



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE NUTRIÇÃO



**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA NA INDUÇÃO DE DISTÚRBIOS
CARDIOMETABÓLICOS CARACTERÍSTICOS DA SÍNDROME METABÓLICA
NA PROLE F1**

KARINA BORGES DE SOUZA DA SILVA

Ouro Preto, MG

2019

Karina Borges de Souza da Silva

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA MATERNA NA INDUÇÃO DE DISTÚRBIOS
CARDIOMETABÓLICOS CARACTERÍSTICOS DA SÍNDROME METABÓLICA
NA PROLE F1**

Trabalho apresentado à disciplina Trabalho de Conclusão de Curso – TCC003, do curso de Nutrição, da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Nutrição

Orientadora: Andréia Carvalho Alzamora

Ouro Preto

2019

S586e Silva, Karina Borges de Souza da.
Efeito da dieta hiperlipídica materna na indução de distúrbios
cardiometabólicos característicos da síndrome metabólica na prole F1 [manuscrito]
/ Karina Borges de Souza da Silva. - 2019.

38f.: il.: color; graf.; tabs.

Orientadora: Prof. Dr. Andréia Carvalho Alzamora.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Nutrição. Departamento de Nutrição .

1. Dieta hiperlipídica. 2. Síndrome metabólica. 3. Inflamação. 4. Adipocinas. I.
Alzamora, Andréia Carvalho. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III.
Título.

CDU: 612.39:616-008

Catálogo: ficha.sisbin@ufop.edu.br

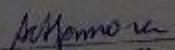


Ata da Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado:

"Efeito da dieta hiperlipídica materna na indução de distúrbios cardiometabólicos característicos da síndrome metabólica na prole F1".

Aos dezenove dias do mês de dezembro de 2019, na Sala 51 da Escola de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Banca Examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso da estudante **Karina Borges de Souza da Silva** orientada pela Prof.^a Andréia Carvalho Alzamora. A defesa iniciou-se pela apresentação oral feita pela estudante, seguida da arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por Aprovar a estudante.

Membros da Banca Examinadora:


Prof.^a Andréia Carvalho Alzamora
Presidente (DECBI/ICEB/UFOP)


Prof.^a Júlia Cristina Cardoso Carraro
Examinadora (DENCS/ENUT/UFOP)


Doutora Vivian Paulino Figueiredo
Examinadora (DECBI/ICEB/UFOP)

Trabalho desenvolvido no **Laboratório de Hipertensão** da Universidade Federal de Ouro Preto, com auxílio financeiro da CAPES, CNPQ, FAPEMIG, PROPP-NUPEB-UFOP.

Dedico este trabalho à minha mãe, Cláudia Marina, por todo apoio, compreensão e amor. À minha vó, Geralda Borges (*in memoriam*), por todos os ensinamentos e inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por ter me proporcionado chegar até aqui e por prover toda força e coragem necessária para a conclusão dessa etapa.

À minha família, por serem meu refúgio e meu incentivo. À minha mãe, pelo amor, cuidado, coragem e todo o apoio que eu precisei. Ao meu irmão, Dalvan, por todo carinho e paciência. Aos meus tios, em especial ao Adão, Djalma, Maria das Graças e minha madrinha Conceição, por não terem medido esforços para a realização dessa conquista. À minha prima Damyana, pelos conselhos, pela amizade e por ser alguém em que eu pudesse espelhar minha vida acadêmica.

Ao meu namorado, Thiago, por toda compreensão, amor, amizade e por sempre estar disposto a lutar ao meu lado minhas batalhas diárias.

À minha sogra, Elaine, e a sua família, às minhas cunhadas, Gabi e Ana, por se tornarem minha família, por todo amparo, cuidado, ajuda e principalmente pelos momentos de descontração.

Agradeço imensamente ao Laboratório de Hipertensão por terem me acolhido desde o início da graduação. À minha orientadora, prof^ª. Andréia Alzamora pela oportunidade de conhecer a pesquisa, pela paciência e ensinamentos. À Taynara pela amizade, compressão, por toda paciência e conhecimentos compartilhados durante todos esses anos. À Claudiane e Maria Andréa, pela coorientação na pesquisa e pelos ensinamentos que vão além da vida acadêmica. À Fabiane, pela amizade e por toda ajuda com as disciplinas. À Vivian por toda a paciência, conhecimento compartilhado e por toda ajuda. À Rosana e Sr. Wilson pelo cuidado e apoio. Obrigada por terem me proporcionado tantos momentos de aprendizado e descontração que agregaram tanto à minha vida durante a graduação.

Aos meus amigos amigas Lorena, Joyce e Jhonni pelo companheirismo, compreensão, força e por todas as risadas.

Aos amigos que a UFOP me proporcionou, que me ajudaram, cuidaram e fizeram com esses anos fossem muito além do que eu esperava encontrar. Agradeço pela oportunidade de ter conhecido o Nelson e por todo cuidado, carinho e conselhos prestados em vida. Aos amigos que fiz durante o curso e que eu levarei pra vida: Victor, Letícia, Jéssica, João, Úrsula, Lara, Aline, Luiza, Thamires, Samantha, Catharina, Laísa, Priscila, Gabriela, Karol, Mariane,

Marianna, Raphaela, Brenda, Isabela Fernandez, Izabela Bittencourt e Isabela Silva. Ao 16.1 e àqueles que riram, choraram, me ajudaram e se desesperaram junto comigo (risos).

À todos meus professores, em especial à Simone, Tereza e Sílvia por todo carinho e por irem muito além da sala de aula.

Aos funcionários da UFOP por toda gentileza e cuidado durante a graduação.

Por fim, aos animais de experimentação que sacrificam suas vidas pela ciência.

“Tenha até pesadelos, se necessário for. Mas sonhe.”

(Patrícia Galvão)

RESUMO

O consumo de dieta hiperlipídica (H) no período de acasalamento, gestação e lactação está associado a alterações cardiometabólicas na prole F1. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da dieta hiperlipídica materna na indução de distúrbios cardiometabólicos característicos da síndrome metabólica nas proles machos F1 machos. Ratos Fischer com 90 dias de idade foram acasalados e submetidos à dieta controle (C) ou à dieta H. Após o desmame, os ratos foram submetidos à dieta C e divididos em dois grupos: proles das genitoras que receberam dieta H (F1HM, n=8) e que receberam dieta C (F1CM, n= 7). Após 90 dias, foi realizada cirurgia de canulação da artéria aorta abdominal e veia femoral para registro da pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), eutanásia e coleta de plasma, órgãos e tecidos. O material obtido foi armazenado no freezer a -80°C para futuras análises. Foram avaliados parâmetros nutricionais, biométricos, bioquímicos, hepáticos, hemodinâmicos e marcadores inflamatórios, sendo que o valor significativo corresponde a $P < 0,05$. Os resultados mostraram que as proles F1HM apresentaram aumento da ingestão alimentar ($23 \pm 0,4$ g), ingestão calórica ($80 \pm 1,3$ kcal), eficiência alimentar ($0,70 \pm 0,01$ kcal/g) e ingestão de água ($34 \pm 0,7$ mL) comparados aos grupos controles F1CM ($17 \pm 0,8$ g; $59 \pm 2,9$ Kcal; $0,60 \pm 0,02$ Kcal/g; $22 \pm 0,3$ mL, respectivamente). Em relação aos parâmetros biométricos, as proles F1HM apresentaram aumento da massa corporal ($324 \pm 13,40$ g), do depósito de gordura inguinal ($2,37 \pm 0,27$ g/100g), depósito de gordura retroperitoneal ($2,50 \pm 0,11$ g/100g), depósito de gordura epididimal ($2,20 \pm 0,20$ g/100g), tecido adiposo marrom ($0,15 \pm 0,011$ g/100g) e do índice de adiposidade ($6,41 \pm 0,52$) comparados aos seus grupos controles ($287 \pm 6,72$ g; $1,81 \pm 0,07$ g/100g; $1,70 \pm 0,10$ g/100g; $1,50 \pm 0,20$ g/100g; $0,11 \pm 0,011$ g/100g; $5,04 \pm 0,40$, respectivamente). Quanto aos parâmetros bioquímicos, as proles F1HM apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de glicemia ($139 \pm 2,4$ mg/dL), de insulina ($1,51 \pm 0,16$ ng/mL), HOMA-IR ($57,0 \pm 4,6$) e HOMA- β ($259 \pm 15,9$) comparados aos seus grupos controle ($113 \pm 5,4$ mg/dL; $0,90 \pm 0,09$ ng/mL; $38,3 \pm 1,9$; $316 \pm 16,4$, respectivamente). Nos parâmetros hepáticos, as proles F1HM apresentaram aumento dos níveis de AST ($5,7 \pm 0,8$ U/mL) e ALT ($7,6 \pm 1,3$ U/mL) comparados aos seus grupos controle ($3,5 \pm 0,6$ U/mL; $3,7 \pm 0,7$ U/mL, respectivamente). No tocante aos parâmetros hemodinâmicos, as proles F1HM apresentaram aumento da PAM ($126,8 \pm 2,6$ mmHg) comparada ao seu grupo controle ($103 \pm 3,2$ mmHg). E em relação aos marcadores inflamatórios, as proles F1HM apresentaram aumento dos níveis de leptina ($13,5 \pm 2,7$ ng/mL) e dos níveis de MCP-1 ($36,5 \pm 1,5$ pg/mL) comparado aos seus grupos controles ($4,4 \pm 1,1$ ng/mL; $30,6 \pm 2,03$ pg/mL, respectivamente). Em conjunto, os dados mostraram que a dieta H ofertada a genitoras somente no período de acasalamento, gestação e lactação aumentou na prole (F1HM) a ingestão alimentar de dieta C, provavelmente por um distúrbio nos mecanismos de controle da saciedade, apresentando aumento dos níveis de leptina plasmática em função da maior adiposidade. Esses distúrbios induziram aumento no índice de adiposidade que resultou em um estado de inflamação sistêmica.

Palavras chaves: dieta hiperlipídica, prole F1, síndrome metabólica, inflamação, adipocinas.

ABSTRACT

Consumption of a high fat diet (H) during mating, pregnancy and lactation is associated with cardiometabolic changes in F1 offspring. The aim of this study was to evaluate the effect of maternal hyperlipidic diet on the induction of cardiometabolic disorders characteristic of metabolic syndrome in F1 male offspring. Ninety-day-old Fischer rats were mated and submitted to the diet control (C) or the diet H. After weaning, the rats were submitted to the diet C and divided into two groups: offspring of the parents who received diet H (F1HM, n = 8) and received diet C (F1CM, n = 7). After 90 days, abdominal aortic artery and femoral vein cannulation surgery was performed to record mean arterial pressure (MAP, mmHg) and heart rate (HR, bpm), euthanasia and collection of plasma, organs and tissues and stored at - 80°C for future analysis. Nutritional, biometric, biochemical, hepatic, hemodynamic parameters and inflammatory markers were evaluated. It was considered as significant value $P < 0.05$. The results showed that F1HM offspring had increased food intake (23 ± 0.4 g), caloric intake (80 ± 1.3 kcal), feed efficiency (0.70 ± 0.01 kcal / g) and water intake. (34 ± 0.7 mL) compared to the F1CM control groups (17 ± 0.8 g; 59 ± 2.9 Kcal; 0.60 ± 0.02 Kcal / g; 22 ± 0.3 mL, respectively). Regarding the biometric parameters, F1HM offspring presented increased body mass (324 ± 13.40 g), inguinal fat deposit (2.37 ± 0.27 g / 100g), retroperitoneal fat deposit (2.50 ± 0.11 g / 100g), epididymal fat deposit (2.20 ± 0.20 g / 100g), brown adipose tissue (0.15 ± 0.011 g / 100g) and adiposity index ($6.41 \pm 0, 52$) compared to their control groups (287 ± 6.72 g; 1.81 ± 0.07 g / 100g; 1.70 ± 0.10 g / 100g; 1.50 ± 0.20 g / 100g; 0.11 ± 0.011 g / 100g; 5.04 ± 0.40 , respectively). Regarding the biochemical parameters, F1HM offspring had increased plasma glucose levels (139 ± 2.4 mg / dL), insulin (1.51 ± 0.16 ng / mL), HOMA – IR (57.0 ± 4). , 6) and HOMA – β (259 ± 15.9) compared to their control groups (113 ± 5.4 mg / dL; 0.90 ± 0.09 ng / mL; 38.3 ± 1.9 ; 316 ± 16 , 4, respectively). In liver parameters, F1HM offspring showed increased AST (5.7 ± 0.8 U / mL) and ALT (7.6 ± 1.3 U / mL) levels compared to their control groups ($3.5 \pm 0, 6$ U / mL; 3.7 ± 0.7 U / mL, respectively). Regarding hemodynamic parameters, F1HM offspring had an increase in MAP (126.8 ± 2.6 mmHg) compared to their control group (103 ± 3.2 mmHg). Regarding the inflammatory markers, F1HM offspring had increased leptin levels (13.5 ± 2.7 ng / mL) and MCP-1 levels (36.5 ± 1.5 pg / mL) compared to their control groups (4.4 ± 1.1 ng / mL; 30.6 ± 2.03 pg / mL, respectively). Taken together, the data showed that diet H offered to mothers only during mating, pregnancy and lactation increased in the offspring (F1MH) the dietary C intake probably due to a disturbance in satiety control mechanisms, presenting an increase in the levels of plasma leptin as a function of higher adiposity. These disorders induced an increase in adiposity index which resulted in a state of systemic inflammation.

