



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE RATOS À DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE PARÂMETROS CARDIOMETABÓLICOS DAS PROLES F1 e F2

CLAUDIANE MARIA BARBOSA

Ouro Preto, MG

2018

CLAUDIANE MARIA BARBOSA

EFEITOS DA EXPOSIÇÃO DE RATOS À DIETA
HIPERLIPÍDICA SOBRE PARÂMETROS
CARDIOMETABÓLICOS DAS PROLES F1 e F2

Orientadora: Profa. Dra. Andréia Carvalho Alzamora

Coorientadora: Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

B238e Barbosa, Claudiane Maria.
Efeitos da exposição de ratos à dieta hiperlipídica sobre parâmetros
cardiometabólicos das proles F1 e F2 [manuscrito] / Claudiane Maria Barbosa. -
2018.
80f.; il.: grafs; tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Andréia Carvalho Alzamora.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Pró-Reitoria de
Pesquisa e Pós-Graduação. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Síndrome metabólica. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Doenças induzidas pela
nutrição. I. Carvalho Alzamora, Andréia. II. Universidade Federal de Ouro
Preto. III. Título.

CDU: 612.015

Catálogo: www.sisbin.ufop.br



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**



UFOP

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Aos 22 dias do mês de fevereiro do ano de 2018, às 09:00 horas, nas dependências Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas (Nupeb), foi instalada a sessão pública para a defesa de dissertação da mestranda Claudiane Maria Barbosa, sendo a banca examinadora composta pela Profa. Andreia Carvalho Alzamora (Presidente - UFOP), pela Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara (Membro - UFOP), pelo Prof. Romulo Leite (Membro - UFOP). Dando início aos trabalhos, a presidente, com base no regulamento do curso e nas normas que regem as sessões de defesa de dissertação, concedeu à mestranda Claudiane Maria Barbosa 30 minutos para apresentação do seu trabalho intitulado "Efeitos da Exposição de Ratas à Dieta Hiperlipídica Sobre Parâmetros Cardiometabólicos das Proles F1 e F2", na área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica. Terminada a exposição, a presidente da banca examinadora concedeu, a cada membro, um tempo máximo de 45 minutos, para perguntas e respostas à candidata sobre o conteúdo da dissertação, na seguinte ordem: Primeiro, Prof. Romulo Leite; segundo, Profa. Daniela Caldeira Costa Calsavara; terceiro, Profa. Andreia Carvalho Alzamora. Dando continuidade, ainda de acordo com as normas que regem a sessão, a presidente solicitou aos presentes que se retirassem do recinto para que a banca examinadora procedesse à análise e decisão, anunciando, a seguir, publicamente, que a mestranda foi aprovada por unanimidade, sob a condição de que a versão definitiva da dissertação deva incorporar todas as exigências da banca, devendo o exemplar final ser entregue no prazo máximo de 60 (sessenta) dias à Coordenação do Programa. Para constar, foi lavrada a presente ata que, após aprovada, vai assinada pelos membros da banca examinadora e pela mestranda. Ouro Preto, 22 de fevereiro de 2018.

Presidente: Andreia Carvalho Alzamora

Membro: Daniela Caldeira Costa

Membro: Romulo Leite

Mestranda: Claudiane Maria Barbosa

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

“Não é sobre chegar ao topo do mundo e saber que venceu. É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu.”

ANA VILELA

Dedico este trabalho a Deus e aos meus familiares

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho não teria sido possível sem a ajuda e o apoio daqueles a que agora me refiro, a todos os mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha professora orientadora, Doutora **Andréia Carvalho Alzamora**, agradeço por ter acreditado em mim desde o início. Aprendi muito nesta convivência contigo, sua simplicidade, paciência e sabedoria me extrapolaram os limites do aprendizado acadêmico e se tornam lições para minha vida. Agradeço por sua orientação, amizade e dedicação. Tenho imensa admiração por você.

A meu coorientador, Prof. Dr. **Leonardo Máximo Cardoso**, pelo apoio.

Aos meus pais, **Joaquim e Nélia** meu bem mais precioso, que apesar de suas limitações, souberam me passar à importância e o valor contido nos estudos. Sempre acreditando na minha capacidade e no meu crescimento profissional. Sou muito grata e tenho orgulho de vocês.

A **tia Efigênia**, pela convivência e pelo carinho adquirido aos longos dos anos.

Às minhas irmãs, **Déia, Lira, Fatinha, Adelma**, por compartilharem comigo às dificuldades em cada etapa e por fazerem parte da minha vida.

Em especial a minha amiga irmã **Déia** que sempre me incentivou e lutou para que esse momento acontecesse. “Foi ela que me ajudou a levantar quando eu cair”.

A **Lira**, que esta sempre à disposição para me ajudar nas pequenas e grandes coisas da vida.

A **Jackson**, meu querido cunhado que esta sempre pronto a me ajudar no que for preciso.

A **Ednalva**, pelo carinho, apoio, confiança. Que chegou em minha vida, me incentivando e fazendo com que cada dia mais, eu acreditasse mais em mim e me aceitasse como sou.

Quero também agradecer a todos os meus amigos e colegas do laboratório de Hipertensão: **Taynara, Rosana, Vívian, Fabiana, Karina, Déia e Grazi**. Meu muito obrigado, por terem me socorrido nos longos experimentos, sem a ajuda de vocês eu não teria conseguido.

A **Taynara** por ter disponibilidade em todas as necropsias e está sempre pronta em ajudar no que for necessário;

A **Rosana e Déia** pelas organizações das necropsias;

A **Vívian** pela correria e pela organização dos experimentos;

A **Karina** pela ajuda nas necropsias;

A **Fabiane** pela atualizações das planilhas e necropsias;

A **Grazi** pelos conselhos;

Cada uma com sua individualidade e peculiaridade somando contribuiu para que os experimentos acontecessem da melhor maneira possível. A vocês só tenho o agradecer.

Ao **Sr. Wilson**, pela amizade, colaboração no trato e manutenção dos animais.

A **prof^a. Dr. Daniela Caldeira Costa e prof. Dr. Rômulo Leite** por terem aceitado o convite e pelas contribuições na minha banca.

Ao Laboratório **LBTM** por nos ceder sempre que preciso as chaves para o nitrogênio líquido e o freezer -80°C.

Ao laboratório de **Imunopatologia, em especial a prof. Dr^a Cláudia Martins Carneiro**, e as alunas **Luciana e Josefa** por nos disponibilizar sempre de forma cuidadosa e atenciosa o freezer -80°C.

Aos funcionários do CCA, por sempre terem me recebido muito bem.

Quero manifestar também minha eterna GRATIDÃO e RESPEITO aos animais de experimentação, por sacrificarem suas vidas pela ciência e também pela inocência.

À CAPES, REDE TOXIFAR, INCT-FAPEMIG-CNPQ, PROPP-NUPEB-UFOP pelo financiamento.

RESUMO

A má alimentação dos progenitores pode predispor a prole a doenças cardiometabólicas. O objetivo desse estudo foi investigar se a dieta hiperlipídica (H) submetida aos progenitores predispõe a prole a distúrbios cardiometabólicos. Para isso ratos Fischer foram submetidos à dieta H (G0HM e G0HF) ou controle (C) (G0CM e G0CF) durante o acasalamento, gestação e lactação, gerando as proles F1 (F1HM e F1CM) ou (F1HF e F1CF). Parte das proles F1 (F1HM e F1CM) ou (F1HF e F1CF) foram acasalados e tornaram-se os genitores G1 (G1HM e G1HF) ou (G1CM e G1CF), e suas proles divididas em (F2HM e F2CM) ou (F2HF e F2CF). Todas as proles F1 e F2 consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade. Avaliou-se os parâmetros nutricionais, biométricos, bioquímicos e hemodinâmicos. Os progenitores G0HM apresentaram aumento da PAM (PAM), FC (bpm) e massa corporal (g). As progenitoras apresentaram resistência à insulina (ng/ml), aumento do índice de adiposidade, dos níveis de triglicérides (mg/dL), da ingesta energética (Kcal), aumento relativo do pâncreas (g/100g), da glicemia (mg/dL), do HOMA-IR e da PAM.

Os ratos F1HM (n=6-14) e F1HF (n= 6-9) apresentaram aumento da PAM (123±4 e 122±3; respectivamente), maior queda da PAM induzida pelo hexametônio (ms/mmHg) (-56±2 e -44±5; respectivamente), da ingesta de água (ml) (238±12 e 164±8; respectivamente), ingesta calórica (791±12 e 587±11; respectivamente) e alimentar (g) (226±5 e 168±6; respectivamente), o depósito de gordura retroperitoneal (g/100g) (5,9±4 e 5,0±0,3; respectivamente), o índice de adiposidade (18±1,4 e 7±0,4; respectivamente), a massa corporal (341±1 e 218±5; respectivamente), a glicemia de jejum (138±2 e 129±4; respectivamente), e triglicérides (176±10 e 180±10; respectivamente) comparado aos grupos F1CM (n=6-16) e F1CF (n=6-18). Os ratos F2HM (n=7-12) e F2HF (8-15) apresentaram aumento a PAM (127±1 e 130±5; respectivamente), maior queda da PAM induzida pelo hexametônio (-46±1 e -42±2; respectivamente), a ingesta de água (257±10 e 188±8; respectivamente), ingesta alimentar (233±7 e 176±6; respectivamente) e calórica (812±13 e 608±12; respectivamente), peso relativo do fígado (g/100g) (3,4±0,1 e 3,5±0,1; respectivamente), o índice de adiposidade (13±0,2 e 7,7±0,1; respectivamente), massa corporal (336±3 e 209±2; respectivamente), a glicemia de jejum (124±2 e 123±7; respectivamente), o colesterol total (mg/dL) (93±2 e 103±3; respectivamente) e os triglicérides (142±8 e 169±9; respectivamente) comparado aos grupos F2CM (n= 8-11) e F2CF (n=8-12). Nossos dados mostram que a dieta H materna durante o acasalamento, gestação e lactação induziu distúrbios característicos da SM nas proles F1 e F2 mesmo estas sendo alimentadas com dieta C após desmame. Além disso, esses distúrbios cardiometabólicos foram de maior extensão nas proles F2 em relação as proles F1.

Palavras-chave: Síndrome metabólica, genitores, proles F1 e F2, dieta hiperlipídica.

ABSTRACT

The poor maternal diet during pregnancy can predispose the offspring to cardiometabolic diseases. The aim of this study was to investigate whether the high fat diet (H) submitted to parents predisposes the offspring to cardiometabolic disorders. For this, Fischer rats were submitted to diet H (G0HM and G0HF) or control (C) (G0CM and G0CF) during mating, gestation and lactation, generating F1 (F1HM and F1CM) or (F1HF and F1CF) offspring. Part of the F1 (F1HM and F1CM) or (F1HF and F1CF) progeny were mated and became the G1 (G1HM and G1HF) or (G1CM and G1CF) parents, and their offspring divided into (F2HM and F2CM) or (F2HF and F2CF). All F1 and F2 offspring consumed C diet after weaning until 90 days of age. Nutritional, biometric, biochemical and hemodynamic parameters were evaluated. The G0HM progenitors presented increase of mean arterial pressure (MAP-mmHg), FC (bpm) and body mass (g). The progenitors presented insulin resistance (ng / ml), increase in the adiposity index, triglyceride levels (mg / dL), energy intake (Kcal), relative increase of pancreas (g / 100g) dL, HOMA-IR and MAP. The F1HM (n = 6-14) and F1HF (n = 6-9) rats presented an increase in MAP (123 ± 4 and 122 ± 3, respectively), a higher fall in MAP induced by hexamethonium (ms/mmHg) (-56±2 and -44±5, respectively), and ingestion of water (ml) (238±12 and 164±8, respectively), caloric intake (791±12 and 587±5, respectively), the retroperitoneal fat deposit (g / 100g) (5.9±4 and 5.0±0.3, respectively), the adiposity index (18±1.4 and 7±0.4, respectively), body mass (341±1 and 218 ± 5, respectively), fasting glycemia (138±2 and 129±4, respectively), and triglycerides (176±10 and 180±10; respectively) compared to F1CM (n =6-16) and F1CF (n =6-18) groups. The F2HM (n=7-12) and F2HF (8-15) rats showed an increase in MAP (127±1 and 130± 5, respectively), a higher fall in MAP-induced by hexamethonium (-46±1 and -42±2, respectively), ingestion of water (257±10 and 188±8, respectively), food ingestion (233±7 and 174±6, respectively) and caloric intake (812±13 vs 608±12, respectively), relative weight of the liver (g / 100g) (3.4±0.1 vs 3.5±0.1, respectively), adiposity index (13±0.2 and 7.7±0.1, respectively), body mass (123±2 and 123±7, respectively), total cholesterol (mg / dL) (93± 2 and 103±3, respectively) and the total cholesterol (336 ± 3 and 209 ± 2, respectively), fasting glycemia (142±8 and 169±9, respectively) compared to F2CM (n=8-11) and F2CF (n=8-12) groups. Our data show that the maternal H diet during mating, gestation and lactation induced characteristic disturbances of MS in F1 and F2 offspring even though they were fed C diet after weaning. In addition, these cardiometabolic disorders were of greater extension in the F2 offspring relative to the F1 offspring.

