UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

JACQUELINE MARIA DA SILVA

INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA POR RATAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO: INFLUÊNCIA NA ESTRUTURA ADIPOCITÁRIA DA PROLE

RECIFE
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

JACQUELINE MARIA DA SILVA

INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA POR RATAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO: INFLUÊNCIA NA ESTRUTURA ADIPOCITÁRIA NA PROLE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do Título de Mestre em Nutrição. Área de concentração: Bases Experimentais da Nutrição.

Orientadora: Profª. Drª. Raquel da Silva Aragão. Professora Adjunta C-I do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão CAV-UFPE.

Coorientador: Profº Drº Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior. Professor Associado I do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão CAV-UFPE.

RECIFE
2018

Catalogação na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

S586i Silva, Jaqueline Maria da.
Ingestão crônica de dieta hiperlipídica por ratas durante a gestação e lactação: influência na estrutura adipocitária da prole / Jaqueline Maria da Silva. – Recife: o autor, 2018.
71 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Raquel da Silva Aragão.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Nutrição.
Inclui referências, figuras, tabelas e anexos.

1. Programação. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Tecido adiposo branco. 4. Tecido adiposo marrom. 5. Morfometria. I. Aragão, Raquel da Silva (orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 135)

JACQUELINE MARIA DA SILVA

INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA POR RATAS DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO: INFLUÊNCIA NA ESTRUTURA ADIPOCITÁRIA NA PROLE

Dissertação aprovada em 23/02/2018

_____

Profª. Drª Lígia Cristina Monteiro Galindo
Departamento de Anatomia / UFPE

_____

Profª. Drª Luciana Maria Silva de Seixas Maia
Departamento de Histologia / UFPE

_____

Profª. Drª Isabeli Lins Pinheiro

Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte - CAV / UFPE

RECIFE

2018

Dedico não somente as linhas redigidas neste trabalho, mas em especial o alcance de mais uma conquista na minha formação, àqueles que SEMPRE acreditaram mais em mim, do que eu mesma, meus amados pais:

José Bezerra da Silva – Sr Zeca (In memoriam);

Maria Josefa da Silva – Dona Lica.

AGRADECIMENTOS

A Ti meu DEUS serei sempre grata por me conceder forças diante de tantos percalços enfrentados nessa caminhada; fé e perseverança para alcançar objetivos antes tão distantes das minhas possibilidades; e humildade para compreender que a busca pelo conhecimento científico em nada me faz "superior' àqueles que não seguiram os mesmos caminhos;

Ao meu PAI, exemplo de força, determinação e honestidade. Dono de um coração gigante, dono de uma moral inquestionável. Melhor herança não poderia ter nos deixado; seus valores, sem dúvida moldaram meu caráter, e me fazem a cada dia querer ser melhor!
"Só enquanto eu respirar vou me lembrar de vc..."

À minha MÃE, meu exemplo, que sempre acreditou em mim, muito mais que eu mesma, sempre me apoiou e fez (e ainda faz) o possível e impossível para contribuir para o meu crescimento. Serei eternamente grata por todo seu amor, por toda sua bondade;

Aos meus IRMÃOS (Josemar, Poliana e Gilvan) e meus sobrinhos (Thamires, Murilo e Anna Beatriz), simplesmente por existirem, vibrarem com minhas conquistas e tornarem minha vida mais feliz!

À minha ORIENTADORA, Profª Drª Raquel da Silva Aragão, pela disponibilidade, atenção, paciência e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo desses dois anos. Sua competência é admirável! Você é um exemplo de professora e pesquisadora!

Ao meu CO-ORIENTADOR, Profº Drº Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior, por ter me recebido em seu laboratório e com tanta paciência e competência me guiado nos procedimentos histológicos. Admiro a tranquilidade e gentileza que você lida com seus alunos. Você também é um exemplo de professor e pesquisador!

Ao Profº Drº RAUL MANHÃES DE CASTRO e aos demais professores e alunos que compõem seu grupo de pesquisa, pelo acolhimento, solidariedade e trabalho em equipe. Levarei para a vida as amizades aqui construídas!

Aos SERVIDORES e PROFESSORES do Programa de Pós Graduação em Nutrição (PPGN) da UFPE pela contribuição nesta conquista.

Às amigas ERIKA CADENA e CAROLINA CADETE por todo conhecimento e experiência transmitidos, por todo auxílio durante os procedimentos experimentais,

por toda compreensão, paciência e amizade. Você não apenas me ajudaram na consolidação deste trabalho, mas também tornaram meus dias mais alegres!

À amiga THAYNAN OLIVEIRA, sempre tão solicita e comprometida com a execução de nossos experimentos e análises. Te agradeço de coração por toda ajuda na execução deste trabalho, pelas idas e vindas ao CAV, por toda paciência nos momentos de estresse (rsrs) e acima de tudo por toda amizade e incentivo dado. É valioso saber que temos com que contar!

Às nossas ESTAGIÁRIAS de Iniciação Científica Amanda Braz e Raquel Benjamim por toda ajuda prestada na execução deste trabalho.

À amiga DANIELLE VIANA agradeço não apenas pela parceria nesses dois anos, mas principalmente por poder dividir com você todas as alegrias e momentos de dificuldades... Se todas as pessoas tivessem seu coração o mundo certamente seria melhor!

Aos meus amigos ROBERTA e EMERSON, por todo companheirismo, e amizade ao longo de tantos anos, que mesmo com a distância têm prevalecido. Agradeço por compreenderem minha ausência em vários momentos e por vibrarem com minhas conquistas como se fossem suas! Tenho um enorme orgulho e admiração por vocês!

Aos alunos que integram o Laboratório de Biotecnologia e Fármacos do CAV, por todo trabalho em equipe que me auxiliou muito nos procedimentos histológicos.

À minha turma de mestrado: Danielle Viana, Thaynan Oliveira, Nathalia Melo, Nathália Cavalcante, Laura Mata, Paula Brielle e Danielle Guedes. Vocês são feras!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro ao meu projeto de mestrado.

Agradeço de modo geral à todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho pudesse acontecer!

"...Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade..."

“Sou um só, mas ainda sou um. Não posso fazer tudo, mas posso fazer alguma coisa. E por não poder fazer tudo não me recusarei a fazer o que posso. O que eu faço é apenas uma gota no meio do oceano, mas sem ela o oceano seria menor...”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as repercussões do consumo de dieta hiperlipídica materna, de característica hipercalórica ou isocalórica, durante o período perinatal, na estrutura adipocitária da prole de ratos. Foram utilizadas 28 ratas albinas da linhagem *Wistar*. As ratas foram classificadas de acordo com a dieta recebida durante a gestação e lactação em Grupo Controle (GC/n=9), Grupo Hiperlipídica/Isocalórica (GHI, n=6), Grupo Hiperlipídica/Hipercalórica (GHH, n=7). Nas ratas, foram avaliados peso corporal, consumo alimentar e gordura intra-abdominal. Nos filhotes, acompanhamento do peso corporal da lactação ao sacrifício, e consumo alimentar no pós-desmame. No sacrifício, aos 22 ou 70 dias de idade, foram coletadas as gorduras inguinal, epididimal, retroperitoneal, mesentérica, intra-abdominal total e marrom. Durante a gestação e lactação as ratas GHH apresentaram menor consumo alimentar em relação às ratas GHI e GC. Ao desmame, os valores de peso absoluto (PA) e peso relativo (PR) da gordura intra-abdominal das ratas GHH foram maiores que os valores do GC. Os filhotes de ratas GHH apresentaram maior peso corporal com 19 e 21 dias de vida, em relação aos filhotes de ratas GC e maior percentual de ganho de peso que os filhotes de ratas GHI e GC, durante a lactação. Aos 70 dias de idade, os filhotes GHI apresentaram menor peso corporal quando comparados aos filhotes GC. Nos animais sacrificados aos 22 dias, os PA e PR do coxim adiposo inguinal foram maiores nos filhotes GHH que nos filhotes GHI ou GC. Para o coxim epididimal, filhotes GHH apresentaram maiores valores de PA e PR que os filhotes GC. Filhotes GHH apresentaram maiores valores de PA para o coxim adiposo retroperitoneal e mesentérico em relação aos GC. Enquanto que para os valores de PR, filhotes GHH e GHI demonstraram maior percentual que filhotes GC. Para o sacrifício aos 70 dias, filhotes GHI apresentaram maiores valores de PR do coxim adiposo inguinal, em relação ao GC. Não houve diferenças nos demais tecidos. Na análise morfométrica de animais com 22 dias, a prole GHH apresentou maiores valores de área e perímetro para os adipócitos inguinais, retroperitoneais e mesentéricos comparado à GHI e GC. Para os animais com 70 dias, a área e perímetro dos adipócitos inguinais, retroperitoneais e mesentéricos da prole GHH foi maior em relação à prole GHI e GC. Ademais, para os adipócitos retroperitoneais, filhotes GHI apresentaram menores valores de perímetro em relação aos GC. O número de adipócitos por área nos coxins inguinal, retroperitoneal e mesentérico, foi menor em filhotes GHH em relação ao GC, aos 22 dias. Aos 70 dias filhotes GHH tiveram menor número de adipócitos/área no coxim retroperitoneal. Em conclusão, foi observado que a hipertrofia adipocitária está presente a curto e em longo prazo em resposta à dieta materna, independente da ingestão energética. Contudo, o aumento do peso e da adiposidade corporal só foi observado ao desmame. Enquanto que não foi observada hiperplasia adipocitária em nenhuma das idades estudadas. A utilização de dieta hiperlipídica materna durante o período perinatal influencia na plasticidade do desenvolvimento do tecido adiposo visceral e subcutâneo.

Palavras-chave: Programação. Dieta hiperlipídica. Tecido adiposo Branco. Tecido Adiposo Marrom. Morfometria.

ABSTRACT

The general objective of this study was to evaluate the repercussions of two maternal high-fat diets with different caloric contents, throughout the perinatal period, on the adipocyte structure of rats. For this, 28 Wistar albino female rats were used. The rats were classified according to the diet received during gestation and lactation: Control Group (GC, n=9), Hyperlipidic/Isocaloric Group (GHI, n= 6), Hyperlipidic/Hypercaloric Group (GHH, n=7). On the rats, body weight, food intake and intra-abdominal fat were evaluated. On puppies, body weight evolution and food consumption were measured post-weaning. At the sacrifice (on 22º or 70º postnatal day), the inguinal, epididimal, retroperitoneal, mesenteric, intra-abdominal and brown fat were collected. During gestation and lactation, GHH rats presented lower food consumption than GHI and GC rats. At weaning, the values of absolute weight (BP) and relative weight (PR) of the intra-abdominal fat of the GHH rats were higher than the GC mothers. The offspring from GHH presented higher body weight on the 19th and 21st postnatal days than CG offspring, and a higher percentage of weight gain was revealed compared to GHI and CG offspring at the same ages. On 70º postnatal day, GHI pups presented lower body weight compared to CG pups. At sacrifice, on 22º postnatal day, PA and PR of the inguinal adipose cushion was higher for the GHH pups than the GHI or CG pups. For the epididimal cushion, GHH pups presented higher PA and PR values than the GC pups. GHH pups presented higher PA values for the retroperitoneal and mesenteric adipose cushions compared to CG. For PR values, GHH and GHI pups showed a higher percentage than CG pups. At sacrifice, on 70º postnatal day, GHI pups presented higher PR values of the inguinal adipose cushion compared to CG, with no other differences in other tissues. For morphometric analysis at 22º postnatal day, GHH offspring presented higher area and perimeter values for inguinal, epididimal and mesenteric adipocytes compared to GHI and CG. At 70º postnatal day, area and perimeter of the inguinal, retroperitoneal and mesenteric adipocytes of GHH offspring were greater compared to GHI and GC offspring. Furthermore, GHI pups presented lower perimeter values compared to the CG. The number of adipocytes per area in the inguinal, retroperitoneal and mesenteric cushions was lower in GHH pups compared to CG at 22 days. At 70º, GHH offspring had a lower number of adipocytes/area in the retroperitoneal cushion. In conclusion, it was observed that adipocyte hypertrophy is present in the short and long term in response to maternal diet, independent of energy intake. However, body weight gain and adiposity were only observed at weaning. While no adipocyte hyperplasia was observed in any of the studied ages. The use of maternal hyperlipidic diet during the perinatal period influences the plasticity of visceral and subcutaneous adipose tissue development.

Keywords: Programming. High Fat Diet. White Adipose Tissue. Brown Adipose Tissue. Morphometry.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Composição centesimal das dietas experimentais. 31
Tabela 2. Composição percentual de macronutrientes das dietas segundo o Valor Energético Total (VET). 32
Tabela 3. Composição de macronutrientes da dieta pós desmame. 32
Tabela 4. Parâmetros corporais, de consumo alimentar e parto das ratas. 38
Tabela 5. Quantificação do tecido adiposo e indicadores corporais dos filhotes aos 22 dias de vida. 41
Tabela 6. Quantificação do tecido adiposo e indicadores corporais dos filhotes aos 70 dias de vida. 45

Figura 1. Desenho Experimental 33
Figura 2. Evolução do peso corporal dos filhotes durante a lactação. 39
Figura 3. Fotomicrografias do tecido adiposo branco da prole de ratos aos 22 dias de vida. 42
Figura 4. Morfometria do tecido adiposo branco em filhotes com 22 dias de vida. ...43
Figura 5. Evolução do peso corporal e consumo alimentar dos filhotes no pós desmame. 44
Figura 6. Fotomicrografias do tecido adiposo branco da prole de ratos aos 70 dias de vida. 46
Figura 7. Morfometria do tecido adiposo branco em filhotes com 70 dias de vida. ...47
Figura 8. Contagem de adipócitos no tecido adiposo branco em filhotes com 22 e 70 dias de vida. 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	micrômetro
AGL	ácidos graxos livres
AgRP	peptídeos relacionado ao Agout
ATP	adenosina trifosfato
bTAM	tecido adiposo marrom “branco”
C/EBPα	proteína ligante ao amplificador alfa
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CEUA	comissão de ética no uso de animais
CDK	ciclina – kinase dependente
CIDE-A	ativador de morte celular
CONCEA	conselho nacional de controle de experimentação animal
GC	grupo controle
GHH	grupo hiperlipídico/hipercalórico
GHI	grupo hiperlipídico/isocalórico
GPC	ganho de peso corporal
HE	Hematoxilina/eosina
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
IMC	índice de massa corporal
iTAM	tecido adiposo marrom induzido
Junk food	alimento rico em calorias e de baixa qualidade nutricional
LAFINNT	laboratório de fisiologia da nutrição Naíde Teodósio
LENIB	laboratório de estudos em nutrição e instrumentação biomédica
LNED	laboratório de nutrição experimental e dietética
LPL	lipase de lipoproteínas
MCE	expansão clonal mitótica
MCP-1	proteína 1 quimioatrativa de macrófagos
MCP-3	proteína 3 quimioatrativa de macrófagos
miRNA	micro ácido ribonucléico mensageiro
NPY	neuropeptídio Y
PAI-1	inibidor 1 de ativador de plasminogênio

PCR	proteína C reativa
PGC1	coativador da transcrição gênica
PPARγ	receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas
RB	proteína retinoblastoma
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
SREBP-1c	proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis
TAB	tecido adiposo branco
TAM	tecido adiposo marrom
TAV	tecido adiposo visceral
TBHQ	terbutil hidroquinona
TG	triacilgliceróis
TNF-α	fator-α de necrose tumoral
UCP-1	proteína desacopladora-1
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
VET	valor energético total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14
2 REFERENCIAL TEÓRICO 17
2.1 Plasticidade e Desenvolvimento Perinatal 17
2.2 Tecido adiposo: função e abordagem fisiológica 20
2.3 Manipulações dietéticas e repercussões metabólicas 25
3 HIPÓTESE 28
4 OBJETIVOS 29
4.1 Objetivo Geral 29
4.2 Objetivos Específicos 29
5 METODOLOGIA 30
5.1 Questões éticas 30
5.2 Animais 30
5.3 Manipulação Nutricional 31
5.4 Desenho Experimental 32
5.5 Avaliação das Mães 33
5.5.1 Peso corporal 33
5.5.2 Consumo alimentar 34
5.6 Avaliação dos Filhotes 34
5.7 Consumo Alimentar dos Filhotes 35
5.8 Coleta das amostras 35
5.9 Análises histológicas 35
5.10 Análise morfométrica 36
5.11 Análises Estatísticas 36
6 RESULTADOS 38
7 DISCUSSÃO 49
8 CONCLUSÃO 59
8.1 Perspectivas 59
REFERÊNCIAS 60
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA 71

1. INTRODUÇÃO

A plasticidade do desenvolvimento tem sido hipotetizada por desempenhar um papel central na evolução da diversidade fenotípica entre as espécies (WEST-EBERHARD, 2003). Através da "assimilação genética", os fenótipos inicialmente induzidos por influência de fatores ambientais, nas espécies, tornam-se geneticamente fixados ao longo do tempo (SIKKINK e SNELL-ROOD, 2016).

Nesse contexto, o ambiente nutricional durante os períodos críticos do desenvolvimento pode desencadear distintas adaptações de programação na prole, resultando em alterações permanentes em todos os aspectos do fenótipo, incluindo não apenas a morfologia, mas também a fisiologia e o comportamento (MCMILLEN e ROBINSON, 2005; WEST-EBERHARD, 2005b; LANGLEY-EVANS, 2015). Desse modo, sendo determinante para o risco de doenças metabólicas na idade adulta, incluindo doenças cardiovasculares, diabetes melitos tipo 2 e obesidade (MARTORELL, STEIN e SCHROEDER, 2001; BARKER *et al.*, 2002; LANGLEY-EVANS, 2006).

Estudos a cerca dos efeitos da programação metabólica em longo prazo, focavam em sua maioria na restrição proteica e calórica (PLAGEMANN, 2008; COUPE *et al.*, 2010; GARCIA *et al.*, 2010; PICO *et al.*, 2012). No entanto, atualmente, a desnutrição materna diz respeito a uma menor proporção da população nas sociedades ocidentais porque, em geral, as dietas com elevadas quantidades de gorduras são amplamente consumidas (POMAR *et al.*, 2017). Nesse contexto, estudos mostram que tanto a desnutrição materna como a hipernutrição durante o período perinatal afetam o fenótipo metabólico da prole (BAYOL *et al.*, 2008; PALOU *et al.*, 2010; AKYOL, MCMULLEN e LANGLEY-EVANS, 2012; PALOU *et al.*, 2012; SUN *et al.*, 2012).

O aumento da quantidade de lipídeos na dieta materna é umas das manipulações nutricionais utilizadas para estudar as repercussões no desenvolvimento da prole (CADENA-BURBANO *et al.*, 2017). Estudos mostram que filhotes adultos de fêmeas que consumiram a dieta hiperlipídica, durante a gestação e lactação, apresentaram alterações na maturação de reflexos primitivos, desarranjos no metabolismo de glicose, disfunções cardíacas, alterações no

hipotálamo e no metabolismo de lipídeos no fígado (GHEBREMESKEL *et al.*, 1999; CERF *et al.*, 2005; KHAN *et al.*, 2005; CADENA-BURBANO *et al.*, 2017).

Há evidências de que a composição corporal materna por si só é um fator predisponente à adiposidade nos filhotes (SACKS *et al.*, 2006). Além disso, uma maior adiposidade materna, e não somente o consumo de dieta hiperlipídica na fase perinatal, é necessária para induzir resistência insulínica, hiperleptinemia e maior ganho ponderal nos descendentes na vida adulta (WHITE, PURPERA e MORRISON, 2009).

O tecido adiposo é considerado vulnerável aos efeitos ambientais externos nas fases iniciais da vida (MURABAYASHI *et al.*, 2013). Deste modo, este tecido contribui para a programação de disfunções metabólicas (MURABAYASHI *et al.*, 2013). A obesidade induzida por dieta durante a gestação pode levar a efeitos programados no RNAm, miRNA e expressão de peptídeos bioativos (adipocinas) no tecido adiposo (MURABAYASHI *et al.*, 2013).