Key words: High fat diet, F1 offspring, metabolic syndrome, inflammation, adipokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental	11
Figura 2 - Marcadores inflamatórios das proles machos.....	18
Figura 3 - Parâmetros hepáticos das proles machos	19
Figura 4 - Parâmetros hemodinâmicos das proles machos	20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição das dieta	10
Tabela 2 – Parâmetros nutricionais das proles F1M.....	15
Tabela 3 – Parâmetros biométricos das proles F1M.....	16
Tabela 4 – Avaliação da resistência à insulina das proles F1M	17

LISTA DE ABREVIATURAS

AgPR – Proteína relacionada ao agouti;

ALT – Alanina aminotransferase;

α -MSH – Hormônio estimulador de melanócito;

ARC – Núcleo arqueado;

AST – Aspartato aminotransferase;

Atk – Proteína kinase;

ATP – Adenosina trifosfato;

bpm – batimentos por minuto;

C – controle

CART – Transcrito regulado pela cocaína e anfetamina;

CCA – Centro de ciência animal;

EA – Eficiência alimentar;

EPM – Erro padrão da média;

F1CM – Prole machos descendentes de genitoras que ingeriram dieta controle e que, após o desmame, também recebeu a dieta controle por 90 dias;

F1HM – Prole de machos descendentes de genitoras que ingeriram dieta hiperlipídica e que, após o desmame, recebeu a dieta controle por 90 dias;

FC – Frequência cardíaca;

g – Grama;

GJ – Glicemia de jejum;

GLUT-4 – Transportador de glicose do tipo 4;

H – Hiperlipídica;

HOMA – IR – Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina;

HOMA – β – Modelo de avaliação da homeostase da capacidade das células β ;

IA – Ingestão alimentar;

IC – Ingestão calórica;

IJ – Insulina de jejum;

IL-1 – Interleucina-1;

IL-10 – Interleucina-10;

IL-13 – Interleucina-13;

IL-4 – Interleucina-4;

IL-6 – Interleucina-6;

IR – Receptor de insulina;

IRS-1 – Substrato receptor de insulina 1;

IRS-2 – Substrato receptor de insulina 2;

JAK2 – *Janus kinase 2*;

Kcal – Quilocalorias;

Kg – Quilogramas;

M1 – Macrófagos pró-inflamatórios;

M2 – Macrófagos anti-inflamatórios;

MCP-1 – Proteína quimioatraente de monócitos 1;

mg – miligramas;

mHg – Milímetros de mercúrio;

mmol/L – Milimol/litro;

mV – milivolt;

NaCl – Cloreto de sódio;

NPY – Neuropeptídeo Y;

ObRb – Isoforma longa do receptor de leptina;

ObRs – Receptores de leptina;

°C – Graus celsius;

PAM – Pressão arterial média;

PI3K – fosfatidilinositol 3 kinase;

POMC – Pró-opiomelanocortina;

RI – Resistência à insulina

SM – Síndrome metabólica;

SNS – Sistema nervoso simpático;

STAT3 – *Signal transduces activators of transcription - 3*;

TA – Tecido adiposo;

TAB – Tecido adiposo branco;

TAG – Triacilglicerol;

TAM – Tecido Adiposo marrom;

TNF- α – Fator de necrose tumoral;

UI – microlitro;

UPC-1 – Proteína desacopladora 1.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. JUSTIFICATIVA	7
3. OBJETIVOS	8
3.1. OBJETIVOS GERAIS	8
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4. MATERIAIS E METODOLOGIA	9
4.1. ANIMAIS	9
4.2. DEFINIÇÃO DAS DIETAS	9
4.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	10
4.5. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS NUTRICIONAIS	11
4.6. CONFEÇÃO DE CÂNULAS VASCULARES	12
4.7. CANULAÇÃO E ISOLAMENTO DE ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS	12
4.8. AVALIAÇÃO DIRETA DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA	12
4.9. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	12
4.10. ANÁLISES BIOQUÍMICAS	13
4.10.1. Cálculo HOMA-IR e HOMA- β	13
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	13
5. RESULTADOS	15
5.1. PARÂMETROS NUTRICIONAIS	15
5.2. PARÂMETROS BIOMÉTRICOS	15
5.3. AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À INSULINA	16
5.4. MARCADORES INFLAMATÓRIOS	17
5.5. PARÂMETROS HEPÁTICOS	18
5.6. PARÂMETROS HEMODINÂMICOS	19
6. DISCUSSÃO	21
7. CONCLUSÃO	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

1. INTRODUÇÃO

Fatores genéticos e ambientais, incluindo interações entre genes e dietas, são responsáveis por programações no ambiente intrauterino que podem contribuir para doenças metabólicas na prole (BOURET; SIMERLY, 2006). O consumo de dieta hiperlipídica (H) promove alterações metabólicas, além de, na gestação induzir mudanças no ambiente intrauterino levando a morbidades associadas à síndrome metabólica (SM) na prole (ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005).

A SM foi descrita com essa nomenclatura pela primeira vez por Reaven (1998), conhecida também como síndrome X, é uma doença contemporânea que pode ser caracterizada pela associação de três ou mais fatores de risco, como aumento do colesterol total, da glicemia, da pressão arterial e da adiposidade. Esses fatores de risco associados, aumentam a suscetibilidade à diabetes e mortalidade devido à doenças cardiovasculares. A hipótese mais aceita para o desenvolvimento da SM é a interação entre resistência insulina (RI), inflamação e obesidade (BEZERRA; OLIVEIRA, 2013), sendo essa última considerada uma epidemia, caracterizada pela expansão do tecido adiposo (TA) (GEHRKE; PEREIRA, 2007).

O TA é subdividido em tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). Os adipócitos presentes no TAB armazenam somente uma única gota de lipídio, unilocular, que abrange todo o citosol da célula. Por outro lado, no TAM os adipócitos são multiloculares, apresentando diversas gotículas de lipídios (AHIMA; FLIER, 2000).

O TAM é responsável pela geração de calor por meio da oxidação lipídica, um processo conhecido como termogênese (CHOE e cols., 2016; DE CASTRO BARBOSA e cols., 2016). Esse tecido é encontrado em roedores e em humanos, principalmente nas regiões cervicais e interescapulares durante todos os estágios da vida. Em adultos, encontra-se em menor quantidade, porém, possui importância no controle do metabolismo energético através da termogênese, característica que pode influenciar positivamente no controle da obesidade (CHECHI; NEDERGAARD; RICHARD, 2014). Tal característica é observada devido à presença da proteína desacopladora 1 (UCP-1), presente em mitocôndrias nos adipócitos do TAM.

O TAB, por sua vez, é um órgão com funções autócrina, parácrina e endócrina (GOLLISCH e cols., 2009). É composto por adipócitos, uma matriz extracelular, vasos sanguíneos, nervos e vários outros tipos de células, incluindo pré-adipócitos, células

estaminais e células imunitárias (KALUPAHANA; MOUSTAID-MOUSSA; CLAYCOMBE, 2012). Os adipócitos são as únicas células especializadas no armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerol em seu citoplasma. Essas células possuem todas as enzimas e proteínas reguladoras necessárias para síntese de ácido graxo, a partir das lipoproteínas circulantes, quilomícrons e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), para síntese de lipídeos (lipogênese) e para mobilização de lipídeos estocados (lipólise) (AHIMA; FLIER, 2000).

O TAB é dividido em depósito de gordura subcutâneo e visceral com diferenças na organização estrutural, tamanho celular e função biológica. O depósito de gordura visceral é o componente que apresenta maior efeito deletério sobre os parâmetros metabólicos e hemodinâmicos (JENSEN, 2002). A sua localização anatômica, entre os órgãos, e o excesso desse depósito leva ao acúmulo de lipídios no fígado, músculo esquelético e, potencialmente, no cérebro e nas células- β pancreáticas. Como consequência, ocorre diminuição da ação da insulina nesses tecidos. Além disso, o depósito de gordura visceral apresenta distribuição diferenciada em relação ao sexo, sendo que os homens apresentam maior proporção em relação às mulheres (LÉ; WAJCHENBERG, 2000).

O depósito de gordura subcutâneo, localizado entre a pele e os músculos, é principal responsável pela produção de adipocinas, como a leptina, proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) e adiponectina. A leptina está relacionada com o controle da ingestão alimentar e gasto energético por meio da regulação do sistema nervoso central. Por sua vez, a expressão de MCP-1 é proporcional à massa adiposa, o que contribui para a infiltração de macrófagos. No entanto, a adiponectina apresenta oposição a leptina e ao MCP-1, apresentando níveis diminuídos em casos de obesidade (GONZAGA DA CUNHA; GONZAGA DA CUNHA; MACHADO, 2014).

Em ratos o TA, assim como em humanos é dividida em TAB e TAM, com as mesmas funções. Apresenta três depósitos de gordura morfológicamente distintos, a subcutâneo (inguinal), visceral (epidídimo e retroperitoneal) e o mesentérico (CATALANO; STEFANOVSKI; BERGMAN, 2010).

A expansão da massa adiposa pode ser caracterizada pelo aumento do número de adipócitos, denominado hiperplasia ou adipogênese, e/ou pelo aumento da área do adipócito, hipertrofia (CÉSAR FARIAS DE QUEIROZ e cols., 2009). A adipogênese é o processo de diferenciação do TA, caracterizado pela conversão de pré-adipócitos em adipócitos maduros. Ocorre a partir de células-tronco, com início ainda na fase fetal e, principalmente, durante o período pós-natal precoce. Para que ocorra a adipogênese, é preciso o estímulo de fatores

associados à regulação do metabolismo lipídico e vias de anabolismo (AMARAL, 2017; KIRKLAND e cols., 1994).

A hipertrofia pode ser caracterizada por um quadro de hipóxia devido ao crescimento inadequado da rede vascular quando os vasos sanguíneos se tornam rarefeitos, o que leva a uma cascata de resposta inflamatória (FARIAS, 2016). A hipóxia causada pela hipertrofia do TAB favorece a infiltração de células imunes e citocinas pró-inflamatórias. Esse quadro é agravado pelo aumento da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) (LI e cols., 2018) que recruta macrófagos polarizando-os em direção a um estado M1, atuando na manutenção da inflamação ((HUME, 2015; SAHA; SHALOVA; BISWAS, 2017)

A MCP-1 está envolvida em diversos processos biológicos e sua desregulação está associada a distúrbios metabólicos como a obesidade (LI e cols., 2018; OUCHI e cols., 1999). A MCP-1 é uma citocina pró-inflamatória da família das beta-quimiocinas ou quimiocinas CC, que estimula principalmente o recrutamento de monócitos, mas também os basófilos, eosinófilos, linfócitos-T e as células *natural killer* (PALOMINO; MARTI, 2015; PANEE, 2012). Os níveis plasmáticos de MCP-1 têm relação positiva com níveis de leptina circulante. Como resultado, ocorre acúmulo de macrófagos no TAB desencadeando a regulação de genes pró-inflamatórios, sugerindo, assim, um efeito pró-inflamatório da leptina em níveis acima do limiar fisiológico (HOFFMANN e cols., 2019).

