or post-weaning (SDgl-WD and WDgl-SD) were compared with the SDgl- SD group (Figure 2). After statistical analysis, it appears that dietary intake of WDgl-SD group does not differ from SDgl-SD group (Figure 2). Since when carried out a comparison between the SDgl-WD with SDgl-SD was observed that the SDgl-WD showed consumption of WD in

lower post-weaning period at 4 weeks as compared to WDgl-WD showed increased consumption only in the 2nd week (Figure 2).

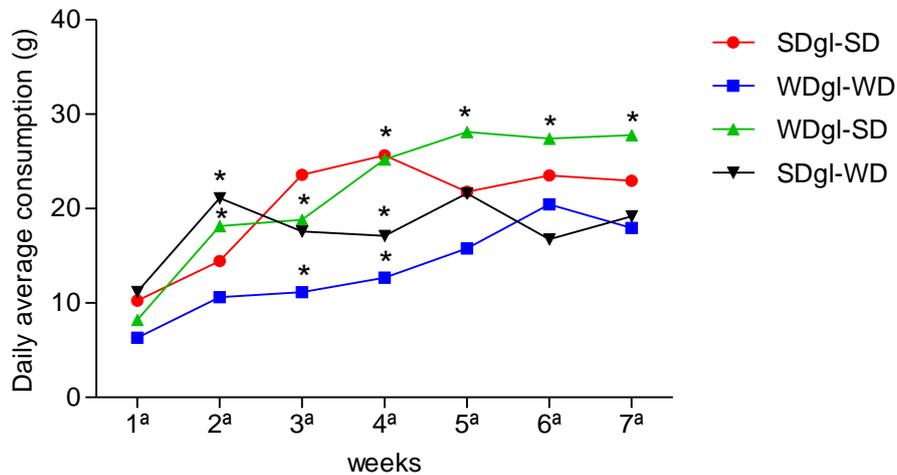


Figure 2: Average daily feed intake (g) of *Wistar* rats ($n = 5$ animals / group) fed a standard diet (SD) or "westernized" diet (WD) in the periods of pregnancy, lactation and / or post-weaning. SDgl-SD (Control group) versus WDgl-WD or SDgl-WD or WDgl-SD (experimental groups). Values expressed as mean \pm SD. Significance obtained from the two way ANOVA test followed by Bonferroni's test (* $p < 0.05$).

3.3. Weight gain

Weight change (g) weekly groups fed SD or WD during pregnancy, lactation and / or post-weaning is shown in Figure 3. As is depicted, the animals WDgl-WD group showed a gain of about 16% in significantly body weight ($p < 0.05$) higher in the 3rd, 6th and 7th week diet consumption when compared to animals SDgl-SD group (figure 3). While WDgl-SD group showed greater weight gain than SDgl-SD from the 4th week until the 7th week (Figure 3). As for the body weight of SDgl-WD, it was observed that this group showed higher difference in weight gain that SDgl-SD from the 5th week to the 7th week (Figure 3).

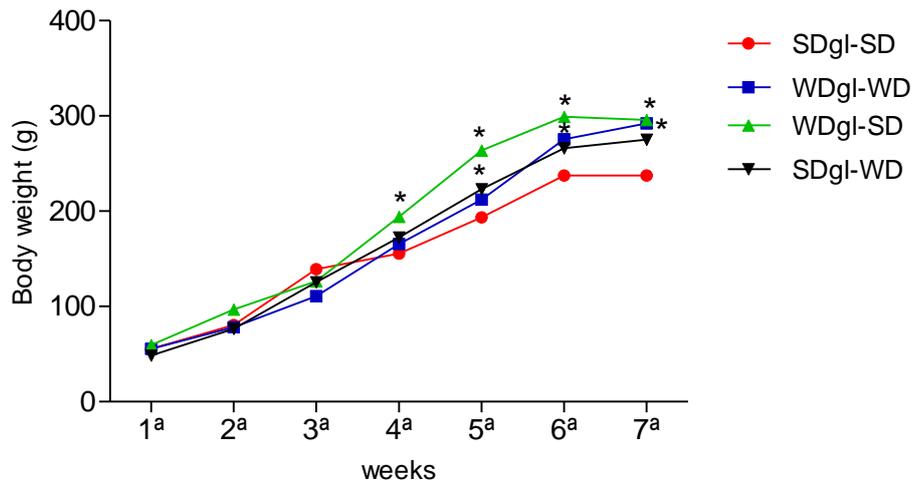


Figure 3: Average body weight (g) of Wistar rats ($n = 5$ animals / group) were fed with standard diet (SD) or "westernized" diet (WD) in the periods of pregnancy and lactation and / or post-weaning. SDgl-SD (Control group) versus WDgl-WD or SDgl-WD or WDgl-SD (experimental groups). Values expressed as mean \pm SD. Significance obtained from the two way ANOVA test followed by Bonferroni's test (* $p < 0.05$).

3.4. Biochemical and hematological parameters

Table 3 shows the biochemical profile and haematological of offspring fed with SD or WD during pregnancy, lactation and post weaning up to 60 days (SDgl-SD and WDgl-WD, respectively), as well as those submitted for exchange diets (WDgl-SD and SDgl-WD) after the post weaning period up to 60 days. As can be seen, none of the biochemical or hematological variables differ between groups.

Table 3: Biochemical and haematological the rat offspring variables Wistar adults (n = 5 animals / group) fed with SD or WD during pregnancy, lactation and post-weaning up to 60 days (SDgl-SD and WDgl-WD respectively) or submitted to swap diets (WDgl-SD and SDgl-WD) after the post-weaning period.