A capacidade do tecido adiposo tamponar variações na oferta e demanda energética é alcançada mediante respostas metabólicas e endócrinas integradas, bem como alterações dinâmicas na composição celular (CINTI, 2001). Essa capacidade de tamponamento pode ser excedida durante a hipernutrição crônica, resultando no extravasamento de lipídeos do tecido adiposo e sua acumulação patológica (UNGER, 2002). Metabólitos derivados dessa acumulação ectópica prejudicam a ação da insulina nos tecidos periféricos, bem como a produção pelo pâncreas, um processo denominado lipotoxicidade (UNGER e SCHERER, 2010).

Os adipócitos marrons por sua vez exibem atividade termogênica ao aperfeiçoar a eficiência metabólica, contribuindo para o controle do peso corporal em várias espécies animais (BROETTO e BRITO, 2012). A oxidação de ácidos graxos e a produção de calor pelas células adiposas marrons se devem à intensa atividade metabólica do elevado número de mitocôndrias, que expressam a proteína desacopladora-1 (UCP-1) também conhecida como termogenina (RICQUIER e BOUILLAUD, 2000). A UCP-1 permite a dissipação do gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia respiratória mitocondrial. O desacoplamento entre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP, promove dissipação de energia na forma de calor (LANGIN, 2010).

Considerando a influência da nutrição na plasticidade do tecido adiposo durante a fase perinatal, torna-se importante o estudo dos efeitos do consumo de

uma dieta hiperlipídica materna sobre a plasticidade, distribuição e morfometria do tecido adiposo na prole. Nossa pergunta condutora é “Quais as repercussões do consumo materno de dietas hiperlípidicas, com diferentes teores calóricos, sobre a estrutura adipocitária da prole de ratos?” Os resultados encontrados neste estudo poderão contribuir para melhor compreensão sobre a influência do aumento da ingestão lipídica materna sobre as variações no mecanismo de hipertrofia e hiperplasia adipocitária, bem como acúmulo de gordura corporal nos descendentes. Além disso, inferir se esses efeitos são atribuídos ao aumento do aporte lipídico per si, ou a associação com o aumento da ingestão energética.

A pesquisa foi desenvolvida em colaboração com os laboratórios da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE): Laboratório de Fisiologia da Nutrição Naíde Teodósio (LAFINNT), Laboratório de Estudos em Nutrição e Instrumentação Biomédica (LENIB), Laboratório de Nutrição Experimental e Dietética (LNED), Laboratório de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica e Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, ambos do Centro Acadêmico de Vitória (CAV). O presente trabalho será concluído com a elaboração de um artigo original.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Plasticidade e Desenvolvimento Perinatal

A plasticidade frequentemente estudada como “plasticidade do desenvolvimento”, é compreendida como respostas de organismos a diferentes condições ambientais ou estímulos, ou seja, é a capacidade de um genótipo de manifestar fenótipos distintos em resposta a um estímulo ambiental (BRADSHAW, 1965). Dessa forma, o genótipo não irá determinar fenótipos específicos, porque os genes vão interagir com cadeias bioquímicas, celulares e teciduais, de modo que organismos geneticamente idênticos respondem de maneira distinta a diferentes estímulos (BRADSHAW, 1965; SCHEINER, 1993; PIGLIUCCI, MURREN e SCHLICHTING, 2006).

A maioria dos tecidos retém a plasticidade celular durante os períodos embrionário e de desenvolvimento fetal (LANGLEY-EVANS, 2009). Como resultado, estas são consideradas as fases críticas do desenvolvimento, durante as quais estímulos ambientais podem originar diferentes estados fisiológicos, morfológicos e comportamentais (WEST-EBERHARD, 2005a; LANGLEY-EVANS, 2009).

A hipótese da plasticidade do desenvolvimento deu abertura a um novo paradigma de pesquisa, para compreender os riscos de desenvolvimento de doenças crônicas, que ultrapassou as explicações simplistas baseadas em influências genéticas e de estilo de vida (BENYSHEK, 2013; VICKERS, 2014). Uma abordagem melhor integrada desenvolveu a análise da interação entre a herança genética e os fatores de estilo de vida, incluindo dieta, mas também incorporando o papel da plasticidade do desenvolvimento, na formação de distintos resultados fenotípicos baseados em exposições ambientais variadas (BENYSHEK, 2013).

A partir da hipótese de Barker e colaboradores (1989; 2002), de que condições adversas intrauterinas e durante a infância aumentavam o risco de doenças cardiovasculares, seus estudos demonstraram que pessoas nascidas com baixo peso permaneceram fisiologicamente diferentes daquelas com peso adequado, de forma persistente, até a vida adulta (BARKER, OSMOND e LAW, 1989). Estudos subsequentes apontaram a associação entre o baixo peso e a flexibilidade metabólica do músculo esquelético (DA SILVA ARAGAO *et al.*, 2014),

diferentes respostas ao estresse (JONES *et al.*, 2006), artérias menos elásticas (PAINTER *et al.*, 2007), padrões específicos de secreção hormonal (DE ROOIJ *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2007) e depressão (RICE, HAROLD e THAPAR, 2006).

Para um possível esclarecimento das repercussões tardias de uma deficiência nutricional durante o período de desenvolvimento, Hales e Barker (1992) propuseram a hipótese do “fenótipo econômico”. Nesta hipótese, o feto seria capaz de se adaptar a um ambiente intrauterino adverso, otimizando o uso de suprimentos energéticos reduzidos, no sentido de garantir sua sobrevivência sob condições de restrição alimentar (HALES e BARKER, 1992). Entretanto, na ausência da privação nutricional, a maior oferta de nutrientes, aumentaria no indivíduo, o risco de surgimento de doenças metabólicas e cardiovasculares na vida adulta (HALES e BARKER, 1992; MCMILLEN e ROBINSON, 2005; BARKER, 2007).

Evidências crescentes indicam que os efeitos da plasticidade do desenvolvimento também podem ser transmitidos às gerações futuras, na ausência de outras agressões ambientais (BENYSHEK, 2013). A transmissão desses efeitos é muitas vezes vista como uma forma de herança epigenética, quer via linhagem materna ou paterna, para ambas heranças, germinal e somática, com modificações epigenética que podem ser responsáveis por alterações fenotípicas em novas gerações (AIKEN e OZANNE, 2014).

A compreensão da plasticidade nas fases iniciais da vida e suas repercussões associadas é um campo de pesquisa de elevada relevância (BARKER, 1992; 1995; SYMONDS *et al.*, 2007; HANLEY *et al.*, 2010). Estudos experimentais e epidemiológicos mostraram que alterações nutricionais nos estágios pré, peri e pós-natal podem ter impacto significativo sobre o desenvolvimento e saúde futuros (BARKER, 1995; SYMONDS *et al.*, 2007; BERGLUND *et al.*, 2016). Levando em consideração que grande parte do desenvolvimento do sistema regulatório do balanço energético ocorre no período perinatal, condições desfavoráveis nesta fase de desenvolvimento podem reprogramar o metabolismo, de modo a ajustá-lo nestas condições, perpetuando-se ao longo de sua vida (REMMERS e DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

No cenário nacional, alterações nos padrões dietéticos e nutricionais da população, assim como drástica redução na prática de atividades físicas, configuram o processo da transição nutricional, caracterizada pela redução nas prevalências dos déficits nutricionais e aumento significativo de sobrepeso, obesidade e distúrbios

metabólicos associados (FILHO e RISSIN, 2003). Alguns aspectos vêm sendo descritos para melhor compreensão desse fenômeno, como o aumento da preferência da população por alimentos processados e ultra-processados (SOUZA, 2010). Há consequente aumento do consumo de ácidos graxos saturados, açúcares simples e sódio e redução considerável de frutas, legumes e verduras, o que acarreta déficit na ingestão de vitaminas e minerais indispensáveis ao bom funcionamento do organismo (SOUZA, 2010).

De etiologia multifatorial, a obesidade, definida como o acúmulo excessivo de gordura corporal, comumente resultante do desequilíbrio crônico entre o consumo alimentar e o gasto energético (OMS, 2002). É um dos fatores preponderantes para explicar o aumento da carga das doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), uma vez que está associada frequentemente a enfermidades cardiovasculares como hipertensão arterial, dislipidemias, diabetes tipo 2, osteoartrites e certos tipos de câncer, sendo também apontada como importante condição que predispõe à mortalidade (SBC, 2013).

Achados clínicos têm sugerido que a obesidade e diabetes gestacional podem favorecer, no feto, o desenvolvimento de um fenótipo para a obesidade na fase adulta (GLUCKMAN e HANSON, 2004; ARMITAGE, POSTON e TAYLOR, 2008). Em animais roedores, acontece um processo similar, onde o consumo de uma dieta hiperlipídica materna, durante as fases gestacional e lactacional, resulta em um fenótipo nos filhotes semelhantes ao da obesidade em humanos (ARMITAGE *et al.*, 2005; PARENTE, AGUILA e MANDARIM-DE-LACERDA, 2008). A ingestão crônica de dieta hiperlipídica por ratas, durante períodos críticos do desenvolvimento, programa a descendência para o surgimento de obesidade, intolerância à glicose e hiperinsulinemia na vida adulta (SRINIVASAN *et al.*, 2006).

Em humanos, a evidência dos efeitos da plasticidade na saúde da prole decorrente da obesidade gestacional é demonstrada no estudo de Guénard e colaboradores (2013) com irmãos nascidos antes e após suas genitoras serem submetidas ao by-pass gástrico para redução da adiposidade corporal. Os indivíduos nascidos após o procedimento cirúrgico apresentaram-se menos obesos e exibiram perfis de risco cardiometabólicos melhorados na idade adulta, comparados com os irmãos nascidos antes da cirurgia materna (GUENARD *et al.*, 2013). Esses estudos observacionais em humanos sugerem que um ambiente

perinatal obesogênico tem efeitos de modulação metabólica sobre a prole (KRAL *et al.*, 2006; GUENARD *et al.*, 2013; ALFARADHI *et al.*, 2016).

2.2. Tecido adiposo: função e abordagem fisiológica

Dois tipos de tecido adiposo com bioatividade distintas são classicamente descritos em mamíferos: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM). Ambos atuam no balanço energético, mas enquanto o TAM é especializado na dissipação de energia na forma de calor durante a termogênese, o TAB está principalmente envolvido na estocagem de energia (QUEIROZ *et al.*, 2009).

O TAB consiste na maior quantidade do tecido adiposo encontrado em humanos adultos, com maior deposição subcutânea (85% do tecido adiposo total) na região corporal inferior ou abdominal e depósitos de gordura visceral (aproximadamente 10%) com distribuição omental/mesentérica e/ou retroperitoneal (WHITE e TCHOUKALOVA, 2014). Os adipócitos brancos maduros são células grandes, muitas vezes maiores que as hemácias, armazenam os triacilgliceróis (TG) em uma única e grande gota lipídica que chega a ocupar 85-90% do seu citoplasma, e podem alterar acentuadamente seu tamanho (volume e diâmetro) conforme a quantidade de TG acumulada (POND, 2001).

Por muito tempo, acreditou-se que o TAB desempenhava basicamente a função de reserva energética corporal, onde os adipócitos atuariam de forma global na homeostase energética (MARIMAN e WANG, 2010). Essa visão tradicional tem sido contestada desde a descoberta que o tecido adiposo era capaz de produzir moléculas bioativas, como o fator endócrino adipsina, uma das primeiras proteínas cuja sua produção foi identificada (FLIER *et al.*, 1987). Em 1994, a identificação da leptina estabeleceu definitivamente esse tecido como um órgão endócrino, e desde então, uma grande variedade de peptídeos bioativos, muitos com ação hormonal, são descritos como produto de liberação do tecido adiposo (LAFONTAN, 2005).

A produção e liberação dessas substâncias bioativas (adipocinas) pelo tecido adiposo desempenha um papel significativo nas alterações cardiometabólicas, induzidas pelo excesso de gordura corporal (QUEIROZ *et al.*, 2009). Na obesidade, o tecido adiposo encontra-se infiltrado por macrófagos ativados, que atuam estimulando a liberação de excessiva quantidade de citocinas pró-inflamatórias, como fator-α de necrose tumoral (TNF-α), o inibidor 1 de ativador de plasminogênio

(PAI-1), interleucina-6 (IL-6), proteína 4 ligadora de retinol, proteína 1 quimioatrativa de macrófagos (MCP-1) e proteínas de fase aguda (TILG e MOSCHEN, 2006). Essas moléculas liberadas exercem no organismo ações tanto parácrina, ao potencializarem a resposta inflamatória local no tecido adiposo, como endócrina, ao induzirem a resistência insulínica associada à obesidade, levando a distúrbios como diabetes e doenças cardiovasculares (PERMANA, MENGE e REAVEN, 2006).

Os compartimentos do TAB apresentam diferentes valores de expressão e secreção das adipocinas. De maneira geral, o tecido adiposo visceral (TAV), ou omental, é o mais ativo, ou seja, mais sensível à lipólise, via catecolaminas e β-adrenorreceptores, e mais resistente à ação da insulina, liberando maior concentração de ácidos graxos livres (AGL), diretamente na veia porta (KELLEY *et al.*, 2000; ARNER, 2003). Além disso, o TAV secreta concentrações elevadas de adipocinas pró-inflamatórias, como resistina, PAI-1, proteína C reativa (PCR), IL-6, seguido do tecido adiposo subcutâneo abdominal, e do tecido adiposo subcutâneo glúteo-femoral (WAJCHENBERG, 2000; GIACCHETTI *et al.*, 2002). Outras adipocinas, a exemplo da leptina, são expressas em maior quantidade no tecido adiposo subcutâneo (FRAYN *et al.*, 2003; RAJALA e SCHERER, 2003).

Fox e colaboradores (2007) ao avaliarem homens e mulheres, sem doença cardiovascular e dentro da normalidade do IMC, observaram que embora tanto o tecido adiposo subcutâneo quanto o visceral estejam correlacionados com fatores de risco metabólicos, o TAV está fortemente associado a um perfil de risco metabólico adverso. Dessa forma, o TAV é considerado um depósito de gordura patogênica único, onde sua quantificação proporciona melhor compreensão do risco metabólico associado a distribuição de gordura corporal (FOX *et al.*, 2007).

O acúmulo da massa adiposa observada na obesidade é determinado pelo aumento do tamanho (hipertrofia) e/ou do número (hiperplasia) dos adipócitos (QUEIROZ *et al.*, 2009). Alterações no diâmetro e volume dessas células maduras ocorrem em resposta a ativação de suas ações metabólicas típicas: lipogênese e lipólise (KONIECZNY e EMERSON, 1984; JENSEN, 1997). Esses processos variam de acordo com a necessidade de incorporação ou liberação de lipídeos, que dependem de fatores como estado nutricional, gasto energético, influência de hormônios catabólico ou anabólicos, da atividade de enzimas envolvidas nestes processos e da heterogeneidade dos diversos compartimentos adiposos do organismo (KONIECZNY e EMERSON, 1984; JENSEN, 1997).

Histologicamente o tecido adiposo é categorizado como um tipo de tecido conjuntivo frouxo e, como tal, o colágeno contribui consideravelmente para a massa não celular deste tecido (MARIMAN e WANG, 2010). Ao menos parcialmente, esse colágeno é produzido pelos adipócitos (PIERLEONI *et al.*, 1998). Contudo, as células da fração do estroma vascular contendo pré-adipócitos, células endoteliais capilares, monócitos / macrófagos infiltrados e uma população de células-tronco multipotentes também podem contribuir para isso (PIERLEONI *et al.*, 1998). Cada adipócito é cercado por uma espessa matriz extracelular de adipócitos, referida como uma lâmina basal contendo colágeno IV como componente principal (PIERLEONI *et al.*, 1998).

O tecido adiposo marrom é importante para a resposta termogênica e balanço energético nos mamíferos. A atividade termogênica do TAM, ao otimizar a eficiência metabólica, contribui para o controle do peso corporal em várias espécies animais (BROETTO e BRITO, 2012). A oxidação de ácidos graxos e a produção de calor pelas células adiposas marrons se devem à intensa atividade metabólica do elevado número de mitocôndrias, que expressam a proteína desacopladora-1 (UCP-1) também conhecida como termogenina (RICQUIER e BOUILLAUD, 2000). A UCP-1 permite a dissipação do gradiente eletroquímico de prótons gerado pela cadeia respiratória mitocondrial (LANGIN, 2010). O desacoplamento entre o consumo de oxigênio e a síntese de ATP, promove dissipação de energia na forma de calor (LANGIN, 2010).

A termogênese induzida por dieta no TAM influencia o comportamento alimentar e o equilíbrio energético. Cinti (2006) observou que ratos transgênicos carentes de TAM desenvolveram obesidade. O principal sinal para ativação de adipócitos marrons é a redução da temperatura corporal abaixo da termoneutra (23ºC) (BROETTO e BRITO, 2012). Os sinais térmicos são analisados por áreas específicas do sistema nervoso central, que promovem estimulação da inervação simpática do TAM (CINTI, 2006; BROETTO e BRITO, 2012). Noradrenalina, liberada pelos terminais simpáticos, junto aos adipócitos marrons, ativa os receptores adrenérgicos do subtipo β3 que induz a maquinaria da célula para produzir calor - termogênese induzida pelo frio (CINTI, 2006; BROETTO e BRITO, 2012).

Acredita-se que a ativação de receptores β3 adrenérgico, transforme adipócitos brancos em adipócitos marrons e que esta conversão poderia contribuir para o tratamento da obesidade e diabetes em ratos (CINTI, 2006). A excitação

crônica por exposição ao frio causa aumento na expressão de UCP-1 seguida por hiperplasia do TAM e recrutamento de adipócitos marrons no TAB, em ratos adultos (JACOBSSON *et al.*, 1985; GUERRA *et al.*, 1998; BROETTO e BRITO, 2012), modificando a suscetibilidade para ganho de peso (ALMIND *et al.*, 2007).

A quantidade de TAM foi inversamente correlacionada com o índice de massa corporal (IMC) em pessoas idosas (CYPESS *et al.*, 2009). O TAM metabolicamente ativo parece ser particularmente reduzido em pacientes com obesidade ou diabetes (BARTELT e HEEREN, 2014). Estes achados sugerem um papel significativo do TAM no metabolismo e abrange novas oportunidades para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas para o tratamento da obesidade (POLYAK *et al.*, 2016).

Aglomerados de adipócitos que expressam a UCP-1 com capacidade termogênica também se desenvolvem no TAB em resposta a vários estímulos (HARMS e SEALE, 2013). Esses adipócitos têm sido classificados como bege, “brite” (marrom no branco), iTAM (TAM induzido), TAM recrutável e bTAM (TAM branco). Semelhante aos adipócitos do TAM, células beges no TAB de camundongos são definidas por sua morfologia de gotículas lipídicas multiloculares, alto teor mitocondrial e a expressão de um conjunto central de genes específicos de gordura marrom (ex.: UCP-1, CIDE-A (ativador de morte celular) e PGC1 (coativador transcricional que regula genes envolvidos no metabolismo energético)). Apesar de uma habilidade comum de sofrer termogênese, as células marrom e bege têm muitas características distintivas e devem ser consideradas como tipos celulares distintos (HARMS e SEALE, 2013).

Uma diferença importante entre os dois tipos celulares é que os adipócitos marrons expressam altos níveis de UCP-1 e outros genes termogênicos em condições basais (não estimuladas), enquanto os adipócitos beges expressam esses genes apenas em resposta a ativadores como agonistas do receptor β-adrenérgico ou PPARγ (PETROVIC *et al.*, 2010; WU, COHEN e SPIEGELMAN, 2013).