A leptina é um peptídeo produzido predominantemente no depósito de gordura subcutâneo (PARK; AHIMA, 2015), sendo um potente regulador da ingestão de alimentos e do gasto energético por meio de ação central e periférica (LIMA, FÁBIO BESSA; CURI, 2012). A sua expressão é controlada por diversas substâncias, como a insulina, os glicocorticóides e as citocinas pró-inflamatórias (ROMERO; ZANESCO, 2006). A leptina mantém a homeostase energética por ajustar a ingestão calórica ao gasto energético, transpondo a barreira hematoencefálica, onde atua principalmente no hipotálamo, mais especificamente no núcleo arqueado através de um receptor de membrana específico, estimulando a síntese de pró-opiomelanocorticotropina (POMC). Este composto é precursor do hormônio estimulador de melanócito α , que possui propriedade anorexígena e a produção do fator de transição cocaína-anfetamina dependente (CART). O estímulo desses neurônios pela leptina leva a diminuição do consumo alimentar (LIMA, FÁBIO BESSA; CURI, 2012).

Em outro grupo de neurônios, a leptina age inibindo o neuropeptídeo Y (NPY) e a proteína relacionada ao agouti (AgPR), que são orexigênicos ou seja, aumentam a ingestão de alimentos (CONE, 2005; PE MARGIOTTA e cols., 2016). Nesse caso, a leptina desencadeia seus efeitos através de ligação a receptores específicos do tipo ObRs, os quais pertencem à

família dos receptores de citocina de classe I que se encontram espalhados pelo sistema nervoso central e tecidos periféricos, como músculo, fígado e TA. O ObRb é o receptor mais estudado e o único que contém um domínio intracelular capaz de transmitir o sinal de ligação com a leptina dentro da célula. A ativação do ObRb pela leptina leva a uma cascata formada por diversas vias de transdução de sinal, como a via JAK2 (*Janus kinase-2*) e STAT3 (*Signal Transducers Activators of Transcription-3*) (FARR; GAVRIELI; MANTZOROS, 2015; GAO; HORVATH, 2008).

A hiperleptinemia é atribuída às alterações no receptor de leptina ou a uma deficiência em seu sistema de transporte na barreira hematoencefálica, fenômeno denominado resistência à leptina (PE MARGIOTTA e cols., 2016; ROMERO; ZANESCO, 2006). A hiperleptinemia promove estresse oxidativo, produção de mediadores inflamatórios, recrutamento de monócitos e expressão de moléculas de adesão pelo endotélio vascular que podem levar à disfunção endotelial (MÜNZBERG; MORRISON, 2015). Os níveis de leptina e de adiponectina exibem correlações opostas no quadro de SM (AL-HAMODI e cols., 2014; MANTOVANI e cols., 2016).

A adiponectina induz a oxidação de gorduras, diminuindo triacilglicerol (TAG) em nível hepático e muscular, aumenta a sensibilidade à insulina, além de possuir ação anti-inflamatória, resultante da diminuição da produção de interleucina 6 (IL-6), com consequente indução da produção de interleucina 10 (IL-10), e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) (COSTA; DUARTE, 2006). Seu potencial antiaterogênico foi reconhecido por sua capacidade de modular a resposta inflamatória e de afetar os principais mecanismos envolvidos na aterogênese (OUCHI e cols., 2000). Os níveis circulantes de adiponectina sugerem uma relação inversamente proporcional ao depósito de gordura visceral e aos níveis de colesterol.

A hipoadiponectinemia plasmática tem sido associada à obesidade, SM, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia e hipertensão arterial, sendo atribuída em grande parte à RI (IWASHIMA e cols., 2004; KAZUMI e cols., 2004; WEYER e cols., 2001), ao processo redox, à atividade do sistema nervoso simpático (SNS), citocinas pró-inflamatórias e aumento da lipólise (KAMIGAKI e cols., 2006; KIM e cols., 2005; YAMAUCHI; KAMON; ITO, 2003). Ouchi e colaboradores (2011) mostraram que pacientes obesos e com diabetes tipo 2 apresentam aumento das vias inflamatórias e consequentemente redução nos níveis de adiponectina.

A insulina é um polipeptídeo e sua secreção é estimulada por substratos energéticos metabolizáveis pelas células- β pancreáticas (HABER e cols., 2001). A insulina regula a

homeostase de glicose, reduz a produção hepática e promove diminuição da gliconeogênese e glicogênese, aumentando a captação periférica de glicose, principalmente no TA e músculo esquelético. Além de estimular a lipogênese no fígado, nos adipócitos e reduzir a lipólise, promove, ainda, aumento da síntese proteica (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

A captação de glicose no TA, fígado e músculo esquelético se inicia com a sinalização da insulina ao seu receptor (IR) específico de membrana, uma proteína com atividade quinase intrínseca, contendo duas subunidades alfa e duas subunidades beta. A ligação da insulina à subunidade α leva a atividade cinase da subunidade β , seguido pela autofosforilação dos resíduos de tirosina da subunidade β e um maior aumento na atividade cinase. A cinase do IR fosforila os resíduos de tirosina do IRS-1 (substrato do receptor de insulina 1) e IRS-2 (substrato do receptor de insulina 2). Quando os resíduos de tirosina do IRS-1-2 são fosforilados, os IRS se ligam à PI3K (fosfoinosítídeo 3-quinase), ativando-a. A PI3K converte o seu substrato, PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bifosfato), no mensageiro lipídico PIP3 (fosfatidilinositol 3,4, 5 – trifosfato). O PIP3 então liga-se a Akt (proteína quinase B) e permite que duas outras cinases *phosphoinositide-dependent kinase 1* (PDK1) e *mTOR complex 2* (mTORC2) fosforile e ativem a Akt (FREITAS; CESHINI; RAMALLO, 2014). A Akt é uma importante efetora da resposta à insulina e seus substratos medeiam diretamente muitos dos efeitos metabólicos da insulina. O substrato da Akt, GSK-3 (glicogênio sintase-quinase-3), que participa da regulação da síntese do glicogênio. A Akt, ativada pela insulina, fosforila a GSK-3 no sítio inibitório Ser9, levando a estimulação da síntese de glicogênio. Então a insulina fosforila a GSK-3 e a inativa (GONZALEZ; MCGRAW, 2006).

A RI é um estado no qual os tecidos sensíveis à insulina (tecido adiposo, fígado e músculo esquelético) manifestam uma falha na resposta a níveis circulantes normais do hormônio insulina, gerando como mecanismo compensatório o aumento da produção desta pelas células- β pancreáticas, o que resulta em hiperinsulinemia (DOMINICI e cols., 2014). Defeitos da ação da insulina nos tecidos-alvo levam ao aumento do processo inflamatório crônico de baixa intensidade que está presente na SM (VOLP e cols., 2008).

O processo inflamatório prejudica a hiperplasia e dificulta a ação da insulina nos adipócitos durante o desenvolvimento da hipertrofia e hipóxia. Tal processo está associado à lipólise elevada e aumento da liberação de ácidos graxos livres, levando à deposição de gordura ectópica em outros tecidos, como o fígado (ARENDETT e cols., 2013). O aumento das concentrações séricas das enzimas hepáticas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), consideradas marcadores de lesão hepática, tem sido evidenciado como importante preditor para o desenvolvimento da SM (LEE e cols., 2007; XIA e cols.,

2011). O aumento da concentração sérica das enzimas citadas está correlacionado com fatores de risco cardiovascular, incluindo níveis séricos de TAG, colesterol total, níveis plasmáticos de glicose e pressão arterial sistólica e diastólica (PESSOA e cols., 2015).

A hipertensão arterial é causada pelo aumento da atividade do SNS, do sistema renina angiotensina, da atividade do eixo hipófise-adrenal e da RI que são alterações observadas na SM (LOPES, 2005). As alterações inflamatórias contribuem para a remodelação vascular, crescimento celular, extravasamento de leucócitos, aumento do estresse oxidativo, produção de citocinas, ativação de células imunes e pró-inflamatórias que estão envolvidas na hipertensão arterial (ANDRADE; SANTOS; VILELA-MARTIN, 2014).

Os distúrbios metabólicos têm se mostrado um crescente problema de saúde na sociedade moderna, com a prevalência da SM atingindo proporções epidêmicas (FERREIRA LOPES BRENT EGAN; FERREIRA LOPES, 2006). Além do grande número de jovens e adultos que vêm sendo diagnosticados com a SM, a quantidade de mulheres em idade reprodutiva expostas a padrões alimentares com predomínio de dietas ricas em gorduras chama atenção para as possíveis consequências metabólicas em relação as próximas gerações (FLEGAL e cols., 2012).

Considerando todo o exposto e visto que o consumo de dieta hiperlipídica pela mãe no período de acasalamento, gestação e lactação pode propiciar alterações metabólicas e desencadear doenças como a SM na prole, o presente estudo visa avaliar os efeitos cardiometabólicos nas proles de ratas submetidas à dieta hiperlipídica, sobretudo no que diz respeito às alterações ocorridas na resposta inflamatória.

2. JUSTIFICATIVA

A gestação e o início da vida pós-natal são períodos de tempo críticos que podem afetar o crescimento e o desenvolvimento da prole. A nutrição materna tem sido descrita como um fator determinante para a saúde da prole, afetando diretamente a programação fetal, prejudicando o desenvolvimento de vários órgãos e tecidos, por determinar respostas fisiológicas permanentes que levam ao desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta.

Contribuir para o tratamento e também para evitar os distúrbios cardiovasculares e metabólicos, além de subsidiar a criação de estratégias preventivas e terapêuticas, reforçando a necessidade de medidas para promoção de práticas alimentares saudáveis durante o período de gestação.

No presente estudo esperamos ampliar o entendimento acerca de como fatores ambientais, especialmente a dieta H das genitoras somente no período de acasalamento, gestação e lactação, pode afetar os parâmetros nutricionais da geração (F1), além de induzir alterações no TAB, uma vez que essas mudanças nutricionais e metabólicas podem aumentar o risco de inflamação e predispor a prole a SM.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica materna na indução de distúrbios cardiometabólicos característicos da síndrome metabólica nas proles machos F1.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica ofertada às genitoras nas proles machos F1 macho sobre:

- Parâmetros nutricionais (ingestão alimentar, ingestão calórica, ingestão de água e eficiência alimentar);
- Peso relativo do fígado, tecido adiposo branco (inguinal, retroperitoneal, epididimal) e tecido adiposo marrom;
- Massa corporal, índice de Lee e índice de adiposidade;
- Glicemia, níveis de insulina, HOMA – IR e HOMA – β ;
- Pressão arterial média e frequência cardíaca;
- Níveis de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT);
- Níveis plasmáticos de leptina, MCP-1 e de adiponectina.

4. MATERIAIS E METODOLOGIA

4.1. Animais

Com intuito de obter proles, foram utilizados machos e fêmeas *Fischer*, todos com 90 dias de idade, para que pudessem ser acasalados. As proles machos foram utilizadas para experimentação com 90 dias após nascimento. Os animais permaneceram em gaiolas de polipropileno (30 cm x 21 cm x 19 cm) com no máximo cinco animais e no ciclo claro-escuro 12h – 12h no Centro de Ciência Animal da UFOP (CCA/UFOP), com livre acesso à água e à dieta. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Ética em Cuidados de Animais Experimentais. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética animal da Universidade Federal de Ouro Preto com protocolo de nº 2016/49 (Anexo A).