Parameters	SDgl-SD	WDgl-WD	WDgl-SD	SDgl-WD
Albumin (g/dL)	2,38±0,24	2,18±0,49	2,22±0,21	2,44±0,08
Total protein (g/dL)	5,02±0,34	4,72±0,69	4,76± 0,32	4,98±0,49
CRP (ng/dL)	6,74±24,1	6,75±4,70	6,75±4,70	6,75±3,80
Leukocyte (10 ³ mm ³)	9,53±0,52	8,57±1,16	9,06±0,96	8,08±2,01
Neutrophils (%)	2,96±0,62	2,96±1,12	1,99±0,51	2,91±1,23
Eosinophils (%)	0,12±0,03	0,08±0,05	0,08±0,02	0,12±0,05
Basophils (%)	0,03±0,01	0,02±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01
Lymphocytes (%)	4,46±1,04	5,88±1,21	5,52±1,30	4,11±8,06
Monocyte (%)	2,19±2,85	1,70±3,01	2,09±1,30	2,15±2,84

The values are presented as mean ± SD. Significance obtained from the test one way ANOVA followed by Tukey test (p <0.05). CRP: C-reactive protein.

3.5. WD influence on the intensity of the acute inflammatory response of Wistar rats

The table shows the development of paw edema induced by carrageenan (experimental model of acute inflammation) in SDgl-SD, WDgl-WD, WDgl-SD and SDgl-WD groups. Statistical analysis reveals that the severity of the acute inflammatory response induced by carrageenan was most severe in WDgl-WD, WDgl -SD and SDgl-WD groups in the intervals 120, 180 and 240 minutes when compared to SDgl-SD group.

Table. 4: Mean Paw Volume in SDgl-SD, WDgl-WD, SDgl-DO and WDgl-SD groups (n = 5 animals / group) with paw edema induced by carrageenan injection supplant (0.1 mL).

Groups	Paw edema (mL)				
	30 min	60 min	120 min	180 min	240 min
SDgl-SD	0,38 ± 0,12 (100%)	0,56± 0,18 (100%)	0,93± 0,20 (100%)	1,11 ± 0,26 (100%)	1,07 ± 0,14 (100%)
WDgl-WD	0,71± 0,25 (+86%)	0,91± 0,23 (+62%)	1,66 ± 0,61* (+78%)	2,06 ± 0,62* (+85%)	2,10 ± 0,67* (+96%)
SDgl-WD	0,49 ± 0,17 (+28%)	0,68± 0,14 (+21%)	1,35 ± 0,16* (+45%)	1,55 ± 0,23* (+39%)	1,27 ± 0,34 (+18%)
WDgl-SD	0,77±0,07 (+102%)	1,03± 0,10* (+83%)	1,62 ± 0,16* (+74%)	1,92± 0,36* (+72%)	1,51 ± 0,37* (+41%)

() Percentage increase of paw volumes (intensity inflammatory response) in relation to SDgl-SD group. Values expressed as mean ± SD. * P <0.05.

3.6. WD consumption influence on the anti-inflammatory activity of nimesulide in rats

The Figure 4 shows the development of paw edema in animals fed with SD or WD treated with nimesulide in acute inflammation model induced by carrageenan. As can be seen, the anti-inflammatory effect of nimesulide (% inhibition of paw edema) was significantly (p <0.05) lower in WDgl-WD from the group, when compared to SDgl-SD group. Additionally, the animals in the group SDgl-SD anti-inflammatory effect of nimesulide was checked at the intervals of 120 (38.70%) 180 (38.73%) and 240 min (38.31%); while the animals in WDgl-WD only group in the range of 120 min (42.16%).