O tecido adiposo branco e marrom compartilham muitas características, inclusive a de ter a mesma origem embrionária (LANGIN, 2010). O perfil da expressão gênica revela uma vasta gama de marcadores em comum relacionados à adipogênese (por exemplo, fatores de transcrição, como o receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas – PPARγ e proteína ligante ao amplificador alfa - C/EBPα), armazenamento de gordura (transporte de ácidos graxos, síntese e

esterificação) e mobilização (lipólise) (LANGIN, 2010). O aparecimento de células adiposas marrons dentro de depósitos de tecido adiposo branco, também sustenta essa ideia (LANGIN, 2010).

Os pré-adipócitos são linhagens celulares derivadas de células-tronco embrionárias multipotentes de origem mesodérmica, eles podem se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteoblastos e miócitos (LANGIN, 2010). Essas células multipotentes tornam-se pré-adipócitos quando perdem a habilidade de diferenciação em outras linhagens mesenquimais, tornando-se “comprometidas” com a linhagem adipocitária (AILHAUD e HAUNER, 2004). Essa fase inicial, chamada de determinação ou comprometimento, é uma fase pouco caraterizada. Na segunda fase da adipogênese – a diferenciação terminal, os pré-adipócitos adquirem as características de adipócitos maduros, ocorre o acúmulo das gotas lipídicas e a habilidade de resposta à hormônios, a exemplo da insulina. Essa fase consiste na ativação de eventos transcricionais em cascata (AILHAUD e HAUNER, 2004).

A diferenciação do pré-adipócito em adipócito é um processo controlado e inclui fatores de transcrição adipogênicos, tais como a proteína 1c ligadora do elemento regulado por esteróis (SREBP-1c), as proteínas ligantes ao amplificador CCAAT (CCAAT/*enhancer binding protein* – C/EBPs) além do PPARγ, que desempenham um papel-chave na cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006). Sinais hormonais e nutricionais podem afetar a diferenciação do adipócito (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006).

A maioria dos adipócitos marrons é originária de células precursoras na mesoderme embrionária, que também dão origem a células musculares esqueléticas e uma subpopulação de adipócitos brancos (SEALE *et al.*, 2008; LEPPER e FAN, 2010; SANCHEZ-GURMACHES *et al.*, 2012). Esses precursores expressam transitoriamente Myf5 e Pax7, dois genes que anteriormente eram pensados como marcadores seletivos das células miogênicas esqueléticas na mesoderme (SEALE *et al.*, 2008; LEPPER e FAN, 2010). Em consonância com uma relação de desenvolvimento entre adipócitos marrons e músculo, as células percursoras da gordura marrom expressam uma sinalização gênica semelhante ao músculo (TIMMONS *et al.*, 2007), e adipócitos marrons e célula muscular possuem proteomas mitocondriais relacionados (FORNER *et al.*, 2009). No entanto, não foi esclarecido, se as células que expressam Myf5 são multipotentes ou se existem

pools isolados de precursores que expressam Myf5 e contribuem para origem do músculo e/ou adipócitos marrons e brancos (HARMS e SEALE, 2013).

A origem embrionária e hierarquia celular de adipócitos bege é pouco clara. Adipócitos beges e marrons provavelmente vêm de linhagens celulares distintas, uma vez que células beges, ao menos no depósito subcutâneo, não têm histórico de expressão de Myf5 (MA *et al.*, 1988; SANCHEZ-GURMACHES *et al.*, 2012). No TAM formado, uma questão importante é se os adipócitos beges surgem de adipócitos brancos por transdiferenciação, ou surgem através da diferenciação de novo e maturação de precursores (HARMS e SEALE, 2013).

Os achados de Himms-Hagen e colaboradores (2000) sugerem que a maioria dos adipócitos bege surgem de células pré-existentes, cujas quais eles presumiram ser adipócitos maduros. Cinti (2006) fornece evidências em apoio à ideia que grandes adipócitos brancos uniloculares se transformam em adipócitos bege em resposta ao frio e agonistas β3-adrenérgicos.

2.3. Manipulações dietéticas e repercussões metabólicas

A oferta de dieta hiperlipídica, em modelos animais, durante períodos de gestação e lactação, constitui um método comum para a promoção de anormalidades metabólicas na prole (SIEMELINK *et al.*, 2002; KOROTKOVA *et al.*, 2005). Em adição, a composição dos ácidos graxos da dieta é determinante para a plasticidade fetal, em especial o excesso de gorduras saturadas (SIEMELINK *et al.*, 2002; KOROTKOVA *et al.*, 2005). No entanto, o período de exposição dietética, o percentual energético proveniente dos lipídios e a composição das dietas experimentais são variáveis entre os estudos, o que pode gerar fenótipos diferenciados nas proles (SULLIVAN, SMITH e GROVE, 2011).

No estudo de Ravagnani e colaboradores (2012) foi avaliado os efeitos de dietas hipercalóricas/hiperlipídicas com extrato de baru e chocolate, associadas ao exercício físico, sobre a área de adipócitos e TAG hepáticos de ratos. As dietas hipercalóricas aumentaram o peso e área de células do tecido adiposo retroperitoneal, bem como visceral (omental) quando comparado à dieta controle (RAVAGNANI *et al.*, 2012).

Mecanismos distintos relacionados a adversidades na nutrição materna podem atuar no prejuízo metabólico e funcional da prole na idade adulta. A

regulação do transporte de nutrientes placentários específicos constitui um mecanismo importante para a compreensão entre a ingestão materna de dieta hiperlipídica e o supercrescimento (JONES *et al.*, 2009) e a homeostase glicêmica do feto (DUNN e BALE, 2009). Evidências indicam que os fatores maternos circulantes como hormônios (leptina, insulina), nutrientes (ácidos graxos, TAG e glicose) e citocinas inflamatórias ocupam papel importante na gênese de doenças crônicas na prole (SULLIVAN, SMITH e GROVE, 2011).

A ingestão de dietas hiperlípidicas esta diretamente relacionada com o desenvolvimento da obesidade (VELLOSO, 2009). Milanski e colaboradores (2009) demonstraram que os ácidos graxos saturados de cadeia longa, encontrados principalmente em carnes vermelhas, são os lipídeos considerados maiores potencializadores da adipogênese. Nesse estudo, os pesquisadores verificaram que essas moléculas ligam-se aos receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) das microglias, células protetoras do hipotálamo, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-a, IL-1β e IL-6) e, consequentemente, a destruição dos neurônios responsáveis pelo controle do apetite e da termogênese (MILANSKI *et al.*, 2009).

Em estudo experimental com obesidade materna induzida por dieta rica em lipídeos e açúcares, Alfaradhi e colaboradores (2016) evidenciaram que filhotes de camundongos que receberam dieta obesogênica no período perinatal, apresentaram elevada produção de TNF-α e quimiocinas (CCl2 e CCl7) no tecido adiposo. Além disso, tiveram redução na expressão de miR-706, que atua na regulação da tradução de proteínas inflamatórias. Evidenciando que a exposição a um ambiente obesogênico durante o desenvolvimento, promove um ambiente inflamatório no tecido adiposo, que é independente da adiposidade da prole (ALFARADHI *et al.*, 2016).

Os achados do estudo de Yu e colaboradores (2017) revelam que camundongos alimentados com dieta hiperlipídica, com 60% das calorias totais derivadas dos lipídeos, exibiram resistência sistêmica a insulina, após 16 semanas de consumo. Tal efeito foi atenuado pela suplementação com do óleo de linhaça, que promoveu bloqueio da ativação metabólica de macrófagos no tecido adiposo (YU *et al.*, 2017).

O excesso de lipídeos na alimentação materna durante a gestação e lactação promove nos filhotes maior peso corporal ao desmame (CADENA-BURBANO *et al.*, 2017), redução dos marcadores de oxidação lipídica (*Cpt1a* e *Acadvl*) e aumento

dos marcadores de síntese de triacilgliceróis (*Agpat* e *Gpam*). O menor índice hepático de miR-122 e maior de miR-370, na prole, foi inversamente correlacionado com os níveis séricos triacilgliceróis e de ácidos graxos não esterificados (DE PAULA SIMINO *et al.*, 2017).

O consumo materno de dieta hiperlipídica desempenha um papel crítico nas vias de programação hipotalâmicas que regulam a alimentação (SULLIVAN *et al.*, 2010). A superalimentação pós-natal precoce eleva os peptídeos orexigênicos neuropeptídio Y (NPY) e peptídeos relacionado ao Agout (AgRP) no núcleo arqueado do hipotálamo de ratos jovens (GROVE *et al.*, 2005). Além disso, há uma reduzida sensibilidade aos efeitos anorexigênicos da leptina (WALKER *et al.*, 2008). Nesse sentido, o excesso de energia ingerida no período neonatal leva a alterações na expressão do NPY e AgRP no hipotálamo, em associação com a hiperfagia e aumento da adiposidade (PLAGEMANN, 2005).

A exposição neonatal a dietas hiperlipídicas (ricas em ácidos graxos saturados), bem como alterações no tipo de dieta pós-natal, alteram o controle glicêmico da prole na idade adulta. Quando administrada exclusivamente durante a gestação, a dieta hiperlipídica produziu efeitos desfavoráveis na morfologia pancreática, assim como maiores depósitos de tecido adiposo epididimal em roedores descendentes adultos (GREGORIO *et al.*, 2013).

Diante do exposto a cerca da influência que estímulos externos, durante os períodos críticos do desenvolvimento, podem induzir na estrutura e função dos sistemas fisiológicos, torna-se relevante o estudo dos efeitos da exposição perinatal a dietas hiperlipídicas sobre a plasticidade, distribuição e morfometria do tecido adiposo na prole.

3. HIPÓTESE

O consumo de dieta hiperlipídica, isocalórica ou hipercalórica, por ratas, no período gestacional e lactacional, promove aumento na deposição de gordura corporal, com aumento no número e tamanho dos adipócitos brancos na prole a curto e longo prazo.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as repercussões do consumo de dieta hiperlipídica materna, de característica hipercalórica ou isocalórica, durante o período perinatal, na estrutura adipocitária da prole de ratos a curto e longo prazo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar na ratas:

- ✓ Consumo alimentar;
- ✓ Evolução ponderal;
- ✓ Adiposidade corporal ao desmame;

Avaliar nos filhotes:

- ✓ Consumo alimentar;
- ✓ Evolução ponderal;
- ✓ IMC e Índice de Lee;
- ✓ Adiposidade corporal e percentual de tecido adiposo marrom;
- ✓ Morfometria dos adipócitos brancos viscerais e subcutâneos.

5. METODOLOGIA

5.1. Questões éticas

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com o número de processo 0051/2016 (ANEXO A). A manipulação animal seguiu as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

5.2. Animais

Foram utilizadas 28 ratas albinas da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Alguns critérios foram adotados para a escolha das ratas: 1º) ausência de parentesco; 2º) possuírem idade entre 90 e 120 dias de vida; 3º) peso corporal entre 220g e 250g e 4º) serem nulíparas (BENTO-SANTOS *et al.*, 2012). Tais critérios foram adotados a fim de minimizar possíveis influências genéticas e fisiológicas nos resultados.

Durante o período experimental, os animais foram mantidos em biotério de experimentação, com temperatura de 23°C±2°C, sob ciclo claro-escuro 12/12h, com ciclo claro (20:00 às 08:00 h) e ciclo escuro (08:00 às 20:00 h) e livre acesso à água filtrada e alimentação. Passado o período de adaptação, os roedores foram alocados em gaiolas-padrão para ratos, feitas de polipropileno (33x40x17cm). O mapeamento do ciclo estral se deu através do esfregaço vaginal, ao ser observado o período estro do ciclo, as fêmeas foram submetidas ao acasalamento, em uma proporção de 2 fêmeas/1 macho. Após visualização da presença de espermatozoide na cavidade vaginal (MARCONDES, BIANCHI e TANNO, 2002), as ratas foram separadas dos machos e alojadas individualmente em gaiolas-maternidades, com livre acesso a água filtrada e a uma das dietas experimentais.

Um dia após o nascimento, foram realizados a sexagem, aferição do peso corporal e padronização da ninhada. A ninhada foi ajustada para oito filhotes por rata, com o máximo de filhotes machos e as fêmeas utilizadas como complemento da ninhada. Os filhotes escolhidos tiveram peso entre 5,0g e 8,0g, e os supra numéricos foram sacrificados por decapitação. Foram considerados 1 – 2 filhotes de cada prole para a composição dos grupos, afim de evitar influências genéticas.

Os filhotes foram amamentados durante os primeiros 21 dias pós-natais (período de aleitamento). Nesse período os animais também foram expostos às dietas experimentais de suas respectivas mães. No 21° dia de vida os filhotes foram desmamados, e alocados em gaiolas conjuntas. Ao desmame todos os filhotes foram alimentados com a mesma dieta padrão para roedores (Presence®, Brasil) até atingirem idade igual a 70 dias e serem sacrificados.

5.3. Manipulação Nutricional

Para manipulação dietética, foram utilizadas a dieta controle proposta por (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993) e dois tipos de dietas experimentais hiperlipídicas, com mesmo teor lipídico e diferente valor energético (CADENA-BURBANO *et al.*, 2017). As dietas foram confeccionadas no Laboratório de Nutrição Experimental e Dietética (LNED) da UFPE. A composição centesimal e de macronutrientes das dietas utilizadas segue nas tabelas 1 e 2. A composição da dieta padrão de biotério (Presence®, Brasil) utilizada pelos filhotes ao desmame segue na tabela 3.

Tabela 1. Composição centesimal das dietas experimentais.

Ingredientes	Controle AIN-93G (g/100g)	Hiperlipídica Isocalórica (g/100g)	Hiperlipídica Hipercalórica (g/100g)
Caseína (>85% proteína)	20,00	20,00	25,2
Amido de milho (87% carboidrato)	39,75	19,3	24,50
Amido dextrinizado (92% carboidrato)	13,20	6,4	8,0
Sacarose	10,00	4,85	6,17
Óleo de soja	7,00	7,00	7,00
Banha animal (100% lipídeo)	-	13,40	19,00
Celulose	5,00	24,00	5,00
Mix mineral (AIN-93G)	3,50	3,50	3,50
Mix vitamínico	1,00	1,00	1,00
L-Metionina	0,30	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25	0,25
TBHQ	0,0014	0,0014	0,0014
TOTAL (g)	100	100	100
Valor Energético Kcal/g	3,6	3,64	4,62

Fonte: Adaptado de (REEVES, NIELSEN e FAHEY, 1993; CADENA-BURBANO *et al.*, 2017). Os cálculos da composição centesimal foram baseados nas informações nutricionais enviadas pela empresa fornecedora dos produtos.

Tabela 2. Composição percentual de macronutrientes das dietas segundo o Valor Energético Total (VET).

VET por Macronutrientes	Controle AIN-93G	Hiperlipídica Isocalórica	Hiperlipídica Hipercalórica
Proteína	19	18,6	18,7
Carboidrato	63	30,2	30,3
Lipídeo	18	51,2	51

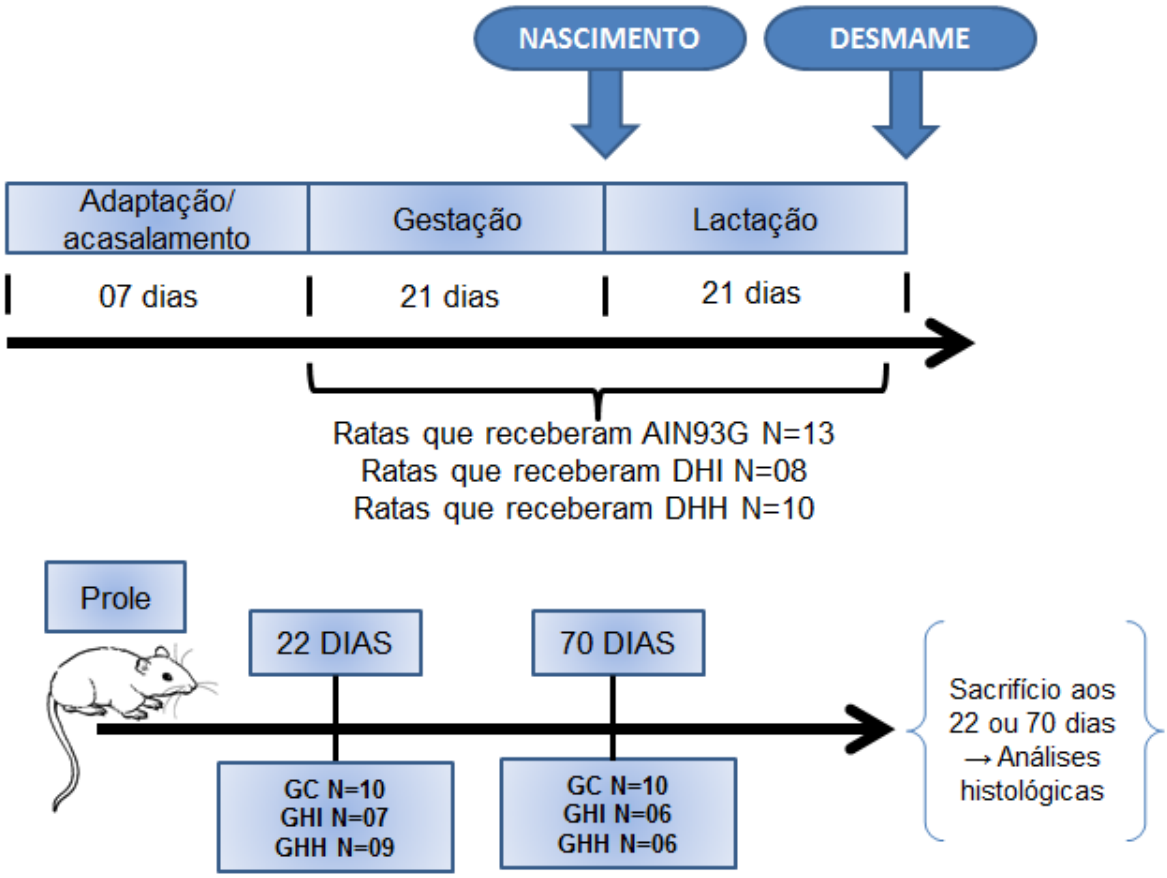
Tabela 3. Composição de macronutrientes da dieta pós desmame.

Macronutrientes	Dieta padrão de laboratório		
	g	Kcal	Kcal%
Proteína	23	92	26
Carboidrato	58	232	64
Lipídeo	4	36	10
Total		360	100
Kcal/g		3,6	

5.4. Desenho Experimental

Os animais foram divididos em três grupos experimentais, de acordo com o tipo de dieta que a mãe recebeu no período perinatal: Grupo Controle - GC (N=19), Grupo Hiperlipídico/Isocalórico - GHI (N=13) e Grupo Hiperlipídico/Hipercalórico - GHH (N=15). As dietas foram sempre ofertadas *ad libitum*. O desenho experimental segue na Figura 1.

Figura 1. Desenho Experimental



5.5. Avaliação das Mães

5.5.1. Peso corporal

A aferição do peso corporal materno foi realizada no primeiro dia da confirmação da gestação, bem como no último dia do período gestacional. Da mesma forma, foi aferido o peso no primeiro e último dia da lactação, objetivando reduzir os estresses da manipulação nas ratas. O peso foi aferido utilizando balança eletrônica (Shimadzu, modelo BL3200H com sensibilidade de 0,01 g). Os dados obtidos serviram para calcular a porcentagem de ganho de peso corporal (GPC) através da seguinte fórmula:

%GPC = [peso corporal final (g) X 100/peso do 1º dia de gestação (g)] – 100

(BAYOL *et al.*, 2004)

5.5.2 Consumo alimentar

O consumo alimentar das ratas foi realizado semanalmente durante a gestação e lactação. O consumo foi determinado pela diferença entre a quantidade de dieta ofertada durante o inicio do ciclo escuro (08:00 h) e a quantidade de dieta não consumida 24 h após a oferta, no dia em que o consumo foi mensurado (LOPES DE SOUZA et al., 2008). Com base na ingestão alimentar em gramas, foi determinado o valor energético do consumo.