4.2. Definição das Dietas

Após os 90 dias de idade, durante o período de acasalamento, gestação e lactação, as genitoras foram submetidos à dieta controle (C) AIN-93M ou à dieta hiperlipídica (H) do fornecedor Pragsoluções®, que contém 37% de banha de porco. A prole do presente estudo recebeu apenas a dieta C após o desmame. A composição das dietas está descrita na tabela abaixo:

Tabela 1 – Composição das dieta (g/100g) AIN-93M e Hiperlipídica Pragsoluções®

Ingredientes (g/Kg)	AIN-93M	Hiperlipídica
Amido de milho	620,70	-
Sacarose	100,00	-
Frutose	-	34,2
Caseína	140,00	180,50
Leite condensado	-	316,00
Óleo soja	40,00	-
Banha	-	370,00
Fibra (celulose)	50,00	50,00
Farelo de trigo	-	-
Mix mineral (AIN-93G-MX)*	-	35,00
Mix mineral (AIN-93M-MX)*	35,00	-
Mix vitamínico (AIN-93G-VX)*	10,00	10,00
DL- Metionina	1,80	3,00
Cloreto de colina	2,50	2,50
Macronutrientes (% Kcal)		
Proteína	14,72	15,60
Carboidrato	75,82	15,92
Gordura	9,46	68,48
Saturada	15,20	28,09
Monoinsaturada	23,30	28,46
Poliinsaturada	60,00	8,87
Kcal/g	3,80	5,20
Kg/g	15,91	21,77

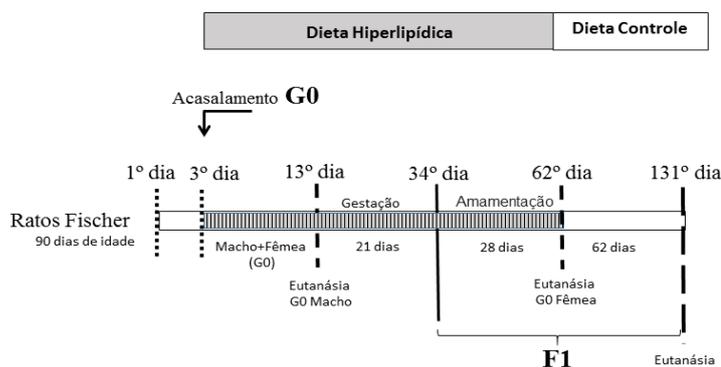
Composição das dietas (g/100g) oferecidas aos animais. A porcentagem de Kcal foi calculada com base nas calorias fornecidas pelos macronutrientes considerados individualmente, sendo: carboidratos 4 Kcal/g; proteínas 4 Kcal/g; e lipídios 9 Kcal/g. A porcentagem de gorduras poliinsaturadas, monoinsaturadas e saturadas foi calculada de acordo com a quantidade total de lipídeos (g) fornecida em cada dieta.

4.3. Protocolo Experimental

Para o período de acasalamento (10 dias), uma fêmea e um macho virgens (animais G0/progenitoras), com 90 dias de idade, foram alocados em gaiolas de polipropileno e divididos em grupos de animais que consumiram dieta H e outro grupo que consumiram dieta C. Após esse período, os machos foram retirados e as fêmeas foram realocadas em gaiolas individuais e continuaram a receber a dieta H ou C durante o período de gestação (21 dias) e lactação (28 dias), atentando-se aos cuidados para evitar a consanguinidade entre os grupos.

Após o nascimento, as ninhadas foram manipuladas de maneira que foram mantidos até oito filhotes por genitora, a fim de garantir crescimento homogêneo daqueles. Logo após o término do período de lactação, dividiu-se a prole macho em dois grupos: um oriundo das genitoras que receberam a dieta C, e outro proveniente de genitoras que receberam a dieta H. Estes animais foram realocados em gaiolas coletivas (3 a 5 animais por gaiola) e receberam dieta C até completar os 90 dias de idade.

Figura 1 – Delineamento experimental



Adaptado de BARBOSA e cols., 2019.

4.4. Definição dos Grupos

F1CM – Proles de machos descendentes de genitoras que ingeriram a dieta C e que, após desmame, consumiram a dieta C por 90 dias;

F1HM – Proles de machos descendentes de genitoras que ingeriram a dieta H e que, após desmame, consumiram a dieta C por 90 dias.

4.5. Avaliação dos Parâmetros Nutricionais

As informações a respeito da ingestão alimentar (IA) e do consumo de água foram coletadas a partir da aferição do peso das dietas e medição do volume de água restante consumido em cada gaiola duas vezes por semana. Posteriormente, foi calculado o consumo médio de dieta e de água por animal. A ingestão calórica (IC) foi calculada através da fórmula: IA x Kcal fornecida por dieta. A eficiência alimentar (EA) foi calculada pela relação da variação ponderal do animal (diferença entre o peso final e o peso inicial) com a IC (MARTINS e cols., 2015; OLIVEIRA JUNIOR e cols., 2013).

4.6. Confeção de Cânulas Vasculares

Cânulas foram confeccionadas com 4 cm (arterial) ou 2 cm (venosa) de tubos de polietileno (PE 10), polimerizados por aquecimento a 17 cm de tubos de PE 50. O interior das cânulas foi preenchido com uma solução salina (NaCl, 0,9%) e a extremidade livre de PE 50 foi fechada com um ocluser metálico.

4.7. Canulação e Isolamento de Artéria e Veia Femorais

Para registro dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de quetamina (80mg/Kg) com xilazina (7mg/Kg). Em seguida, realizou-se uma pequena incisão na pele, separando a musculatura para localização do feixe vâsculo-nervoso femoral. As cânulas foram introduzidas na aorta abdominal, via artéria femoral, e na veia cava inferior através da veia femoral, para administração de drogas. Posteriormente, as mesmas foram amarradas junto ao feixe com fio cirúrgico.

4.8. Avaliação Direta da Pressão Arterial Média

Finda às 48 horas de recuperação da cirurgia para implantação das cânulas, foi injetada na cânula arterial 0,1 mL de uma solução de heparina em salina isotônica (1000 UI/mL) (pela extremidade do PE50 exteriorizada) para evitar a formação de coágulos durante o registro.

Os dados da PAM foram monitorados pelo transdutor de pressão e pré-amplificados por um pré-amplificador (BridgeAmp). Os dados analógicos foram convertidos a variáveis discretas por um conversor analógico para digital (ADInstrumentsPtyLtd, Austrália) e registrados pelo software LabChart 7 for Windows e gravados em arquivos individuais para cada animal. A amplitude (resolução espacial) da janela de digitalização foi configurada para 20 mV e os dados foram digitalizadas com resolução temporal de 1ms (1000 Hz).

4.9. Avaliação dos Parâmetros Biométricos

Durante o protocolo experimental, todos os animais foram pesados duas vezes por semana. Ao final do experimento, foram realizadas as medidas do comprimento naso-anal para cálculo do índice de Lee, indicado pela equação: $[\text{peso corporal (g)}^{1/3}/\text{comprimento naso-anal (cm)} \times 1000]$ (LEE, 1929; MORAES-SILVA e cols., 2013). Posteriormente, foi realizada a eutanásia dos animais. Fígado, tecido adiposo branco e marrom foram retirados e o peso úmido e relativo (g/100g de rato) avaliados. Para avaliação dos depósitos corporais de gordura em ratos, utilizou-se o índice de adiposidade, que engloba a massa dos depósitos de gordura

retroperitoneal, inguinal e epididimal a partir da fórmula: [massa absoluto (g) dos depósitos de gordura inguinal + retroperitoneal + epididimal) / massa do rato (g)] x100] (COX; LAUGHTON; POWLEY, 1985; LEVIN, 1992).

4.10. Análises Bioquímicas

Após a eutanásia, foram coletadas amostras de sangue (2 a 3mL) dos ratos submetidos ao jejum noturno (12 horas). Em seguida, essas amostras foram centrifugadas (8000 g; 4° C; 6 min) para a separação do soro para dosagens dos níveis de glicose e atividade sérica de ALT e AST. O plasma foi aliquoteado e guardado a -80°C, para realização das análises bioquímicas determinados por método colorimétrico utilizando kits comerciais individuais (Labtest, Lagoa Santa – MG, Brasil), de acordo com as instruções do fabricante.

Os níveis de insulina, leptina, MCP-1 e adiponectina foram determinados pelo método de imunoenensaio do tipo Elisa sanduíche utilizando os kits. O princípio desta dosagem e o protocolo estão descritos detalhadamente nos anexos B, C, D e E.

4.10.1. Cálculo HOMA-IR e HOMA-β

Para cálculo das variáveis que estimam a resistência à insulina, no presente estudo foram utilizadas as seguintes fórmulas (MATTHEWS e cols., 1985):

HOMA-IR – Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina:

$$\text{HOMA IR} = (\text{IJ} \times \text{GJ}) / 22,5$$

HOMA-β – Modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células

β:

$$\text{HOMA-}\beta = (20 \times \text{IJ}) / (\text{GJ} - 3,5)$$

Onde:

IJ = insulina de jejum em um/L

GJ = glicemia de jejum em mmol/L

4.11. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo software *GraphPad Prism 6 for Windows*, (San Diego, CA, EUA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste *Shapiro-Wilk*. A análise de dados paramétricos foi realizada utilizando o teste *t não pareado* e os dados foram apresentados como a média ± erro padrão da média. A análise de dados não

paramétricos foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney* e os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média. O nível de significância foi previamente fixado em $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Parâmetros Nutricionais

Os parâmetros nutricionais são relativos às proles machos (F1HM e F1CM) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de genitoras que consumiram dieta H ou C durante o acasalamento, gestação e lactação. Tais parâmetros foram obtidos através da mensuração da ingesta alimentar, ingesta calórica e ingesta de água.

Conforme apresentado na tabela 2, os animais descendentes de genitoras que consumiram dieta H (F1HM) apresentaram aumento ($P < 0,05$) na ingestão alimentar, ingestão calórica e ingestão de água e da eficiência alimentar comparado aos animais que consumiram dieta C (F1CM).

Tabela 2 – Parâmetros nutricionais das proles F1M

Parâmetros	F1CM	F1HM
Ingestão alimentar (g)	17 ± 0,8	23 ± 0,4*
Ingestão calórica (kcal)	59 ± 2,9	80 ± 1,3*
Ingestão de água (mL)	22 ± 0,3	34 ± 0,7*
Eficiência alimentar (kcal/g)	0,60 ± 0,02	0,70 ± 0,01*
N	7	8

Parâmetros nutricionais das proles machos (F1HM e F1CM) que consumiram dieta controle (C) após desmame até 90 dias de idade, oriundos de genitoras que consumiram dieta hiperlipídica (H) ou C. * $P < 0,05$ comparado ao grupo F1CM (teste *t*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Ingestão alimentar (g) e ingestão de água (mL) obtida através da média de consumo alimentar por grupo grupo por dia. Ingestão calórica (Kcal) obtida através da fórmula: IA x 3,5 Kcal. Eficiência alimentar (Kcal/g) obtida através da fórmula: Variação da massa corporal / ingestão calórica média. n= número de animais.

5.2. Parâmetros Biométricos

Com o objetivo de avaliar os parâmetros biométricos, foram mensuradas a massa corporal, a massa relativa dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, epididimal, do TA marrom, da massa do fígado, do índice de Lee e do índice de adiposidade, relativos às proles machos (F1HM e F1CM) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias

de idade, oriundos de genitoras que consumiram dieta H ou C durante o acasalamento, gestação e lactação.

Segundo apresentado na tabela 3, os animais provenientes de genitoras que consumiram dieta H (F1HM) tiveram aumento ($P < 0,05$) da massa corporal, dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal e epididimal, do TAM e do índice de adiposidade, quando comparado aos animais provenientes de genitoras que consumiram dieta C (F1CM). Não houve diferença significativa no índice de Lee.