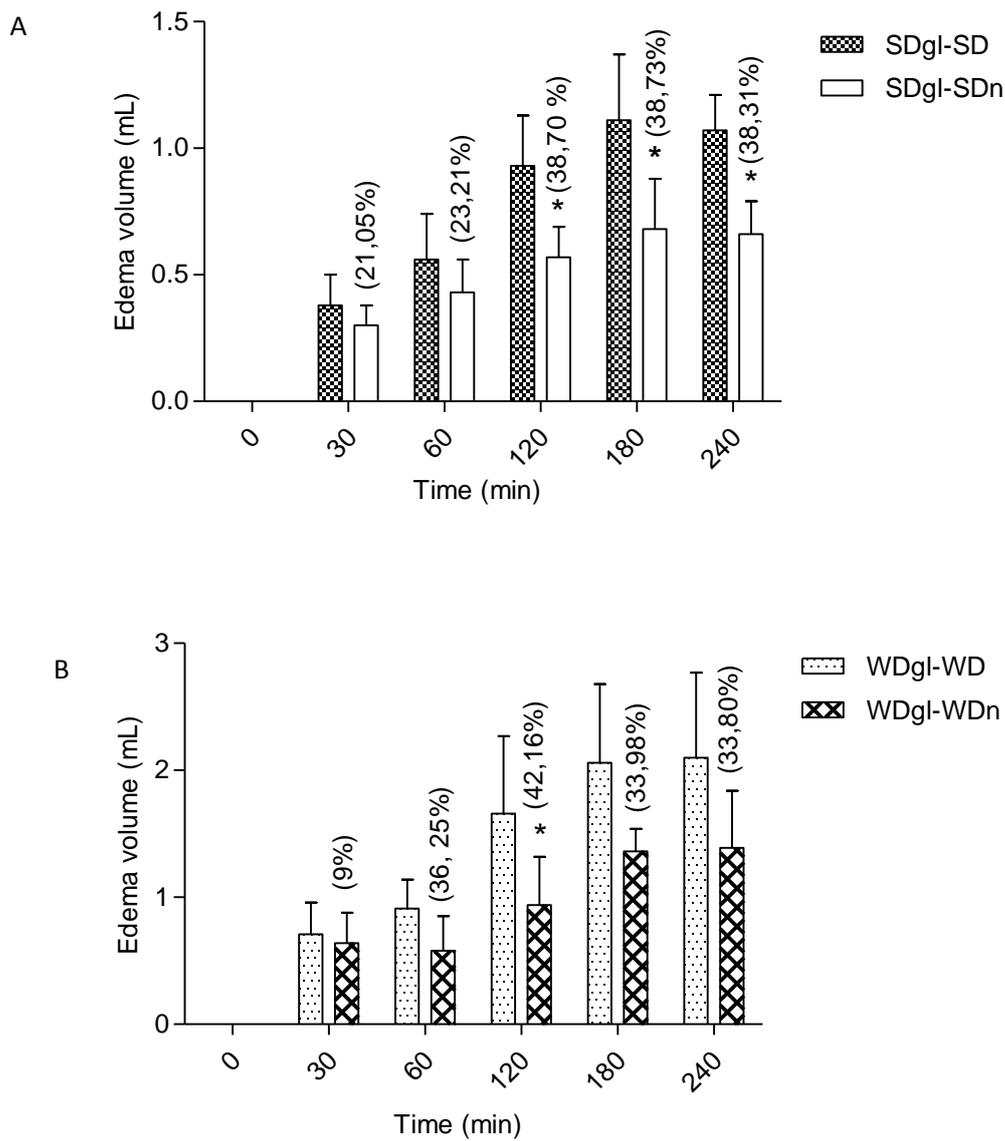


Figure 4: Effect of nimesulide (5 mg/ kg) on the rat paw edema induced by subplantar injection of carrageenan in SDgl-SDn (A) and WDgl-WDn (B) groups. Values expressed as mean \pm SD. Significance obtained from the test two-way ANOVA followed by Bonferroni test. * P < 0.05 when compared to their respective control groups (SDgl-SD versus SDgl-SDn, and WDgl-WD versus WDgl- WDn).

3.7. Levels of IL-6 and TNF- α

The Figure 5 shows data of the concentrations of pro-inflammatory cytokines IL-6 and TNF- α in the subplantar region of the homogenate SDgl-SDn, WDgl-WDn, SDgl-SD and WDgl-WD groups. The results show a significant elevation (p < 0.05) in the levels of these

cytokines in animal WDgl-WD group compared to SDgl-SD group. The groups treated with nimesulide (SDgl-SDn and WDgl-WDn) showed no change in the levels of these cytokines when their respective control groups (SDgl-SD and WDgl-WD).

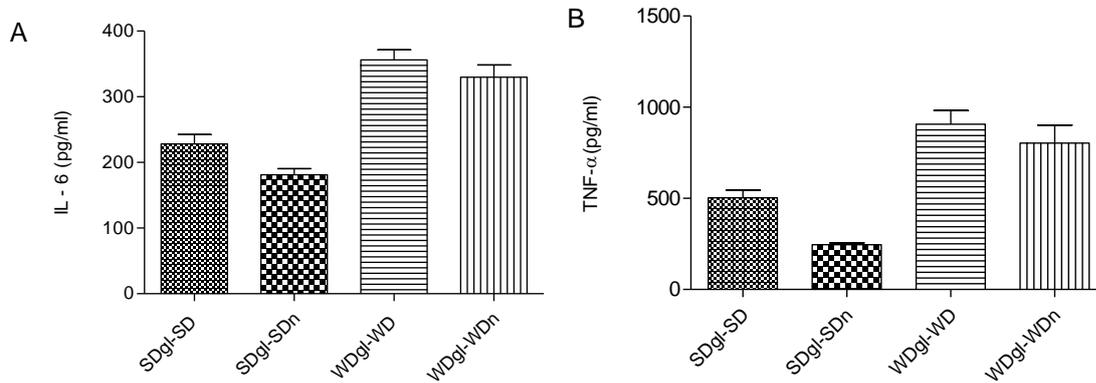


Figure 5: Levels IL-6 (A) and TNF- α (B) in the homogenate of the subplantar region of the treated groups (SDgl-SDn and WDgl-WDn) and their respective control groups (SDgl-SD and WDgl-WD) Six (06) hours after the carrageenan injection. Values expressed as mean \pm SD. *Significance obtained from the test one way followed by Tukey test ($p < 0.05$).

3.8. Activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO)

The animals in the WDgl-WD group had MPO activity significantly ($p < 0.05$) higher compared to SDgl-SD group (Figure 6). With regard to treatment with nimesulide (5 mg/kg; ip), animals from SDgl-SDn group showed a significant reduction in MPO activity compared to their respective control group (SDgl-SD), while no change was observed in the WDgl-WDn group in relation to their respective WDgl-WD control.