Key words: Metabolic syndrome, parents, F1 and F2 offspring, high fat diet.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão esquemática do Sistema Renina Angiotensina.....	5
Figura 2: Delineamento experimental.....	11
Figura 3: Representação esquemática do teste de sensibilidade reflexa.....	15
Figura 4: Parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos dos machos G0 e G1.....	22
Figura 5: Parâmetros bioquímicos das fêmeas G0 e G1.....	31
Figura 6: Parâmetros hemodinâmicos das fêmeas G0 e G1.....	33
Figura 7: Parâmetros bioquímicos das proles machos e fêmeas F1.....	41
Figura 8: Parâmetros hemodinâmicos das proles machos e fêmeas F1.....	43
Figura 9: Parâmetros bioquímicos das proles machos e fêmeas F2.....	49
Figura 10: Parâmetros hemodinâmicos das proles machos e fêmeas F2.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das dietas.....	10
Tabela 2: Parâmetros biométricos dos machos G0 e G1.....	20
Tabela 3: Parâmetros nutricionais das fêmeas G0 e G1.....	25
Tabela 4: Parâmetros biométricos das fêmeas G0 e G1.....	27
Tabela 5: Avaliação da resistência à insulina das fêmeas G0 e G1.....	29
Tabela 6: Parâmetros nutricionais das proles machos e fêmeas F1.....	35
Tabela 7: Parâmetros biométricos das proles machos e fêmeas F1.....	37
Tabela 8: Avaliação da resistência à insulina das proles machos e fêmeas F1.....	39
Tabela 9: Parâmetros nutricionais das proles machos e fêmeas F2.....	45
Tabela 10: Parâmetros biométricos das proles machos e fêmeas F2.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

µL: microlitros

C: Controle

CCA: centro de ciência animal

Cm: centímetro

CVLM: bulbo ventrolateral caudal

DC: débito cardíaco

F1CF: Prole fêmea oriunda de progenitores que consumiram dieta C e que logo após desmame consumiu dieta C até completar 90 dias de idade

F1CM: Prole macho oriunda de progenitores que consumiram dieta C e que logo após desmame consumiu dieta C até completar 90 dias de idade

F1HF: Prole fêmea oriunda de progenitores que consumiram dieta H e que logo após desmame consumiu dieta C até completar 90 dias de idade

F1HM: Prole macho oriunda de progenitores que consumiram dieta H e que logo após desmame consumiu dieta C até completar 90 dias de idade

F2CF: Prole fêmea oriunda de genitores que consumiram dieta C, mas que os progenitores consumiram dieta C e que logo após desmame a prole consumiu dieta C até completar 90 dias de idade

F2CM: Prole macho oriunda de genitoras que consumiram dieta C, mas que os progenitores consumiram dieta C e que logo após o desmame a prole consumiu dieta C até completar os 90 dias de idade

F2HF: Prole fêmea oriunda de genitores que consumiram dieta C, mas que os progenitores consumiram dieta H e que logo após desmame a prole consumiu dieta C até completar 90 dias de idade

F2HM: Prole macho oriunda de genitores que consumiram dieta C, mas que os progenitores consumiram dieta H e que logo após desmame a prole consumiu dieta C até completar 90 dias de idade

FC: frequência cardíaca

g: grama

G0CF: Progenitora submetida à dieta C no período de acasalamento, gestação e lactação, totalizando 59 dias

G0CM: Progenitor submetido à dieta C no período de acasalamento, totalizando 10 dias

G0HF: Progenitora submetida à dieta H no período de acasalamento, gestação e lactação, totalizando 59 dias

G0HM: Progenitor submetido à dieta H no período de acasalamento, totalizando 10 dias

G1CF: Fêmea F1 onde os progenitores (G0) comeram dieta C, que se tornou genitor da prole F2 e submetido à dieta C

G1CM: Macho F1 onde os progenitores (G0) comeram dieta H, que se tornou genitor da prole F2 e submetido à dieta C

G1HF: Fêmea F1 onde os progenitores (G0) comeram dieta H, que se tornou genitora da prole F2 e submetida à dieta C

G1HM: Macho F1 onde os progenitores (G0) comeram dieta H, que se tornou genitora da prole F2 e submetida à dieta C

GJ: glicemia de jejum

H: hiperlipídica

HA: hipertensão arterial

HOMA-IR: modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina

HOMA- β : modelo de avaliação da homeostase da capacidade funcional das células β

IJ: insulinemia de jejum

KDa: quilodalton

Kg: quilograma

LABNEX: laboratório de nutrição experimental

LDL: lipoproteína de baixa densidade

mg: miligrama

Min: minuto

mmHg: milímetros de mercúrio

mmol/L; milimol/litro

NTS: núcleo do trato solitário

°C: graus celsius

PA: pressão arterial

PAM: pressão arterial média

PE: Polietileno

RI: resistência à insulina

RPM: rotações por minuto

RVLM: bulbo ventrolateral rostral

SM: síndrome metabólica

SNC: sistema nervoso central

SNS: sistema nervoso simpático

SRA: sistema renina angiotensina

TAB: tecido adiposo branco

TAM: tecido adiposo marrom

TTOG: teste de tolerância oral a glicose

UCP-1: isoforma 1 da proteína desacopladora da cadeia respiratória

UCP-2: isoforma 2 da proteína desacopladora da cadeia respiratória

UCP-3: isoforma 3 da proteína desacopladora da cadeia respiratória

VLM: bulbo ventrolateral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	8
3 OBJETIVOS	9
3.1 Objetivo geral.....	9
3.2 Objetivos específicos.....	9
4 MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1 Animais	10
4.2 Definição das Dietas.....	10
4.3 Protocolo Experimental	11
4.4 Definição dos grupos.....	11
4.5 Avaliação do consumo alimentar e água	13
4.6 Avaliação indireta da pressão arterial média.....	13
4.7 Confecção de cânulas vasculares.....	13
4.8 Canulação e isolamento de artéria e veia femorais	14
4.9 Avaliações cardiovasculares direta da pressão arterial média.....	14
4.10 Avaliação da Sensibilidade da Bradicardia reflexa	14
4.11 Avaliação do bloqueio simpático sobre a PAM.....	15
4.12 Avaliação dos parâmetros biométricos	16
4.13 Glicemia de jejum e teste de tolerância oral a glicose.....	16
4.14 Análises Bioquímicas	17
4.14.1 Dosagem colesterol total, triglicérides e glicose.....	17
4.14.2 Dosagem da insulina e da leptina por ELISA	17
4.15 Cálculo HOMA IR e HOMA β	17
4.16 Análise estatística	18
5 RESULTADOS	19
5.1 Avaliação dos parâmetros biométricos dos progenitores G0 e genitores G1 ...	19
Tabela 2. Parâmetros biométricos dos progenitores G0 e genitores G1	20
5.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos dos progenitores G0 e genitores G1	21
5.3 Avaliação dos parâmetros nutricionais das progenitoras G0 e genitoras G1 ...	23
5.4 Avaliação dos parâmetros biométricos das progenitoras G0 e genitoras G1 ...	26
5.5 Avaliação da resistência á insulina das progenitoras G0 e genitoras G1.....	28
5.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das progenitoras G0 e genitoras G1 ..	30
5.7 Avaliações parâmetros hemodinâmicos das progenitoras G0 e genitoras G1.	32
5.8 Avaliação dos parâmetros nutricionais das proles F1 macho e fêmea.....	34
5.9 Avaliação dos parâmetros biométricos das proles F1 macho e fêmea.....	36
5.10 Avaliação da resistência a insulina das proles F1 macho e fêmea	38
5.11 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das proles F1 macho e fêmea.....	40
5.12 Avaliação hemodinâmica das proles F1 macho e fêmea.....	42
5.13 Avaliação dos parâmetros nutricionais das proles F2 macho e fêmea.....	44
5.14 Avaliação dos parâmetros biométricos das proles F2 macho e fêmea	46
5.15 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das proles F2 macho e fêmea.....	48
5.16 Avaliações hemodinâmicas das proles F2 macho e fêmea.....	50
6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS	52

6.1 Sumário dos progenitores e genitores G0 e G1.....	52
6.2 Sumário das proles F1 e F2	53
7 DISCUSSÃO	53
8 CONCLUSÃO	61
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
9) ANEXOS.....	72

1 INTRODUÇÃO

Os efeitos epigenéticos podem ser definidos como características herdáveis e reversíveis que podem ocorrer nos mamíferos, que afetam a expressão do gene ou do fenótipo celular, que independem das alterações na sequência primária do DNA (SANTOS e cols., 2011; CHOI e cols., 2013). Os padrões epigenéticos são sensíveis a modificações ambientais e podem causar mudanças fenotípicas que serão transmitidas aos descendentes (PRAY, 2004)

Alterações ambientais como o tipo de alimentação podem promover alterações epigenéticas (SECKL, HOLMES, 2007; HUANG e cols., 2017). Estudos epidemiológicos mostram que a má alimentação da mãe ou do pai pode influenciar a saúde do indivíduo antes mesmo de seu nascimento (OZANNE, CONSTANCIA, 2007). Mudanças ocorridas durante o crescimento intrauterino estão associadas ao aumento da incidência de doenças cardiovasculares e metabólicas na vida adulta (BARKER, 1997). A programação nutricional é um processo pelo qual um estímulo ocorre no período crítico do desenvolvimento da fase intrauterina, afetando permanentemente estruturas e funções do organismo (WELLS, 2003). Estudos recentes têm mostrado que a má alimentação durante o período gestacional e de lactação por parte da gestante, pode levar a complicações da síndrome metabólica (SM) na prole durante a vida adulta (WELLS, 2003; FOWDEN, FORHEAD, 2004; FOWDEN e cols., 2006; FLYNN, 2013). Adicionalmente, em modelos animais, verificou-se que a dieta hiperlipídica (H) submetida à genitora transfere características semelhante à SM nos filhotes (GLUCKMAN, HANSON, 2004).

Em muitos países do mundo o consumo excessivo de alimentos ricos em gordura, industrializados e alimentos com alto teor de carboidratos simples se correlaciona com aumento da incidência de SM (LEWIS e cols., 2002; PENALVA, 2008). A SM é clinicamente caracterizada por no mínimo três fatores de risco: como disfunção endotelial, aumento do colesterol, aumento dos triglicérides, redução do lipoproteína de alta densidade (HDL), aterosclerose, hipertensão arterial, obesidade central e resistência a insulina (RI) (REAVEN, 1988; GINSBERG, HUANG, 2000, WHO, 2015).

A SM resulta da interação de fatores relacionados ao indivíduo (predisposição genética para hipertensão arterial e sedentarismo), e também fatores relacionados ao meio ambiente como (dieta hiperlipídica, consumo excessivo de sal e estresse), o que caracteriza a natureza multifatorial da patogênese da SM (MINAME, CHACRA, 2005). E essas interações genéticas juntamente com o meio ambiente irão resultar em alterações no organismo através do aumento da atividade simpática, aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e RI (FONTES e cols., 1997).

A RI é um estado em que os tecidos sensíveis à insulina, ou seja, tecido adiposo, fígado e músculo não respondem adequadamente aos níveis circulantes normais de insulina. Para compensar esta resposta inadequada, as células- β pancreáticas aumentam a produção de insulina levando a hiperinsulinemia (DOMINICI e cols., 2014).

A hiperinsulinemia, atuando no sistema nervoso central, age aumentando a atividade do sistema nervoso simpático (SNS), gerando um estado hiperadrenérgico que promove vasoconstrição na musculatura e contribui para a elevação dos níveis da pressão arterial média (PAM). Além disso, tanto a insulina quanto o aumento da atividade simpática podem estimular a reabsorção renal de sódio, que também contribui para a elevação da PA (REAVEN e cols., 1996; HALL, 2000).

A hipertensão arterial (HA) é uma doença multifatorial, em que o substrato energético alterado predispõe o indivíduo à ação de fatores ambientais, como sal e álcool em excesso, estresse, dietas inadequadas que desencadeiam o desequilíbrio dos complexos (hipertensores e hipotensores) que regulam a pressão arterial (SACKS e cols., 2001). O controle da HA implica, portanto, ajustes apropriados da frequência e da contratilidade cardíaca, do estado contrátil dos vasos de resistência (retorno venoso) (MICHELINI, 2000; CAMPAGNOLE-SANTOS, HAIBARA, 2001). A regulação dos níveis pressóricos dentro de uma faixa estreita de variação é mantida por complexos mecanismos inter-relacionados de controle neural, humoral e local que pode ser em curto e em longo prazo (FERRARIO e cols., 1990b). O controle reflexo da frequência cardíaca (FC) é um importante mecanismo de regulação da PA em curto prazo (MICHELINI, 2000; SACKS e cols., 2001). As

fibras barorreceptoras localizadas nos seios carotídeos e no arco aórtico, próximo à bifurcação da carótida, informam permanentemente ao sistema nervoso central (SNC) a situação da PA através dos nervos glossofaríngeo e vago, regulando assim, a PAM momento a momento. O núcleo do trato solitário (NTS) é a primeira estação dos sinais sensoriais originários do sistema periférico. Essa informação é recebida pelo NTS no bulbo e a resposta efetora ocorre pela integração dos sinais periféricos com estímulos que chegam de outras áreas como diencéfalo e telencéfalo (FELDMAN, ELLENBERGER, 1988) para definir a atividade do sistema nervoso simpático (SNS).

O SNS desempenha importante papel no controle de funções cardiovasculares, especialmente no controle da PA (KOHLMANN e cols., 2000). Esse sistema exerce influências sobre os dois parâmetros hemodinâmicos responsáveis pelos níveis de PA, isto é, débito cardíaco e a resistência periférica (KOHLMANN e cols., 2000; IRIGOYEN e cols., 2001).

Vários estudos mostram que a HA acompanhada de outros fatores bioquímicos, leva a alterações no metabolismo da insulina e dos lipídeos e sugere que a ligação dessas alterações é influenciada pelo SNS. Assim, várias comorbidades e distúrbios metabólico-hormonais que frequentemente se associam à HA, tais como a obesidade, RI, diabetes mellitus, dislipidemias e arteriosclerose, são influenciadas pela atividade do SNS. Além disso, dados sugerem que o SNS está associado à gênese da HA e que aumento do tônus simpático pode ter um determinante genético (IRIGOYEN e cols., 2001; LOPES, 2007).

Diversos estudos mostraram que existem projeções neuronais excitatórias do NTS para o bulbo ventrolateral caudal (CVLM), que é caracterizado como uma região depressora, e partem desta área neurônios inibitórios para uma região pressora rostral (RVLM) por meio de via neuronal ascendente (LOWEY, 1981; ROSS e cols., 1984a; MCKITRICK, CALERRESU, 1997). Os neurônios do RVLM são simpatoexcitatórios e capazes de estimular neurônios pré-ganglionares simpáticos, os quais causam elevação da FC, do inotropismo e da contratilidade no coração, e aumento na resistência vascular provocando, assim, elevação da PA (LOWEY, 1981).