5.6. Avaliação dos Filhotes

O peso corporal foi avaliado nos filhotes a cada dois dias do 1° ao 21° dia pós-natal. Após o desmame, o peso corporal dos filhotes também foi avaliado semanalmente até os 70 dias de vida. Foi utilizada uma balança eletrônica digital (Shimadzu, modelo BL3200H com sensibilidade de 0,01 g). Todas as avaliações foram feitas sempre pelo mesmo avaliador no horário de 08:00 às 10:00 horas.

As medidas do eixo longitudinal também foram realizadas a cada dois dias do 1° ao 21° dia pós-natal, através uma rápida imobilização do animal. Com uma caneta, os pontos entre o focinho e a base da cauda foram marcados e a distância entre estes, efetuada com o auxílio de um paquímetro. Da mesma forma, todas as avaliações foram feitas sempre pelo mesmo avaliador no horário de 08:00 às 10:00 horas.

A porcentagem de ganho de peso foi determinada a partir da relação entre o peso corporal inicial e final (peso corporal final (g) x 100/peso corporal inicial (g)) – 100) (BAYOL *et al.*, 2004). Para verificação da porcentagem de ganho de peso, foram consideradas as idades do 1º ao 21º e 22º ao 70º dias de vida.

O índice de Lee foi calculado através do comprimento naso-anal e o peso corporal, onde Índice de Lee = (raiz cúbica ($3\surd$) do peso corporal (g) / comprimento naso-anal (cm)). O Índice de Massa Corporal foi calculado pela fórmula: peso corporal(g) / [comprimento naso-anal (cm)]^2.

5.7. Consumo Alimentar dos Filhotes

Ao desmame os filhotes foram mantidos em gaiolas de polipropileno (33x40x17cm), num total de dois filhotes por gaiola. O consumo alimentar dos filhotes foi realizado semanalmente durante o período pós desmame (22º - 70º dia). O consumo foi determinado pela diferença entre a quantidade de dieta ofertada durante o início do ciclo escuro (08:00 h) e a quantidade de dieta não consumida 24 h após a oferta, no dia em que o consumo foi mensurado (LOPES DE SOUZA et al., 2008). O valor total encontrado foi dividido pela quantidade de filhotes da gaiola.

5.8. Coleta das amostras

Aos 22 ou 70 dias de vida, os animais foram eutanasiados por decapitação, com o auxílio de uma guilhotina (Insight® - modelo EB271). Esse procedimento foi realizado de forma rápida, por manipulador treinado, visando minimizar o sofrimento e estresse nos animais.

Imediatamente após a decapitação, foram dissecados os coxins adiposos para análise histológica. Foram removidos: tecido adiposo inguinal, compreendido como o depósito de gordura localizado na região interna da coxa; tecido adiposo retroperitoneal, localizado na região intra-abdominal posterior, adjacente ao rim; tecido adiposo mesentérico, sendo este todo o coxim aderido aos intestinos; e tecido adiposo marrom, neste caso também foi removido todo o coxim. Foi padronizado o lado esquerdo do animal para a retirada das amostras. A técnica foi realizada sempre pelo mesmo manipulador. Os valores de peso de cada tecido adiposo removido foram quantificados e registrados, bem como o valor total da gordura intra-abdominal.

5.9. Análises histológicas

Após a coleta ao sacrifício, os tecidos foram mergulhados em uma solução de formol a 10% neutro tamponado (NBF), e armazenados em tubos criogênicos de 5ml, permanecendo por um período de 24h – 48h. Em seguida, transferidos para álcool 70% até a continuidade do experimento. As amostras foram desidratadas em

álcool etílico em concentrações crescentes, diafanizadas pelo xilol, impregnadas e incluídas em parafina. Os blocos foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes semi-seriados com espessura de 4µm.

Os cortes obtidos foram transferidos para um banho-maria, com auxílio de uma pinça, para serem distendidos. A água foi mantida em uma temperatura aproximada de 40ºC. Os cortes obtidos foram colocados em lâminas untadas com albumina, para melhor adesão da peça, desparafinizados, desidratados e montados com lamínulas (24x60mm), após isso foram mantidos em estufa regulada à temperatura de 37ºC, por 24 horas para secagem. Os preparados histológicos foram submetidos à técnica de coloração por Hematoxilina-Eosina (HE) e analisados em microscópio de luz.

5.10. Análise morfométrica

As imagens histológicas das lâminas foram capturadas por meio de câmera digital (Moticam 2300 de 3.0 megapixels) acoplada ao microscópio óptico (Nikon Eclipse E200), sob foco fixo e clareza de campo, obtendo-se 10 a 20 campos por lâmina com aumento final de 100x. O software utilizado para a captura das fotomicrografias foi o Motic Images Plus Versão 2.0.

As fotomicrografias foram avaliadas através do software ImageJ versão 1.43 (Research Services Branch, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), mensurando-se a área e perímetro de cada célula, totalizando-se um total de 5000 células por cada subgrupo experimental. Adicionalmente, os plugins “colour deconvolution”, “cell counter” e “threshold” foram utilizados na contagem celular e na determinação da área percentual por fotomicrografia ocupada por adipócitos.

5.11. Análises Estatísticas

Para a análise dos dados foi utilizado o software GraphPad Prism 6® (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA). Para verificar a normalidade das amostras foi realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov.

As variáveis referentes às mães durante o período perinatal como peso e consumo alimentar, gordura intra-abdominal, peso da ninhada, número de filhotes e

média de peso ao nascimento foram analisadas por ANOVA one-way com pós teste de Tukey. Os dados referentes ao ganho de peso corporal, peso absoluto e relativo dos coxins adiposos branco e marrom, IMC, Índice de Lee e contagem de células por área, nos filhotes, também foram analisados por ANOVA one-way com pós-teste de Tukey.

Nos filhotes, os dados de peso corporal, no período da lactação, peso corporal pós desmame, e consumo alimentar pós desmame, foram analisados por ANOVA two-way medidas repetidas com pós-teste de Tukey. As variáveis morfométricas do tecido adiposo branco foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's.

Variáveis paramétricas são apresentadas como média e erro padrão da média. Variáveis com distribuição não-paramétrica são descritas pela mediana e percentil 25 e 75. O nível de significância adotado foi $p< 0,05$ para todas as análises.

6. RESULTADOS

No período gestacional, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais com relação ao peso corporal inicial e final, e percentual de ganho de peso total das ratas. O consumo alimentar das ratas GHH foi menor que o GHI e GC ($p<0,05$). A ingestão energética referente ao consumo alimentar não foi diferente entre os grupos. Para os dados de parto, o peso e média de peso da ninhada e número total de filhotes ao nascimento não diferiu entre os grupos (Tabela 4).

Durante o período da lactação, não houve diferenças entre as mães nas medidas de peso corporal inicial e final, bem como no percentual de ganho de peso total das mães. O consumo alimentar das ratas GHH foi menor que o do GC ($p<0,01$). Contudo, o valor energético da ingestão alimentar não foi diferente entre os grupos. Ao desmame, os valores de peso absoluto e relativo da gordura intra-abdominal das mães GHH foram maiores que os valores do GC ($p<0,05$) (Tabela 4).

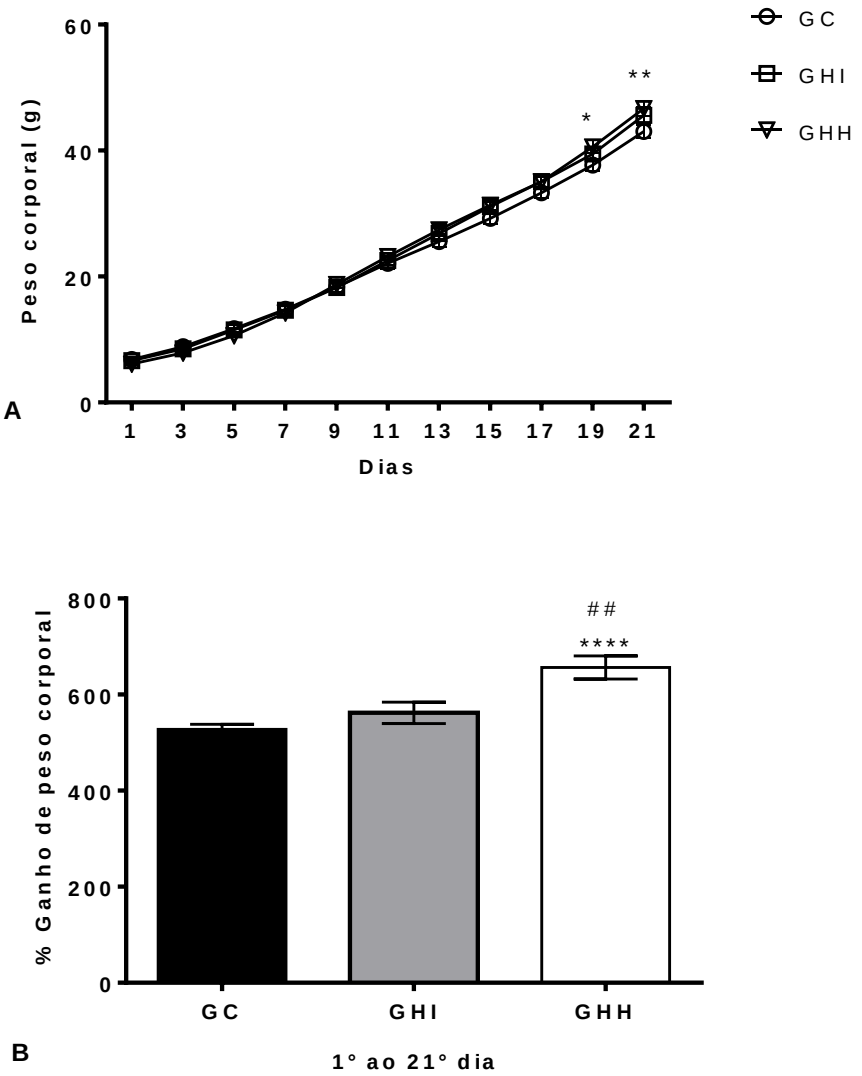
Tabela 4. Parâmetros corporais, de consumo alimentar e parto das ratas.

Variáveis	GC (n = 6 - 13)	GHI (n = 6 - 8)	GHH (n = 4 - 10)
Gestação			
Peso corporal inicial (g)	242,6 ± 5,45	233,5 ± 7,60	244,2 ± 8,72
Peso corporal final (g)	326,9 ± 8,40	329,4 ± 9,17	338,0 ± 11,61
% de ganho de peso total	37,33 ± 2,62	41,31 ± 2,67	38,86 ± 4,53
Consumo alimentar (g)	368,5 ± 13,78	361,7 ± 16,56	302,4 ± 15,32*#
Ingestão energética (Kcal)	1327 ± 49,63	1317 ± 60,27	1397 ± 70,79
Peso da ninhada (g)	64,54 ± 5,67	60,54 ± 4,75	60,12 ± 3,33
Número de filhotes	10,22 ± 0,68	10,71 ± 0,80	10,57 ± 0,61
Média de peso filhotes (g)	6,35 ± 0,25	5,46 ± 0,35	5,71 ± 0,17
Lactação			
Peso corporal inicial (g)	270,3 ± 5,70	261,0 ± 6,41	276,7 ± 6,93
Peso corporal final (g)	269,5 ± 5,94	266,2 ± 10,92	283,6 ± 5,91
% de ganho de peso total	0,7028 ± 1,02	0,9631 ± 2,91	2,149 ± 1,09
Consumo alimentar (g)	760,1 ± 20,54	710,9 ± 45,49	617,8 ± 13,04**
Ingestão energética (Kcal)	2736 ± 73,96	2588 ± 165,6	2854 ± 60,26
Gordura intra-abdominal (g)	9,012 ± 0,85	10,44 ± 1,21	12,76 ± 1,06*
% de gordura intra-abdominal	3,487 ± 0,25	3,641 ± 0,33	4,619 ± 0,25*

Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). Grupos: GC = grupo controle; GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico; GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico. As ratas receberam dieta controle, hiperlipídica/isocalórica e hiperlipídica/hipercalórica durante o período perinatal. Teste ANOVA *one way*, seguido do pós-teste Tukey. $^{*}P<0,05$; $^{**}P<0,01$; vs. GC; $^{\#}P<0,05$ vs. GHI.

Ao analisar os dados de acompanhamento de peso corporal e percentual de ganho de peso, do nascimento ao desmame, observamos que os filhotes de mães GHH apresentaram maior peso corporal nos dias 19 e 21 do período da lactação, em relação aos filhotes de mães GC ($p<0,05$; $p<0,01$ respectivamente) (Figura 2A). Com relação ao percentual de ganho de peso durante a lactação, os filhotes de mães GHH tiveram maior percentual de ganho de peso corporal que os filhotes de mães GHI e GC ($p<0,01$; $p<0,0001$ respectivamente) (Figura 2B).

Figura 2. Evolução do peso corporal dos filhotes durante a lactação.



(A) Peso corporal do 1º ao 21º dia pós-natal. (B) Percentual de ganho de peso durante o período de lactação. Grupos: GC = grupo controle (n=21-22); GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico (n=10-12); GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico (n=15-17). Filhotes de mães que receberam dieta controle, hiperlipídica/isocalórica e hiperlipídica/hipercalórica durante o período perinatal. Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). Teste two way ANOVA, seguido do pós-teste Tukey; *P<0,05; **P<0,01; ****P<0,0001 vs. GC; ##P<0,01 vs.GHI.

Nos animais sacrificados aos 22 dias, o peso absoluto e relativo do coxim adiposo inguinal foi maior nos filhotes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica/hipercalórica que nos filhotes de mães que consumiram dieta hiperlipídica/isocalórica ou dieta controle ($p<0,0001$). Com relação ao coxim adiposo epididimal, os filhotes de mães GHH apresentaram maiores valores de peso absoluto e relativo que os filhotes de mães GC ($p<0,05$; $p<0,01$ respectivamente) (Tabela 5).

Filhotes de mães GHH apresentaram maiores valores de peso absoluto para o coxim adiposo retroperitoneal em relação aos filhotes de mães GC ($p<0,01$). Para os valores de peso relativo deste tecido, filhotes de ratas GHH e GHI demonstraram maior percentual de peso que filhotes GC ($p<0,01$; $p<0,05$ respectivamente) (Tabela 5). O coxim adiposo mesentérico foi maior na prole de ratas GHH, comparado à prole de ratas GC ($p<0,05$). Os valores de peso relativo do tecido adiposo mesentérico não diferiram entre os grupos (Tabela 5).

O tecido adiposo marrom de filhotes de mães GHH foi maior em valores percentuais que os filhotes de mães GC ($p<0,05$), não havendo diferenças nos valores de peso absoluto entre os grupos. O peso absoluto da gordura intra-abdominal de filhotes de ratas GHH foi maior que o GC ($p<0,01$). Em relação ao peso relativo, filhotes GHH tiveram maiores percentuais de gordura intra-abdominal que filhotes GC e GHI ($p<0,001$; $p<0,01$ respectivamente). Não foram verificadas diferenças no IMC e Índice de Lee entre os grupos (Tabela 5).

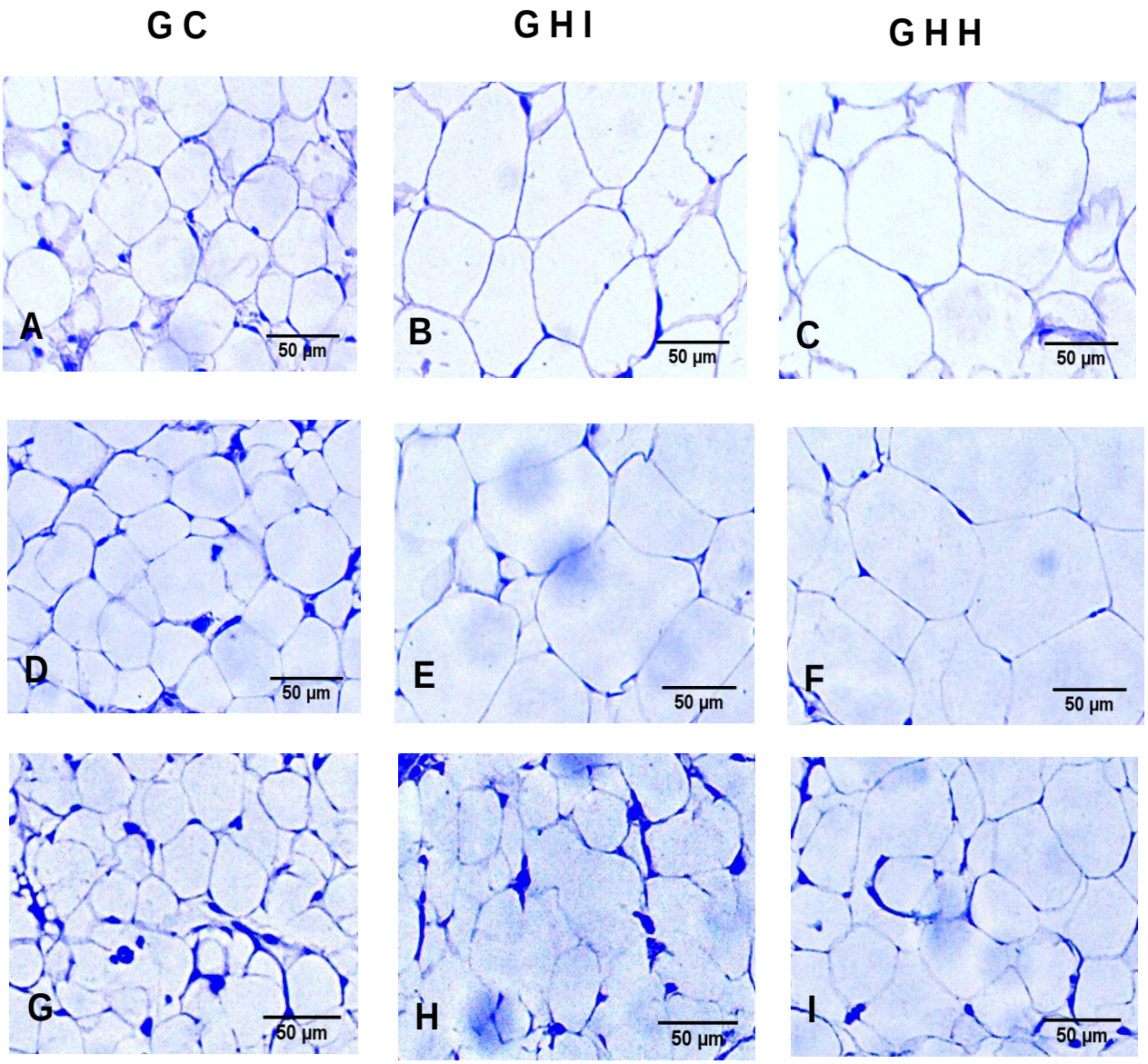
Tabela 5. Quantificação do tecido adiposo e indicadores corporais dos filhotes aos 22 dias de vida.