Tabela 3 – Parâmetros biométricos das proles F1M

Parâmetros	F1CM	F1HM
Massa corporal (g)	287 ± 6,72	324 ± 13,40*
Depósito de gordura inguinal (g/100g)	1,81 ± 0,07	2,37 ± 0,27*
Depósito de gordura retroperitoneal (g/100)	1,70 ± 0,10	2,50 ± 0,11*
Depósito de gordura epididimal (g/100)	1,50 ± 0,20	2,20 ± 0,20*
TA marrom (g/100)	0,11 ± 0,011	0,15 ± 0,011*
Índice de Lee	0,30 ± 0,004	0,29 ± 0,006
Adiposidade	5,04 ± 0,40	6,41 ± 0,52*
N	4-7	5-8

Parâmetros biométricos das proles machos (F1HM e F1CM) que consumiram dieta controle (C) após desmame até 90 dias de idade, oriundos de genitoras que consumiram dieta hiperlipídica (H) ou C. * $P < 0,05$ comparado ao grupo F1CM (teste *t* ou *Mann-Whitney*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Peso relativo (g/100g da massa corporal do rato) de tecidos; cálculo do índice de Lee [massa corporal (g)/1/3 /comprimento naso-anal (cm) x 1000]; cálculo de adiposidade [Massa absoluta (g) dos depósitos de gordura inguinal + retroperitoneal + epididimal/ da massa corporal do rato (g) x 100]. n= número de animais. TA = tecido adiposo.

5.3. Avaliação da Resistência à Insulina

Para avaliação da resistência à insulina mensurou-se a glicemia, os níveis de insulina, o HOMA-IR e o HOMA- β relativos às proles machos (F1HM e F1CM) provenientes de genitoras que consumiram dieta H ou C durante o acasalamento, gestação e lactação e que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade.

Conforme tabela 4, os ratos oriundos de genitoras que consumiram dieta H (F1HM) apresentam aumento ($P < 0,05$) da glicemia, dos níveis de insulina e do o HOMA - IR e

diminuição do HOMA- β quando comparado aos animais provenientes de genitoras que consumiram dieta C.

Tabela 4 – Avaliação da resistência à insulina das proles F1M

Parâmetros	F1CM	F1HM
Glicemia (mg/dL)	113 \pm 5,4	139 \pm 2,4*
Insulina (ng/mL)	0,90 \pm 0,09	1,51 \pm 0,16*
HOMA- IR	38,3 \pm 1,9	57,0 \pm 4,6*
HOMA- β	316 \pm 16,4	259 \pm 15,9*
N	7	8

Avaliação da resistência à insulina das proles F1 machos (F1CM E F1HM) que consumiram dieta controle (C) após desmame até 90 dias de idade, oriundos de genitoras que consumiram dieta hiperlipídica (H) ou C. *P<0,05 comparados ao grupo F1CM (teste *t* ou *Mann-Whitney*). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA - IR) = insulina jejum (IJ) x glicose jejum (GJ)/22,5. Modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células β (HOMA β)= (20 x IJ)/ (GJ x 3,5). n= número de animais.

5.4. Marcadores inflamatórios

Para avaliação dos marcadores inflamatórios, foram analisados, por meio de teste sorológico (ELISA), os níveis plasmáticos de leptina, de MCP-1 e de adiponectina relativos aos animais oriundos de genitoras que consumiram dieta H ou C durante o acasalamento, gestação e lactação e que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade.

Conforme apresentado na figura 2, os animais F1HM, provenientes de genitoras que consumiram dieta H apresentaram aumento (P<0,05) nos níveis leptina (13,5 \pm 2,7; N=4) e MCP-1 (36,5 \pm 1,5; N=6) em comparação aos animais F1CM (4,4 \pm 1,1, N=5; 30,6 \pm 2,03, N=7, respectivamente), oriundos de genitoras que consumiram dieta C. Não foram observados valores significativos nos níveis e adiponectina (697,5 \pm 64,11 N=4; 623,9 \pm 114,7 N=4).

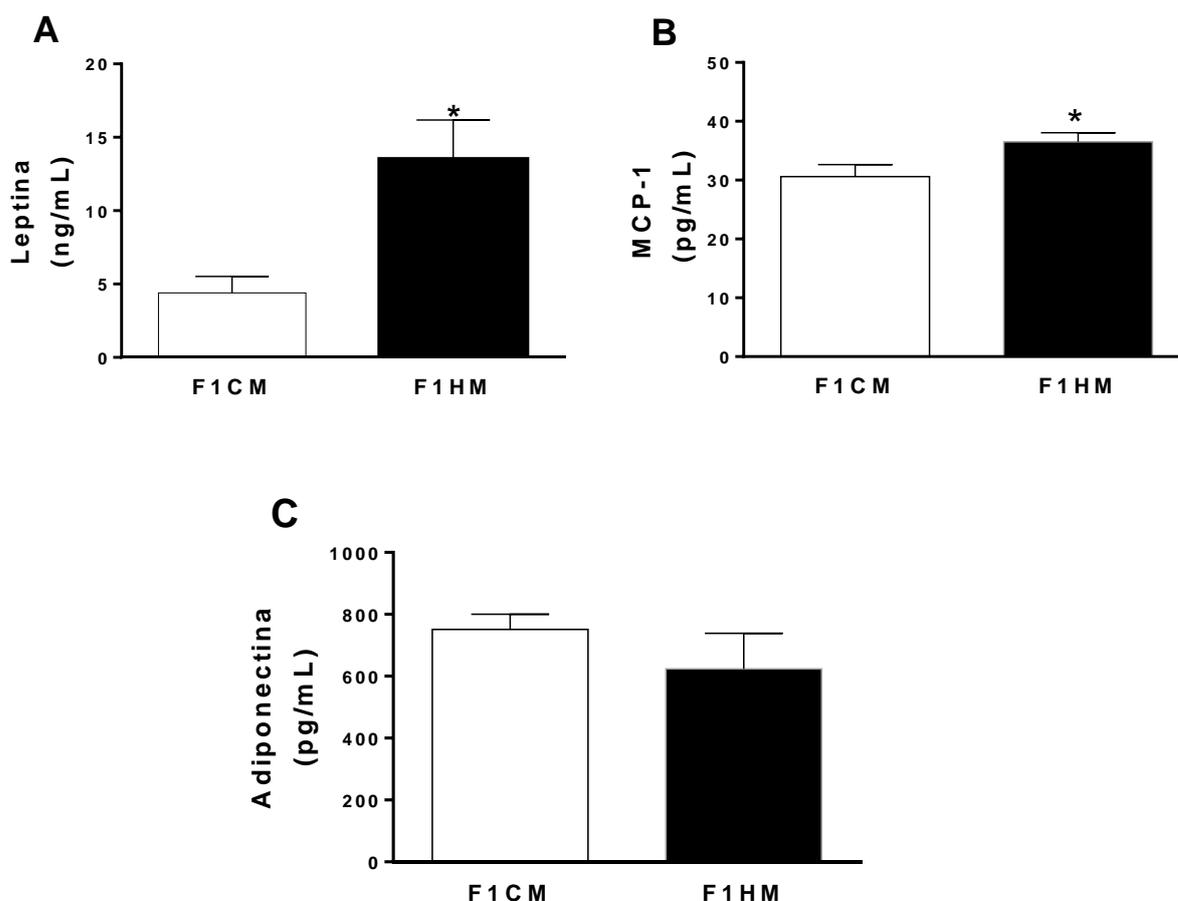


Figura 2 - Marcadores inflamatórios das proles machos (F1HM e F1CM) leptina (ng/mL, n= 4,5; painel A), MCP-1 (pg/mL, n= 6,7; painel B) e adiponectina (pg/mL, n= 4,4; painel C) que consumiram dieta controle (C) após desmame até 90 dias de idade, oriundos de genitoras que consumiram dieta hiperlipídica (H) ou C. *P<0,05 comparado ao grupo F1CM (teste t). Valores expressos como média + erro padrão da média. n = número de animais

5.5. Parâmetros Hepáticos

Para avaliação do dano hepático, foram analisados os níveis de AST e os níveis de ALT, relativos às proles machos oriundas de genitoras que consumiram dieta H ou C durante acasalamento, gestação e lactação e que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade.

De acordo com a figura 3, os animais F1HM, oriundos de genitoras que consumiram dieta H apresentaram aumento (P<0,05) nos níveis de AST ($5,7 \pm 0,8$; N=7) e nos níveis de ALT ($7,6 \pm 1,3$; N=8) comparado aos animais F1CM ($3,5 \pm 0,6$, N=8; $3,7 \pm 0,7$, N=6, respectivamente), provenientes de genitoras que consumiram dieta C. Não foi observada diferença significativa em relação à massa do fígado ($9,4 \pm 0,4$ N=7; $10,7 \pm 0,6$ N=5).

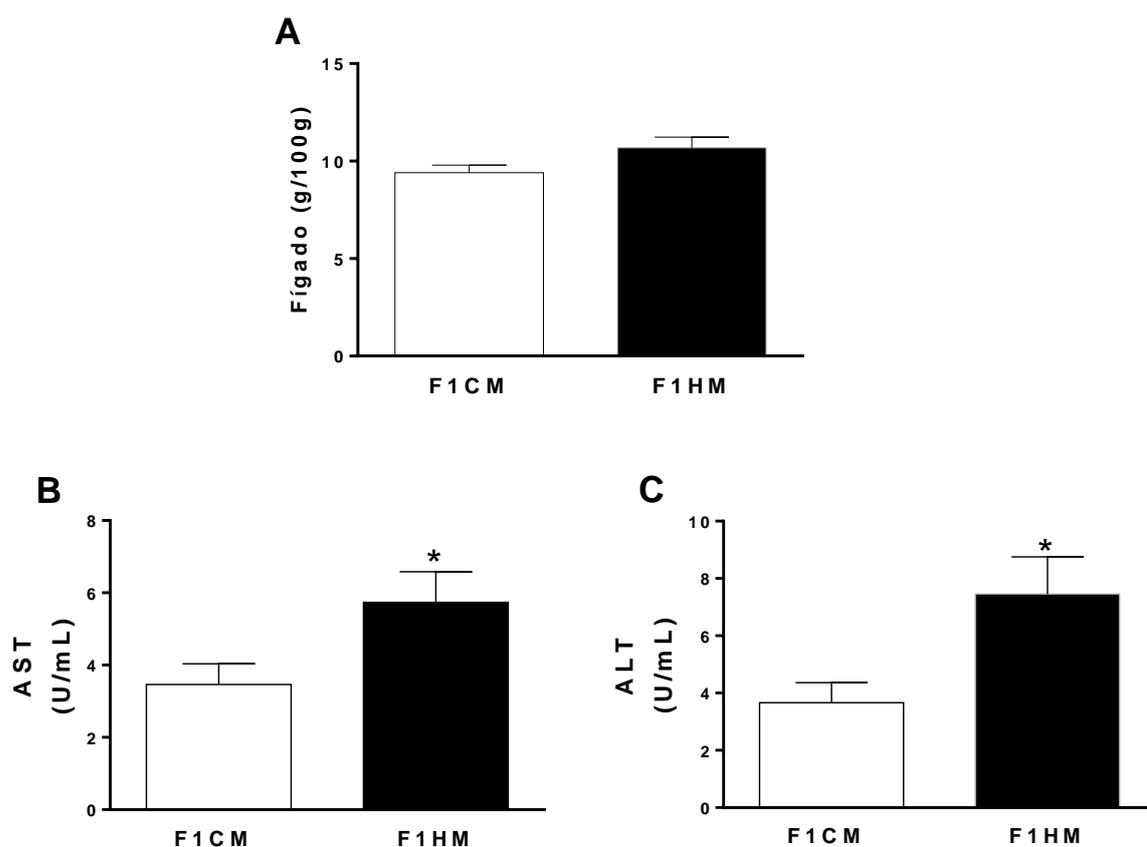


Figura 3 - Parâmetros hepáticos das proles machos (F1CM E F1HM) de AST (U/mL, n= 6,8; painel B) e de ALT (U/mL, n = 8,7; painel C) que consumiram dieta controle (C) após desmame até 90 dias de idade, oriundos de genitoras que consumiram a dieta hiperlipídica (H) ou C. *P<0,05 comparado aos grupos F1CM (teste t).