Quando os níveis pressóricos são mantidos elevados ou diminuídos por semanas, os barorreceptores podem se adaptar a um novo *set point* e exercer sua função de conservar estes níveis pressóricos de adaptação deste novo *set point* dos pressorreceptores quando níveis mais elevados da PA são mantidos (MCCUBIN e cols., 1956; KUMADA e cols., 1990; BRITTO, 1997). A manutenção da PA elevada, por algum momento estará acompanhada de redução da sensibilidade da bradicardia reflexa (SBR) (BRISTOW e cols., 1969). Estudo de Carvalho e cols. (2003) (CARVALHO e cols., 2003) sugerem que haja uma inabilidade de neurônios do CVLM em contrabalancear o aparente aumento da atividade simpatoexcitatória intrínseca de neurônios localizados no RVLM de animais hipertensos.

Quando ocorre um aumento da PA, sinais periféricos oriundos dos barorreceptores projetam-se para neurônios no CVLM, no núcleo ambíguo e no núcleo dorsal do nervo vago. Projeções neurais simpatoinibitórias do CVLM para RVLM causará ação inibitória da atividade simpática tônica. Já o núcleo ambíguo e no núcleo dorsal do nervo vago provocará ativação do sistema nervoso parassimpático e que irá reduzir reflexamente a FC e conseqüentemente a PA (AICHER e cols., 1995; CHAN, SAWCHENKO, 1998; HAN e cols., 1998).

Já o sistema renina angiotensina (SRA) é o sistema hormonal mais amplamente estudado entre os sistemas de regulação da PA em médio e em longo prazo. O SRA cuja cascata de formação inclui interações enzima-substratos que resultam na produção de vários peptídeos biologicamente ativos. Desempenha importante papel no controle da PA, homeostase dos fluidos corporais, eletrólitos, e função celular (FERRARIO e cols., 1997; SANTOS e cols., 2003). O SRA controla a osmolaridade do meio interno juntamente com a aldosterona e com a vasopressina (FERRARIO e cols., 1990b; MARTINEZ-MALDONADO, 1991).

Vários outros peptídeos biologicamente ativos que compõem o SRA são conhecidos além da Ang II, dentre eles estão a angiotensina III (Ang III), angiotensina IV (Ang IV), angiotensina-(1-7) [(Ang-(1-7)], angiotensina-(1-9) [(Ang-(1-9)], angiotensina-(1-5) [Ang-(1-5)] e alamandina. (SANTOS e cols.,

1988; FERRARIO, 1990a; SANTOS, CAMPAGNOLE-SANTOS, 1997; SANTOS e cols., 2000; LAUTNER e cols., 2013).

O desequilíbrio entre os componentes do SRA esta relacionado a diferentes doenças como distúrbios característicos da SM e doenças cardiovasculares (HENRIKSEN, 2007; PERKINS, DAVIS, 2008). Na SM ocorre aumento da atividade dos componentes do eixo, da enzima conversora de angiotensina (ECA)/angiotensina (Ang) II/ receptor AT1 da Ang II (MONTEZ e cols., 2012; PUTNAM e cols., 2012) que exerce ações pró-inflamatórias, pró-oxidantes e proliferativas (DOMINICI e cols., 2014), enzima conversora de Ang II (ECA2)/ Ang-(1-7)/ receptor MAS da Ang-(1-7), que se apresenta como regulador endógeno ao eixo ECA/AngII/AT1 devido as suas propriedades anti-hipertensivas, anti-hipertróficas, anti-trombóticas e anti-fibróticas (FURUHASHI e cols., 2004; FERRARIO e cols., 2005; SANTOS e cols., 2008).

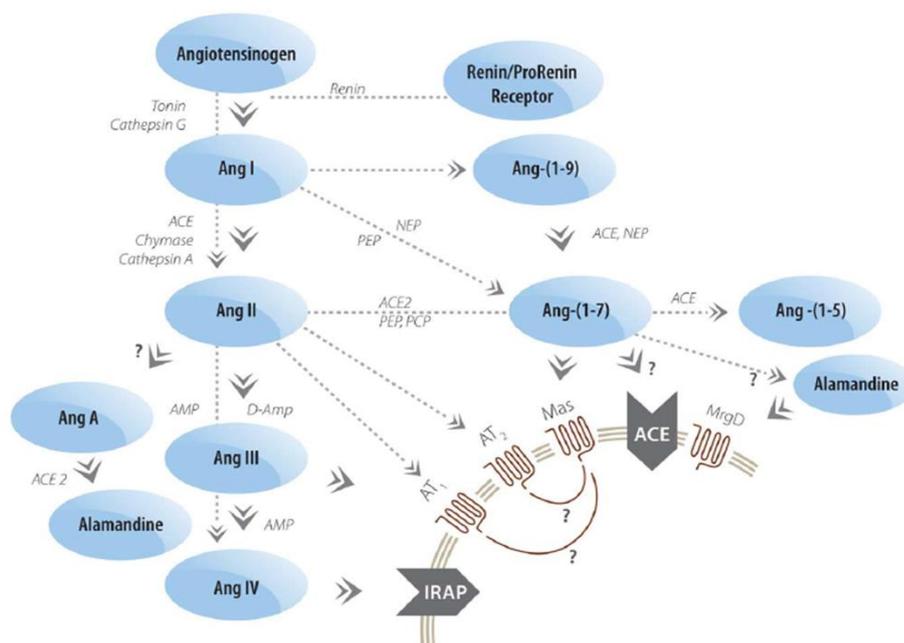


FIGURA 1: Visão esquemática do sistema renina angiotensina (Fonte: Santos et al., 2013)

O aumento da leptina circulante foi sugerido como contribuidor para o aumento da PA na obesidade por ativação do SNS (HAYNES e cols., 1997; SHEK e cols., 1998). A leptina é um hormônio polipeptídico não glicosilado de 16 kDa produzido principalmente pelo tecido adiposo branco (TAB) e é classicamente conhecida como hormônio da saciedade, que ao ser liberado pelo TAB, atua no cérebro induzindo redução da ingestão alimentar (YU e cols.,

1997; OTERO e cols., 2006). Locais de ligação à leptina foram encontrados em regiões do cérebro que também são importantes no controle cardiovascular, e há motivos para suspeitar que a leptina poderia afetar a função cardiovascular através dos seus efeitos no SNC (BORNSTEIN, TORPY, 1998).

A produção de leptina está parcialmente relacionada ao tamanho da massa do TAB e depende ainda dos níveis de insulina, estado energético, hormônios sexuais, e de uma grande variedade de mediadores inflamatórios, incluindo interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (KRYSIK e cols., 2005; LAGO e cols., 2007). Em condições normais os níveis circulantes de leptina correlacionam-se com o conteúdo de gordura corporal. Entretanto durante a obesidade, observa-se que o aumento da leptina não é mais capaz de regular corretamente a ingestão alimentar, caracterizando a redução da sensibilidade à leptina. Em adição, diversos estudos mostraram aumento dos níveis séricos de leptina durante processos infecciosos e inflamatórios (HOWARD e cols., 1999; FAGGIONI e cols., 2001); que ocorre provavelmente, secundário ao aumento de interleucina-1b (IL-1b), TNF- α e interleucina-6 (IL-6). Esses dados sugerem que a atuação da leptina durante processos inflamatórios como em situações de aumento do tecido gorduroso visceral é regulada, em parte, pela liberação de outras adipocinas (FANTUZZI, 2008).

Autores sugerem que níveis reduzidos de aldosterona plasmática podem ser devidos à redução da ingestão de potássio associada à anorexia induzida por leptina (TARTAGLIA e cols., 1995), outra explicação é que ocorra um efeito direto da leptina no córtex adrenal (SHEK e cols., 1998). Já foi demonstrado em culturas de células adrenais primárias, que a leptina pode inibir diretamente a produção de esteróides adrenocorticais e a expressão de mRNA das enzimas do citocromo P450 (TARTAGLIA e cols., 1995). Portanto, a leptina pode diminuir cronicamente a produção de esteróides ao nível da adrenal. Além disso, dados mostram um aumento na atividade da renina plasmática em ratos cronicamente tratados com leptina (0,12 mg / kg por dia durante 7 dias) e que o aumento da renina pode ser devido ao aumento da atividade simpática (SHEK e cols., 1998).

Já é sabido que a dieta H esta diretamente relacionada com a SM na mãe (PENALVA, 2008, LEWIS, 2002). Em modelos animais verificou-se que a dieta H da genitora induz nas proles um fenótipo semelhante à SM humana (GLUCKMAM & HANSON, 2004).

Dados anteriores de nosso laboratório (DE CASTRO e cols.2013) mostram que dietas ricas em frutose e hiperlipídica induzem alterações metabólicas e acúmulo de gordura no fígado e rins dependentes da idade do rato. A dieta hiperlipídica, para os ratos jovens (4 semanas de idade) e a dieta rica em frutose, para os ratos adultos (12 semanas de idade) são as intervenções nutricionais mais eficientes em induzir, em maior extensão, as alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas características da síndrome metabólica humana. Nesse estudo anterior de nosso laboratório (DE CASTRO e cols., 2013) mostramos que ratos submetidos ao consumo de dietas ricas em frutose e dieta hiperlipídica (12 e 4 semanas de idade, respectivamente) sofrem distúrbios metabólicos como aumento do colesterol total e/ou frações e aumento da alanina aminotransferase, associado a alterações histológicas hepáticas como esteatose e presença de processos inflamatórios (DE CASTRO et al., 2013).

Adicionalmente, estudos (WILLIAMS e cols., 2014; ZHENG e cols., 2014; DESAI e cols., 2017; JOHNSON e cols., 2017) epigenéticos recentes sugerem que o ambiente e a alimentação durante a gestação pode influenciar a saúde da prole em longo prazo. Assim, na fase adulta a prole, onde a genitora foi exposta a dieta hiperlipídica, apresenta aumento no peso corporal, menor tolerância à glicose, diminuição da sensibilidade à insulina, aumento do colesterol sérico e esteatose hepática após desmame (ZHENG e cols., 2014). Ainda, a dieta materna rica em gordura durante a gravidez e a lactação pode modular a gliconeogênese, a homeostase lipídica e a expressão gênica na sinalização de coativador dos receptores ativados por proliferadores peroxissomais (PPAR) no início da vida da prole (ZHENG e cols., 2014).

Baseado nessas evidências, este presente projeto visa investigar os efeitos da dieta hiperlipídica submetida aos progenitores (pai e mãe G0) no período do acasalamento, e na progenitora G0 durante a gestação e lactação, sobre diferentes parâmetros nas proles de ratos F1 e F2. Com os resultados

obtidos na realização desse projeto, pretendemos esclarecer se a dieta desequilibrada submetida à progenitora pode gerar distúrbios metabólicos nas proles F1 e F2 e também ampliar o entendimento das alterações nutricionais, biométricas, bioquímicas e hemodinâmicas envolvidas no desenvolvimento e na manutenção do excesso de gordura corporal que acomete um grande número de pacientes em todo mundo.

2 JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos a SM tem sido alvo de muitos estudos devido ao aumento da incidência dessa doença e devido ao fato da doença apresentar múltiplas causas e grande variabilidade na manifestação dos distúrbios entre pacientes. Além disso, existe uma intensa busca para compreendermos os efeitos epigenéticos sobre a saúde da prole, em longo prazo. A gestação e lactação são períodos de grande importância para o desenvolvimento e crescimento da prole.

A má alimentação da gestante pode levar a complicações para a prole no decorrer da vida. Esse estudo se justifica pelos fatos (1) das doenças cardiovasculares, serem uma das mais frequentes causas de morbidade e mortalidade no mundo,(2) do crescente aumento na parcela da população que vem desenvolvendo sobrepeso e obesidade devido ao consumo de dieta H e hipercalórica e (3) dos escassos trabalhos relacionados aos efeitos de tal dieta sobre o desenvolvimento do sistema metabólico e seus mecanismos de controle em indivíduos adultos que foram expostos a ela durante o desenvolvimento fetal (FESTI et al., 2014; BOULANGÉ et al., 2016).

Neste sentido, nosso presente estudo possui como inovação avaliar os efeitos da exposição de ratos à dieta H sobre parâmetros cardiometabólicos das proles F1 e F2. Dessa forma, esperamos incrementar os poucos estudos acerca de como fatores ambientais, como a dieta durante o período perinatal, que a afetam a “programação fetal” durante o desenvolvimento de mamíferos podem gerar e manter quadros de doenças.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da dieta H submetida aos progenitores durante o período de acasalamento, gestação e lactação sobre diferentes parâmetros cardiometabólicos nas proles F1 e F2.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a ingesta alimentar, calórica e de água em ratos G0, G1, F1 e F2;
- Avaliar os parâmetros biométricos (peso relativo do fígado, rins, coração, pâncreas, suprarrenais, depósito de gordura inguinal, retroperitoneal, epididimal e tecido adiposo marrom, índice de Lee e de adiposidade e massa corporal) em ratos G0, G1, F1 e F2;
- Avaliar a resistência à insulina através da glicemia de jejum, insulina, HOMA-IR, HOMA- β em ratos G0, G1 e F1;
- Avaliar os parâmetros bioquímicos através da leptina, teste de tolerância oral à glicose (TTOG) e perfil lipídico em ratos G0, G1, F1 e F2;
- Avaliar os parâmetros hemodinâmicos através da avaliação direta da pressão arterial basal, frequência cardíaca basal, sensibilidade da bradicardia reflexa e bloqueio simpático pelo hexametônio em ratos G0, G1, F1 e F2.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados machos (290g \pm 10; n= 20) e fêmeas (220g \pm 10; n=20) Fisher, todos com 90 dias de idade para acasalamento com o intuito de obter proles, que foram utilizadas para experimentação com 90 dias após nascimento. Os animais permaneceram em gaiolas individuais e em ciclo claro-escuro 12h – 12h no Centro de Ciência Animal da UFOP (CCA/UFOP). Durante todo o experimento os animais tiveram livre acesso à água e às dietas. 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 nº do protocolo 2016/49 (ANEXO I).