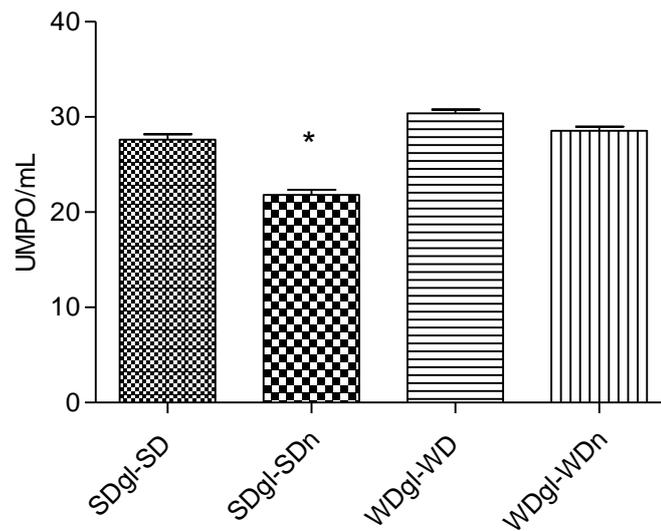


Figure 6: Activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) in the supernatant of homogenate of overcoming six Wistar rats region (04 hours) after carrageenan injection in the groups treated with nimesulide (SDgl-SDn, WDgl-WDn) and their respective control groups (SDgl-SD and WDgl-WD). Values expressed as mean \pm SD. *Significance obtained from the test one way followed by Tukey test ($p < 0.05$).

4. Discussion

The westernized diet has a higher amount of calories when compared to the standard diet composition vivarium (4,08kcal / g versus 3,6kcal / g, respectively). This may have been crucial in reducing intake and energy in the matrix and proles who consumed WD. However, body weight gain may have been related to the high content of saturated fatty acids that compose the westernized diet and not by the amount consumed in grams.

Pomplun et al. (2007) relate to work injury metabolism of mitochondria to gain predisposition of excessive body weight in mammals, when fed high-energy diets similar to those found in populations of the West. The hyperphagia observed in some studies using high fat diets is motivated by the inherent characteristics of the lipid as high palatability and texture (Tagle, 1981; Rolls; Shide, 1992).

Clinical data and research in animals suggests that obesity during pregnancy period negatively affects the health of the short offspring and long-term, the risk of obesity development and other comorbidities and may result in premature death (Reynolds et al., 2013). According to Cunningham et al., (2014), body weight at the beginning of life is a key indicator of the risk of metabolic diseases in adulthood (Cunningham et al., 2014). In our study, the DO was able to induce obesity, verified by the increase in body weight of the animals receiving the diet during pregnancy, lactation and / or post-weaning.

Desai et al., (2014) in a study observed that the different effects caused by maternal diet on the phenotype of offspring are dependent on the supply period (pregnancy or lactation and pregnancy and lactation), which found that exposure diet calorie during gestation and lactation resulting in an altered phenotype in the offspring, characterized by an exaggerated obesity when compared to progeny derived matrices group fed the same diet during pregnancy only. These results suggest that the greater the exposure to the greater the possibility of the individual presenting metabolic complications in adulthood.

According to results of this study, the permutation of the westernized diet between the gestation period, lactation and post weaning does not change the body weight of the animal, however, these groups exhibit physical characteristics and inflammatory profile similar to the group that consumed this diet hypercaloric throughout life, suggesting thereby that groups (WDgl-WD, WDgl-SD and SDgl-WD) have metabolic profile similar to an obese (exacerbated acute inflammatory response, increased level of cytokines, the myeloperoxidase activity and leukocyte migration).

Iannitti and colleagues (2012) in their study, using Zucker rats and the model of inflammation by carrageenan injection and such obese animals showed a more severe acute inflammatory response when compared to normonutridos rats. These results are similar to

those found in this study. Further, Barbato et al. (2005) found in his work, an increase in vascular inflammatory response of obese Zucker rats, being characterized by elevated expression of adhesion molecules and macrophage infiltration.

According to Hosogai and colleagues (2007), in obesity, the adipocytes are hypertrophied and compromise the vascularization of adipose tissue, causing a restriction in the availability of oxygen and the resulting hypoxic tissue (Pasarica et al., 2009). As the material expands, macrophages infiltrate and activate TNF- α production, interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β , leptin, resistin, and monocyte chemoattractant protein (MCP-1) (Weisberg et al. 2003; Vachharajani; Granger, 2009; Sun; Kusminski; Scherer, 2011). Fantuzzi (2005) suggests that leptin induces oxidative stress and contributes to macrophage accumulation by facilitating the adhesion of macrophages to endothelial cells. In our study, it was shown that the level of TNF- α and IL-6 in animals that consumed the Westernized diet were higher when compared to animals with PD and these results suggest the association of obesity to the state of sub-chronic these animals inflammation that they were exposed to the high fat diet.

Evidence demonstrated by several studies have shown significant weight gain and early neutrophil infiltration of the parenchyma of the intraabdominal adipose tissue after start of intake of fat diet to C57BL / 6J (Elgazar-Carmon et al, 2008;. Hadad et al ., 2013). Borate et al (2016) investigating the MPO activity in obese subjects with or without systemic inflammation and cardiovascular risk potential, found that the level of this enzyme in serum was higher in obese individuals with systemic inflammation. Wang et al., (2014) demonstrated that high fat intake results in increased infiltration of neutrophils and MPO activity expression in epididymal white adipose tissue, along with increased weight and altered insulin signaling.

The C-reactive protein (CRP) is an inflammatory marker, commonly found in high levels in animals and obese patients (Hogan et al., 2011). However, in our study, there was no significant difference in CRP level in the serum of animals that consumed the Westernized diet. These results were similar to that found by White et al (2013).