5.6. Parâmetros Hemodinâmicos

Com objetivo de avaliar os parâmetros hemodinâmicos, foram aferidas a pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm), relativas às proles machos (F1HM e F1CM) oriundas de genitoras que consumiram dieta H ou C durante o acasalamento, gestação e lactação e que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade.

Conforme apresentado na figura 4, painel A, os animais F1HM, oriundos de genitoras que consumiram dieta H apresentaram aumento ($P<0,05$) na PAM ($126,8 \pm 2,6$; $N=8$) comparado aos animais F1CM ($103,0 \pm 3,2$; $N=7$), provenientes de genitoras que consumiram dieta C. Não foi observada diferença significativa em relação à FC ($400,3 \pm 0,6$, $N=7$; $403,2 \pm 1,18$ $N=8$).

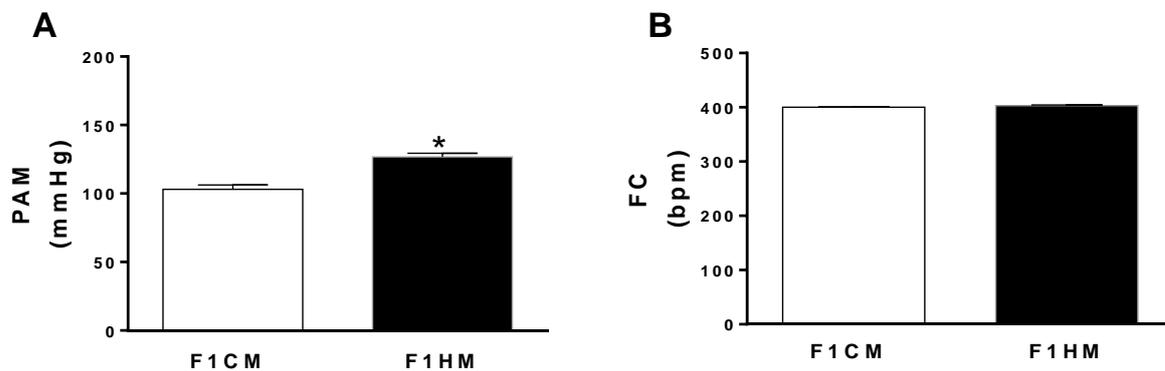


Figura 4 - Parâmetros hemodinâmicos das proles machos (F1CM e F1HM) pressão arterial média (PAM, mmHg, n= 7,8; painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, n= 7,8; painel B) que consumiram dieta controle (C) após desmame até 90 dias de idade, oriundas de genitoras que consumiram dieta hiperlipídica (H) ou C (F1CM). *P<0,05 comparado ao grupo F1CM (*teste t*). Valores expressos como média \pm erro padrão da média.

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, as proles F1HM mesmo ingerindo dieta C, apresentaram aumento dos níveis plasmáticos de leptina e um aumento na ingestão alimentar, sugerindo um distúrbio nos mecanismos de controle da saciedade, levando ao aumento no índice de adiposidade, na massa corporal, nos níveis de plasmáticos de glicemia, de insulina, MCP-1, do ALT, do AST, da PAM das proles F1HM.

Por outro lado, em um estudo anterior de nosso laboratório (BARBOSA e cols., 2019) mostrou que a dieta H, a qual foi submetida a genitora no período de acasalamento, gestação e lactação, promoveu aumento dos níveis plasmáticos de leptina, diminuição da ingestão alimentar, sugerindo eficiência no controle do centro de saciedade. Entretanto, mesmo com a diminuição da ingestão alimentar, as genitoras apresentaram aumento do TAB, da pressão arterial, dos triglicérides, dentre outros distúrbios característicos da SM.

Ainda no presente estudo, as proles F1HM apresentaram aumento da ingestão alimentar, da ingestão calórica, da ingestão de água e da eficiência alimentar mesmo consumindo dieta C durante 90 dias de idade. Nossos dados estão de acordo com estudos em que proles (85-95 dias de idade e 48 dias de idade) que consumiram dieta C oriundas de ratas Sprague-Dawley, que consumiram dieta H contendo 60% de lipídios no período de quatro semanas antes do acasalamento, no acasalamento, na gestação e na lactação (BILBO; TSANG, 2010) e no período de gestação e de lactação (KOJIMA; CATAVERO; RINAMAN, 2016), apresentaram aumento da ingestão calórica e alterações metabólicas.

De acordo com os dados obtidos, as proles F1HM apresentaram aumento do índice de adiposidade e da massa corporal. Nossos dados estão de acordo com os estudos da literatura que mostraram que proles de ratas (Sprague e Dawley e camundongos ICR), que receberam dieta H (42 a 62%) pelo período de (4,11 e 12 semanas) antes do acasalamento e durante o acasalamento, gestação e lactação – ou seja, teor de gordura e tempo da dieta muito maiores em relação a nosso presente estudo –, apresentaram aumento da massa corporal e tolerância à glicose alterada (BARBOSA e cols., 2015; MASUYAMA e cols., 2016; DESAI e cols., 2015).

Os dados do presente estudo mostram ainda que as proles F1HM apresentaram aumento dos depósitos de gordura (retroperitoneal, inguinal e epididimal) e do TAM. Estudos anteriores do nosso laboratório (DE CASTRO e cols, 2013) mostraram que o consumo de dieta H por ratos *Fischer* recém desmamados por um período de 13 semanas promoveu o

aumento do depósito de gordura visceral, bem como induziu alterações metabólicas e histológicas características da SM humana. Nossos resultados sugerem que a dieta H materna pode alterar a programação no ambiente intrauterino da prole F1HM, promovendo o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, assim como outras alterações metabólicas associadas ao aumento do tecido adiposo visceral. Estudos de Liang e colaboradores (2016), mostram que a dieta H materna com 60% de lipídios levou ao aumento do depósito do TAB e do TAM da prole pós desmame, sugerindo prejuízos na termogênese adaptativa do TAM.

Adicionalmente, no presente estudo observou-se aumento nos níveis plasmáticos de glicose, insulina e leptina. Nossos dados estão de acordo com estudos que avaliaram os efeitos da dieta H materna em ratos Sprague-Dawley com 43% de lipídios sobre os parâmetros metabólicos, apresentando aumento dos níveis plasmáticos de glicose e leptina (BARRAND e cols., 2017). Bezpalko e colaboradores (2015) avaliaram os efeitos da dieta H em ratas durante a gestação com 45% de gordura, da dieta hiperglicídica (30% sacarose) e da dieta hipercalórica (combinação dessas dietas ofertadas), observando o aumento dos níveis séricos de leptina, além do aumento da massa corporal e da massa do fígado das proles que consumiram dieta C. E, ainda, que ratos Sprague-Dawley alimentados com dieta C, que foram amamentados por genitoras que consumiram dieta H, com 60% de lipídeos durante a gestação e lactação, apresentaram resistência à leptina e isso pode ser a razão pela qual essas proles aumentaram a ingestão alimentar e apresentaram maior massa corporal (SUN e cols., 2012). Dados da literatura demonstram que a dieta materna com 62% de lipídeos durante a gestação e lactação ofertada a camundongos C57/BL6J foi capaz de promover um quadro de intolerância a glicose e resistência à insulina na prole adulta que consumiu dieta C (YOKOMIZO e cols., 2014). Assim, podemos sugerir a participação da leptina no aumento da atividade simpática e inibição do centro de saciedade.

Estudos mostram que a leptina promove a formação de circuitos neurais durante o período neonatal, os quais controlam a ingestão de alimentos e a adiposidade durante o crescimento (BOURET; SIMERLY, 2006). Reynolds e colaboradores (2010) mostraram que a alimentação hiperlipídica durante o desenvolvimento resulta em mudanças permanentes no controle do apetite e funcionamento neuroendócrino e do metabolismo energético do feto, bem como aumenta o risco de obesidade e doenças associadas na vida adulta.

Foi observado também, no presente estudo, que a prole de machos F1HM apresentou aumento nos níveis de MCP-1. Em um estudo que avaliou o efeito da dieta H materna com 60% de lipídios, desde 8 semanas antes do acasalamento até a lactação, observou-se aumento significativo nos níveis de leptina e MCP-1 na prole (LIMA e cols., 2019). Os macrófagos são

importantes estimuladores da produção de proteínas inflamatórias agudas, que contribuem com a manutenção do estado sistêmico de inflamação e RI (SPONTON, 2016). Além disso, a MCP-1 envolvidas nas primeiras fases da resposta inflamatória que culmina em aterosclerose (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007).

Ademais, o presente estudo mostrou que prole de machos F1HM apresentaram aumento das enzimas hepáticas ALT e AST quando comparado aos seus respectivos controles. Entretanto, estudo de Bouanane e colaboradores (2010) mostrou que o consumo materno de dieta H com 42% de lipídios, durante a gestação e lactação, promoveu alteração da função do fígado sem promover alterações nas enzimas hepáticas na prole de ratos obesos, indicando que a dieta não causou danos nos hepatócitos na prole de ratos Wistar que consumiram dieta C. Isso se deu provavelmente devido ao conteúdo da dieta materna que no nosso estudo foi de 68% de lipídios e 37% de banha.

Nossos dados hemodinâmicos estão de acordo com estudos de Roza (2016), que avaliou o efeito da dieta H com 60% de lipídios, durante oito semanas antes do acasalamento, no acasalamento, gestação e lactação em ratos Wistar com 16 semanas de idade que consumiram dieta C. Observou-se aumento da PAM, sugerindo que o quadro de hiperglicemia e hiperinsulinemia podem causar excitação simpática, contribuindo para o aumento PAM na prole.

No presente estudo não foram observadas diferenças significativas nos níveis plasmáticos de adiponectina na prole F1HM. Diferentemente do que demonstraram Gregoraszcuk e colaboradores (2016), que ao avaliarem os efeitos dieta H com 30% de gordura ofertada a ratas durante a gestação e a lactação, obtiveram como resultado um quadro de hipoadiponectinemia na prole fêmea de ratas Wistar após a lactação. Tal resultado provavelmente se deve ao fato das proles terem consumido apenas o leite materno.

7. CONCLUSÃO

Em conjunto, nossos dados mostraram que proles F1HM, oriundos de genitoras que consumiram dieta H somente no período de acasalamento, gestação e lactação, apresentaram distúrbios cardiometabólicos, provavelmente devido a alterações no centro da saciedade, em decorrência do aumento nos níveis de leptina plasmática que favoreceu o aumento da ingestão de dieta C e conseqüentemente levou à expansão do TA, aumento da PAM, de marcadores inflamatórios e do quadro de RI.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 11, n. 8, p. 327–32, out. 2000.

AL-HAMODI, Z. e cols. Association of adipokines, leptin/adiponectin ratio and C-reactive protein with obesity and type 2 diabetes mellitus. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 6, n. 1, p. 4–11, 2014.

AMARAL, L. P. DO. Efeitos da leptina na adipogênese e produção de mediadores inflamatórios por adipócitos 3T3-L1. **Fundação Oswaldo Cruz. Instituto Oswaldo Cruz**, p. 1–75, 2017.

ANDRADE, D. O. DE; SANTOS, S. P. DE O.; VILELA-MARTIN, J. F. Inflammation, endothelial dysfunction and acute events in hypertension. **Rev Bras Hipertens**, v. 21(3), p. 129–133, 2014.

ARMITAGE, J. A.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **The Journal of Physiology**, v. 565, n. 1, p. 3–8, maio 2005.

BARBOSA, C. M. e cols. Maternal high-fat diet displayed disorders characteristic of metabolic syndrome that were transferred to first-and second-generation offspring. **British Journal of Nutrition**, p. 1–27, 2019.