4.2 Definição das Dietas

Após 90 dias de idade, os animais machos e fêmeas consumiram dieta C (comercial para roedores, Nuvilab CR1) ou dieta H com 37% de banha (DE CASTRO e cols, 2013) durante o período de acasalamento, gestação e lactação. Todas as proles receberam dieta (C). A composição das dietas está descrito na tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Composição e conteúdo energético das dietas

DIETA CONTROLE (C)			DIETA HIPERLIPÍDICA (H)		
Ingredientes	p/ 1 kg	Un	Ingredientes	p/ 1 kg	Un
Proteína	220,000	g	Leite condensado	316,000	g
			Caseína	180,500	g
Carboidrato	575,000	g	Frutose	34,200	g
Lípido	123,000	g	Banha	370,000	g
Fibra bruta	70,000	g	Fibra (cel. Microcrist.)	50,000	g
Cálcio	10,000	g	Mix mineral	35,000	g
Fósforo	6.000	mg	Mix vitamina	10,000	g
Mix mineral	90,000	g	Cloridrato de Colina	2,500	g
			DL-Metionina	1,800	g
Kcal/ g	3,50		Kcal/ g	5,20	
TOTAL (g)	1000,0		TOTAL (g)	1000,0	

Composição da dieta (g/Kg) consumidas pelos animais.

4.3 Protocolo Experimental

No acasalamento, uma fêmea e um macho (geração G0), virgens, não consanguíneos, com 90 dias de idade, foram alocados em gaiola plástica (30 cm x 21 cm x 19 cm). Os animais foram divididos em dois grupos e receberam dieta C ou H por 10 dias. Findado este período, os machos foram retirados e as fêmeas foram realocadas em gaiolas individuais, onde continuaram a receber, dieta C ou H durante todo o período de gestação (28 dias) e de lactação (21 dias), totalizando 59 dias.

No nascimento, as ninhadas foram manipuladas aleatoriamente de maneira tal que foram mantidos até oito filhotes por mãe a fim de garantir crescimento homogêneo. No desmame, os machos e as fêmeas das ninhadas (geração F1) foram divididos em dois grupos: Um oriundo das genitoras que receberam dieta C e outro proveniente das genitoras que receberam dieta H. Estes animais foram realocados em gaiolas coletivas (4 a 5 animais por gaiola, separados por sexo) e receberam dieta C por mais 90 dias. Uma parte dos ratos machos e fêmeas da geração F1 foi separada para acasalamento para gerar os ratos F2. Para tanto, foram acasalados machos e fêmeas F1 (geração G1), não consanguíneos, oriundos da geração G0 que foram divididos em dois grupos: machos e fêmeas onde a geração G0 consumiu dieta C e machos e fêmeas onde a geração G0 consumiu dieta H. A geração F2 foi acompanhada até 90 dias de idade e consumiu apenas dieta C.

4.4 Definição dos grupos

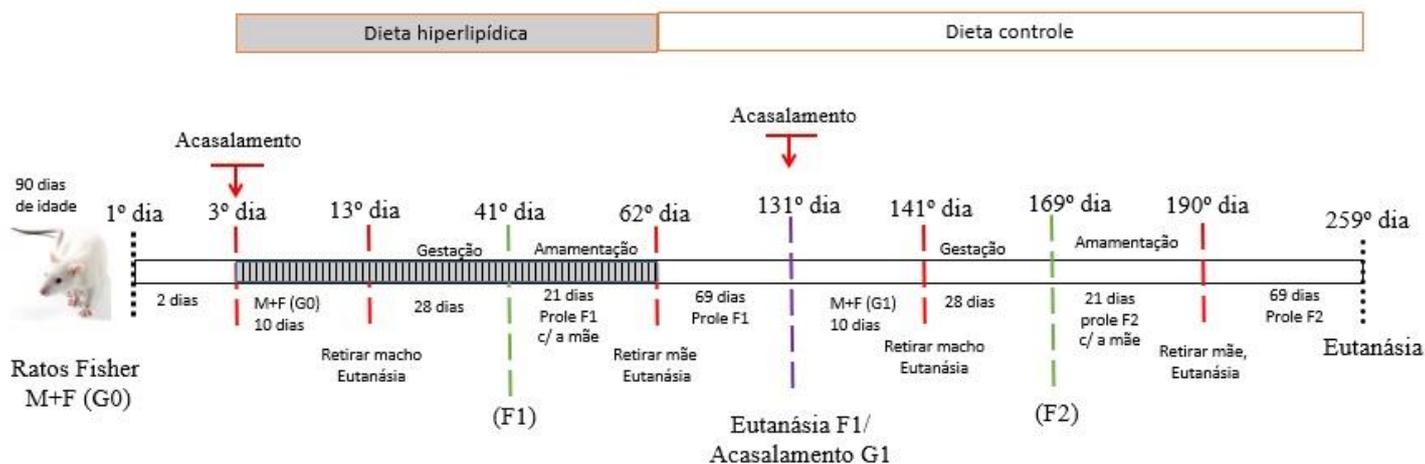


Figura 2: Delineamento experimental

Os ratos foram divididos em 16 grupos:

Grupo G0CM: progenitor submetido à dieta C no período de acasalamento, totalizando 10 dias;

Grupo G0HM: progenitor submetido à dieta H no período de acasalamento, totalizando 10 dias;

Grupo G0CF: progenitora submetida à dieta C no período de acasalamento, gestação e lactação, totalizando 59 dias;

Grupo G0HF: progenitora submetida à dieta H no período de acasalamento, gestação e lactação, totalizando 59 dias;

Grupo F1CM: prole macho oriundo de progenitores que consumiram dieta C e que logo após desmame consumiu dieta C até completar 90 dias de idade.

Grupo F1HM: prole macho oriunda de progenitores que consumiram dieta H e que logo após desmame consumiu dieta C até completar 90 dias de idade.

Grupo F1CF: prole fêmea foi oriunda de progenitores que consumiram dieta C e que logo após desmame consumiu dieta C até completar 90 dias de idade.

Grupo F1HF: prole fêmea foi oriunda de progenitores que consumiram dieta H e que logo após desmame consumiu dieta C até completar 90 dias de idade.

Grupo G1CM: macho F1 onde os progenitores (G0) comeram dieta C, que se tornou genitor da prole F2 e submetido à dieta C.

Grupo G1HM: macho F1 onde os progenitores (G0) comeram dieta H, que se tornou genitor da prole F2 e submetido à dieta C.

Grupo G1CF: fêmea F1 onde os progenitores (G0) comeram dieta C, que se tornou genitora da prole F2 e submetida à dieta C.

Grupo G1HF: fêmea F1 onde os progenitores (G0) comeram dieta H, que se tornou genitora da prole F2 e submetida à dieta C.

Grupo F2CM: prole macho oriundo de genitores que consumiram dieta C, mas que os progenitores consumiram dieta C e que logo após o desmame a prole consumiu dieta C até completar os 90 dias de idade.

Grupo F2HM: prole macho oriunda de genitores que consumiram dieta C, mas que os progenitores consumiram dieta H e que logo após desmame a prole consumiu apenas dieta C até completar 90 dias de idade.

Grupo F2CF: prole fêmea oriunda de genitores que consumiram dieta C, mas que os progenitores consumiram dieta C e que logo após desmame a prole consumiu apenas dieta C até completar 90 dias de idade.

Grupo F2HF: prole fêmea oriunda de genitores que consumiram dieta C, mas que os progenitores consumiram dieta H e que logo após desmame a prole consumiu apenas dieta C até completar 90 dias de idade.

4.5 Avaliação do consumo alimentar e água

Duas vezes por semanas foram pesado a dieta e medido o volume de água consumido de todas as gaiolas e posteriormente foi calculado o consumo médio de dieta e de água por animal.

4.6 Avaliação indireta da pressão arterial média

Os grupos G0CM, G0HM, G1CM e G1HM foram submetidos à plestimografia de cauda um dia após o acasalamento para avaliação indireta da PAM e da FC.

O animal foi colocado em um sistema de contenção para ratos (LE 5022, Panlab) e permaneceu em uma caixa de aquecimento (LE 5610, Panlab) para facilitar as medidas de PAM. Neste sistema de contenção somente a cauda do animal fica mantida exteriorizada na qual foi acoplado um manguito de borracha e um transdutor (LE 5160-R, Panlab) para registro da PAM e FC. Cerca de cinco mensurações foram realizadas em cada animal e a média foi utilizada nas análises dos resultados.

4.7 Confeção de cânulas vasculares

Cânulas foram confeccionadas a partir de 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 oclisor metálico.

4.8 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 vásculo-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. Em seguida, as mesmas foram amarradas junto ao feixe com fio cirúrgico.

4.9 Avaliações cardiovasculares direta da pressão arterial média

Findadas às 48 horas de recuperação da cirurgia para implantação das cânulas, 0,1 mL de uma solução de heparina em salina isotônica (1000 UI/mL) foi injetada na cânula arterial (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 estocados 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).

4.10 Avaliação da Sensibilidade da Bradicardia reflexa

Após os 90 dias, nos ratos (F1CM, F1HM, F1CF, F1HF, F2CM, F2HM, F2CF e F2HF) foram avaliados a sensibilidade da bradicardia barorreflexa (SBR). Para a avaliação da SBR, os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de uma mistura de quetamina (80mg/kg) com xilazina (7mg/kg), para implantação das cânulas na artéria e na veia femorais esquerdas para

mensuração da pressão arterial pulsátil (PAP) e para administração de drogas, respectivamente. Após a cirurgia, o analgésico cetoprofeno intramuscular ($4\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 0,1\text{mL}$) e os antibióticos benzilpenicilinabenzatina (600.000 UI), benzilpenicilina procaína (300.000 UI), benzilpenicilina potássio (300.000 UI) e estreptomicina sulfato (500 mg) 0,1mL subcutâneo foram administrados. Cada animal se recuperou da cirurgia em gaiolas individuais por um período de 48 horas com livre acesso a água e dieta.

A SBR foi avaliada relacionando-se as alterações reflexas de FC induzidas por alterações transitórias da PAM. Para produzir alterações da PAM, os animais foram submetidos a injeções (em bolus) endovenosas (0,1 ml) de doses crescentes de fenilefrina que variavam de 0,5 a 50,0 μg (Sigma Chemical Co.,USA) de maneira a se obter respectivamente respostas pressoras de aproximadamente 10, 20, 30, 40 mmHg. Um intervalo mínimo de um minuto foi mantido entre as injeções, para permitir que a PAM e FC retornassem aos valores basais. Os picos das mudanças na FC ocorreram durante os primeiros 5-10 segundos e corresponderam à máxima alteração na PAM produzidas pela fórmula: $60.000/\text{FC}$ (Figura 3).

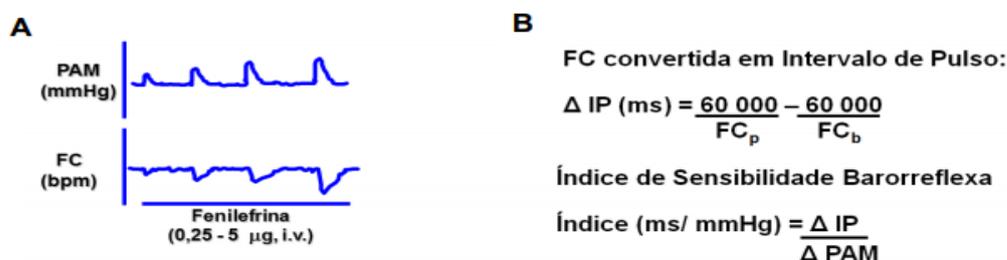


Figura 3: Representação esquemática do teste de sensibilidade do controle reflexo da FC através de injeções em doses crescentes de fenilefrina (painel A) e fórmulas de conversão da FC em intervalo de pulso (IP, ms) e do índice de sensibilidade barorreflexa (ms/mmHg) (painel B). PAM; FC de pico; FC basal; delta de variação (Δ).

4.11 Avaliação do bloqueio simpático sobre a PAM

O bloqueador ganglionar simpático, hexametônio (cloreto de hexametônio) (Sigma Chemical Co., USA), foi preparado em solução de (20 mg/kg i.v.). Estas soluções foram aliquotadas em microtubos e permaneceram congeladas até o momento do uso no freezer -20°C . Após o término das

injeções (em bolus) endovenosas (0,1 ml) de doses crescentes de fenilefrina, esperou-se 10 minutos para que o registro voltasse aos valores basais e em seguida foi administrada a dose intravenosa de 20mg/Kg e logo após, aguardou mais 5 minutos e encerrou-se o registro.

4.12 Avaliação dos parâmetros biométricos

Todos os animais foram pesados duas vezes por semana até o final do protocolo experimental. Ao final do experimento, foram realizadas as medidas do comprimento naso-anal para cálculo do índice de Lee, indicado pela equação: $[\text{massa corporal (g)}^{1/3} / \text{comprimento naso-anal (cm)} \times 1000]$ e em seguida foram eutanasiados e os órgãos: rins, fígado, coração, pâncreas e suprarenais, tiveram seus pesos úmidos (g/100g da massa corporal do rato) avaliados. Os depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, epididimal foram dissecados e pesados (g/100g do da massa corporal do rato) e foi realizado o índice de adiposidade através da fórmula $[\text{massa absoluta (g) dos depósitos de gordura inguinal} + \text{retroperitoneal} + \text{epididimal} / \text{massa corporal do rato (g)} \times 100]$ (Levin, 1992) e depósito de tecido adiposo marrom intraescapular foi dissecado e pesado (g/100g do rato).

4.13 Glicemia de jejum e teste de tolerância oral a glicose

Em um grupo de 8 animais realizou-se a dosagem da glicemia de jejum e o teste de tolerância oral a glicose (TTOG). Os ratos foram submetidos ao jejum noturno de 8 horas. No dia seguinte foi preparada uma solução de glicose 40%, que foi administrada via gavagem para os animais acordados na dosagem de 2g/Kg. As amostras de sangue foram retiradas da cauda dos animais antes e aos tempos 10, 20, 30 e 90 minutos após administração oral da solução de glicose de acordo com realizado por Song e colaboradores (SONG e cols., 2004). Os valores de glicose foram obtidos a partir da colocação de uma gota de sangue da cauda dos animais em fitas do glicosímetro do tipo Accu-chek active®.