In order to mitigate the consequences arising from an inflammatory stimulus, it is used therapeutic approach with the use of anti-inflammatories. Among the most widely prescribed classes worldwide are anti-inflammatory non-steroidal drugs (NSAIDs) selective or non-selective cyclooxygenase enzyme. The drug used in this study, nimesulide, coxibs is designated, i.e., selective inhibitor of cyclooxygenase-2 (COX-2) (Batlouni, 2010).

In our study, pretreatment with nimesulide (5 mg / kg; ip) reduced the intensity of the acute inflammatory response originated offspring of mothers who consumed the standard diet during pregnancy, lactation and their respective offspring in the post-weaning (SDGL-SD), but offspring of dams fed in the same period westernized diet (WD-WDgl), nimesulide was not able to reduce acute inflammatory response. Some studies show that functional and body composition in obese changes can alter the distribution of the drug, there were no statistically significant changes in the volume of distribution, renal and hepatic clearance and protein binding (Shenkman; Shir, Brodsky, 1993; Pühringer et al., 1995). Nimesulide has acidic character, therefore, is a lipophilic, i.e., has a higher affinity to fat. Other studies show the problem of prescription drug for obese patients.

The drug binding to plasma proteins is not modified in obesity. Current studies on the subject are necessary to better understand the pharmacological mechanism of obesity, considering that is a pathology that grows uncontrollably throughout the world and NSAIDs are drugs most frequently used worldwide.

The level of cytokines of rats pretreated with nimesulide (5mg / kg, ip), our studies demonstrated no statistical differences between the groups, that is, nimesulide was not able to decrease the level of cytokines TNF- α and IL-6. However, the labor Abed; Kaplanski (2001) pretreated rats with nimesulide (30mg / kg i.p.) caused a decrease in TNF- α production. We suggest that the dose and the vehicle used for Abed; Kaplanski (2001) have influenced the reduction of synthesis of this cytokine (5mg / kg vs. 30mg / kg, carboxymethylcellulose versus DMSO). Our results corroborate those found by Liang et al., (2014) who demonstrated that nimesulide has not been able to decrease TNF- α level quantized in the liver and aorta in mice fed a HFD.

5. Conclusion

We conclude that the consumption of the westernized diet when consumed during critical periods of development (pregnancy, lactation and / or post-weaning) causes an increase in the intensity of the acute phase inflammatory response, as well as change in the pharmacological effectiveness of nimesulide in rats.

6. Acknowledges

We acknowledge the financial support of the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

10. References

- Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (ABEP), 2011. Critério de classificação econômica Brasil <http://www.abep.org/novo/Utils/FileGenerate.ashx?id=197> (Acesso em 07.12.2014).
- Associação brasileira para o estudo da obesidade e da síndrome metabólica (ABESO), 2012. Obesidade mata 28 milhões por ano. <http://www.abeso.org.br/lenoticia/876/oms+obesidade+mata+28+milhoes+por+ano.shtml>. (Acesso em 12.12.2014).
- Azab , A.N.; Kaplaski, J., 2001. A reduction of tumor necrosis factor-alpha in paw exudate of lipopolysaccharide treated rats by nimesulide. *Life Sci.* *68*,1667-75.
- Bautista, C.J.; et al. 2016. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *Br J Nutr.* *115*, 538-546.
- Beauchamp, G.K.; Mennella, J.A., 2011. Flavor perception in human infants: development and functional significance. *Digestion*, *3* (Suppl 1), 1-6.
- Borato, D.C. et al. 2016. Biomarkers in Obesity: Serum Myeloperoxidase and Traditional Cardiac Risk Parameters. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* *124*, 49-54.
- Bradley, P.P. et al. 1982. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. *Blood* *60*, 618-622.
- Bullo, M. et al 2003. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrosis factor, and leptin expression. *Obes Res.* *11*, 525-531.
- Buettner, R. et al. 2006. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* *36*, 485-501.
- Cai, X., et al. 2012. Development and validation of a rapid LC-MS/MS method for the determination of JCC76, a novel antitumor agent for breast cancer, in rat plasma and its application to a pharmacokinetics study. *Biom Chromatogr.* *26*, 1118–24.
- Calle, E.E., Kaaks, R., 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* *4*, 579-591.
- Cunha Fda, S. et al. 2015. Both food restriction and high-fat diet during gestation induce low birth weight and altered physical activity in adult rat offspring: the “Similarities in the Inequalities” models. *PLoS One* *10*, p. e0118586.
- Del Prado, M. et al. 1997. Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. *J Nutr.* *127*, 458-62.
- Demiryilmaz, I. et al. 2014. Protective effect of nimesulide against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats: Effects on oxidant/antioxidants, DNA mutation and COX-1/COX-2 levels. *Pharmacol Rep* *66*, 647-652.
- Desai, M. et al. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* *211*, e1-237.e13.
- Fantuzzi, G., 2005. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* *115*, 911-9.