Variáveis	GC (n = 5 - 10)	GHI (n = 4 - 7)	GHH (n = 6 - 9)
TA inguinal (g)	0,150 ± 0,022	0,185 ± 0,030	0,351± 0,043***##
TA inguinal (%)	0,335 ± 0,044	0,414 ± 0,070	0,768± 0,061****##
TA epididimal (g)	0,040 ± 0,004	0,057 ± 0,011	0,067 ± 0,006*
TA epididimal (%)	0,091 ± 0,006	0,108 ± 0,014	0,150 ± 0,016**
TA retroperitoneal (g)	0,036 ± 0,004	0,058 ± 0,005	0,067 ± 0,009**
TA retroperitoneal (%)	0,090 ± 0,009	0,136 ± 0,011*	0,145 ± 0,014**
TA mesentérico (g)	0,134 ± 0,018	0,154 ± 0,015	0,209 ± 0,016*
TA mesentérico (%)	0,338 ± 0,040	0,345 ± 0,029	0,448 ± 0,046
TA intra-abdominal total (g)	0,485 ± 0,043	0,566 ± 0,033	0,733 ± 0,036**
TA intra-abdominal total %	1,025 ± 0,088	1,150 ± 0,105	1,649± 0,062***##
TA marrom (g)	0,138 ± 0,008	0,139 ± 0,011	0,149± 0,011
TA marrom (%)	0,274 ± 0,012	0,305 ± 0,019	0,349 ± 0,017*
IMC (g/cm^2)	0,031 ± 0,001	0,029 ± 0,001	0,033 ± 0,001
Índice de Lee (g/cm)	0,296 ± 0,005	0,291 ± 0,004	0,308 ± 0,005

Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). Grupos: GC = grupo controle; GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico; GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico. Filhotes de mães que receberam dieta controle, hiperlipídica/isocalórica e hiperlipídica/hipercalórica durante o período perinatal. IMC = índice de massa corporal. TA = Tecido Adiposo. Teste ANOVA one way, seguido do pós-teste Tukey. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001; vs. GC; #P<0,05; ##P<0,01 vs.GHI.

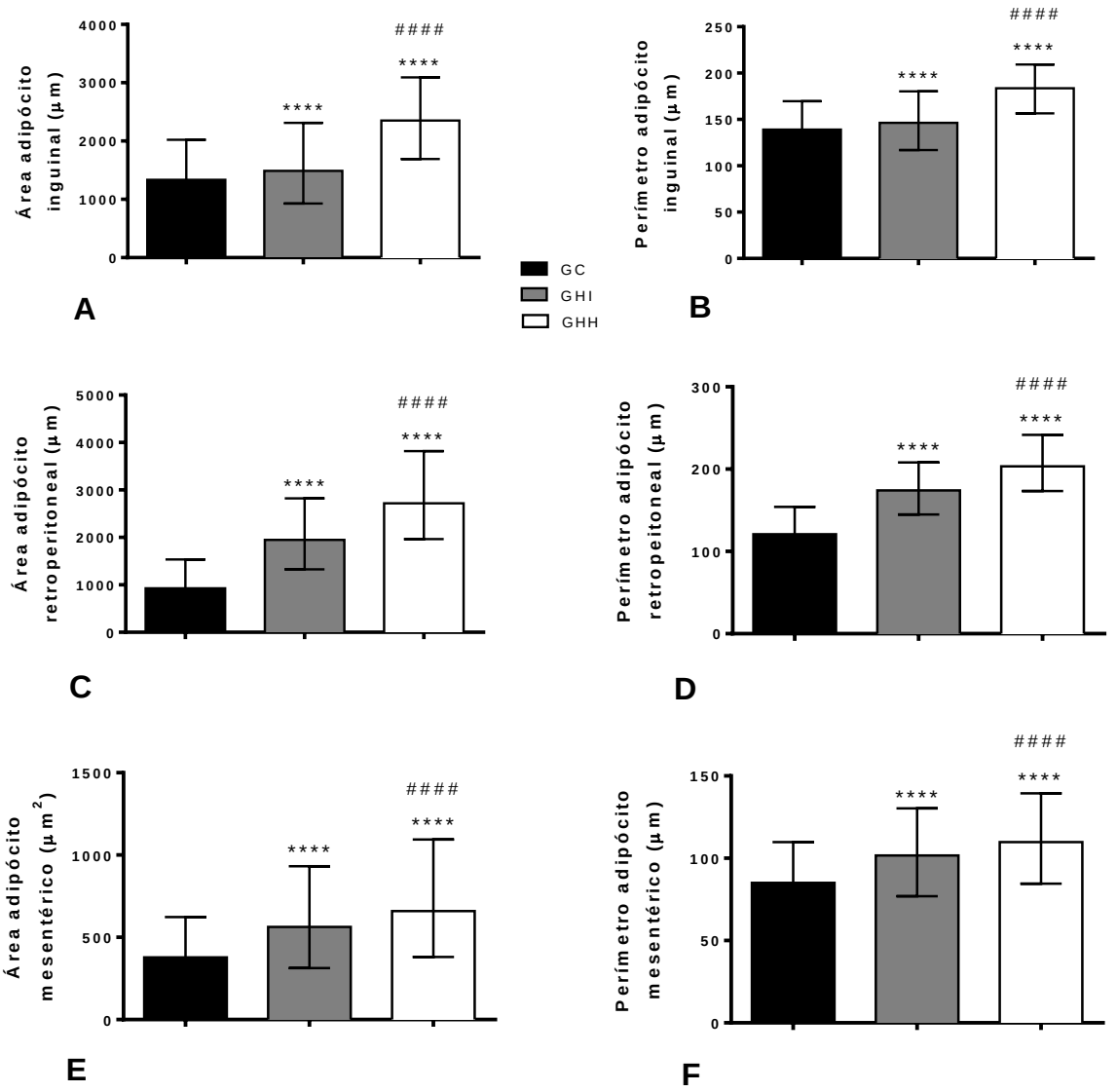
Na Figura 3, seguem as fotomicrografias do tecido adiposo inguinal, retroperitoneal e mesentérico de filhotes de mães GC, GHI e GHH, respectivamente, sacrificados aos 22 dias. A análise morfométrica dos coxins adiposos, após processamento histológico, demonstrou que a prole de mães GHH apresentou maiores valores de área e perímetro para os tecidos adiposos inguinal, mesentérico e retroperitoneal comparado aos filhotes GHI e GC (p<0,0001). Filhotes GHI apresentaram maiores valores de área e perímetro para os mesmos tecidos, comparados ao GC (p<0,0001) (Figura 4).

Figura 3. Fotomicrografias do tecido adiposo branco da prole de ratos aos 22 dias de vida.



Coxim adiposo inguinal de filhotes de mães GC, GHI, GHH (fotos A, B e C, respectivamente). Coxim adiposo retroperitoneal de mães GC, GHI, GHH (fotos D, E e F, respectivamente). Coxim adiposo mesentérico de mães GC, GHI, GHH (fotos G, H e I, respectivamente). Grupos: GC = grupo controle; GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico; GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento 100x. Fonte: Arquivo pessoal (novembro/2017).

Figura 4. Morfometria do tecido adiposo branco em filhotes com 22 dias de vida.



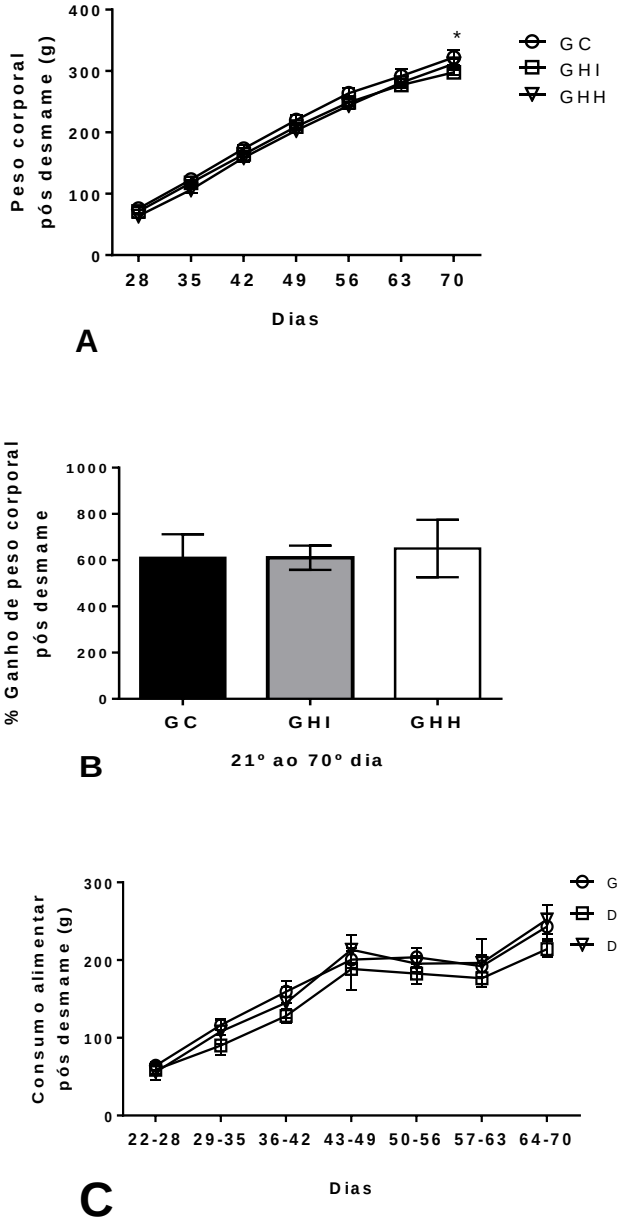
(A) Área do adipócito inguinal. (B) Perímetro do adipócito inguinal. (C) Área do adipócito retroperitoneal. (D) Perímetro do adipócito retroperitoneal. (E) Área do adipócito mesentérico. (F) Perímetro do adipócito mesentérico. Grupos: GC = grupo controle (n=10); GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico (n=7); GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico (n=9). Filhotes de mães que receberam dieta controle, hiperlipídica/isocalórica e hiperlipídica/hipercalórica durante o período perinatal. Os resultados são apresentados como mediana e percentil 25 e 75. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's; ****P<0,0001 vs. GC; ####P<0,0001 vs.GHI.

O acompanhamento ponderal dos filhotes no pós-desmame demonstrou que filhotes de mães GHI apresentaram menor peso corporal comparado aos filhotes de mães GC aos 70 dias de idade ($p<0,05$) (Figura 5A).

O percentual de ganho de peso no período dos 21 aos 70 dias de vida, não foi diferente entre os grupos (Figura 5B). Da mesma forma, não houve diferenças

quanto ao consumo alimentar no período pós desmame dos filhotes de mães hiperlípidicas e controle (Figura 5C).

Figura 5. Evolução do peso corporal e consumo alimentar dos filhotes no pós desmame.



(A) Acompanhamento semanal do peso corporal do desmame até 70 dias de vida. (B) Percentual de ganho de peso pós desmame. (C) Ingestão alimentar pós desmame. Grupos: GC = grupo controle (n=7-10); GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico (n=4-8); GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico (n=4-7). Filhotes de mães que receberam dieta controle, hiperlipídica/isocalórica e hiperlipídica/hipercalórica durante o período perinatal. Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). Teste two way (a, c) e one way ANOVA (b), seguido do pós-teste Tukey; *P<0,05 vs. GC.

Com relação aos filhotes sacrificados aos 70 dias de vida, não foram observadas diferenças nos valores de peso absoluto e relativo dos coxins adiposos epididimal, mesentérico, retroperitoneal e marrom, entre os grupos. Da mesma forma, não houve diferenças no peso absoluto do tecido adiposo inguinal. No entanto, o valor percentual desse tecido esteve aumentado nos filhotes de mães que consumiram dieta hiperlipídica/hipercalórica em relação aos filhotes de mães controle ($p<0,05$) (Tabela 6). Não houve diferenças entre os grupos, aos 70 dias de vida, na gordura intra-abdominal total, IMC e Índice de Lee (Tabela 6).

Tabela 6. Quantificação do tecido adiposo e indicadores corporais dos filhotes aos 70 dias de vida.

Variáveis	GC (n = 8 - 10)	GHI (n = 4 - 6)	GHH (n = 4 - 6)
TA inguinal (g)	0,875 ± 0,088	1,008 ± 0,197	0,920 ± 0,085
TA inguinal (%)	0,244 ± 0,025	0,272 ± 0,049	0,363 ± 0,025*
TA epididimal (g)	2,030 ± 0,142	2,014 ± 0,240	1,663 ± 0,114
TA epididimal (%)	0,615 ± 0,053	0,735 ± 0,073	0,670 ± 0,054
TA retroperitoneal (g)	1,652 ± 0,196	1,087 ± 0,127	1,487 ± 0,139
TA retroperitoneal (%)	0,485 ± 0,049	0,410 ± 0,053	0,552 ± 0,027
TA mesentérico (g)	2,268 ± 0,165	1,698 ± 0,198	2,024 ± 0,191
TA mesentérico (%)	0,719 ± 0,063	0,631 ± 0,066	0,787 ± 0,018
TA intra-abdominal total (g)	11,73 ± 0,976	9,890 ± 1,702	11,41 ± 1,174
TA intra-abdominal total %	3,479 ± 0,290	3,646 ± 0,539	4,087 ± 0,225
TA marrom (g)	0,321 ± 0,018	0,261 ± 0,028	0,277 ± 0,043
TA marrom (%)	0,090 ± 0,005	0,105 ± 0,012	0,109 ± 0,012
IMC (g/cm^2)	0,059 ± 0,001	0,057 ± 0,002	0,054 ± 0,001
Índice de Lee (g/cm)	0,300 ± 0,004	0,296 ± 0,004	0,289 ± 0,001

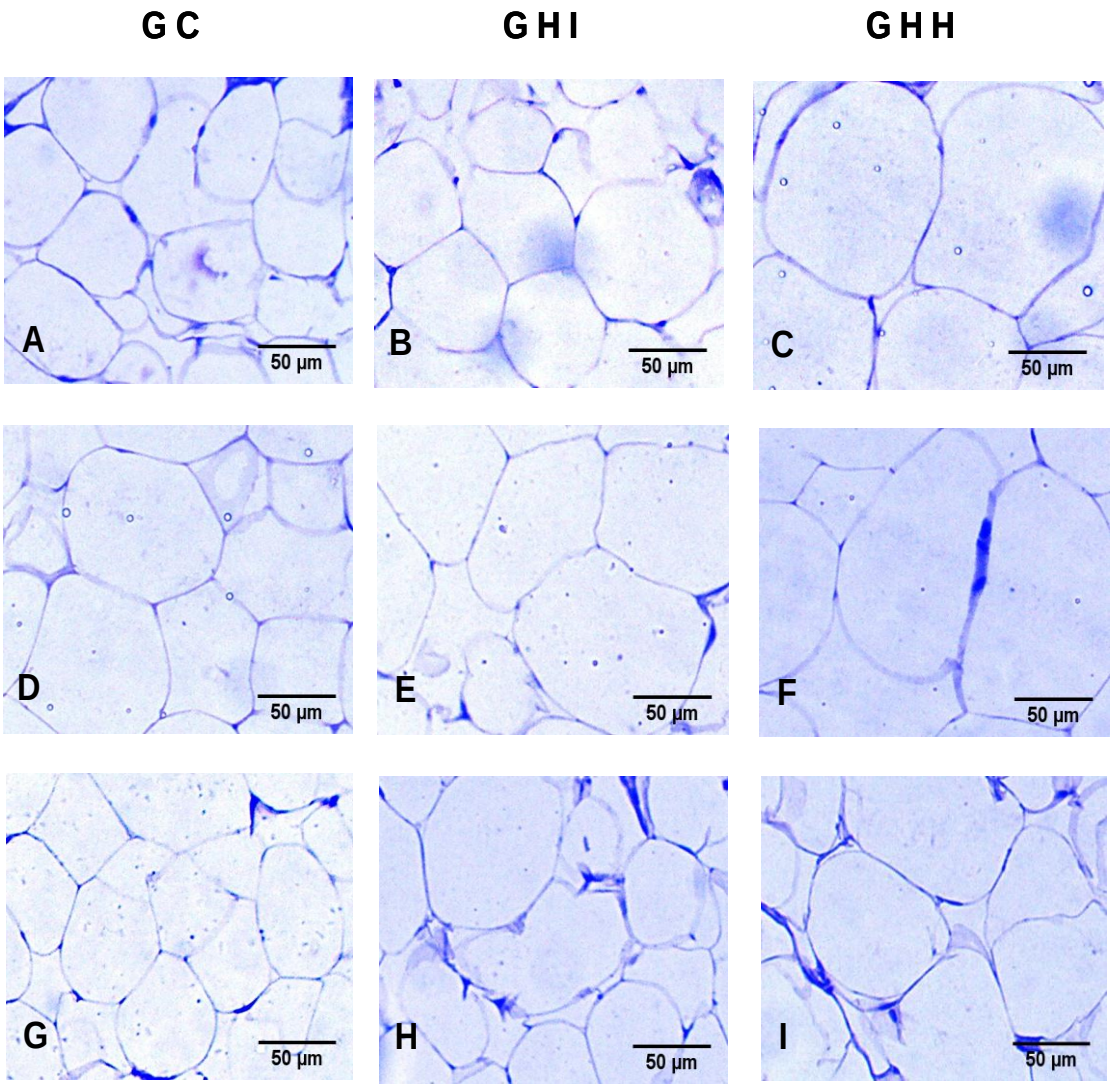
Os resultados são apresentados como médias ± erro padrão da média (EPM). Grupos: GC = grupo controle; GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico; GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico. Filhotes de mães que receberam dieta controle, hiperlipídica/isocalórica e hiperlipídica/hipercalórica durante o período perinatal. IMC = índice de massa corporal. TA = Tecido Adiposo. Teste ANOVA *one way*, seguido do pós-teste Tukey. $^{*}P<0,05$; vs. GC.

Na Figura 6, seguem as fotomicrografias do tecido adiposo inguinal, retroperitoneal e mesentérico de filhotes de mães GC, GHI e GHH, respectivamente. Na morfometria dos filhotes aos 70 dias de vida, a área e perímetro dos adipócitos inguinais da prole de mães GHH foi maior, em relação a prole de mães GHI e GC ($p<0,0001$) (Figura 7).

A área e o perímetro do adipócito retroperitoneal dos filhotes GHH foi maior do que a dos animais GHI e GC (área: $p<0,0001$; perímetro: $p<0,001$), no entanto,

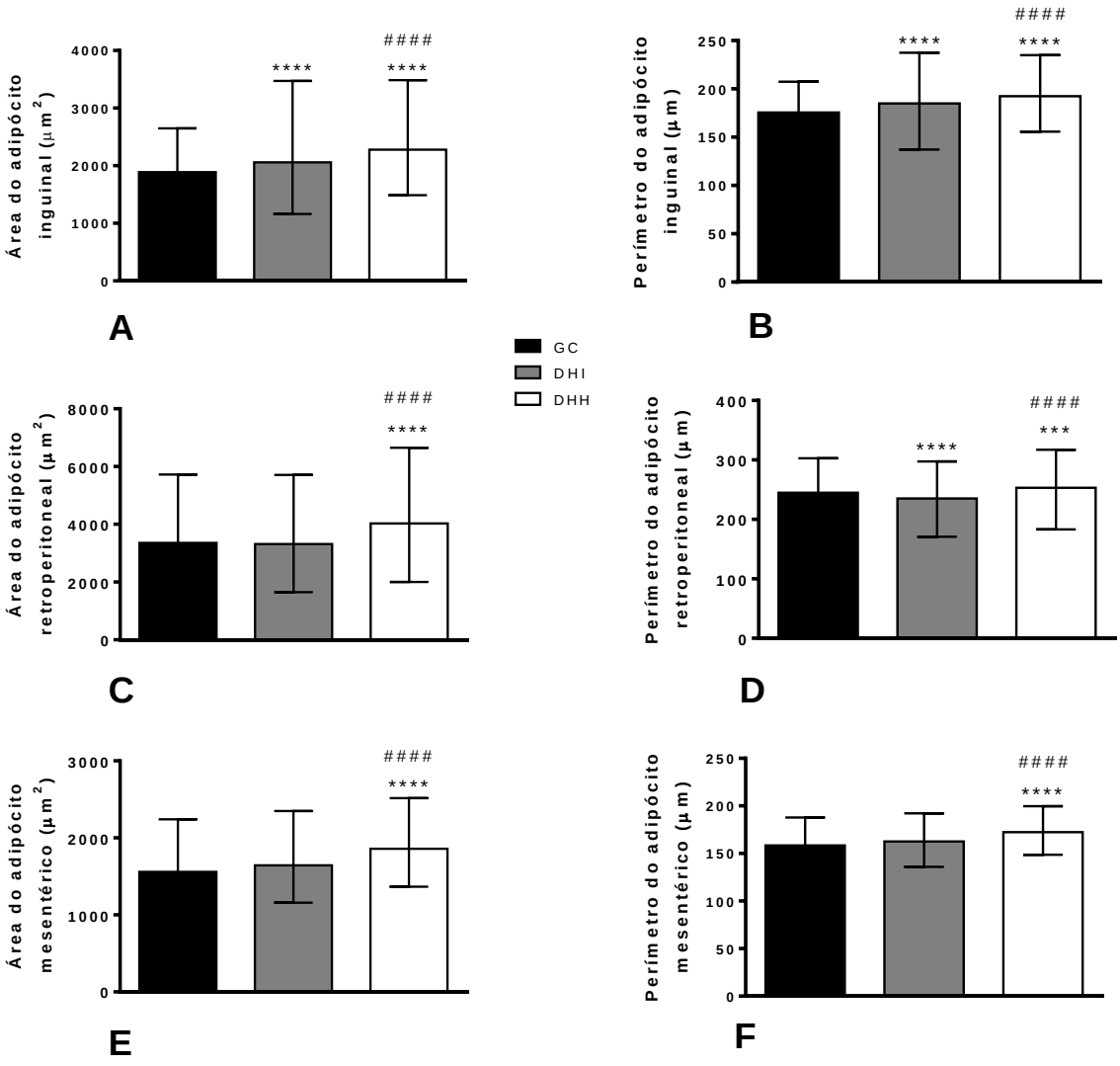
os filhotes de ratas GHI apresentaram menores valores de perímetro em relação aos GC (p<0,0001). Adipócitos mesentéricos foram maiores em área e perímetro na prole de ratas GHH em relação à prole GHI e GC (p<0,0001) (Figura 7).