4.14 Análises Bioquímicas

Após a eutanásia dos animais submetidos ao jejum noturno foram coletadas amostras de sangue (2 a 3 ml) com heparina. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas (4000 rpm; 4°C; 6 min), o plasma aliquoteado e guardado a – 80°C, para posteriores análises bioquímicas.

4.14.1 Dosagem colesterol total, triglicérides e glicose

Os níveis de colesterol total, triglicérides e glicose foram determinados através de kits comerciais individuais (Labtest, Lagoa Santa – MG, Brasil) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As análises foram realizadas no laboratório de Nutrição experimental (LABNEX/UFOP).

4.14.2 Dosagem da insulina e da leptina por ELISA

Os níveis da insulina e da leptina foram determinados pelo método de imunoenensaio do tipo Elisa sanduíche utilizando o Kit *Ultra sensitive Rat insulin Elisa Kit* (Crystal Chem, Downers Grove, IL., USA). O princípio desta dosagem e o protocolo estão descritos detalhadamente nos anexos II e III.

4.15 Cálculo HOMA IR e HOMA β

As variáveis que estimam a resistência à insulina utilizadas no presente estudo foram calculadas a partir das seguintes fórmulas:

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

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

IJ= insulinemia de jejum em $\mu\text{m/L}$

GJ= glicemia de jejum em mmol/L (MATTHEWS, 1985)

4.16 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software *Prism 6 for Windows*, (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Os dados foram expressos como média com o respectivo erro padrão da média para os animais de cada dieta. Os parâmetros foram analisados por test “t de Student”, com exceção do TTOG que foi avaliado pelo teste ANOVA *two-way*, seguido do pós-teste Bonferroni. O nível de significância foi previamente fixado em $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos parâmetros biométricos dos progenitores G0 e genitores G1

Com o objetivo de avaliar os parâmetros biométricos dos progenitores G0 submetidos à dieta H (G0HM) ou C (G0CM) durante o acasalamento (10 dias) e genitores G1 (G1HM e G1CM) oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C até completar 90 dias de idade, mensurou-se o peso relativo do fígado, dos rins, do coração, do pâncreas, das suprarrenais, dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, epididimal, do tecido adiposo marrom e da massa corporal; calculou-se o índice de Lee e o índice de adiposidade.

Como mostrado na tabela 2, os progenitores do grupo G0HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) da massa corporal comparados ao grupo G0CM. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

Em relação aos genitores do grupo G1HM os dados foram similares ao grupo G1CM em todos os parâmetros analisados.

Tabela 2. Parâmetros biométricos dos progenitores G0 e genitores G1

Parâmetros	G0CM	G0HM	G1CM	G1HM
Fígado (g/100g)	3,36±0,06	3,21±0,05	3,24±0,04	3,32±0,07
Rim (g/100g)	0,72±0,01	0,68±0,02	0,67±0,01	0,68±0,01
Coração (g/100g)	0,36±0,01	0,35±0,01	0,39±0,01	0,35±0,01
Pâncreas (g/100g)	0,32±0,02	0,36±0,02	0,39±0,01	0,43±0,01
Suprarrenais (g/100g)	0,02±0,00	0,04±0,01	0,02±0,00	0,02±0,00
Depósito de gordura inguinal (g/100g)	1,43±0,09	1,46±0,08	2,16±0,14	2,04±0,05
Depósito de gordura retroperitoneal (g/100g)	1,88±0,09	2,13±0,18	1,72±0,09	1,90±0,10
Depósito de gordura epididimal (g/100g)	1,71±0,09	1,87±0,15	1,64±0,08	1,72±0,09
TA marrom (g/100g)	0,07±0,00	0,07±0,00	0,11±0,01	0,09±0,00
Índice de Lee	297±3,44	300±4,89	295±3,38	310±4,76
Adiposidade	5,04±0,22	5,48±0,17	5,81±0,38	6,19±0,20
Massa corporal (g)	310±4,63	335±7,74*	363±5,15	370±4,94
N	8	7	9	8

Parâmetros biométricos de progenitores G0 submetidos à dieta H (G0HM) ou C (G0CM) durante o acasalamento e genitores G1 (G1HM e G1CM) oriundos de progenitores (G0CF e G0CM) ou (G0HF e G0HM) e que logo após o desmame consumiram dieta C. *p<0,05 comparado aos grupos G0CM e G1CM (teste *t* de *student*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Peso relativo (g/100g da massa corporal do rato) de órgãos e tecidos, cálculo do índice de Lee [massa corporal (g)^{1/3} /comprimento naso-anal (cm) x 1000] e 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.

5.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos dos progenitores G0 e genitores G1

Com a intenção de avaliar os parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos dos progenitores G0 submetidos à dieta H (G0HM) ou C (G0CM) durante o acasalamento (10 dias) e genitores G1 (G1HM e G1CM) oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) e C (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C até completar 90 dias de idade foram mensuradas a glicemia de jejum, o teste de tolerância oral a glicose (TTOG), os níveis de colesterol total e de triglicérides, da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) de forma indireta por pletismografia de cauda.

A figura 4 mostra que os progenitores G0HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) da PAM ($126 \pm 4,3$ mmHg; $n=6$) e da FC ($408 \pm 14,5$ bpm; $n=6$) comparado ao grupo G0CM ($112 \pm 3,7$ mmHg; $n=7$, $371 \pm 6,7$ bpm; $n=7$, respectivamente). Não houve diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

Já os genitores G1HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) da glicemia de jejum ($96,5 \pm 6,8$ mg/dL; $n=7$) e dos níveis de triglicérides ($207 \pm 14,7$ mg/dL; $n=7$) comparado ao grupo G1CM ($82,6 \pm 2,41$ mg/dL; $n=8$, $152 \pm 3,6$ mg/dL; $n=8$ respectivamente). E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

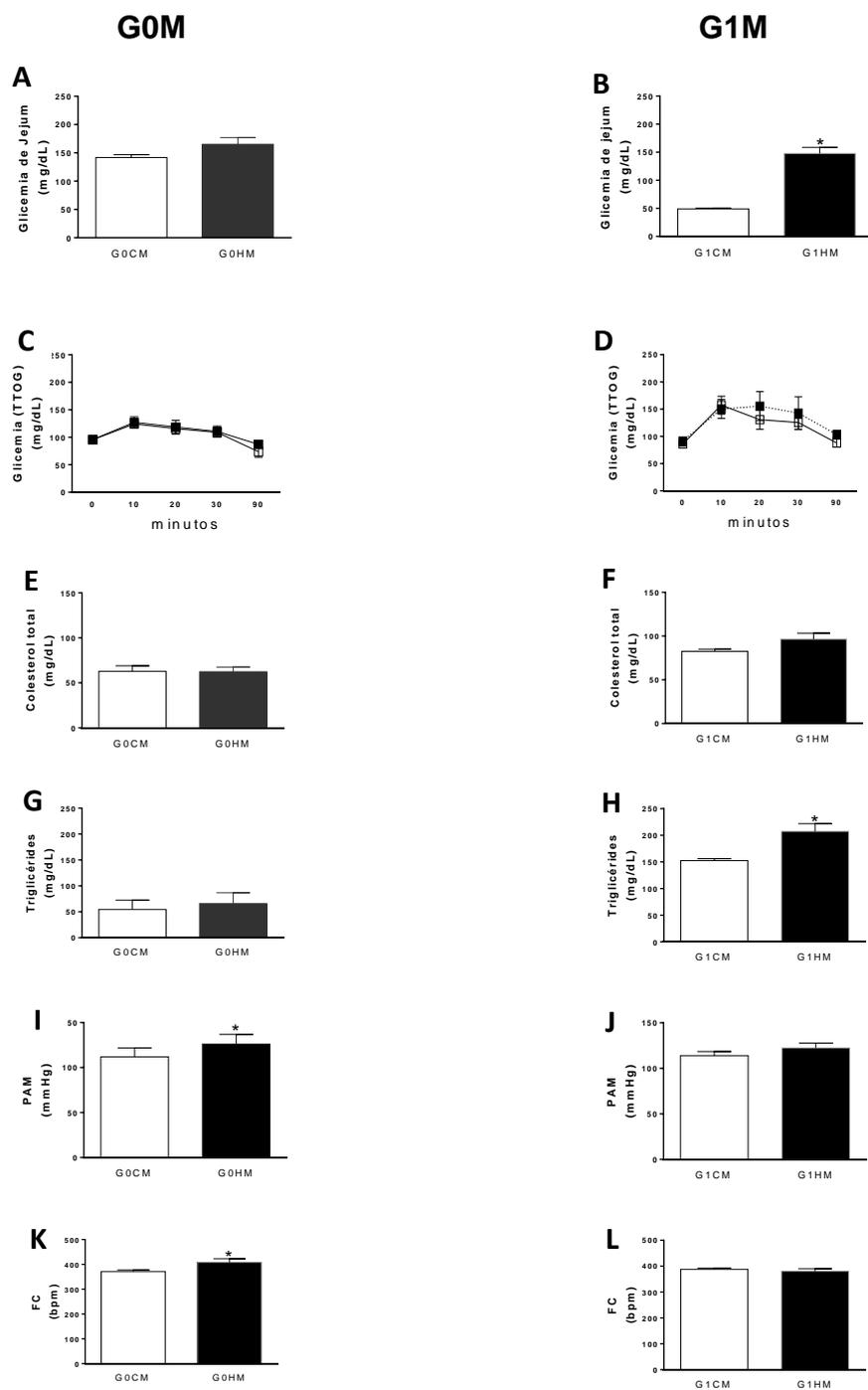


Figura 4: Parâmetros bioquímicos e hemodinâmicos de progenitores G0 (painéis A, C, E, G, I e K) submetidos à dieta H (G0HM) ou C (G0CM) durante o acasalamento e genitores G1 (painéis B, D, F, H, J e L) (G1HM e G1CM) oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e que após desmame consumiram dieta C. * $p < 0,05$ comparado aos grupos G0CM e G1CM (teste *t de student*) e para análise teste de tolerância oral a glicose (TTOG, mg/dL, painéis C e D) foi utilizado ANOVA *two* seguido pós teste Bonferroni. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Níveis da glicemia de jejum (mg/dL, painéis A e B), de colesterol total (mg/dL, painéis E e F), de triglicérides (mg/dL, painéis G e H), (PAM, mmHg, painéis I e J), FC (bpm, painéis K e L). N= 6 e 7.

5.3 Avaliação dos parâmetros nutricionais das progenitoras G0 e genitoras G1

Com o intuito de avaliar os parâmetros nutricionais das progenitoras G0 submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento (10 dias) a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) e das genitoras G1 (G1HF e G1CF) oriundas de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C até completar 90 dias de idade mensurou-se a ingesta alimentar, a ingesta calórica e a ingesta de água.

Como mostrado na tabela 3, às progenitoras do grupo G0HF apresentaram redução ($p < 0,05$) na ingesta alimentar no período da gestação e lactação ($250 \pm 14,6$ g; $n=6$, $652 \pm 36,9$ g; $n=6$ respectivamente) e a ingesta de água (155 ± 96 mL; $n=6$, $170 \pm 9,5$ mL; $n=6$ respectivamente) comparado ao grupo G0CF ($360 \pm 15,5$ g; $n=6$, 1092 ± 39 g; $n=6$, 210 ± 10 mL; $n=6$, 284 ± 16 mL; $n=6$, respectivamente). E não foi observada diferença significativa na ingesta calórica.

Em relação às genitoras do grupo G1HF os dados foram similares ao grupo G1CF em todos os parâmetros analisados.

Tabela 3. Parâmetros nutricionais das progenitoras G0 e genitoras G1

Parâmetros	Gestação		Lactação		Gestação		Lactação	
	G0CF	G0HF	G0CF	G0HF	G1CF	G1HF	G1CF	G1HF
Ingesta alimentar (g)	360±15	250±15*	1092±39	652±37*	380±12	361±15	1080±34	1055±36
Ingesta calórica (Kcal)	1261±54	1200±76	3822±14	3389±19	1329±43	1313±78	3781±121	3699±187
Ingesta água (ml)	210±10	155±10*	284±16	170±10*	215±10	219±9	273±15	185±9,3
N	6	6	6	6	6	6	6	6

Parâmetros nutricionais progenitoras G0 submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento, a gestação e a lactação e das genitoras G1 (G1HF e G1CF) oriundas de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C. *p<0,05 comparado aos grupos G0CF e G1CF (teste *t* de *student*) Valores expressos como média ± erro padrão da média. N= número de animais.

5.4 Avaliação dos parâmetros biométricos das progenitoras G0 e genitoras G1

Com o objetivo de avaliar os parâmetros biométricos das progenitoras G0 submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento (10 dias) a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) e das genitoras G1 (G1HF e G1CF) oriundas de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C até completar 90 dias de idade mensurou-se o peso relativo do fígado, dos rins, do coração, do pâncreas, das suprarrenais, dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, do tecido adiposo marrom e da massa corporal; calculou-se o índice de Lee e o índice de adiposidade.

Como mostrado na tabela 4, às genitoras do grupo G0HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) do peso relativo do pâncreas, dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, do tecido adiposo marrom, do índice de adiposidade e da massa corporal comparado ao grupo G0CF. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

Já as genitoras do grupo G1HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) da massa corporal comparado ao grupo G1CF. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

Tabela 4. Parâmetros biométricos das progenitoras G0 e genitoras G1

Parâmetros	G0CF	G0HF	G1CF	G1HF
Fígado (g/100g)	4,25±0,25	4,68±0,27	4,51±0,37	4,51±0,42
Rins (g/100g)	0,82±0,04	0,81±0,01	0,85±0,04	0,87±0,04
Coração (g/100g)	0,48±0,01	0,52±0,01	0,86±0,10	0,47±0,02
Pâncreas (g/100g)	0,43±0,05	0,63±0,06*	0,40±0,04	0,42±0,04
Suprarrenais (g/100g)	0,04±0,00	0,05±0,01	0,05±0,00	0,06±0,00
Depósito de gordura inguinal (g/100g)	0,75±0,11	1,10±0,09*	0,90±0,06	1,09±0,10
Depósito de gordura retroperitoneal (g/100g)	1,81±0,19	5,00±0,20*	2,18±0,24	2,49±0,67
TA marrom (g/100g)	0,07±0,01	0,14±0,01*	0,12±0,00	0,10±0,02
Índice de Lee	0,28±0,02	0,29±0,81	0,29±0,00	0,31±0,01
Adiposidade	3,40±0,47	7,42±0,33*	3,25±0,31	3,58±0,77
Massa corporal (g)	243±3,48	287±5,84*	216±6,14	256±6,03*
N	6	6	7	6

Parâmetros biométricos das progenitoras G0 submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento, a gestação e a lactação e das genitoras G1 (G1HF e G1CF) oriundas de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C. *p<0,05 comparado aos grupos G0CF e G1CF (teste *t* de *student*) Valores expressos como média ± erro padrão da média. Peso relativo (g/100g da massa corporal do rato) de órgãos e tecidos, cálculo do índice de Lee [massa corporal (g)^{1/3} /comprimento naso-anal (cm) x 1000] e de adiposidade [Massa absoluta (g) dos depósitos de gordura inguinal + retroperitoneal / da massa corporal do rato (g) x 100]. N= número de animais. TA = tecido adiposo.