- Ferro Cavalcante, T.C. et al. 2013. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. *Lipids* 48, 1157-1168.
- Ferro Cavalcante, T.C. et al. 2014. Early exposure of dams to a westernized diet has long-term consequences on food intake and physiometabolic homeostasis of the rat offspring. *Int J Food Sci Nutr.*, 65, 989-993.
- Fontana, L. et al. 2007. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes* 56, 1010-1013.
- Hida, K. et al. 2005. Visceral adipose tissue-derived serine protease inhibitor: a unique insulin-sensitizing adipocytokine in obesity. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 10610-5.
- Hogan, S. et al. 2011. Dietary supplementation of grape skin extract improves glycemia and inflammation in diet-induced obese mice fed a western high fat diet. *J Agric Food Chem.* 59, 3035-41.
- Hosogai, N. et al. 2007. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56: 901-11.
- Howard, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk. 2004. *J Am Coll Cardiol.* 43, 519-25.
- Iannitti, T. et al. 2012. Increased central and peripheral inflammation and inflammatory hyperalgesia in Zucker rat model of leptin receptor deficiency and genetic obesity. *Exp Physiol.* 97, 1236-45.
- Inoue, T. et al. 2008. Effects of nimesulide, a cyclooxygenase-2 selective inhibitor, on colitis induced tumors. *Inflammopharmacology* 16, 36-39.
- Kabaran, S., Besler, H.T., 2015. Do fatty acids affect fetal programming? *J Health Popul Nutr.* 33, 14.
- Liang, Y. et al. 2014. Constitutive activation of AMPK α 1 in vascular endothelium promotes high fat diet-induced fatty liver injury: role of COX-2 Induction. *Br J pharmacol.* 171, 498-508.
- Nangunoori, R.K. et al. 2016. Deep Brain Stimulation for obesity: from a theoretical framework to practical application. *Neural Plast.* 2016:7971460.
- Pasarica, M. et al. 2009. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58, 718-725.
- Payolla, T.B. et al. 2015. High-fat diet during pregnancy and lactation impairs the cholinergic anti-inflammatory pathway in the liver and white adipose tissue of mouse offspring. *Mol Cell Endocrinol.* 30, S0303-7207.
- Pereira, A.V. et al. 2011. Determinação da constante de dissociação (K_a) do Captopril e Nimesulida – Experimentos de Química Analítica para o curso de Farmácia. *Química Nova* 34, 1656-1660.
- Prado, W.L. et al. 2009. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição do exercício. *Rev. Bras. Med. Esporte*, 15.
- Purcell, R.H. et al. 2011. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav.* 2011; 104: 474-479.

- Rainford, K.D., 2005. Nimesulide: Actions and Uses; Birkhauser Verlag: Bassel.
- Raipuria, M. et al. 2015. Effects of maternal diet and exercise during pregnancy on glucose metabolism in skeletal muscle and fat of weanling rats. *PloS One* 10, e0120980.
- Reynolds, R.M. et al. 2013. Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: follow-up of 1 323275 person years. *BMJ*, 347:F4539.
- Sun, K. et al. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121, 2094-101.
- Thompson, J.A. et al. 2015. The contribution of Toll-like receptors to placental inflammation in diet induced maternal obesity. *Placenta* 36, 1204-6. .
- Trayhurn, P., 2007. Adipocyte biology. *Obes Rev.*; 8, 41-4.
- Vachharajani, V., Granger, D.N., 2009. Adipose tissue: a motor for the inflammation associated with obesity. *IUBMB* 61, 424-30.
- Wang, H., et al. 2002. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY and AgRP mRNA expression. *Am. J. Physiol.*, 282, E1352-9.
- Wang, Q. et al. 2014. Myeloperoxidase deletion prevents high-fat diet induced obesity and insulin resistance. *Diabetes* 63, 4172-85.
- Weisberg, S.P. et al. 2003. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation* 112, 1785-8.
- White, P.A.S. et al. 2013. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 57.
- Wilson, R.M. et al. 2015. Maternal obesity alters immune cell frequencies and responses in umbilical cord blood samples. *Pediatr Allergy Immunol.* 26, 344-51.
- Winter, C.A. et al. 1962. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111, 544-547, 1962.
- WHO (World Health Organization). Obesidad y sobrepeso <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>. (Acesso em 05.11.2014). 2015

ANEXO A



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br

Recife, 05 de maio de 2015.

Ofício nº 37/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Maria Bernadete de Sousa Maia**

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.003845/2015-63

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Impactos da dieta ocidentalizada durante o período intrauterino na resposta inflamatória aguda e suas implicações na farmacocinética da nimesulida em ratos Wistar.**"

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição/UFPE; Animais; Rato Heterogênico; Linhagem: Wistar; Idade: 60 dias; Peso; (220 - 250g) Sexo: machos (12) e fêmeas (24) e (48) filhotes machos; Número total de animais: 84

Atenciosamente,

Pedro V. Carelli
 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CCB - UFPE
 UFPE SIAPE 1801584

ANEXO B



EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY

Official Journal of The Federation of European Pharmacological Societies

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Audience	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Abstracting and Indexing	p.2
•	Editorial Board	p.2
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0014-2999

DESCRIPTION

The *European Journal of Pharmacology* publishes research papers covering all aspects of experimental pharmacology with focus on the mechanism of action of structurally identified compounds affecting biological systems.

The scope includes: Behavioural pharmacology Neuropharmacology and analgesia Cardiovascular pharmacology Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology Endocrine pharmacology Immunopharmacology and inflammation Molecular and cellular pharmacology Regenerative pharmacology Biologicals and biotherapeutics Translational pharmacology Nutraceutical pharmacology

The journal publishes full-length papers, short reviews (not exceeding 12 pages) and perspectives (*by invitation only*), intended to debate recent advances in rapidly developing fields.