Figura 6. Fotomicrografias do tecido adiposo branco da prole de ratos aos 70 dias de vida.



Coxim adiposo inguinal de filhotes de mães GC, GHI, GHH (fotos A, B e C, respectivamente). Coxim adiposo retroperitoneal de filhotes de mães GC, GHI, GHH (fotos D, E e F, respectivamente). Coxim adiposo mesentérico de filhotes de mães GC, GHI, GHH (fotos G, H e I, respectivamente). Grupos: GC = grupo controle; GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico; GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico. Coloração: Hematoxilina-Eosina (HE). Aumento 100x. Fonte: Arquivo pessoal (novembro/2017).

Figura 7. Morfometria do tecido adiposo branco em filhotes com 70 dias de vida.

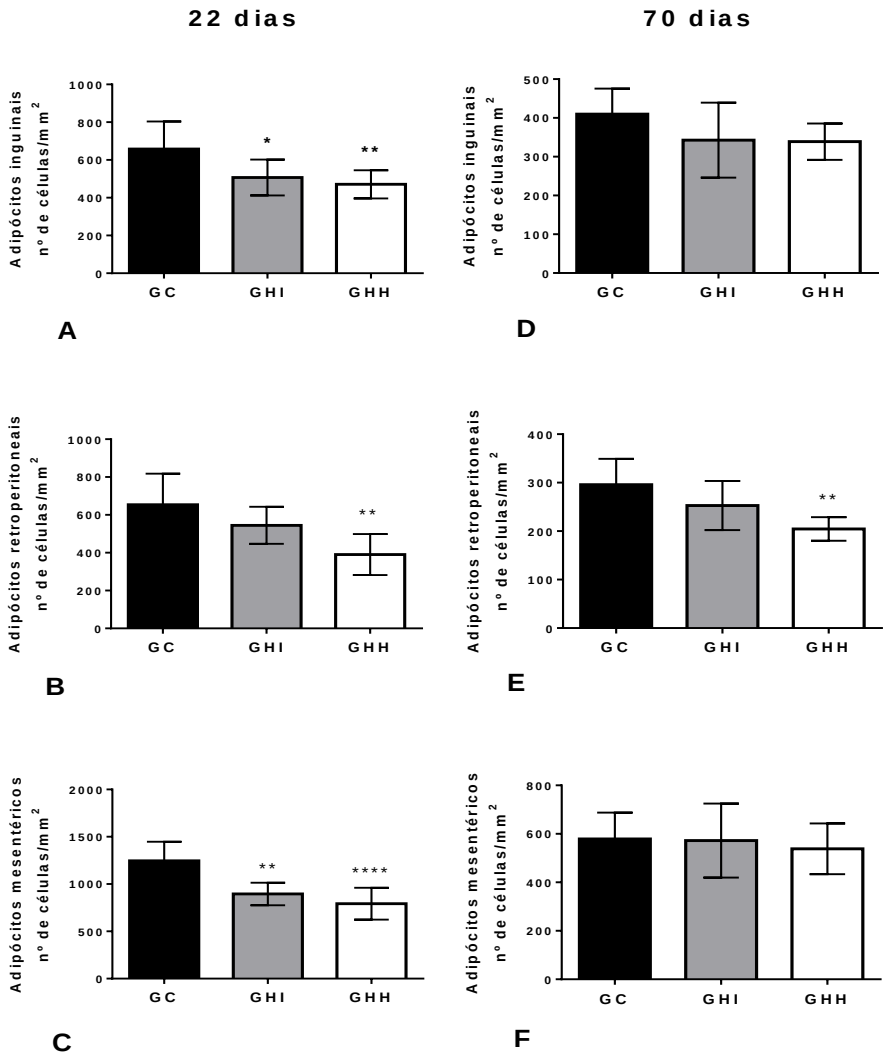


(A - B) Área e perímetro do adipócito inguinal. (C - D) Área e perímetro do adipócito retroperitoneal. (E - F) Área e perímetro do adipócito mesentérico. Grupos: GC = grupo controle (n=9); GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico (n=6); GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico (n=6). Os resultados são apresentados como mediana e percentil 25 e 75. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn's; ***P<0,001; ****P<0,0001 vs. GC; ####P<0,0001 vs.GHI.

Com relação à contagem de células adiposas na prole, filhotes de ratas GHH apresentaram menor número de adipócitos por área do tecido adiposo inguinal, retroperitoneal e mesentérico, respectivamente (p<0,01; p<0,01; p<0,0001), em relação aos filhotes de ratas GC, aos 22 dias. Filhotes GHI também apresentaram menor número de adipócitos por área do tecido adiposo inguinal e mesentérico (p<0,05 e p<0,01) quando comparados à filhotes GC, aos 22 dias (Figura 8). Aos 70 dias de idade, foi evidenciado que filhotes de ratas GHH apresentaram menor

número de adipócitos por área do tecido adiposo retroperitoneal (p<0,01) quando comparados aos filhotes GC. Não sendo observadas diferenças nos tecidos adiposos inguinal e mesentérico entre os grupos (Figura 8).

Figura 8. Contagem de adipócitos no tecido adiposo branco em filhotes com 22 e 70 dias de vida.



(A, B e C) Adipócitos por área no tecido adiposo inguinal, retroperitoneal e mesentérico, respectivamente, aos 22 dias. (C, D e E) Adipócitos por área no tecido adiposo inguinal, retroperitoneal e mesentérico, respectivamente, aos 70 dias. Grupos: GC = grupo controle (n= 8 - 10); GHI = grupo hiperlipídico/isocalórico (n= 5 - 7); GHH = grupo hiperlipídico/hipercalórico (n=5 - 9). Teste ANOVA *one way*, seguido do pós-teste Tukey.; *P<0,05; **P<0,01; ****P<0,0001 vs. GC.

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, a ingestão materna de dieta hiperlipídica/hipercalórica foi capaz de promover nos filhotes aumento do peso e da adiposidade corporais, ao desmame, com concomitante aumento da área e perímetro das células adiposas viscerais e subcutâneas. Contudo, aos 70 dias de vida, não foram observadas alterações de peso ou de adiposidade corporais. Entretanto, o aumento do tamanho dos adipócitos foi permanente. Em ambas as idades, não foi observada hiperplasia adipocitária em resposta à dieta materna hiperlipídica.

Baseado no acompanhamento das fêmeas progenitoras durante todo o período de gestação e lactação, nosso trabalho demonstrou que, embora o consumo alimentar das ratas GHH tenha sido menor em relação aos grupos controle e GHI (gestação) e GC (lactação), não foram identificadas diferenças no valor energético da ingestão alimentar, entre os grupos, o que configurou um consumo isocalórico. Resultados semelhantes foram descritos por Shaw, Rasmussen e Myers (1997) e Cadena-Burbano e colaboradores (2017), onde ratas alimentadas com dietas hiperlípidicas durante o período perinatal apresentaram menor ingestão alimentar em gramas, sem que houvesse diferenças na ingestão energética em relação ao controle. No presente estudo, o excedente de lipídeos utilizado na composição da dieta, pode ter promovido um menor consumo alimentar (SHAW, RASMUSSEN e MYERS, 1997) e a ingestão energética ter sido ajustada de forma a proporcionar consumo isocalórico nas fêmeas alimentadas com dieta hiperlipídica/hipercalórica (JACOB *et al.*, 2013).

No que diz respeito a evolução ponderal, as ratas durante os períodos de gestação e lactação, não apresentaram repercussões significativas no ganho de peso em resposta ao consumo das dietas hiperlipídicas. Estudos anteriores também não observaram modificações ponderais nas progenitoras em resposta ao consumo de dietas hiperlipídicas no período perinatal (SHAW, RASMUSSEN e MYERS, 1997; MENDES-DA-SILVA *et al.*, 2014; CADENA-BURBANO *et al.*, 2017). Segundo Keesey e Hirvonem (1997) a existência de um “ponto de ajuste do peso corporal” em humanos e roedores, faz com que a redução ou elevação do peso corporal seja responsiva a alterações na ingestão alimentar e dispêndio energético para manutenção do peso corporal alvo. A não alteração do peso corporal das ratas

alimentadas com dietas hiperlipídicas pode ter ocorrido devido não ter havido diferenças no consumo energético desses animais.

Apesar de não ter havido diferenças na evolução ponderal das ratas no período perinatal, ao desmame, os pesos absoluto e relativo da gordura intra-abdominal das ratas GHH foram maiores que os valores do GC. Resultados similares foram descritos por Pomar e colaboradores (2017), cujas ratas alimentadas com dieta de cafeteria, durante a lactação, apresentaram maior percentual de gordura corporal em relação às ratas controle. A maior adiposidade das ratas não foi relacionada ao peso, já que o acompanhamento ponderal da lactação demonstrou menor peso corporal nas que consumiram dieta de cafeteria (POMAR *et al.*, 2017). Nas ratas do nosso estudo, o maior teor calórico e de lipídeos da dieta hiperlipídica/hipercalórica pode ter contribuído para aumento na lipogênese. Esse aumento facilitaria o armazenamento de triglicerídeos nos estoques maternos resultando em maior adiposidade (CARVALHO *et al.*, 2013).

A distribuição percentual de energia fornecida pelos macronutrientes, especificamente dos lipídios, tem sido advogada como um facilitador do acúmulo de gordura visceral (XU *et al.*, 2010). O lipídio é dentre os três macronutrientes aquele de menor aumento na termogênese induzida pela alimentação e o de maior eficiência de armazenamento (HERMSDORFF, VOLP e BRESSAN, 2007; CARVALHO *et al.*, 2013). Ambos fatores podem estar subjacentes as evidências acima mencionadas (HERMSDORFF, VOLP e BRESSAN, 2007; CARVALHO *et al.*, 2013).

Em nosso estudo, o consumo materno das dietas hiperlipídicas não levou a diferenças no peso total da ninhada, número de filhotes paridos e média de peso dos filhotes ao nascimento, em relação ao controle. Resultados semelhantes foram observados por (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997) com a utilização de dieta hiperlipídica isocalórica e por WHITE, PURPERA e MORRISON (2009) com utilização de dieta hiperlipídica/hipercalórica, onde o consumo de dieta hiperlipídica por ratas no período perinatal não causou diferenças no número de filhotes da ninhada e peso ao nascimento.

Nossos resultados mostram que filhotes de mães GHH apresentaram maior peso corporal, ao final do período da lactação (dias 19 e 21), comparados aos filhotes de mães GC. O percentual de ganho de peso do nascimento ao desmame também foi maior nos filhotes GHH do que nos GHI e GC. Estudos em ratos

mostraram que a dieta materna hiperlipídica está associada ao aumento do peso corporal da prole durante o período de lactação (WHITE, PURPERA e MORRISON, 2009; FERRO CAVALCANTE *et al.*, 2013; CADENA-BURBANO *et al.*, 2017).

Segundo Pomar e colaboradores (2017) a ingestão dietética materna durante o período de lactação afeta diretamente a disponibilidade de nutrientes para a biossíntese do leite. Em seu estudo, o leite de ratas alimentadas com dieta de cafeteria apresentou maior concentração de triacilgliceróis do que o leite de ratas que ingeriram dieta controle, sem diferenças nas concentrações de lactose e proteínas totais (POMAR *et al.*, 2017).

Cabe salientar que, em nosso estudo, a diferença ponderal ocorreu nos filhotes GHH mesmo ambos os grupos hiperlipídicos terem sido expostos à dietas com 51% de lipídeos e não ter havido maior consumo energético pelas ratas durante o período de gestação e lactação. A quantidade de celulose utilizada na formulação da dieta hiperlipídica isocalórica foi 19% maior que a utilizada nas dietas hiperlipídica hipercalórica e controle, esse maior percentual de fibras pode ter influenciado a biodisponibilidade nutricional do leite das ratas e refletido na diferença ponderal dos filhotes hiperlipídicos (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997).

Entretanto, no estudo de Del Prado e colaboradores (1997) filhotes de ratas que consumiram dieta hiperlipídica isocalórica (20g de lipídeos/100g de dieta) apresentaram maior peso corporal entre o 6º e 12º dias da lactação, comparados a filhotes cujas mães foram alimentadas com dieta reduzida em lipídeos (2,5g de lipídeos/100g de dieta). Os autores utilizaram 25,7% de celulose na composição da dieta para configuração da característica isocalórica e hiperlipídica, e ao analisarem o leite das ratas verificaram que houve maior teor lipídico nas que consumiram a dieta hiperlipídica comparado com as ratas que consumiram a dieta reduzida em lipídeos (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997). Desta forma a utilização da celulose não teria influenciado na disponibilidade de lipídeos no leite das ratas. Não foram encontradas diferenças na excreção fecal de proteínas e lipídeos (DEL PRADO, DELGADO e VILLALPANDO, 1997).

As fibras solúveis e insolúveis apresentam efeitos fisiológicos diferenciados (POTTY, 1996). A ação hipocolesterolêmica das fibras é atribuída à sua fração solúvel, porém, a taxa de redução do colesterol pode variar com o tipo e a quantidade de fibra solúvel consumida (JUDD e TRUSWELL, 1982; EASTWOOD, 1992; MELO *et al.*, 2007.). As fibras solúveis possuem a propriedade de hidratar-se

no meio aquoso do intestino delgado, formando géis caracterizados por ligações cruzadas com os sais biliares, reduzindo a absorção de lipídeos (JUDD e TRUSWELL, 1982; EASTWOOD, 1992; MELO *et al.*, 2007.).

As fibras insolúveis não atuam sobre a colesterolemia. São responsáveis por aumentar a massa e fluidez fecal, apresentando efeito mecânico no trato gastrointestinal, reduzindo a constipação (MACEDO, SCHMOURLO e VIANA, 2012). Além disso, aumentam também a excreção de alguns minerais como o zinco, cálcio, ferro e magnésio por ter efeito competidor na absorção desses minerais (MACEDO, SCHMOURLO e VIANA, 2012). A não diferença observada no ganho de peso da prole de ratas que consumiram dieta hiperlipídica isocalórica, em nosso estudo, pode ter ocorrido em detrimento a esse efeito de competição na absorção de nutrientes decorrente do uso da maior concentração de celulose na dieta.

Em nosso estudo o maior percentual de ganho de peso dos filhotes GHH durante a lactação, não persistiu no período pós desmame. Os filhotes de ratas GHI apresentaram menor peso corporal em relação aos filhotes de ratas GC, com 70 dias de vida. Contudo não houve diferenças no percentual de ganho de peso no mesmo período entre os grupos. Da mesma forma, o consumo alimentar no pós desmame não foi diferente entre os filhotes de ratas expostas as dietas hiperlipídicas e controle.

Ademais do acompanhamento ponderal, também foi avaliada a adiposidade da prole. Aos 22 dias, os filhotes de mães GHH apresentaram maiores valores de peso absoluto e relativo para os coxins adiposos inguinal (em relação à filhotes GHI e GC), maiores pesos absolutos para os coxins retroperitoneal e mesentérico (em relação à filhotes GC) e maior peso relativo do coxim retroperitoneal (filhotes GHH e GHI em relação aos GC). Com 70 dias de idade essas diferenças na adiposidade da prole não foram mais significativas, exceto para o valor percentual do coxim adiposo inguinal, que foi maior em filhotes de ratas GHH em relação aos filhotes GC.

O estudo de WHITE, PURPERA e MORRISON (2009) sugere que não apenas o consumo de dieta hiperlipídica durante o período perinatal por ratas, promove alterações ponderiais e metabólicas na prole. O acúmulo de gordura corporal e obesidade maternos per si seria o principal mecanismo promotor de tais alterações na prole. Essa constatação se deu pelo fato que as ratas que receberam dieta hiperlipídica (60% de lipídeos – 5,24 Kcal/g) durante o período perinatal, mas cujo consumo energético foi igual ao grupo com redução de lipídeos (10% de

lipídeos – 3,85 Kcal/g), tiveram filhotes com maior adiposidade ao desmame (comparados à prole que recebeu dieta restrita em lipídeos), contudo, os mesmos não apresentaram diferenças ponderais, de adiposidade e de ingestão alimentar com 8 semanas de idade (WHITE, PURPERA e MORRISON, 2009).

A homeostase do peso corporal e adiposidade dos filhotes GHH e GHI aos 70 dias de idade, neste estudo, pode ter seguido as premissas sugeridas no estudo acima referido, já que nossas ratas mesmo em consumo de dietas hiperlipídicas não apresentaram diferenças no valor energético da ingestão alimentar durante os períodos de gestação e lactação, em comparação com as ratas expostas à dieta controle. Outros autores também obervaram que a exposição materna a dieta hiperlipídica ou de cafeteria não promove adiposidade na prole de ratos machos a longo prazo, quando esses filhotes são expostos a uma dieta contole ao desmame (GREGORIO *et al.*, 2013; POMAR *et al.*, 2017).

No estudo de Gregório e colaboradores (2013), a exposição materna durante a gestação e lactação a uma dieta hiperlipídica (49% de lipídeos – suplementada com banha de porco 20g/100g) apenas foi associada a adiposidade na prole quando esses filhotes foram alimentados no período pós desmame (até 3 meses de idade) com a mesma dieta das ratas genitoras. Já no estudo de Pomar e colaboradores (2017), as ratas que foram expostas a dieta de cafeteria (rica em lipídeos, açúcares e sódio) durante a lactação tiveram prole com maior percentual de gordura corporal ao desmame. No entanto, aos seis meses de idade, as diferenças no teor de gordura corporal foram mitigadas (POMAR *et al.*, 2017). Cabe a ressalva, que diferentemente do presente estudo, os autores realizaram manipulação dietética apenas na lactação e observaram que as ratas tiveram maior consumo energético no período estudado.

No entanto, no estudo de Bayol e colaboradores (2008) foi evidenciado que a prole de ratas alimentadas com dieta "junk food" (41% de lipídeos, sendo 18% gordura saturada) durante a gestação e lactação, mas que receberam dieta controle ao desmame, apresentaram aumento da adiposidade, em relação à massa corporal, em comparação com filhotes de ratas alimentadas com dieta controle (8% de lipídeos, sendo 1,73% saturados) durante o período do estudo. Essa adiposidade foi evidenciada por aumento de 37% e 43% do coxim adiposo perirrenal em filhotes machos e fêmeas, respectivamente, na 10ª semana pós parto. Diferentemente do nosso estudo, Bayol e colaboradores (2008) puderam evidenciar maior adiposidade

no pós desmame, quando a prole foi alimentada com dieta controle, no entanto, não é possível saber se esse fato pode ter sido associado a uma maior ingestão calórica e lipídica materna, já que esses dados não foram apresentados (BAYOL *et al.*, 2008).