5.5 Avaliação da resistência á insulina das progenitoras G0 e genitoras G1

Com o objetivo de avaliar a resistência á insulina das progenitoras G0 submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento (10 dias) a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) e das genitoras G1 (G1HF e G1CF) oriundas de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C até completar 90 dias de idade foram mensurados os níveis da glicose de jejum, da insulina e do cálculo do HOMA IR e do HOMA β .

A Tabela 05 mostra que as progenitoras do grupo G0HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos níveis da glicemia de jejum e no cálculo do HOMA-IR comparado ao grupo G0CF. No entanto, os níveis de insulina e o cálculo do HOMA- β no grupo G0HF foram similares ($p < 0,05$) ao grupo G0CF.

Já as genitoras do grupo G1HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) da glicemia de jejum comparado ao grupo G1CF. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

Tabela 5. Avaliação da resistência à insulina das progenitoras G0 e genitoras G1

Parâmetros	G0CF	G0HF	G1CF	G1HF
Glicemia (mg/dL)	107±6,57	135±4,09*	102±5,54	129±3,02*
Insulina (ng/ml)	0,59±0,01	0,62±0,01	0,89±0,01	1,09±0,02
HOMA – IR	4,51±0,22	6,09±0,18*	5,79±30,1	6,17±0,35
HOMA - β	167±47,4	93±36,8*	189±38,9	155±18,5
N	6	6	7	6

Avaliação da resistência à insulina das progenitoras G0 submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento, a gestação e a lactação e das genitoras G1 (G1HF e G1CF) oriundas de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C. * $p < 0,05$ comparado aos grupos G0CF e G1CF (teste *t* de *student*). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) = insulina jejum (IJ) x (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.

5.6 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das progenitoras G0 e genitoras G1

Com o intuito de avaliar os parâmetros bioquímicos das progenitoras G0 submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento (10 dias) a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) e das genitoras G1 (G1HF e G1CF) oriundas de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C até completar 90 dias de idade foram mensurados os níveis de leptina, o teste de tolerância oral a glicose (TTOG), níveis de colesterol total e de triglicérides.

A figura 5 mostra que as progenitoras do grupo G0HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos níveis de triglicérides ($107 \pm 6,6$ mg/dL; $n=6$) comparado ao grupo G0CF ($85,2 \pm 5,9$ mg/dL; $n=6$). Não houve diferença significativa nos demais parâmetros analisados.

Já as genitoras do grupo G1HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) dos níveis de colesterol total ($72 \pm 3,1$ mg/dL; $n=6$) e de triglicérides ($95 \pm 3,5$ mg/dL; $n=6$) comparado ao grupo G1CF ($54 \pm 5,1$; $59 \pm 5,0$; $n=7$, respectivamente). E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

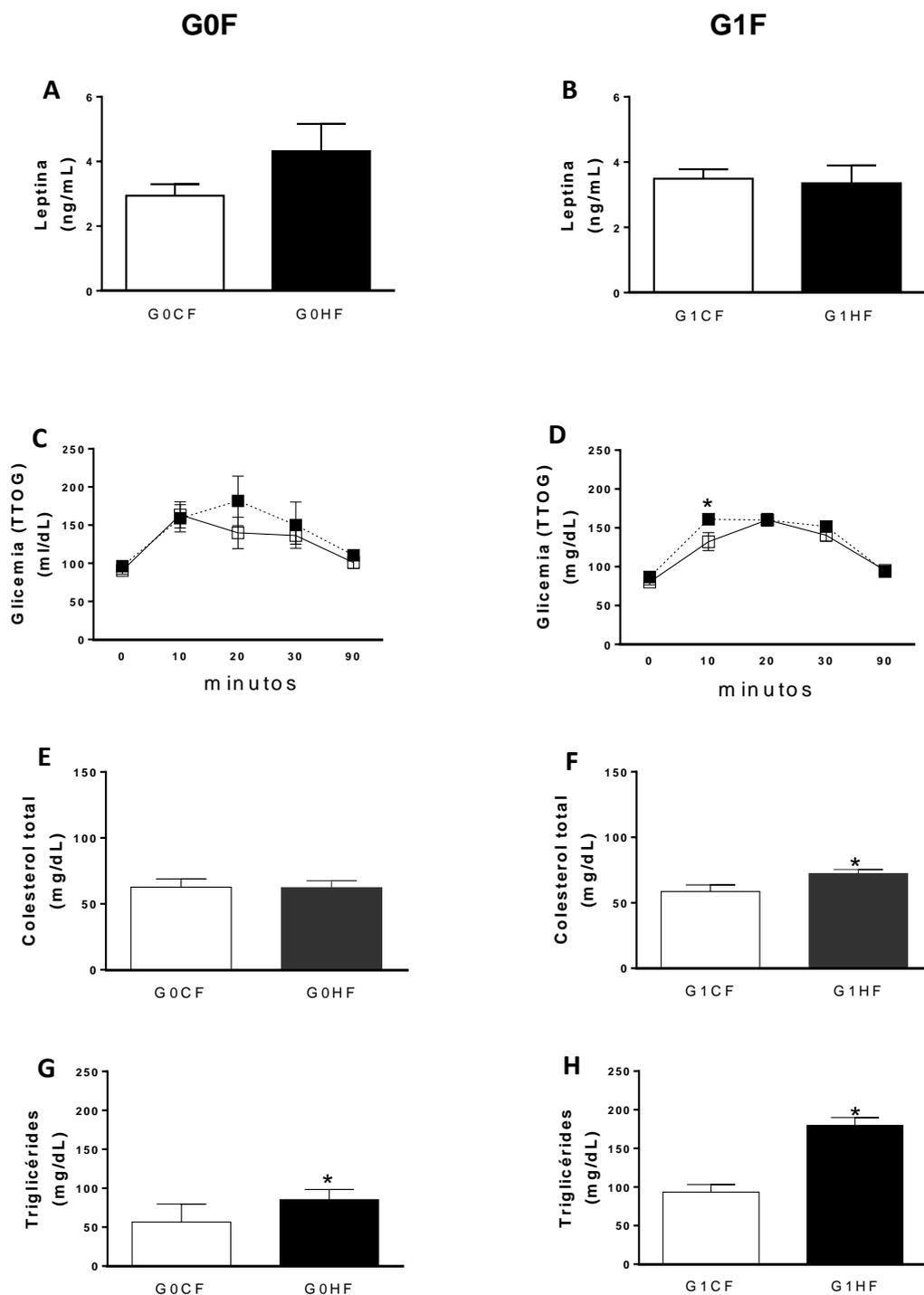


Figura 5: Parâmetros bioquímicos das progenitoras G0 (painéis A, C, E, G) submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento, a gestação e a lactação e das genitoras G1 (painéis B, D, F, H) oriundas de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C. * $p < 0,05$ comparado aos grupos G0CF e G1CF (teste *t* de *student*) e para análise teste de tolerância oral a glicose (TTOG) foi utilizado ANOVA *two* seguido pós teste Bonferroni. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Níveis de leptina (ng/mL, painéis A e B), TTOG (mg/dL, painéis C e D), níveis de colesterol total (mg/dL, painéis E e F) e de triglicérides (mg/dL, painéis G e H). N= 6.

5.7 Avaliações parâmetros hemodinâmicos das progenitoras G0 e genitoras G1.

Com a intenção de avaliar os parâmetros hemodinâmicos das progenitoras G0 submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento (10 dias) a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) e das genitoras G1 (G1HF e G1CF) oriundas de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C até completar 90 dias de idade foi mensurada a pressão arterial média (PAM, mmHg), a frequência cardíaca (FC, bpm), sensibilidade barorreflexa (SBR, ms/mmHg), variação da PAM induzida pelo hexametônio (20 mg/ kg, iv; Δ PAM, mmHg), e variação da FC (Δ FC, bpm).

A figura 6 mostra que as progenitoras F0HF apresentaram aumento $p < 0,05$ da PAM ($134 \pm 7,6$ mmHg; $n=6$) e maior redução da variação da PAM induzida pelo hexametônio ($-47,8 \pm 1,0$ mmHg; $n=6$) em relação ao grupo F0CF ($106 \pm 2,1$ mmHg; $-40,8 \pm 0,4$ mmHg; $n=6$ e 7 respectivamente. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

As genitoras G1HF apresentaram maior redução ($p < 0,05$) da variação da PAM induzida pelo hexametônio ($-45,5 \pm 1,0$ mmHg; $n=6$) em relação ao grupo F1CF ($-34,2 \pm 2,2$) mmHg; $n=6$ e 7 respectivamente. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

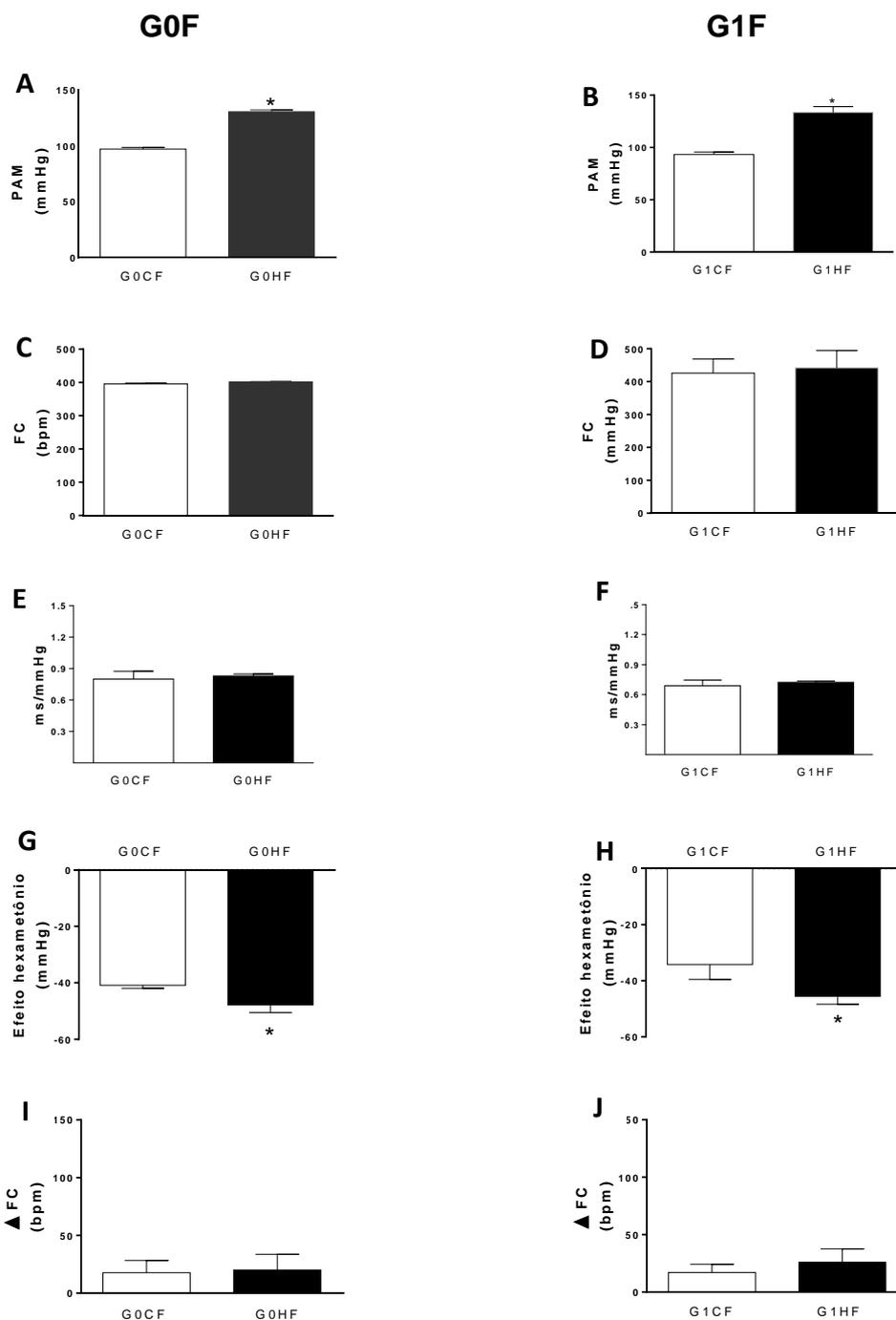


Figura 6: Parâmetros hemodinâmicos das progenitoras G0 (painéis A, C, E, G, I) submetidas à dieta H (G0HF) ou C (G0CF) durante o acasalamento, a gestação e a lactação e das genitoras G1 (painéis B, D, F, H, J) oriundas de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e que após o desmame consumiram dieta C. * $p < 0,05$ comparado aos grupos G0CF e G1CF (teste *t* de *student*). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. PAM (mmHg, painéis A e B), FC(bpm, painéis C e D), sensibilidade barorreflexa (ms/mmHg, painéis E e F), variação da PAM induzida pelo hexametônio (20 mg/ kg, iv; Δ PAM, mmHg; painéis G e H) e (Δ FC, bpm; painel H e J). N= 6.