The table of contents for this journal is now available pre-publication, via e-mail, as part of the free ContentsDirect service from Elsevier. Please send an e-mail message to cdhelp@elsevier.co.uk for further information about this service.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

[backbanner.gif](#) [ScienceDirect](#) [Backfiles](#)

AUDIENCE

Pharmacologists, Toxicologists, Neuroscientists, Molecular Biologists, Medicinal Chemists

IMPACT FACTOR

2014: 2.532 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS
 Elsevier BIOBASE
 Chemical Abstracts
 Current Contents/Life Sciences
 MEDLINE@
 EMBASE
 Pascal et Francis (INST-CNRS)
 Reference Update
 Unlisted Drugs
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief:

F.P. Nijkamp, Utrecht, Netherlands

Editor:

G. Folkerts, Utrecht, Netherlands
 M.J. Los, Linköping, Sweden
 L. Groenink, Utrecht, Netherlands
 F. Engels, Utrecht, Netherlands
 P.A.J. Henricks
 F. A. Redegeld

Review Editor:

G. Booz, University of Mississippi, Jackson, Mississippi, USA

Editorial Board:

I.M. Adcock, London, England, UK
 P. Alberts
 O.A. Andreassen, Oslo, Norway
 L.J. Barthó, Pécs, Hungary
 M.H. Baumann, Baltimore, Maryland, USA
 E. Beubler, Graz, Austria
 G. Biggio, Monserrato, Italy
 A. Brack, Würzburg, Germany
 J. Burk, Williamsburg, Virginia, USA
 Y. Cao, Jupiter, Florida, USA
 C.H. Cho, Hong Kong, China
 K.F. Chung, London, England, UK
 A. Colquhoun, Sao Paulo, Brazil
 A.H.J. Danser, Rotterdam, Netherlands
 N.A. Darmani, Pomona, California, USA
 C. Davidson, Lancashire, England, UK
 J.G. de Man, Antwerpen, Belgium
 G. Di Chiara, Cagliari, Italy
 M. Diener, Gießen, Germany
 M. DiLuca, Milano, Italy
 J. Ding, Shanghai, China
 F. Drago, Catania, Italy
 R. Drucker-Collin, Mexico, Mexico
 M.S. Eliaf, Ioannina, Greece
 M. Endoh, Yamagata, Japan
 W. Faour, Byblos, Lebanon
 J.G. Filipe, Montreal, Quebec, Canada
 H.-J. Freisleben
 J.A. García-Sáinz, Mexico City, Mexico
 K.B. Glaser, North Chicago, Illinois, USA
 R. Gosens, Groningen, Netherlands
 R. Gozzelino, Oeiras, Portugal
 A.R. Green, Loughborough, UK
 J. Haller, Budapest, Hungary

M.D. Hamon, Paris, France
Y. Hattori, Toyama, Japan
D. Heymann, Nantes cedex 3, France
M. Hinamoto, Nagoya, Japan
U. Holzer-Petsche, Graz, Austria
S.T. Hou, Ottawa, Ontario, Canada
A. Jovanović, Dundee, Scotland, UK
J. Kamei, Shinagawa, Japan
G. Kolias, Alexandroupolis, Greece
J. Kotlińska, Lublin, Poland
T.F. Krzeminski, Zabrze, Poland
X.J. Li, Beijing, China
Y. Li, Omaha, Nebraska, USA
R. Loewe, Vienna, Austria
W. Löscher, Hannover, Germany
M. Maczewski, Warsaw, Poland
J.J. Moreno, Barcelona, Spain
G. Müller, Frankfurt am Main, Germany
F. Nicoletti, Pozzilli, Italy
J.M. Pennefather, Parkville, Victoria, Australia
C. Peralta, Barcelona, Spain
A. Pertovaara, Helsinki, Finland
J.M. Pfeilschiffer, Frankfurt am Main, Germany
R.C. Pierce, Philadelphia, Pennsylvania, USA
J.P.R. Pin, Montpellier, France
D. Platt, Southborough, Massachusetts, USA
M. Pouliot, Quebec, Quebec, Canada
R. Przewlocki, Krakow, Poland
M.E.A. Reith, New York, New York, USA
M. Rodriguez-Arias, Valencia, Spain
F.G.M. Russel, Nijmegen, Netherlands
A. Sebastião, Lisbon, Portugal
N. Sharif, Fort Worth, Texas, USA
T. Simeone, Omaha, Nebraska, USA
P. Skolnick, Bethesda, Maryland, USA
B. Stieger, Zürich, Switzerland
K. Tanonaka, Tokyo, Japan
M. Tuncer, Ankara, Turkey
B.J.R. Whittle, London, UK

Founded in 1967.

Founding Editors:

David De Wied

Jacques van Rossum

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *European Journal of Pharmacology* publishes full-length papers on the mechanisms of action of chemical substances affecting biological systems. The journal also considers short reviews (not exceeding 12 pages in print) intended to debate recent advances in rapidly developing fields that are within its scope.

Full-length papers are grouped under the following headings: Behavioral pharmacology, Neuropharmacology and analgesia, Cardiovascular pharmacology, Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology, Endocrine pharmacology, Immunopharmacology and inflammation, and Molecular and cellular pharmacology.

Manuscripts submitted to the journal are accepted on the understanding that they are subject to editorial review.