BARRAND, S. e cols. Impact of maternal high fat diet on hypothalamic transcriptome in neonatal Sprague Dawley rats. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189492, 14 dez. 2017.

BEZERRA, A. P. M.; OLIVEIRA, D. M. DE. Síndrome Metabólica: Bases Moleculares E Fundamentos Da Interação Com Obesidade. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 8, n. 1, p. 63–76, 2013.

BEZPALKO, L.; GAVRILYUK, O.; ZAYACHKIVSKA, O. Inflammatory response in visceral fat tissue and liver is prenatally programmed: Experimental research. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 66, n. 1, p. 57–64, 2015.

BILBO, S. D.; TSANG, V. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. **FASEB Journal**, v. 24, n. 6, p. 2104–2115, jun.

2010.

BOUANANE, S. e cols. Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 59, n. 12, p. 1701–1709, 2010.

BOURET, S.; SIMERLY, R. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. **Clinical Genetics**, v. 70, n. 4, p. 295–301, 17 ago. 2006.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, ago. 2002.

CATALANO, K. J.; STEFANOVSKI, D.; BERGMAN, R. N. Critical role of the mesenteric depot versus other intra-abdominal adipose depots in the development of insulin resistance in young rats. **Diabetes**, v. 59, n. 6, p. 1416–1423, jun. 2010.

CÉSAR FARIAS DE QUEIROZ, J. e cols. **Controle da adipogênese por ácidos graxos**
Control of adipogenesis by fatty acids *Arq Bras Endocrinol Metab.* [s.l: s.n.].

CHECHI, K.; NEDERGAARD, J.; RICHARD, D. Brown adipose tissue as an anti-obesity tissue in humans. **Obesity Reviews**, v. 15, n. 2, p. 92–106, fev. 2014.

CHOE, S. S. e cols. **Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders** *Frontiers in Endocrinology* Frontiers Media S.A., , 13 abr. 2016.

CONE, R. D. **Anatomy and regulation of the central melanocortin system** *Nature Neuroscience*, maio 2005.

CORRÊA-CAMACHO, C. R.; DIAS-MELICIO, L. A.; SOARES, Â. M. V. C. Atherosclerosis, an inflammatory response. **Arq Ciênc Saúde**, v. 14, n. 1, p. 41–48, 2007.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S. Adipose tissue and adipokines. **Acta medica portuguesa**, v. 19, n. 3, p. 251–6, 2006.

COX, J. E.; LAUGHTON, W. B.; POWLEY, T. L. Precise estimation of carcass fat from total body water in rats and mice. **Physiology and Behavior**, v. 35, n. 6, p. 905–910, 1985.

DE CASTRO BARBOSA, T. e cols. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. **Molecular**

Metabolism, v. 5, n. 3, p. 184–197, 1 mar. 2016.

DE CASTRO, U. G. M. e cols. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids in Health and Disease**, v. 12, n. 1, p. 136, 2013.

DOMINICI, F. P. e cols. **Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7)** **Clinical Science**, maio 2014.

FARIAS, D. S. **Associação entre inflamação do tecido adiposo epicárdico e doença arterial coronariana: um estudo clinicopatológico**. [s.l.] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2016.

FARR, O. M.; GAVRIELI, A.; MANTZOROS, C. S. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, v. 22, n. 5, p. 353–9, out. 2015.

FERREIRA LOPES BRENT EGAN, H. M.; FERREIRA LOPES, H. Desequilíbrio Autonômico e Síndrome metabólica: Parceiros Patológicos em uma Pandemia global Emergente Autonomic Dysregulation and the Metabolic syndrome: Pathologic partners in an emerging global pandemic. **Arq Bras Cardiol**, p. 538–547, 2006.

FLEGAL, K. M. e cols. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 307, n. 5, p. 491–497, 1 fev. 2012.

FREITAS, M. C.; CESCHINI, F. L.; RAMALLO, B. T. Resistência à Insulina Associada à Obesidade: Efeitos Anti-Inflamatórios do Exercício Físico. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v. 22, n. 3, p. 139–147, 30 set. 2014.

GAO, Q.; HORVATH, T. L. **Cross-talk between estrogen and leptin signaling in the hypothalamus** **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, maio 2008.

GEHRKE, J.; PEREIRA, R. Associação do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) com a obesidade. **RBONE - Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, v. 1, n. 1, p. 1, 2007.

GOLLISCH, K. S. C. e cols. Effects of exercise training on subcutaneous and visceral adipose

tissue in normal- and high-fat diet-fed rats. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, v. 297, n. 2, ago. 2009.

GONZAGA DA CUNHA, M.; GONZAGA DA CUNHA, A. L.; MACHADO, C. A. **Hipoderme e tecido adiposo subcutâneo: duas estruturas diferentes Artigo de Revisão Autores Surg Cosmet Dermatol**. [s.l: s.n.].

GONZALEZ, E.; MCGRAW, T. E. Insulin Signaling Diverges into Akt-dependent and-independent Signals to Regulate the Recruitment/Docking and the Fusion of GLUT4 Vesicles to the Plasma Membrane □ D. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, p. 4484–4493, 2006.

GREGORASZCZUK, E. e cols. Maternal high-fat diet during pregnancy and lactation had gender difference effect on adiponectin in rat offspring. **Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society**, v. 67, n. 4, p. 543–553, ago. 2016.

HABER, E. P. e cols. Secreção da insulina: efeito autócrino da insulina e modulação por ácidos graxos. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 45, n. 3, p. 219–227, jun. 2001.

HOFFMANN, A. e cols. Leptin decreases circulating inflammatory IL-6 and MCP-1 in mice. **BioFactors**, v. 45, n. 1, p. 43–48, 2019.

HUME, D. A. **The many alternative faces of macrophage activation** **Frontiers in Immunology** Frontiers Research Foundation, , 2015.

IWASHIMA, Y. e cols. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension. **Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)**, v. 43, n. 6, p. 1318–23, jun. 2004.

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

KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID-MOUSSA, N.; CLAYCOMBE, K. J. **Immunity as a link between obesity and insulin resistance**. Molecular Aspects of Medicine. **Anais...** fev. 2012

KAMIGAKI, M. e cols. Oxidative stress provokes atherogenic changes in adipokine gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 339, n. 2, p. 624–632, 13 jan. 2006.

KAZUMI, T. e cols. Serum Adiponectin Is Associated with High-Density Lipoprotein Cholesterol, Triglycerides, and Low-Density Lipoprotein Particle Size in Young Healthy Men. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 53, n. 5, p. 589–593, 2004.

KIM, K. e cols. c-Jun N-terminal kinase is involved in the suppression of adiponectin expression by TNF-alpha in 3T3-L1 adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 327, n. 2, p. 460–7, 11 fev. 2005.

KIRKLAND, J. L. e cols. Effects of age and anatomic site on preadipocyte number in rat fat depots. **Journals of Gerontology**, v. 49, n. 1, 1994.

KOJIMA, S.; CATAVERO, C.; RINAMAN, L. Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups. **Physiology and Behavior**, v. 157, p. 237–245, 1 abr. 2016.

LÉ, B.; WAJCHENBERG, O. Subcutaneous and Visceral Adipose Tissue: Their Relation to the Metabolic Syndrome. **Endocrine Reviews**, v. 21(6), p. 697–738, 2000.

LEE, D. S. e cols. Gamma glutamyl transferase and metabolic syndrome, cardiovascular disease, and mortality risk: the Framingham Heart Study. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 27, n. 1, p. 127–33, jan. 2007.

LEE, M. O. DETERMINATION OF THE SURFACE AREA OF THE WHITE RAT WITH ITS APPLICATION TO THE EXPRESSION OF METABOLIC RESULTS. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 89, n. 1, p. 24–33, 1 jun. 1929.

LEVIN, B. E. Intracarotid glucose induced norepinephrine response and the development of diet induced obesity. **International Journal of Obesity**, v. 16, n. 6, p. 451–457, 1992.

LI, C. e cols. **Macrophage polarization and meta-inflammation** **Translational Research** Mosby Inc., , 1 jan. 2018.

LIANG, X. e cols. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. **Scientific Reports**, v. 6, 30 set. 2016.

LIMA, FÁBIO BESSA; CURI, R. **Moléculas ativas produzidas por órgãos não endócrinos**. Rio de Janeiro: [s.n.].

LIMA, N. DA S. e cols. The effect of Guarana (*Paullinia cupana*) on metabolic and inflammatory parameters in adult male mice programmed by maternal obesity. **European**

Journal of Nutrition, v. 58, n. 2, p. 765–774, 1 mar. 2019.

LOPES, H. F. Hipertensão , obesidade , resistência à insulina e síndrome metabólica. **Rev Bras Hipertens**, v. 12, n. 3, p. 154–158, 2005.

MANTOVANI, R. M. e cols. Early changes in adipokines from overweight to obesity in children and adolescents. **Jornal de Pediatria (Versão em Português)**, v. 92, n. 6, p. 624–630, nov. 2016.

MARTINS, F. e cols. High-fat Diet Promotes Cardiac Remodeling in an Experimental Model of Obesity. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2015.

MATTHEWS, D. R. e cols. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v. 28, n. 7, p. 412–419, jul. 1985.

MORAES-SILVA, I. C. e cols. Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic, and metabolic parameters in rats under high risk of metabolic syndrome development. **Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 6, p. 786–791, 15 mar. 2013.

MÜNZBERG, H.; MORRISON, C. D. Structure, production and signaling of leptin. **Metabolism: clinical and experimental**, v. 64, n. 1, p. 13–23, jan. 2015.

OLIVEIRA JUNIOR, S. A. e cols. Extensive impact of saturated fatty acids on metabolic and cardiovascular profile in rats with diet-induced obesity: a canonical analysis. **Cardiovascular diabetology**, v. 12, p. 65, 15 abr. 2013.

OUCHI, N. e cols. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: Adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, v. 100, n. 25, p. 2473–2476, 21 dez. 1999.

OUCHI, N. e cols. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF- κ B signaling through a cAMP-dependent pathway. **Circulation**, v. 102, n. 11, p. 1296–1301, 12 set. 2000.

OUCHI, N. e cols. Insulin resistance Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature Publishing Group**, 2011.

PALOMINO, D. C. AROLIN. T.; MARTI, L. C. AVALHEIR. Chemokines and immunity. **Einstein (São Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 3, p. 469–473, 2015.

PANEE, J. **Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) in obesity and diabetes***Cytokine*, out. 2012.

PARK, H. K.; AHIMA, R. S. **Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism***Metabolism: clinical and experimental*, 1 jan. 2015.

PE MARGIOTTA, D. e cols. The Complex Role of Leptin in SLE: Is Leptin A Key Link between Metabolic Syndrome, Accelerated Atherosclerosis and Autoimmunity? **Lupus: Open Access**, v. 01, n. 01, p. 1–4, 2016.

PESSOA, N. G. e cols. Avaliação dos níveis séricos das enzimas hepáticas e proteína C reativa em indivíduos com sobrepeso com e sem Síndrome Metabólica. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 36, n. 1Supl, p. 169, 9 mar. 2015.

REAVEN, G. M. Insulin Resistance And Human Disease: A Short History. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 9, n. 2–4, p. 387–406, 1998.

ROMERO, C. E. M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 1, p. 85–91, jan. 2006.

ROZA, N. A. V. **Ingestão materna crônica de dieta hiperlipídica: efeito sobre a função renal, o metabolismo glicídico e a pressão arterial da prole**. [s.l.] Faculdades de Ciências Medidas da Unicamp, 2016.

SAHA, S.; SHALOVA, I. N.; BISWAS, S. K. **Metabolic regulation of macrophage phenotype and function***Immunological Reviews*Blackwell Publishing Ltd, , 1 nov. 2017.

SPONTON, A. C. DA S. **Efeito do treinamento físico aeróbio na reatividade vascular de artéria femoral de ratos alimentados com dieta hiperlipídica**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2016.

SUN, B. e cols. 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.

VOLP, A. C. P. e cols. **Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica***Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, abr. 2008.