5.8 Avaliação dos parâmetros nutricionais das proles F1 macho e fêmea

Com o intuito de avaliar os parâmetros nutricionais das proles macho (F1HM e F1CM) e fêmea (F1HF e F1CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) mensurou-se a ingesta alimentar, ingesta calórica e a ingesta de água.

Como mostrado na tabela 6, os machos e as fêmeas dos grupos F1HM e F1HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) na ingesta alimentar, calórica e de água comparado aos grupos F1CM e F1CF.

Tabela 6. Parâmetros nutricionais das proles F1

Parâmetros	F1CM	F1HM	F1CF	F1HF
Ingesta alimentar (g)	128±6,5	226±5,4*	98,8±3,7	168±6,1*
Ingesta calórica (Kcal)	449±12,9	791±12,3*	346±12,7	587±11,5*
Ingesta água (ml)	154±10,2	238±11,9*	128±6,9	164±7,9*
N	16	14	18	9

Parâmetros nutricionais das proles macho (F1HM e F1CM) e fêmea (F1HF e F1CF) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF). * $p < 0,05$ comparado aos grupos F1CM e F1CF (teste *t* de *student*). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. N= número de animais.

5.9 Avaliação dos parâmetros biométricos das proles F1 macho e fêmea

Com o objetivo de avaliar os parâmetros biométricos das proles macho (F1HM e F1CM) e fêmea (F1HF e F1CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) mensurou-se o peso relativo do fígado, dos rins, do coração, do pâncreas, das suprarrenais, dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, tecido adiposo marrom e da massa corporal; calculou-se índice de Lee e o índice de adiposidade.

Como mostrado na tabela 7, os machos do grupo F1HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, epididimal e do tecido adiposo marrom, do índice de adiposidade e da massa corporal comparado ao grupo F1CM. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

As fêmeas do grupo F1HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, do índice de adiposidade e da massa corporal comparado ao grupo F1CF. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

Tabela 7. Parâmetros biométricos das proles F1

Parâmetros	F1CM	F1HM	F1CF	F1HF
Fígado (g/100g)	3,35±0,09	3,55±0,09	3,84±0,19	4,04±0,19
Rim (g/100g)	0,72±0,02	0,77±0,02	0,98±0,06	1,02±0,04
Coração (g/100g)	0,65±0,02	0,68±0,03	0,80±0,04	0,90±0,05
Pâncreas (g/100g)	0,41±0,02	0,43±0,02	0,45±0,01	0,48±0,05
Suprarrenais (g/100g)	0,02±0,00	0,09±0,06	0,07±0,02	0,08±0,04
Depósito de gordura inguinal (g/100g)	2,30±0,18	5,67±3,69*	1,55±0,07	1,93±0,16*
Depósito de gordura retroperitoneal (g/100g)	1,71±0,15	5,89±3,61*	3,64±0,26	5,01±0,26*
Depósito de gordura epididimal (g/100g)	1,49±0,12	6,14±4,08*	Não se aplica	Não se aplica
TA marrom (g/100g)	0,12±0,01	0,36±0,24*	0,15±0,01	0,16±0,02
Índice de Lee	0,30±3,44	0,31±4,89	0,29±0,02	0,30±0,01
Adiposidade	5,50±0,39	17,7±1,38*	5,19±0,31	6,64±0,40*
Massa corporal (g)	299±0,70	341±1,27*	192±3,88	218±5,14*
N	16	14	18	9

Parâmetros biométricos das proles macho (F1HM e F1CM) e fêmea (F1HF e F1CF) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF). *p<0,05 comparado aos grupos F1CM e F1CF (teste *t* de *student*). Valores expressos como média ± erro padrão da média. Peso relativo (g/100g da massa corporal do rato) de órgãos e tecidos, cálculo do índice de Lee [massa corporal (g)^{1/3} / comprimento naso-anal (cm) x 1000] e 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.

5.10 Avaliação da resistência a insulina das proles F1 macho e fêmea

Com o objetivo de avaliar a resistência à insulina das proles macho (F1HM e F1CM) e fêmea (F1HF e F1CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) foram mensurados os níveis da glicose de jejum, de insulina, do cálculo de HOMA IR e de HOMA β .

A Tabela 08 mostra que os machos do grupo F1HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos níveis da glicemia de jejum comparado ao grupo F1CM. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

As fêmeas do grupo F1HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos níveis da glicemia de jejum e da insulina comparado ao grupo F1CF. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

Tabela 8. Avaliação da resistência à insulina das proles F1

Parâmetros	F1CM	F1HM	F1CF	F1HF
Glicemia (mmol/L)	113±4,63	138±2,41*	99,0±3,41	129±3,82*
Insulina (ng/mL)	0,98±0,12	1,19±0,13	3,56±0,18	6,45±0,92*
HOMA - IR	9,22±1,57	11,5±1,19	7,62±2,23	11,1±1,36
HOMA - β	181±19,8	167±20,1	243±19,3	187±27,4
N	6	6	6	6

Avaliação da resistência à insulina das proles macho (F1HM e F1CM) e fêmea (F1HF e F1CF) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF). * $p < 0,05$ comparado aos grupos F1CM e F1CF (teste *t* de *student*). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (HOMA-IR) = insulina jejum (IJ) x (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.

5.11 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das proles F1 macho e fêmea

Com o intuito de avaliar os parâmetros bioquímicos das proles macho (F1HM e F1CM) e fêmea (F1HF e F1CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) foram mensurados os níveis de leptina, o teste de tolerância oral a glicose (TTOG) e os níveis de colesterol total e triglicérides.

A figura 7 mostra que os machos do grupo F1HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos níveis de triglicérides ($176 \pm 9,4$ mg/dL; $n=6$) comparado ao grupo F1CM ($107 \pm 6,6$ mg/dL; $n=6$).

As fêmeas do grupo F1HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos níveis de leptina ($6,45 \pm 0,92$, $n=6$), de colesterol total ($77 \pm 5,7$; $n=6$) e de triglicérides ($180 \pm 9,8$; $n=6$) comparado ao grupo F1CF ($3,56 \pm 0,18$; $n=6$, $48 \pm 4,3$; $n=6$; $93 \pm 9,7$; $n=6$ respectivamente).

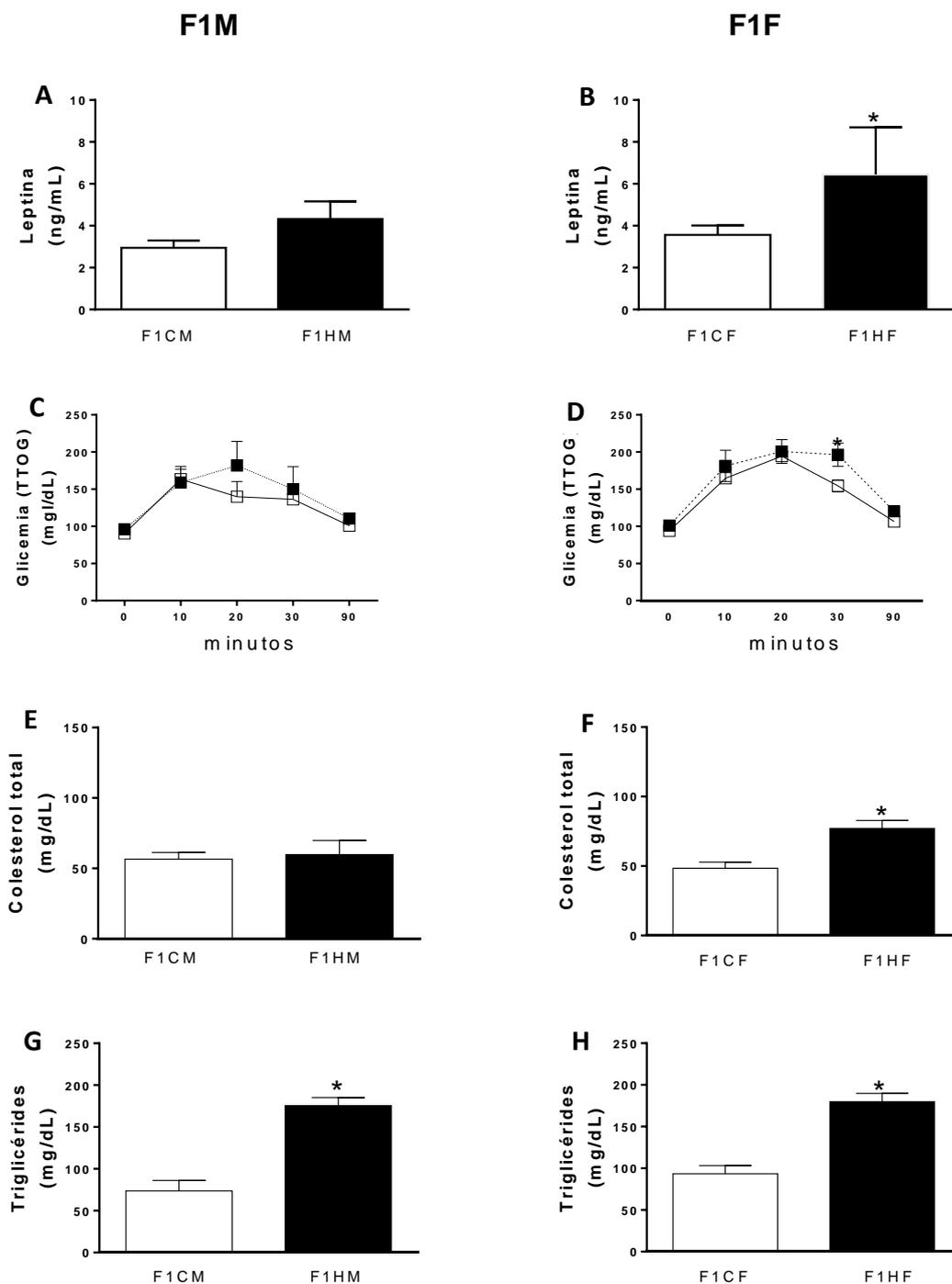


Figura 7: Parâmetros bioquímicos das proles macho (F1HM e F1CM; painéis A, C, E, G) e fêmea (F1HF e F1CF; painéis B, D, F, H) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF). * $p < 0,05$ comparado aos grupos F1CM e F1CF (teste *t* de *student*) e para análise teste de tolerância oral a glicose (TTOG) foi utilizado ANOVA *two* seguido pós teste Bonferroni. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Níveis de leptina (ng/mL, painéis A e B), TTOG (mg/dL, painéis C e D), níveis de colesterol total (mg/dL, painéis E e F) e de triglicérides (mg/dL, G e H). N= 6.

5.12 Avaliação hemodinâmica das proles F1 macho e fêmea

Com a intenção de avaliar os parâmetros hemodinâmicos das proles macho (F1HM e F1CM) e fêmea (F1HF e F1CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias) e a lactação (28 dias) foram mensurados a pressão arterial média (PAM, mmHg), a frequência cardíaca (FC, bpm), sensibilidade barorreflexa (SBR, ms/mmHg), variação da PAM induzida pelo hexametônio (20 mg/ kg, iv; Δ PAM, mmHg), e variação da FC (Δ FC, bpm).

A figura 8 mostra que os machos do grupo F1HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) da PAM ($123 \pm 3,5$ mmHg, $n=13$) e da variação da PAM induzida pelo hexametônio ($-56,1 \pm 2,4$ mmHg, $n=13$) comparado ao grupo F1CM ($106 \pm 3,0$ mmHg, $n=9$; $-31,4 \pm 1,8$ mmHg; $n=7$, respectivamente). E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

As fêmeas do grupo F1HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) da PAM ($122 \pm 3,4$ mmHg; $n=13$) e da variação da PAM induzida pelo hexametônio ($-43,7 \pm 4,9$ mmHg; $n=9$) comparado ao grupo F1CF ($97 \pm 2,7$ mmHg; $n=9$, $-22,1 \pm 4,1$ mmHg; $n=8$, respectivamente). E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