Semelhante aos nossos resultados, Alfaradhi e colaboradores (2016) observaram que filhotes de ratas que consumiram dieta obesogênica (45% de lipídeos) durante a gestação e lactação, não demonstraram diferenças no peso corporal no pós desmame em relação ao controle (7,42% lipídeos). Além do peso, também não foram encontradas diferenças na adiposidade da prole em oito semanas pós desmame, assim como nos níveis séricos de triacilgliceróis, colesterol e glicemia (ALFARADHI *et al.*, 2016). No entanto, foram observadas alterações significativas na expressão gênica do tecido adiposo da prole cujas mães foram alimentadas com dieta obesogênica, com suprarregulação dos genes envolvidos na sinalização das citocinas e desenvolvimento da resposta inflamatória (ALFARADHI *et al.*, 2016). Esse perfil pró-inflamatório da prole de ratas expostas a dieta obesogênica é dito como precedente às diferenças ponderais e de adiposidade (ALFARADHI *et al.*, 2016).

O tecido adiposo abdominal, considerado importante preditor do risco cardiovascular, inclui depósitos de gordura subcutânea e intra-abdominal, a qual, por sua vez, é classificada em gordura visceral (ou intraperitoneal) e retroperitoneal (FRAYN, 2000; BRUNDAVANI, MURTHY e KURPAD, 2006; SAMPAIO *et al.*, 2007). Destes, o tecido adiposo visceral (TAV) é o componente que produz maior efeito prejudicial sobre os parâmetros metabólicos e hemodinâmicos (JENSEN, 2002; POIRIER e DESPRÉS, 2003; VASQUES; *et al.*, 2010).

O tecido adiposo subcutâneo compreende o compartimento clássico destinado ao armazenamento de calorias, que potencialmente atua como isolante térmico (WEISS, 2007). A gordura armazenada em região subcutânea representa o tampão fisiológico para o excesso da ingestão energética combinada ao gasto energético limitado (WEISS, 2007). Quando a capacidade de estocagem lipídica é excedida, o armazenamento é desviado para outros depósitos, como o TAV, músculo esquelético e fígado, o que compromete suas vias metabólicas normais (WEISS, 2007).

A principal diferença entre os depósitos de gordura visceral e subcutâneo é que a drenagem venosa do tecido subcutâneo é realizada pela circulação sistêmica,

enquanto que o TAV é irrigado pela circulação portal (NIELSEN, 2004; JAKOBSEN, 2007). A drenagem portal do TAV fornece acesso direto de ácidos graxos livres (AGL) e adipocinas secretadas pelos adipócitos viscerais, sendo essa característica o centro da maioria das hipóteses postuladas para explicar a associação entre a gordura visceral e doenças cardiometabólicas (BERGMAN *et al.*, 2001; BELANGER *et al.*, 2002; NIELSEN, 2004). As adipocinas ativam mecanismos imuno-hepáticos para a produção de mediadores inflamatórios, além do maior fluxo de AGL para o fígado promover maior resistência insulínica e aumento da produção de triacilgliceróis (JENSEN, 2008; KORENBLAT *et al.*, 2008; WEN-YA, 2013).

A escolha dos depósitos adiposos, neste estudo, levou em consideração que os tecidos adiposos subcutâneo e visceral apresentam diferenças substanciais relacionadas a aspectos anatômicos, morfologia das células adiposas, função endócrina e atividade lipolítica. O tecido adiposo retroperitoneal representa o tecido adiposo abdominal subcutâneo, o mesentérico representa o abdominal visceral e o inguinal, o subcutâneo periférico.

No presente estudo, a administração de dieta hiperlipídica hipercalórica para ratas durante os períodos de gestação e lactação causou na prole além de maior adiposidade ao desmame, maiores valores de área e perímetro para adipócitos inguinais, retroperitoneais e mesentéricos, em relação à prole de ratas que consumiram dieta hiperlipídica isocalórica e controle. Essa diferença nos valores de área e perímetro também foi observada na prole GHI, ao desmame, em relação à prole GC. No período pós-desmame (aos 70 dias), a prole GHH manteve maiores valores de área e perímetro para adipócitos inguinais, retroperitoneais e mesentéricos, em relação aos filhotes GHI e GC. Área e perímetro também foram maiores em adipócitos inguinais na prole GHI em relação ao GC. Enquanto que os valores de perímetro de adipócitos retroperitoneais da prole GHI foram menores em relação ao GC.

A administração de dieta hiperlipídica, em especial rica em lipídeos saturados, durante os períodos críticos do desenvolvimento podem alterar, na prole, aspectos fisiológicos e metabólicos de forma permanente na idade adulta (DUNN e BALE, 2009; ASHINO *et al.*, 2012). Programando os descendentes para o desenvolvimento da adiposidade, caracterizada por hipertrofia adipocitária (BAYOL *et al.*, 2008) intolerância à glicose, hipertrigliceridemia e hepatomegalia, semelhante ao fenótipo

da síndrome metabólica em humanos (GUO e JEN, 1995; SRINIVASAN *et al.*, 2006).

No estudo de Bayol e colaboradores (2008) todos os animais que cursaram com aumento da adiposidade apresentaram aumento na média da área de adipócitos e, como esperado, essa hipertrofia adipocitária foi mais pronunciada na prole exposta a dieta “junk food” durante todo o período experimental (gestação, lactação e pós desmame). No entanto, em estudo anterior Bayol e colaboradores (2005) notaram que a hipertrofia adipocitária observada ao desmame na prole de ratas expostas a dieta “junk food” (neste caso os filhotes receberam dieta controle ao desmame), persistiu até o final da adolescência em comparação à prole exposta apenas a dieta controle.

No estudo de Ravagnani e colaboradores (2012) a exposição de ratos a uma dieta hipercalórica/hiperlipídica a base de chocolate, por dois meses, promoveu maior área em adipócitos de região omental, retroperitoneal e inguinal em relação ao controle. Após os dois meses de ingestão da dieta a base de chocolate, um grupo de animais recebeu adicionalmente outra dieta hipercalórica/hiperlipídica (à base de extrato de baru) para verificação de efeito de interação. Nesses animais foi verificada maior área de adipócitos omentais e retroperitoneais em relação a seus controles (RAVAGNANI *et al.*, 2012). A atividade da lipase de lipoproteínas (LPL), enzima chave na deposição de gordura em vários compartimentos adiposos, bem como os níveis de RNAm da LPL, são maiores nas células abdominais do que nas gluteais em indivíduos do sexo masculino (WAJCHENBERG, 2000).

O aumento do tamanho dos adipócitos não é um processo ilimitado. Eventualmente, seu crescimento atinge um grau máximo, além do qual a sua capacidade de armazenamento de gordura se exaure, e novas células são lentamente recrutadas e emergidas desse tecido (QUEIROZ *et al.*, 2009). Adipócitos muito grandes além do esgotamento da capacidade de estocagem de gordura, tornam-se mais lipolíticos, o que pode desencadear aumento na concentração de ácidos graxos livres no plasma e comprometer a função de diversos órgãos pela lipotoxicidade (DEFRONZO, 2004).

Corroborando com nossos resultados Alfaradhi e colaboradores (2016) demonstraram que adipócitos da prole exposta a dieta hiperlipídica materna foram significativamente maiores comparados ao grupo controle. O número de adipócitos/campo também foi menor em comparação ao controle (ALFARADHI *et al.*,

2016). Além disso, a prole que sofreu exposição à dieta hiperlipídica perinatal cursou com aumento do processo inflamatório, evidenciado por aumento de TNF-α e das quimiocinas CCL2 (ou MCP-1) e CCL7 (ou MCP-3). Sugerindo que a programação de um fenótipo inflamatório no tecido adiposo precoce pode ser um mecanismo subjacente ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos como consequência da exposição materna a dieta hiperlipídica (ALFARADHI *et al.*, 2016).

Um estado pró-inflamatório no tecido adiposo pode estar intrinsecamente ligado ao *turnover* celular defeituoso e remodelação do tecido adiposo, incluindo a infiltração de macrófagos durante exposição ao excesso de nutrientes (SUN, KUSMINSKI e SCHERER, 2011). A abundância de pré-adipócitos e sua capacidade adipogênica são importantes variáveis que influenciam a arquitetura e o estado operacional da expansão do tecido adiposo (SORISKY, MOLGAT e GAGNON, 2013). É proposto que o crescimento hiperplásico, que leva a formação de adipócitos menores, funcionais e saudáveis, derivados de pré-adipócitos sensíveis e abundantes, impulsione a capacidade de armazenamento energético global, mantendo a função do tecido adiposo saudável (SAMOCHA-BONET *et al.*, 2012). Contudo, se a capacidade adipogênica for restringida, quer devido a um número inadequado de pré-adipócitos ou capacidade de diferenciação atenuada, o crescimento hipertrófico de adipócitos existentes dominará, produzindo adipócitos “inchados” e predispondo o processo inflamatório e resistência à insulina (HIRSCH *et al.*, 1989; DANFORTH, 2000; HEILBRONN, SMITH e RAVUSSIN, 2004).

No presente estudo, essa sobreposição da hipertrofia adipocitária de filhotes de ratas expostas às dietas hiperlipídicas em relação à hiperplasia do tecido adiposo desses filhotes foi configurada por menor número de adipócitos por área nos coxins adiposos inguinal e mesentérico (prole GHH e GHI vs. GC), e retroperitoneal (prole GHH vs. GC) aos 22 dias, e menor número de adipócitos por área do tecido adiposo retroperitoneal (prole GHH vs. GC) aos 70 dias.

Os adipócitos hipertróficos atuam na liberação de quimiocinas que atraem monócitos circulantes para infiltrarem o tecido adiposo, onde se tornam macrófagos, contribuindo ainda mais para a produção de citocinas pró-inflamatórias com efeitos deletérios parácrinos e endócrinos (DALMAS, CLEMENT e GUERRE-MILLO, 2011; SUN, KUSMINSKI e SCHERER, 2011; OSBORN e OLEFSKY, 2012). Os macrófagos podem inibir o processo de adipogênese ao interagir com as proteínas do ciclo celular [Myc, ciclina A, ciclina – kinase dependente (CDK) 2, proteína

retinoblastoma (Rb)] que regulam a expansão clonal mitótica (MCE) e a expressão de fatores transcricionais adipogênicos chaves (proteínas de ligação CCAAT e receptor gama ativado por proliferadores de peroxissomas) (SORISKY, MOLGAT e GAGNON, 2013). Além disso, podem também ativar o fator nuclear kB e a expressão de citocinas antiadipogênicas inflamatórias (TNF-α, IL-6 e IL-8), resultando em um fenótipo de pré-adipócitos inflamados e pró-fibrótico e cujas respostas de diferenciação, sobrevivência e/ou proliferação podem estar alteradas (SORISKY, MOLGAT e GAGNON, 2013).

8. CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmaram parcialmente a hipótese de estudo inicialmente proposta. Foi observada que a hipertrofia adipocitária está presente a curto e em longo prazo em resposta à dieta materna, independente de seu consumo energético. Contudo, o aumento do peso e da adiposidade corporal só foi observado ao desmame. Enquanto que, em nenhumas das idades estudadas, foi observada hiperplasia adipocitária. Desse modo, demostramos que a utilização de dieta hiperlipídica materna durante o período perinatal influencia na plasticidade do desenvolvimento do tecido adiposo visceral e subcutâneo.

8.1. PERPECTIVAS

Considerando os resultados encontrados no presente estudo, sugerimos algumas análises a ser realizadas em projetos futuros:

- ✓ Análise da carcaça das ratas genitoras;
- ✓ Excreção de lipídeos fecais diante do uso da celulose na dieta materna;
- ✓ Composição nutricional do leite das ratas;
- ✓ Perfil bioquímico das ratas no pré e pós-natal, bem como da prole aos 22 e 70 dias de idade;
- ✓ Perfil de ácidos graxos das dietas hiperlipídicas (hipercalórica e isocalórica);
- ✓ Avaliação do tecido adiposo marrom na prole;
- ✓ Citocinas pró-inflamatórias do tecido adiposo branco na prole.

REFERÊNCIAS

AIKEN, C. E.; OZANNE, S. E. Transgenerational developmental programming. **Hum Reprod Update,** v. 20, n. 1, p. 63-75, Jan-Feb 2014.

AILHAUD, G.; HAUNER, H. Development of white adipose tissue. **In: Bray AGB. Handbook of Obesity : Etiology and Pathophysiology, Second Edition, Marcel Dekker Inc. New Yord USA.**
, p. 481-514, 2004.

AKYOL, A.; MCMULLEN, S.; LANGLEY-EVANS, S. C. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. **Br J Nutr,** v. 107, n. 7, p. 964-978, Apr 2012.

ALFARADHI, M. Z. et al. Maternal Obesity in Pregnancy Developmentally Programs Adipose Tissue Inflammation in Young, Lean Male Mice Offspring. **Endocrinology,** v. 157, n. 11, p. 4246-4256, Nov 2016.

ALMIND, K. et al. Ectopic brown adipose tissue in muscle provides a mechanism for differences in risk of metabolic syndrome in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 7, p. 2366-2371, Feb 13 2007.

ARMITAGE, J. A. et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. **J Physiol,** v. 565, n. Pt 1, p. 171-184, May 15 2005.

ARMITAGE, J. A.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. **Front Horm Res,** v. 36, p. 73-84, 2008.

ARNER, P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. **Trends Endocrinol Metab,** v. 14, n. 3, p. 137-145, Apr 2003.

ASHINO, N. G. et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **J Nutr Biochem,** v. 23, n. 4, p. 341-348, Apr 2012.

BARKER, D. J. The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. **Proc Nutr Soc,** v. 51, n. 2, p. 135-144, Aug 1992.

_____. The fetal and infant origins of disease. **Eur J Clin Invest,** v. 25, n. 7, p. 457-463, Jul 1995.

_____. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med,** v. 261, n. 5, p. 412-417, May 2007.

BARKER, D. J. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **Int J Epidemiol,** v. 31, n. 6, p. 1235-1239, Dec 2002.

BARKER, D. J.; OSMOND, C.; LAW, C. M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **J Epidemiol Community Health,** v. 43, n. 3, p. 237-240, Sep 1989.

BARTELT, A.; HEEREN, J. Adipose tissue browning and metabolic health. **Nat Rev Endocrinol,** v. 10, n. 1, p. 24-36, Jan 2014.

BAYOL, S. et al. The influence of undernutrition during gestation on skeletal muscle cellularity and on the expression of genes that control muscle growth. **Br J Nutr,** v. 91, n. 3, p. 331-339, Mar 2004.

BAYOL, S. A. et al. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. **J Physiol,** v. 586, n. 13, p. 3219-3230, Jul 01 2008.

BAYOL, S. A.; SIMBI, B. H.; STICKLAND, N. C. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. **J Physiol,** v. 567, n. Pt 3, p. 951-961, Sep 15 2005.

BELANGER, C. et al. Adipose tissue intracrinology: potential importance of local androgen/estrogen metabolism in the regulation of adiposity. **Horm Metab Res,** v. 34, n. 11-12, p. 737-745, Nov-Dec 2002.

BENTO-SANTOS, A. et al. Critérios para escolha da amostra em experimentos com ratos *Wistar*. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciências e Animais de Laboratório,** v. 1, n. 1, p. 121-129, 2012.

BENYSHEK, D. C. The "early life" origins of obesity-related health disorders: new discoveries regarding the intergenerational transmission of developmentally programmed traits in the global cardiometabolic health crisis. **Am J Phys Anthropol,** v. 152 Suppl 57, p. 79-93, Dec 2013.

BERGLUND, S. K. et al. Maternal, fetal and perinatal alterations associated with obesity, overweight and gestational diabetes: an observational cohort study (PREOBE). **BMC Public Health,** v. 16, p. 207, Mar 01 2016.

BERGMAN, R. N. et al. Central role of the adipocyte in the metabolic syndrome. **J Investig Med,** v. 49, n. 1, p. 119-126, Jan 2001.

BRADSHAW, A. D. Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. **Advances in Genetics,** v. 13, p. 115-155, 1965.

BROETTO, F. N.; BRITO, M. D. N. Tecido adiposo marrom e obesidade em humanos. **Revista Saúde e Pesquisa,** v. 5, n. 1, p. 121-135, 2012.

BRUNDAVANI, V.; MURTHY, S. R.; KURPAD, A. V. Estimation of deep-abdominal-adipose-tissue (DAAT) accumulation from simple anthropometric measurements in Indian men and women. **Eur J Clin Nutr,** v. 60, n. 5, p. 658-666, May 2006.

CADENA-BURBANO, E. V. et al. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. **Nutr Neurosci**, p. 1-12, Jul 28 2017.

CARVALHO, M. F. et al. Experimental diet based on the foods listed in the Family Budget Survey is more detrimental to growth than to the reflex development of rats. **Revista de Nutrição,** v. 26, n. 2, p. 177-193, 2013.

CERF, M. E. et al. Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 288, n. 5, p. R1122-1128, May 2005.

CINTI, S. The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues. **Proc Nutr Soc,** v. 60, n. 3, p. 319-328, Aug 2001.

_____. The role of brown adipose tissue in human obesity. **Nutr Metab Cardiovasc Dis,** v. 16, n. 8, p. 569-574, Dec 2006.

COUPE, B. et al. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. **Endocrinology,** v. 151, n. 2, p. 702-713, Feb 2010.

CYPESS, A. M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med,** v. 360, n. 15, p. 1509-1517, Apr 9 2009.

DA SILVA ARAGAO, R. et al. Maternal protein restriction impairs the transcriptional metabolic flexibility of skeletal muscle in adult rat offspring. **Br J Nutr,** v. 112, n. 3, p. 328-337, Aug 14 2014.

DALMAS, E.; CLEMENT, K.; GUERRE-MILLO, M. Defining macrophage phenotype and function in adipose tissue. **Trends Immunol,** v. 32, n. 7, p. 307-314, Jul 2011.

DANFORTH, E., JR. Failure of adipocyte differentiation causes type II diabetes mellitus? **Nat Genet,** v. 26, n. 1, p. 13, Sep 2000.

DE PAULA SIMINO, L. A. et al. Lipid overload during gestation and lactation can independently alter lipid homeostasis in offspring and promote metabolic impairment after new challenge to high-fat diet. **Nutr Metab (Lond),** v. 14, p. 16, 2017.

DE ROOIJ, S. R. et al. Impaired insulin secretion after prenatal exposure to the Dutch famine. **Diabetes Care,** v. 29, n. 8, p. 1897-1901, Aug 2006.

DEFRONZO, R. A. Dysfunctional fat cells, lipotoxicity and type 2 diabetes. **Int J Clin Pract Suppl**, n. 143, p. 9-21, Oct 2004.

DEL PRADO, M.; DELGADO, G.; VILLALPANDO, S. Maternal lipid intake during pregnancy and lactation alters milk composition and production and litter growth in rats. **J Nutr,** v. 127, n. 3, p. 458-462, Mar 1997.

DUNN, G. A.; BALE, T. L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. **Endocrinology,** v. 150, n. 11, p. 4999-5009, Nov 2009.

EASTWOOD, M. A. The fisiological effect of dietary fiber: on uptake. **Annual Review of Nutrition,** v. 12, n. 19-36, 1992.

FERRO CAVALCANTE, T. C. et al. Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids,** v. 48, n. 11, p. 1157-1168, Nov 2013.

FILHO, M. B.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública,** v. 19, p. S181-S191, 2003.

FLIER, J. S. et al. Severely impaired adipsin expression in genetic and acquired obesity. **Science,** v. 237, n. 4813, p. 405-408, Jul 24 1987.