Types of paper

The journal publishes the following article types:

1. Research Paper
2. Review Article

Please note that the journal no longer accepts submission of Rapid Communications and Short Communications.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see "Multiple, redundant or concurrent publication" section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information on this](#)). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3300**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Reviewers

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of at least three potential reviewers. Reviewers who do not have an institutional e-mail address will only be considered if their affiliations are given and can be verified. Preferably international reviewers should be nominated, and their areas of expertise must be stated clearly. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information

Please make sure to adhere to the following word limits:

Abstract: max. 250 words

Introduction: max. 500 words

Discussion: max. 1500 words

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Please make sure to limit the length of this paragraph to max. 500 words.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Please make sure to limit the length of this paragraph to max. 1500 words.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more, but should be readable on screen at a size of 200 × 500 pixels (at 96 dpi this corresponds to 5 × 13 cm). Bear in mind readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and nomenclature, and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below:

Chemical compounds studied in this article

Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Pitidopsisin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865)

[More information.](#)

Electrophoretic gels and blots

Gel and blot images of non-manipulated, non-cut gels or blots are preferred. Molecular weight of relevant bands should be indicated in the image. If re-ordering of the sequence of the samples is necessary, authors are encouraged to rerun the samples on a new gel/blot. If irrelevant parts of the gel image (such as blank lanes or lanes with molecular weight markers) are deleted or splicing of gel lanes is needed (because a rerun is not possible), this should be explicitly described in the figure legend. Authors should add contrasting lines to the image to show where sections have been spliced and joined. In cropped images important bands should be retained and in cropped blots at least six band widths should be visible above and below the band of interest. It is not allowed to combine images from different experiments into a new single image.

It is discouraged to perform quantitative comparisons between samples on different gels or blots. If this is unavoidable, the authors should state in the figure legend that samples derive from the same experiment and that gels/blots were processed in parallel. Quantitative analysis should be normalized to loading controls (e.g. GAPDH, actin, non-phosphorylated protein). Loading controls should be analyzed on the same blot.

Authors should retain their unprocessed gel/blot images, as editors may request them to aid in manuscript evaluation.

Abbreviations

Abbreviations are a hindrance for the reader. Use as few abbreviations as possible and write out names of compounds, receptors, etc., in full throughout the text of the manuscript, with the exceptions given [HERE](#).

Unnecessary abbreviations. Unnecessary abbreviations such as AP, TER, TFT, CER, nAc and LTFSE (for afterpotential, transepithelial potential, Tail-flick test, cold-exposed rats, nucleus accumbens and sympatho-excitatory lateral tegmental field) are not acceptable.

Receptor abbreviations. Receptor abbreviations such as β AR, mAChR, BZR for β -adrenoceptor, muscarinic receptor, benzodiazepine receptor, respectively, should not be used. For receptors avoid the abbreviation "R". With receptor subtypes mention the full receptor name throughout the manuscript e.g., adenosine A1 receptor, dopamine D2 receptor, melanocortin MC3 receptor, endothelin ETA receptor.

Generic names. Generic names should not be abbreviated. For example, AMP, HAL, HIST, RAMH, TAM, SST, for amphetamine, haloperidol, histamine, (R)- α -methylhistamine, tamoxifen, somatostatin, are not accepted. Abbreviations such as (e.g., NA, DA, ACh, ET for noradrenaline, dopamine, acetylcholine, endothelin, should not be used.

Abbreviations which have come to replace the full term. Abbreviations which have come to replace the full term (e.g., GABA, DOPA, EDRF, 5HT, for γ -aminobutyric acid, 3,4-dihydroxyphenylalanine, endothelium-derived relaxing factor, 5-hydroxytryptamine) may be used, provided the term is spelled out in the abstract and in the body of the manuscript the first time the abbreviation is used.

Unwieldy chemical names. Unwieldy chemical names may be abbreviated. For example, 8-OH-DPAT, DOI, DTG, BAPTA, for 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin, 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-aminopropane, 1,3-di(2-tolyl)-guanidine, 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, are acceptable; however, the full chemical name should be given once in the abstract and in the body of the manuscript, followed in both cases by the abbreviation.

Code names. Code names may be used, but the full chemical name should be given in the abstract and in the text.

Authors not conforming to these demands will have their manuscripts returned for correction, with delayed publication as the result.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and Units

Only generic and chemical names of drugs should be used, although a proprietary equivalent may be indicated once, in parentheses. The nomenclature of chemical substances should be consistent, clear and unambiguous, and should conform to the usage of the American Chemical Society and the convention recommended by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, <http://www.iupac.org/general/FAQs/ns.html>) When in doubt, writers should consult the indexes of Chemical Abstracts; the various reports and pamphlets of the American Chemical Society Committee on Nomenclature, Spelling and Pronunciation; the recommendations of the IUBMB (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb>) When drugs which are mixtures of stereoisomers are used, the fact that they have a composite nature and the implication of this for interpretation of the data and drawing of conclusions should be made clear. The use of the appropriate prefix is essential. Use of the generic name alone without a prefix would be taken to refer to agents with no stereoisomers. The nomenclature of receptors and their subtypes and of ion channels should conform to NCIUPHAR (<http://www.iuphar.org/nciuphar.html>) the trivial name of enzymes may be used in the text, but the systematic name and classification number according to Enzyme Nomenclature of the NC-IUBMB (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>), rev. edn. (Academic Press, New York, NY, 1984) should be quoted the first time an enzyme is mentioned.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit [this site](#); some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

The use of color for graphics or tables is strongly discouraged (exceptions are made for invited reviews).

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the

journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.H., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/european-journal-of-pharmacology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use to write your Data in Brief.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases.](#)

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available.](#) Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this [Guide for Authors](#) for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our [Support Center](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

[Track your submitted article](#)

[Track your accepted article](#)

You are also welcome to contact the Elsevier Contact Center.

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>