WEYER, C. e cols. Hypoadiponectinemia in obesity and type 2 diabetes: close association with insulin resistance and hyperinsulinemia. **The Journal of clinical endocrinology and**

metabolism, v. 86, n. 5, p. 1930–5, maio 2001.

XIA, M.-F. e cols. Elevation of liver enzymes within the normal limits and metabolic syndrome. **Clinical and experimental pharmacology & physiology**, v. 38, n. 6, p. 373–9, jun. 2011.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; ITO, Y. Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, n. June, p. 762–769, 2003.

YOKOMIZO, H. e cols. Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic β -cell function in adult offspring with sex differences in mice. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 306, n. 10, p. E1163–E1175, 15 maio 2014.

9. ANEXOS

ANEXO A – Documento de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Ouro Preto



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

Campus Universitário - Morro do Cruzeiro - ICEB-II, Sala 29
35400-000 - Ouro Preto - MG - Brasil
Fone (31) 3559-1368 Fax: (31) 3559-1370
Email: ceua@ufop.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. 2016/49, intitulado "Efeitos da exposição de ratos à dieta hiperlipídica e hipercalórica durante a gestação e amamentação sobre parâmetros hemodinâmicos da prole na vida adulta.", que tem como responsável o/a Prof(a). **Dr(a). Andréia Carvalho Alzamora**, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFOP – CEUA/UFOP, de acordo com tabela abaixo:

Dados dos Animais Aprovados				
Espécie/linhagem	N.º de Animais	Idade	Sexo	Procedência
Fisher	332	12 semanas	Macho e fêmea	CCA

Restrição de dieta: (x) sim () não

Especificar a dieta:

Este Certificado expira em: 11/01/2021

Ouro Preto, 12 de Dezembro de 2016.

Prof.ª Dr.ª Lenice Kappes Becker
Coordenadora da CEUA/UFOP

ANEXO B – Protocolo KIT ULTRA SENSITIVE RAT INSULIN ELISA – INSULINA

- 1) Pré-aqueça todos os reagentes à temperatura ambiente antes da realização do ensaio
- 2) Diluir o 10X Wash Buffer concentrado 10 vezes misturando todo o conteúdo de cada frasco de Wash Buffer com 450 mL de água deionizada (diluir ambos os frascos com 900 mL de água deionizada).
- 3) Remova o número necessário de tiras da Microtiter Assay Plate. As tiras não utilizadas devem ser fechadas novamente na embalagem de alumínio e armazenadas a 2-8 °C. Montar as tiras em um suporte de placa e lavar cada poço 3 vezes com 300 µL de diluted Wash Buffer por lavagem. Descarte o Wash Buffer e remova a quantidade residual de todos os poços, invertendo a placa e batendo-a levemente em toalhas absorventes várias vezes. Não deixe os poços secarem antes de prosseguir para o próximo passo.
- 4) Adicione 10 µL de Assay Buffer aos poços NSB (branco) e a cada um dos poços de amostra. Consulte a Seção IX para orientação de utilização dos poços.
- 5) Se as amostras a serem utilizadas forem soro ou plasma, adicione 10 µL de Matrix Solution aos poços NSB, Standard e Control (Opção A). Se as amostras estiverem livres de componentes do soro, adicione, em vez disso, 10 µL de Assay Buffer (Opção B).
- 6) Adicione em duplicata 10 µL de Rat Insulin Standards na ordem de concentração crescente aos poços apropriados.
- 7) Adicione 10 µL de QC1 e 10 µL de QC2 aos poços apropriados.
- 8) Adicione em duplicata 10 µL das amostras desconhecidas aos poços restantes.
- 9) Adicione 80 µL de Detection Antibody a todos os poços. Para o melhor resultado, todas as adições devem ser concluídas dentro de uma hora. Cubra a placa com plate sealer e incube a temperatura ambiente durante 2 horas em um orbital microtiter plate shaker configurado para rodar a uma velocidade moderada, cerca de 400 a 500 rpm.
- 10) Remova o plate sealer e as soluções de decantação da placa por inversão. Bata levemente como antes para remover as soluções residuais no poço.
- 11) Lavar os poços 3 vezes com diluted Wash Buffer, 300 µL por poço por lavagem. Descartar e bater levemente depois de cada lavagem para remover o tampão residual.
- 12) Adicione 100 µL de Enzyme Solution a cada poço. Cubra a placa com o sealer e incuba com agitação moderada à temperatura ambiente durante 30 minutos no plate shaker.
- 13) Remova o sealer, descarte as soluções da placa por inversão e bata levemente a placa em toalha absorvente para remover o líquido residual.

14) Lave os poços 6 vezes com diluted Wash Buffer, 300 μ L por poço por lavagem. Descarte e bata levemente depois de cada lavagem para remover o tampão residual.

15) Adicione 100 μ L de Substrate Solution a cada poço, cubra a placa com o sealer e agite no plate shaker durante aproximadamente 5 a 20 minutos. A cor azul deve ser formada em poços de Insulin Standards com intensidade proporcional ao aumento das concentrações de insulina. Substrate Solution sensível à luz evite a exposição à luz cobrindo a placa com papel alumínio.

NOTA: Lembre-se de que a cor pode desenvolver-se mais rapidamente ou mais lentamente do que o tempo de incubação recomendado, dependendo da temperatura ambiente local. Por favor, monitore visualmente o desenvolvimento da cor para otimizar o tempo de incubação. Pode-se medir o desenvolvimento da cor usando o filtro de 370 nm, se disponível no espectrofotômetro. Quando a absorbância é entre 1,2 e 1,8 a 370 nm, a Stop Solution pode ser adicionada para terminar o desenvolvimento da cor.

16) Remova o sealer e adicione 100 μ L de Stop Solution [CUIDADO: SOLUÇÃO CORROSIVA] e agite a placa manualmente para assegurar uma mistura completa da solução em todos os poços. A cor azul deve se transformar em amarelo após a acidificação. Leia a absorbância a 450 nm e 590 nm em um leitor de placas dentro de 5 minutos e assegure-se de que não há bolhas de ar em qualquer poço. Registre a diferença de unidades de absorbância.

ANEXO C – Protocolo KIT ELISA RAT EMD MILIPORE® - LEPTINA

- 1) Pré-aqueça todos os reagentes à temperatura ambiente imediatamente antes de realizar o ensaio.
- 2) Diluir o 10X Wash Buffer concentrado 10 vezes misturando todo o conteúdo de cada frasco de Wash Buffer com 450 mL de água deionizada (diluir ambos os frascos com 900 mL de água deionizada).
- 3) Remova o número necessário de tiras da Microtiter Assay Plate. As tiras não utilizadas devem ser fechadas novamente na embalagem de alumínio e armazenadas a 2-8 °C. Montar as tiras em um suporte de placa e lavar cada poço 3 vezes com 300 µL de diluted Wash Buffer por lavagem. Descarte o Wash Buffer e remova a quantidade residual de todos os poços, invertendo a placa e batendo-a levemente em toalhas absorventes várias vezes. Não deixe os poços secarem antes de prosseguir para o próximo passo.
- 4) Adicione 30 µL de Assay Buffer aos poços NSB (branco) e a cada um dos poços de amostra. Adicione 40 µL de Assay Buffer nos poços das amostras. Consulte a Seção IX para orientação de utilização dos poços.
- 5) Se as amostras a serem utilizadas forem soro ou plasma, adicione 10 µL de Matrix Solution aos poços NSB, Standard e Control (Opção A). Se as amostras estiverem livres de componentes do soro, adicione, em vez disso, 10 µL de Assay Buffer (Opção B).
- 6) Adicione em duplicata 10 µL de Rat leptin Standards na ordem de concentração crescente aos poços apropriados.
- 7) Adicione 10 µL de QC1 e 10 µL de QC2 aos poços apropriados.
- 8) Adicione em duplicata 10 µL das amostras desconhecidas aos poços restantes.
- 9) Adicione 50 µL de Detection Antibody a todos os poços. Para o melhor resultado, todas as adições devem ser concluídas dentro de uma hora. Cubra a placa com plate sealer e incube a temperatura ambiente durante 2 horas em um orbital microtiter plate shaker configurado para rodar a uma velocidade moderada, cerca de 400 a 500 rpm. 80.

ANEXO D – Protocolo KIT ELISA RAT EMD MILIPORE® - MCP-1

PREPARAÇÃO DE REAGENTES

Colocar todos os reagentes à temperatura ambiente antes do uso.

Mouse/Rat MCP-1 Control - Reconstitua com 1,0 mL de água deionizada ou destilada.

Wash Buffer - Se cristais se formarem no concentrado, aqueça até a temperatura ambiente e misture suavemente até que os cristais estejam completamente dissolvidos. Para preparar o tampão de lavagem suficiente para uma placa adicione 20 mL de tampão de lavagem concentrado à água deionizada ou destilada para preparar 500 mL de tampão de lavagem.

Substrate Solution – Os reagentes de cor A e B devem ser misturados em volumes iguais imediatamente antes do uso. Proteger da luz. 100 µL da mistura resultante é necessária por poço.

Mouse/Rat MCP-1 Standard - Consulte o rótulo do frasco para obter o volume de reconstituição. Reconstitua o Padrão de MCP-1 com Diluente de Calibrador RD5-3. Não substitua outros diluentes. Esta reconstituição produz uma solução estoque de 1000 pg/mL. Após misturar o padrão, aguardar no mínimo 5 minutos antes de fazer as diluições. Pipete 200 µL de Diluente de Calibrador RD5-3 em cada tubo. Use a solução de estoque para produzir uma série de diluição de 2 vezes. Misture cada tubo completamente antes da próxima transferência. O padrão não diluído serve como o padrão mais concentrado (1000 pg/mL). O Diluente de Calibrador RD5-3 serve como padrão zero (0 pg/mL).

PROCEDIMENTO DE ENSAIO

Trazer todos os reagentes e amostras para a temperatura ambiente antes de usar. É recomendado que todas as amostras, padrões e controle devem ser ensaiados em duplicata.

1. Prepare todos os reagentes, padrões de trabalho e amostras conforme indicado nas seções anteriores.
2. Remova as tiras em excesso da estrutura da placa e devolva-as à bolsa contendo o pacote dessecante e feche novamente.
3. Adicione 50 µL de Diluente de Ensaio RD1W a cada poço.
4. Adicione 50 µL de Padrão, Controle ou amostra por poço. Misture batendo suavemente a placa quadro por 1 minuto. Cubra com a fita adesiva fornecida. Incubar por 2 horas em temperatura ambiente. Um layout de placa é fornecido para registrar padrões e amostras analisadas.
5. Aspirar cada poço e lavar, repetindo o processo quatro vezes para um total de cinco lavagens. Lave preenchendo cada poço com Tampão de Lavagem (400 µL) usando uma

pisseta, coletor dispensador ou lavadora de placa. A remoção completa do líquido a cada passo é essencial para um bom desempenho. Após a última lavagem, retire o Tampão de Lavagem restante, aspirando ou por decantação. Inverta a placa e limpe-a com toalhas de papel limpas.

6. Adicione 100 μ l de Conjugado MCP-1 a cada poço. Cubra com uma nova fita adesiva. Incube por 2 horas à temperatura ambiente.

7. Repita a aspiração / lavagem como no passo 5.

8. Adicione 100 μ L de solução de substrato a cada poço. Incubar por 30 minutos em temperatura ambiente. Proteger da luz.

9. Adicione 100 μ L de Solução de Parada em cada poço. Bata suavemente na placa para garantir a mistura completa.

10. Determine a densidade óptica de cada poço dentro de 30 minutos, usando um leitor de microplacas definido para 450 nm. Se a correção do comprimento de onda estiver disponível, ajuste para 540 nm ou 570 nm. Se a correção do comprimento de onda não estiver disponível, subtraia as leituras a 540 nm ou 570 nm das leituras em 450 nm. Esta subtração corrigirá as imperfeições ópticas na placa. Leituras feitas diretamente a 450 nm sem correção podem ser maiores e menos precisas.