FONSECA-ALANIZ, M. H. et al. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab,** v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FORNER, F. et al. Proteome differences between brown and white fat mitochondria reveal specialized metabolic functions. **Cell Metab,** v. 10, n. 4, p. 324-335, Oct 2009.

FOX, C. S. et al. Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study. **Circulation,** v. 116, n. 1, p. 39-48, Jul 03 2007.

FRAYN, K. N. Visceral fat and insulin resistance-causative or correlative? . **Brazilian Jounal of Nutrition,** v. 83, n. 1, p. 71 - 77, 2000.

FRAYN, K. N. et al. Integrative physiology of human adipose tissue. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 27, n. 8, p. 875-888, Aug 2003.

GARCIA, A. P. et al. Moderate caloric restriction during gestation results in lower arcuate nucleus NPY- and alphaMSH-neurons and impairs hypothalamic response to fed/fasting conditions in weaned rats. **Diabetes Obes Metab,** v. 12, n. 5, p. 403-413, May 2010.

GHEBREMESKEL, K. et al. Maternal diet high in fat reduces docosahexaenoic acid in liver lipids of newborn and sucking rat pups. **Br J Nutr,** v. 81, n. 5, p. 395-404, May 1999.

GIACCHETTI, G. et al. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. **Am J Hypertens,** v. 15, n. 5, p. 381-388, May 2002.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental origins of disease paradigm: a mechanistic and evolutionary perspective. **Pediatr Res,** v. 56, n. 3, p. 311-317, Sep 2004.

GREGORIO, B. M. et al. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. **Eur J Nutr,** v. 52, n. 2, p. 759-769, Mar 2013.

GROVE, K. L. et al. Development of metabolic systems. **Physiol Behav,** v. 86, n. 5, p. 646-660, Dec 15 2005.

GUENARD, F. et al. Differential methylation in glucoregulatory genes of offspring born before vs. after maternal gastrointestinal bypass surgery. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 110, n. 28, p. 11439-11444, Jul 09 2013.

GUERRA, C. et al. Emergence of brown adipocytes in white fat in mice is under genetic control. Effects on body weight and adiposity. **J Clin Invest,** v. 102, n. 2, p. 412-420, Jul 15 1998.

GUO, F.; JEN, K. L. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. **Physiol Behav,** v. 57, n. 4, p. 681-686, Apr 1995.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia,** v. 35, n. 7, p. 595-601, Jul 1992.

HANLEY, B. et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics - a review of present priorities and future opportunities. **Br J Nutr,** v. 104 Suppl 1, p. S1-25, Jul 2010.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nat Med,** v. 19, n. 10, p. 1252-1263, Oct 2013.

HEILBRONN, L.; SMITH, S. R.; RAVUSSIN, E. Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. **Int J Obes Relat Metab Disord,** v. 28 Suppl 4, p. S12-21, Dec 2004.

HERMSDORFF, H. H. M.; VOLP, A. C. P.; BRESSAN, J. O perfil de macronutrients influencia a termogênese induzida pela dieta e a ingestão calórica. . **ALAN,** v. 57, n. 1, p. 33-42, 2007.

HIMMS-HAGEN, J. et al. Multilocular fat cells in WAT of CL-316243-treated rats derive directly from white adipocytes. **Am J Physiol Cell Physiol,** v. 279, n. 3, p. C670-681, Sep 2000.

HIRSCH, J. et al. The fat cell. **Med Clin North Am,** v. 73, n. 1, p. 83-96, Jan 1989.

JACOB, P. S. et al. Isocaloric intake of a high-fat diet promotes insulin resistance and inflammation in Wistar rats. **Cell Biochem Funct,** v. 31, n. 3, p. 244-253, Apr 2013.

JACOBSSON, A. et al. Mitochondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. **J Biol Chem,** v. 260, n. 30, p. 16250-16254, Dec 25 1985.

JAKOBSEN, M. U., ET AL. . Abdominal Obesity and Fatty Liver. **Epidemiologic Reviews,** v. 29, p. 77 - 87, 2007.

JENSEN, M. D. Health consequences of fat distribution. **Horm Res,** v. 48 Suppl 5, p. 88-92, 1997.

JENSEN, M. D. Adipose tissue and fatty acid metabolism in humans. **Journal of the Royal Society of Medicine,** v. 95, n. 42, p. 3 - 7, 2002.

JENSEN, M. D. Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 93, n. 11 Suppl 1, p. S57-63, Nov 2008.

JONES, A. et al. Size at birth and autonomic function during psychological stress. **Hypertension,** v. 49, n. 3, p. 548-555, Mar 2007.

JONES, A. et al. Fetal growth and the adrenocortical response to psychological stress. **J Clin Endocrinol Metab,** v. 91, n. 5, p. 1868-1871, May 2006.

JONES, H. N. et al. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. **Faseb j,** v. 23, n. 1, p. 271-278, Jan 2009.

JUDD, P. A.; TRUSWELL, A. S. Comparasion of the effects of hight and low metthoxyl pectin on blood and faecal lipids in man. . **British Journal of Nutrition,** v. 48, n. 3, p. 451-458, 1982.

KEESEY, R. E.; HIRVONEN, M. D. Body weight set-points: determination and adjustment. **J Nutr,** v. 127, n. 9, p. 1875s-1883s, Sep 1997.

KELLEY, D. E. et al. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 278, n. 5, p. E941-948, May 2000.

KHAN, I. Y. et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 288, n. 1, p. R127-133, Jan 2005.

KONIECZNY, S. F.; EMERSON, C. P., JR. 5-Azacytidine induction of stable mesodermal stem cell lineages from 10T1/2 cells: evidence for regulatory genes controlling determination. **Cell,** v. 38, n. 3, p. 791-800, Oct 1984.

KORENBLAT, K. M. et al. Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects. **Gastroenterology,** v. 134, n. 5, p. 1369-1375, May 2008.

KOROTKOVA, M. et al. Gender-related long-term effects in adult rats by perinatal dietary ratio of n-6/n-3 fatty acids. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 288, n. 3, p. R575-579, Mar 2005.

KRAL, J. G. et al. Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years. **Pediatrics,** v. 118, n. 6, p. e1644-1649, Dec 2006.

LAFONTAN, M. Fat cells: afferent and efferent messages define new approaches to treat obesity. **Annu Rev Pharmacol Toxicol,** v. 45, p. 119-146, 2005.

LANGIN, D. Recruitment of brown fat and conversion of white into brown adipocytes: strategies to fight the metabolic complications of obesity? **Biochim Biophys Acta,** v. 1801, n. 3, p. 372-376, Mar 2010.

LANGLEY-EVANS, S. C. Developmental programming of health and disease. **Proc Nutr Soc,** v. 65, n. 1, p. 97-105, Feb 2006.

_____. Nutritional programming of disease: unravelling the mechanism. **J Anat,** v. 215, n. 1, p. 36-51, Jul 2009.

_____. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. **J Hum Nutr Diet,** v. 28 Suppl 1, p. 1-14, Jan 2015.

LEPPER, C.; FAN, C. M. Inducible lineage tracing of Pax7-descendant cells reveals embryonic origin of adult satellite cells. **Genesis,** v. 48, n. 7, p. 424-436, Jul 2010.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci,** v. 27, n. 6, p. 1400-1408, Mar 2008.

MA, S. W. et al. Absence of increased oxygen consumption in brown adipose tissue of rats exhibiting "cafeteria" diet-induced thermogenesis. **Can J Physiol Pharmacol,** v. 66, n. 11, p. 1347-1354, Nov 1988.

MACEDO, T. M. B.; SCHMOURLO, G.; VIANA, K. D. A. L. Fibra alimentar como mecanismo preventivo de doenças crônicas e distúrbios metabólicos. **Revista UNI** v. 2, n. 2, p. 67-77, 2012.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Braz J Biol,** v. 62, n. 4a, p. 609-614, Nov 2002.

MARIMAN, E. C.; WANG, P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. **Cell Mol Life Sci,** v. 67, n. 8, p. 1277-1292, Apr 2010.

MARTORELL, R.; STEIN, A. D.; SCHROEDER, D. G. Early nutrition and later adiposity. **J Nutr,** v. 131, n. 3, p. 874S-880S, Mar 2001.

MCMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. **Physiol Rev,** v. 85, n. 2, p. 571-633, Apr 2005.

MELO, D. S. D. et al. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sangüineo e o peso do fígado de ratos. **Ciência e Agrotecnologia,** v. 31, n. 2, p. 420-428, 2007.

MENDES-DA-SILVA, C. et al. Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. **Arq Neuropsiquiatr** v. 72, n. 2, p. 136-144, 2014.

MILANSKI, M. et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. **J Neurosci,** v. 29, n. 2, p. 359-370, Jan 14 2009.

MURABAYASHI, N. et al. Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,** v. 169, n. 1, p. 39-44, Jul 2013.

NIELSEN, S., ET AL. . Splanchnic lipolysis in human obesity. . **The Journal of Clinical Investigation,** v. 113, p. 1582 - 1588, 2004.

OMS, O. M. D. S. Relatório mundial sobre violência e saúde. **Genebra: Organização Mundial da Saúde**, 2002.

OSBORN, O.; OLEFSKY, J. M. The cellular and signaling networks linking the immune system and metabolism in disease. **Nat Med,** v. 18, n. 3, p. 363-374, Mar 6 2012.

PAINTER, R. C. et al. Maternal nutrition during gestation and carotid arterial compliance in the adult offspring: the Dutch famine birth cohort. **J Hypertens,** v. 25, n. 3, p. 533-540, Mar 2007.

PALOU, M. et al. Impaired insulin and leptin sensitivity in the offspring of moderate caloric-restricted dams during gestation is early programmed. **J Nutr Biochem,** v. 23, n. 12, p. 1627-1639, Dec 2012.

PALOU, M. et al. Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. **Nutr Metab (Lond),** v. 7, p. 69, Aug 26 2010.

PARENTE, L. B.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. **Clin Nutr,** v. 27, n. 4, p. 623-634, Aug 2008.

PERMANA, P. A.; MENGE, C.; REAVEN, P. D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. **Biochem Biophys Res Commun,** v. 341, n. 2, p. 507-514, Mar 10 2006.

PETROVIC, N. et al. Chronic peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes. **J Biol Chem,** v. 285, n. 10, p. 7153-7164, Mar 5 2010.

PICO, C. et al. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. **Front Physiol,** v. 3, p. 436, 2012.

PIERLEONI, C. et al. Fibronectins and basal lamina molecules expression in human subcutaneous white adipose tissue. **Eur J Histochem,** v. 42, n. 3, p. 183-188, 1998.

PIGLIUCCI, M.; MURREN, C. J.; SCHLICHTING, C. D. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. **J Exp Biol,** v. 209, n. Pt 12, p. 2362-2367, Jun 2006.

PLAGEMANN, A. Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity. **Physiol Behav,** v. 86, n. 5, p. 661-668, Dec 15 2005.

_____. A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation. **J Matern Fetal Neonatal Med,** v. 21, n. 3, p. 143-148, Mar 2008.

POIRIER, P.; DESPRÉS, J. P. Waist circumference, visceral obesity, and cardiovascular risk. **Journal of Cardiopulmonary Rehabilitation and Prevention,** v. 23, p. 161-169, 2003.

POLYAK, A. et al. Brown adipose tissue in obesity: Fractalkine-receptor dependent immune cell recruitment affects metabolic-related gene expression. **Biochim Biophys Acta,** v. 1861, n. 11, p. 1614-1622, Nov 2016.

POMAR, C. A. et al. Maternal consumption of a cafeteria diet during lactation in rats leads the offspring to a thin-outside-fat-inside phenotype. **Int J Obes (Lond),** v. 41, n. 8, p. 1279-1287, Aug 2017.

POND, C. Ecology of storage and allocation of resources: animals. **Encyclopedia of Life Sciences**, p. 1-5, 2001.

POTTY, V. H. Physico-chemical aspects, physiological functions, nutritional importance and technological significance of dietary fibers: a critical appraisal. . **Journal Food Science Technology,** v. 33, n. 1, p. 1-18 1996.

QUEIROZ, J. C. F. D. et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos. **Arq Bras Endocrinol Metab,** v. 53, n. 5, p. 582-594, 2009.

RAJALA, M. W.; SCHERER, P. E. Minireview: The adipocyte--at the crossroads of energy homeostasis, inflammation, and atherosclerosis. **Endocrinology,** v. 144, n. 9, p. 3765-3773, Sep 2003.

RAVAGNANI, F. C. D. P. et al. Efeito de dietas hiperlipídicas com extrato de baru e chocolate sobre a área de adipócitos de ratos submetidos ao exercício físico. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte,** v. 18, n. 3, mai/jun 2012.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr,** v. 123, n. 11, p. 1939-1951, Nov 1993.

REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocr Rev,** v. 32, n. 2, p. 272-311, Apr 2011.

RICE, F.; HAROLD, G. T.; THAPAR, A. The effect of birth-weight with genetic susceptibility on depressive symptoms in childhood and adolescence. **Eur Child Adolesc Psychiatry,** v. 15, n. 7, p. 383-391, Oct 2006.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. **J Physiol,** v. 529 Pt 1, p. 3-10, Nov 15 2000.

SACKS, D. A. et al. What proportion of birth weight is attributable to maternal glucose among infants of diabetic women? **Am J Obstet Gynecol,** v. 194, n. 2, p. 501-507, Feb 2006.

SAMOCHA-BONET, D. et al. Insulin-sensitive obesity in humans - a 'favorable fat' phenotype? **Trends Endocrinol Metab,** v. 23, n. 3, p. 116-124, Mar 2012.

SAMPAIO, L. R. et al. Validity and reliability of the sagittal abdominal diameter as a predictor of visceral abdominal fat. **Arq Bras Endocrinol Metabol,** v. 51, n. 6, p. 980-986, Aug 2007.

SANCHEZ-GURMACHES, J. et al. PTEN loss in the Myf5 lineage redistributes body fat and reveals subsets of white adipocytes that arise from Myf5 precursors. **Cell Metab,** v. 16, n. 3, p. 348-362, Sep 5 2012.

SBC, S. B. D. C. I Diretriz Brasileira de Prevenção Cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia,** v. 101, n. 6, 2013.

SCHEINER, S. M. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. **Annu. Rev. Ecol. Syst.,** v. 24, p. 35-68, 1993.

SEALE, P. et al. PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch. **Nature,** v. 454, n. 7207, p. 961-967, Aug 21 2008.

SHAW, M. A.; RASMUSSEN, K. M.; MYERS, T. R. Consumption of a high fat diet impairs reproductive performance in Sprague-Dawley rats. **J Nutr,** v. 127, n. 1, p. 64-69, Jan 1997.

SIEMELINK, M. et al. Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. **Diabetologia,** v. 45, n. 10, p. 1397-1403, Oct 2002.

SIKKINK, K. L.; SNELL-ROOD, E. C. Plasticity paves the way in an adaptive radiation. **Mol Ecol,** v. 25, n. 24, p. 6009-6011, Dec 2016.

SORISKY, A.; MOLGAT, A. S.; GAGNON, A. Macrophage-induced adipose tissue dysfunction and the preadipocyte: should I stay (and differentiate) or should I go? **Adv Nutr,** v. 4, n. 1, p. 67-75, Jan 1 2013.

SOUZA, E. B. D. Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores. **Cadernos UniFOA**, n. 13, 2010.

SRINIVASAN, M. et al. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. **Am J Physiol Endocrinol Metab,** v. 291, n. 4, p. E792-799, Oct 2006.

SULLIVAN, E. L. et al. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. **J Neurosci,** v. 30, n. 10, p. 3826-3830, Mar 10 2010.

SULLIVAN, E. L.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. **Neuroendocrinology,** v. 93, n. 1, p. 1-8, 2011.

SUN, B. et al. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. **Diabetes,** v. 61, n. 11, p. 2833-2841, Nov 2012.

SUN, K.; KUSMINSKI, C.; SCHERER, P. Adipose tissue remodeling and obesity. **J Clin Invest.,** v. 121, p. 2094-2101, 2011.

SYMONDS, M. E. et al. Long-term effects of nutritional programming of the embryo and fetus: mechanisms and critical windows. **Reprod Fertil Dev,** v. 19, n. 1, p. 53-63, 2007.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nat Rev Immunol,** v. 6, n. 10, p. 772-783, Oct 2006.

TIMMONS, J. A. et al. Myogenic gene expression signature establishes that brown and white adipocytes originate from distinct cell lineages. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 104, n. 11, p. 4401-4406, Mar 13 2007.

UNGER, R. H. Lipotoxic diseases. **Annu Rev Med,** v. 53, p. 319-336, 2002.

UNGER, R. H.; SCHERER, P. E. Gluttony, sloth and the metabolic syndrome: a roadmap to lipotoxicity. **Trends Endocrinol Metab,** v. 21, n. 6, p. 345-352, Jun 2010.

VASQUES;, A. C. J. et al. The use of anthropometric measures to assess visceral fat accumulation. **Rev Nutr,** v. 23, n. 1, p. 107 - 118, 2010.

VELLOSO, L. A. The brain is the conductor: diet-induced inflammation overlapping physiological control of body mass and metabolism. **Arq Bras Endocrinol Metab,** v. 53, n. 2, p. 151-158, mar 2009.

VICKERS, M. H. Developmental programming and transgenerational transmission of obesity. **Ann Nutr Metab,** v. 64 Suppl 1, p. 26-34, 2014.

WAJCHENBERG, B. L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr Rev,** v. 21, n. 6, p. 697-738, Dec 2000.

WALKER, C. D. et al. Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. **Ann N Y Acad Sci,** v. 1144, p. 189-202, Nov 2008.

WEISS, R. Fat distribution and storage: how much, where, and how? **Eur J Endocrinol,** v. 157 Suppl 1, p. S39-45, Aug 2007.

WEN-YA, M. A. E. A. Measurement of waist circumference. . **Diabetes Care,** v. 36, n. 1660 - 1666, 2013.

WEST-EBERHARD, M. J. Developmental Plasticity and Evolution. **Oxford University Press, New York.**, 2003.

WEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 102 Suppl 1, p. 6543-6549, May 3 2005a.

_____. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. **J Exp Zool B Mol Dev Evol,** v. 304, n. 6, p. 610-618, Nov 15 2005b.

WHITE, C. L.; PURPERA, M. N.; MORRISON, C. D. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol,** v. 296, n. 5, p. R1464-1472, May 2009.

WHITE, U. A.; TCHOUKALOVA, Y. D. Sex dimorphism and depot differences in adipose tissue function. **Biochim Biophys Acta,** v. 1842, n. 3, p. 377-392, Mar 2014.

WU, J.; COHEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? **Genes Dev,** v. 27, n. 3, p. 234-250, Feb 1 2013.

XU, R. Y. et al. Carbohydrate-to-fat ratio affects food intake and body weight in Wistar rats. **Exp Biol Med (Maywood),** v. 235, n. 7, p. 833-838, Jul 2010.

YU, X. et al. Flaxseed Oil Alleviates Chronic HFD-Induced Insulin Resistance through Remodeling Lipid Homeostasis in Obese Adipose Tissue. v. 65, n. 44, p. 9635-9646, Nov 8 2017.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

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, 27 de dezembro de 2016.

Ofício nº 122/16

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Prof.ª Raquel da Silva Aragão**
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **0051/2016**

Certificamos que a proposta intitulada **"ingestão crônica de dieta hiperlipídica por ratas durante a gestação e lactação: influência na estrutura histológica de tecidos da prole"**, registrada com o nº **0051/2016**, sob a responsabilidade de Prof.ª **Raquel da Silva Aragão** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 07/12/2016.

Finalidade	( ) Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Até 11/2017
Espécie/linhagem/raça	Ratos Wistar
Nº de animais	112
Peso/Idade	Reprodutores 220-250g / 90-120 dias Filhotes 5,5-8,5g/ 70 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério do Departamento de Nutrição CCS-UFPE

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
Vice-Presidente CEUA/UFPE
SIAPE 2345691
UFPE