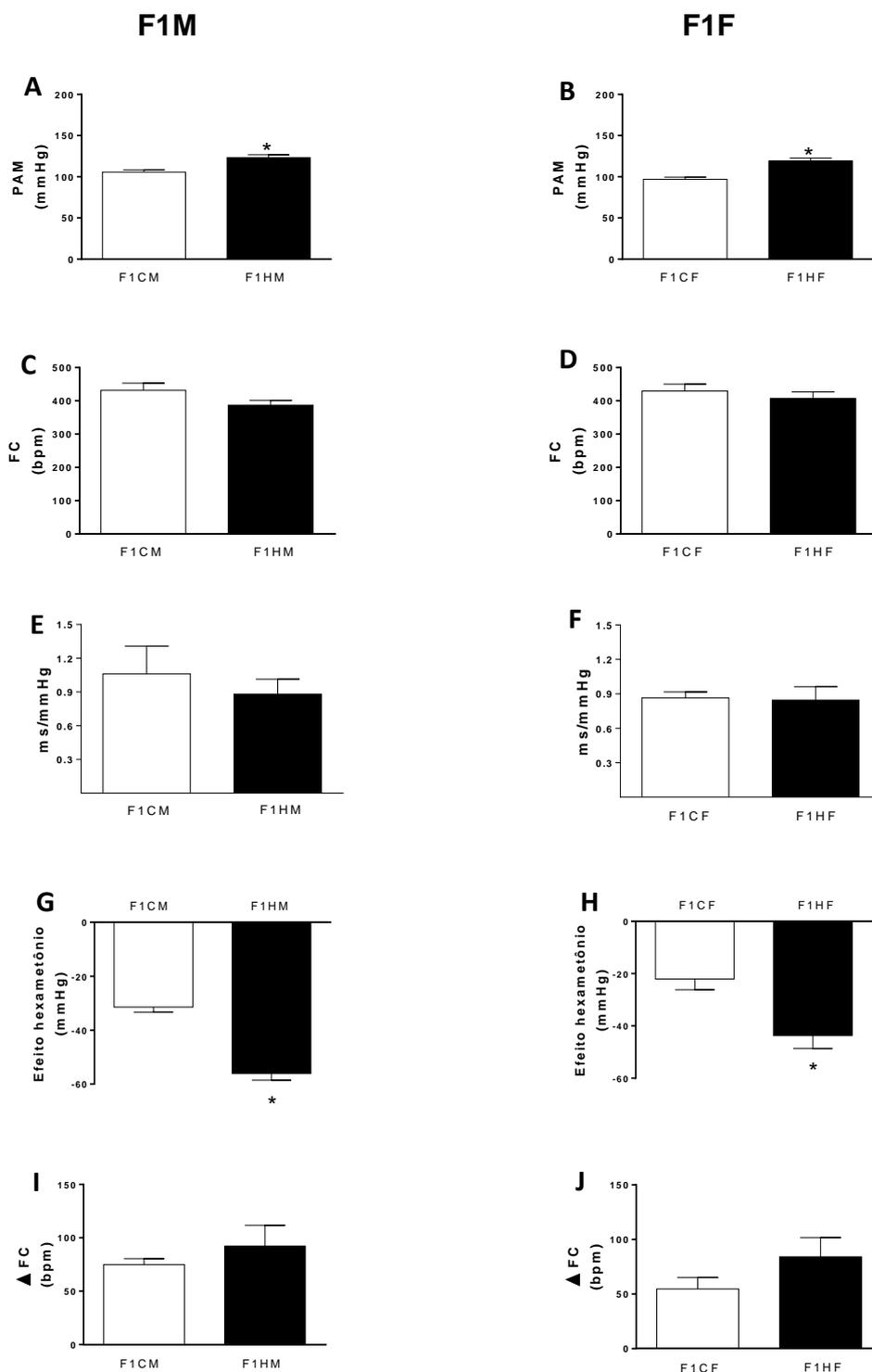


Figura 8: Parâmetros hemodinâmicos das proles macho (F1HM e F1CM; painéis A, C, E, G, I) e fêmea (F1HF e F1CF; painéis B, D, F, H, J) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF). * $p < 0,05$ comparado aos grupos F1CM e F1CF (teste *t* de *student*), valores expressos como média \pm erro padrão da média. PAM (mmHg, painéis A e B), FC (bpm, painéis C e D), sensibilidade barorreflexa (ms/mmHg, painéis E e F), variação da PAM induzida pelo hexametônio (20 mg/kg, iv; Δ PAM, mmHg; painéis G e H) e Δ FC (bpm, painéis I e J). N= 7 - 13.

5.13 Avaliação dos parâmetros nutricionais das proles F2 macho e fêmea

Com a intenção de avaliar os parâmetros nutricionais das proles macho (F2HM e F2CM) e fêmea (F2HF e F2CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias), a lactação (28 dias) e de genitores (G1HF e G1HM) ou (G1CF e G1CM) foram mensurados ingesta alimentar, ingesta calórica e ingesta de água.

Como mostrado na tabela 9, os machos e fêmeas dos grupos F2HM e F2HF respectivamente apresentaram aumento ($p < 0,05$) na ingesta alimentar, calórica e de água comparado aos grupos F2CM e F2CF.

Tabela 9. Parâmetros nutricionais das proles F2

Parâmetros	F2CM	F2HM	F2CF	F2HF
Ingesta alimentar (g)	132±5,4	233±6,7*	103±3,5	176±6,2*
Ingesta calórica (Kcal)	463±9,8	812±13,4*	362±10,2	608±11,6*
Ingesta água (ml)	199±9,3	257±10,2*	137±11,7	188±8,1*
N	11	12	12	15

Parâmetros nutricionais das proles macho (F2HM e F2CM) e fêmea (F2HF e F2CF) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e de genitores (G1HM e G1HF) ou (G1CM e G1CF). * $p < 0,05$ comparado aos grupos F2CM e F2CF (teste *t* de *student*). Valores expressos como média ± erro padrão da média.

5.14 Avaliação dos parâmetros biométricos das proles F2 macho e fêmea

Com a intenção de avaliar os parâmetros das proles macho (F2HM e F2CM) e fêmea (F2HF e F2CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias), a lactação (28 dias) e de genitores (G1HF e G1HM) ou (G1CF e G1CM) foram mensurados o peso relativo do fígado, rins, coração, pâncreas, suprarrenais, dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal, epididimal, tecido adiposo marrom e massa corporal; calculou-se índice de Lee e o índice de adiposidade.

Como mostrado na tabela 10, os machos do grupo F2HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) no peso relativo do fígado, dos depósitos de gordura inguinal, retroperitoneal e epididimal, do índice de adiposidade e da massa corporal comparado ao grupo F2CM. E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

Tabela 10. Parâmetros biométricos das proles F2

Parâmetros	F2CM	F2HM	F2CF	F2HF
Fígado (g/100g)	3,13±0,06	3,39±0,09*	3,05±0,06	3,52±0,09*
Rim (g/100g)	0,69±0,01	0,67±0,02	0,70±0,01	0,77±0,01
Coração (g/100g)	0,40±0,02	0,38±0,01	0,43±0,01	0,45±0,01
Pâncreas (g/100g)	0,35±0,01	0,33±0,01	0,44±0,01	0,48±0,01
Suprarrenais (g/100g)	0,02±0,00	0,04±0,01	0,04±0,02	0,04±0,01
Depósito de gordura inguinal (g/100g)	2,03±0,05	3,24±0,12*	1,87±0,11	2,23±0,08*
Depósito de gordura retroperitoneal (g/100g)	1,25±0,09	4,75±1,12*	2,67±0,10	4,02±0,11*
Depósito de gordura epididimal (g/100g)	1,11±0,06	5,65±0,31*	Não se aplica	Não se aplica
TA marrom (g/100g)	0,10±0,01	0,11±0,01	0,11±0,01	0,11±0,02
Índice de Lee	0,30±0,01	0,31±0,01	0,28±0,01	0,30±0,02
Adiposidade	4,40±0,15	13,4±0,23*	4,94±0,21	7,71±0,13*
Massa corporal (g)	293±5,20	336±2,55*	187±1,82	209±2,07*
N	11	12	12	15

Parâmetros biométricos das proles macho (F2HM e F2CM) e fêmea (F2HF e F2CF) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e de genitores (G1HM e G1HF) ou (G1CM e G1CF). * $p < 0,05$ comparado aos grupos F2CM e F2CF (teste *t* de *student*). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Peso relativo (g/100g da massa corporal do rato) de órgãos e tecidos, cálculo do índice de Lee [massa corporal (g)^{1/3} / comprimento naso-anal (cm) x 1000] e 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.

5.15 Avaliação dos parâmetros bioquímicos das proles F2 macho e fêmea

Com o intuito de avaliar os parâmetros bioquímicos das proles macho (F2HM e F2CM) e fêmea (F2HF e F2CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias), a lactação (28 dias) e de genitores (G1HF e G1HM) ou (G1CF e G1CM) foram mensurados a glicemia de jejum, o teste de tolerância oral a glicose (TTOG), colesterol total e triglicérides.

A figura 9 mostra que os machos F2HM apresentaram aumento nos níveis de glicemia de jejum ($124 \pm 1,9$ mg/dL; n=8), no teste tolerância oral a glicose (TTOG, mg/dL), nos níveis de colesterol total ($93,4 \pm 1,5$ mg/dL; n=8) e de triglicérides ($142 \pm 8,3$ mg/dL; n=8) comparado ao grupo F2CM ($98,1 \pm 2,8$ mg/dL; n=8, $77,4 \pm 4,6$ mg/dL; n=8, $88,2 \pm 2,3$ mg/dL; n=8, respectivamente).

As fêmeas F2HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) nos níveis de glicemia de jejum ($123 \pm 7,4$ mg/dL; n=8), no TTOG (mg/dL), nos níveis de colesterol total ($103 \pm 3,0$ mg/dL; n=8) e de triglicérides ($169 \pm 9,3$ mg/dL; n=8) comparado ao grupo F2CF ($95,6 \pm 0,9$ mg/dL; n=8, $79,8 \pm 3,5$ mg/dL; n=8, $86,4 \pm 4,2$ mg/dL; n=8, respectivamente).

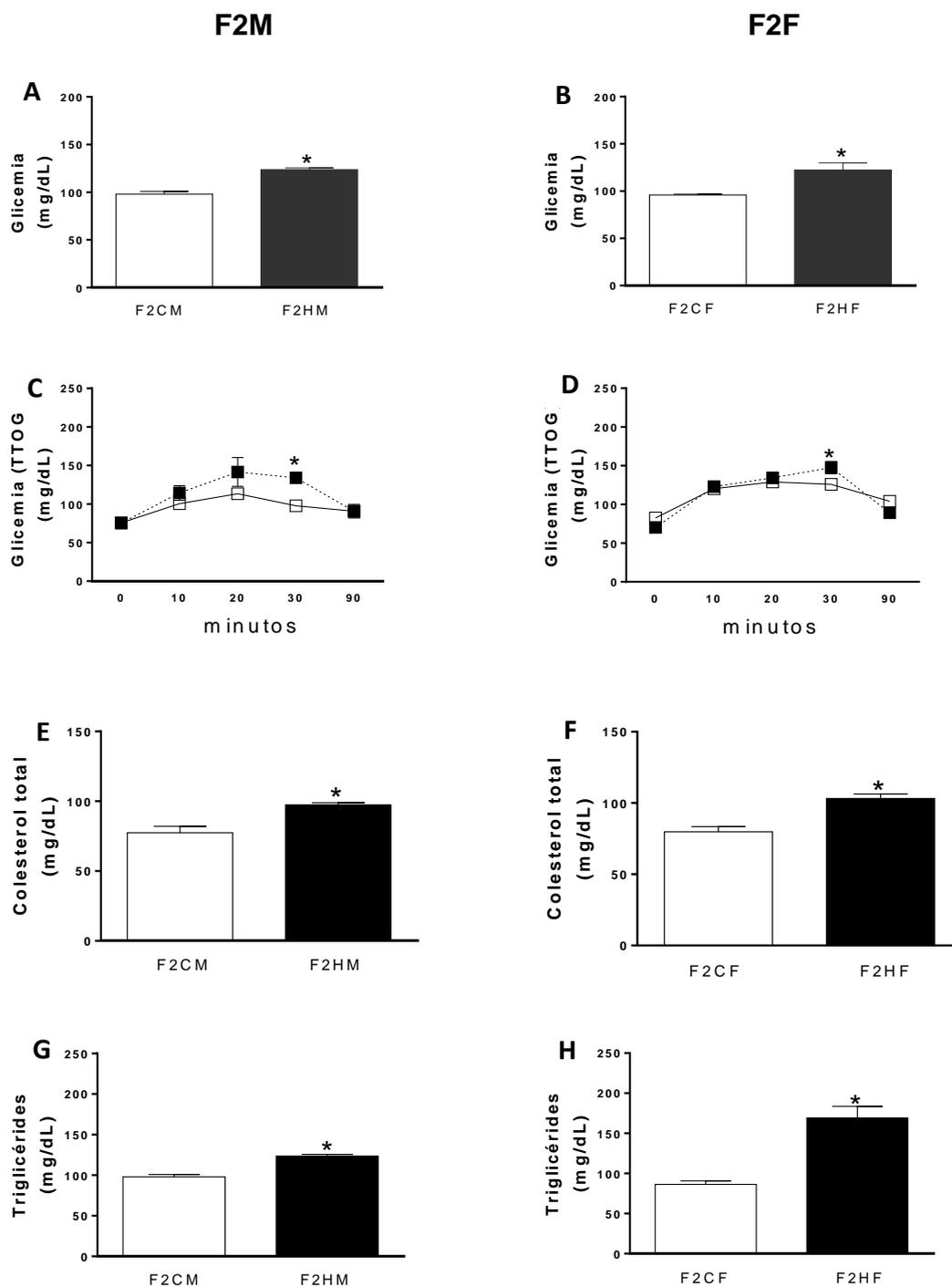


Figura 9: Parâmetros bioquímicos das proles macho (F2HM e F2CM; painéis A, C, E, G) e fêmea (F2HF e F2CF; painéis B, D, F, H) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e de genitores (G1HM e G1HF) ou (G1CM e G1CF). * $p < 0,05$ comparado aos grupos F2CM e F2CF (teste *t* de *student*) e para análise teste de tolerância oral a glicose (TTOG) foi utilizado ANOVA *two* seguido pós teste Bonferroni. Valores expressos como média \pm erro padrão da média. Glicemia de jejum (mg/dL, painéis A e B), (TTOG, mg/dL, painéis C e D), colesterol total (mg/dL, painéis E e F), triglicérides (mg/dL, painéis G e H). N= 8.

5.16 Avaliações hemodinâmicas das proles F2 macho e fêmea

Com o intuito de avaliar os parâmetros hemodinâmicos das proles macho (F2HM e F2CM) e fêmea (F2HF e F2CF) que consumiram dieta C após desmame até completar 90 dias de idade, oriundos de progenitores que consumiram dieta H (G0HM e G0HF) ou C (G0CM e G0CF) durante o acasalamento (10 dias), a gestação (21 dias), a lactação (28 dias) e de genitores (G1HF e G1HM) ou (G1CF e G1CM) foram mensurados a pressão arterial média (PAM, mmHg), a frequência cardíaca (FC, bpm), a sensibilidade barorreflexa (SBR, ms/mmHg), a variação da PAM induzida pelo hexametônio (20 mg/ kg, iv; Δ PAM, mmHg) e a variação da FC (Δ FC, bpm).

A figura 10 mostra que os machos do grupo F2HM apresentaram aumento ($p < 0,05$) da PAM ($127 \pm 1,4$ mmHg; $n=7$) e da variação da PAM induzida pelo hexametônio ($-46,1 \pm 1,3$ mmHg; $n=7$) comparado ao grupo F2CM ($97,8 \pm 2,7$ mmHg; $n=9$, $-25,7 \pm 1,2$ mmHg; $n=9$, respectivamente). E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

As fêmeas do grupo F2HF apresentaram aumento ($p < 0,05$) da PAM ($130 \pm 4,9$ mmHg; $n=5$) e da variação da PAM induzida pelo hexametônio ($-41,8 \pm 1,8$ mmHg; $n=5$) comparado ao grupo F2CF ($97 \pm 1,9$ mmHg; $n=7$, $-21,6 \pm 1,4$ mmHg; $n=7$, respectivamente). E não foi observada diferença significativa entre os demais parâmetros analisados.

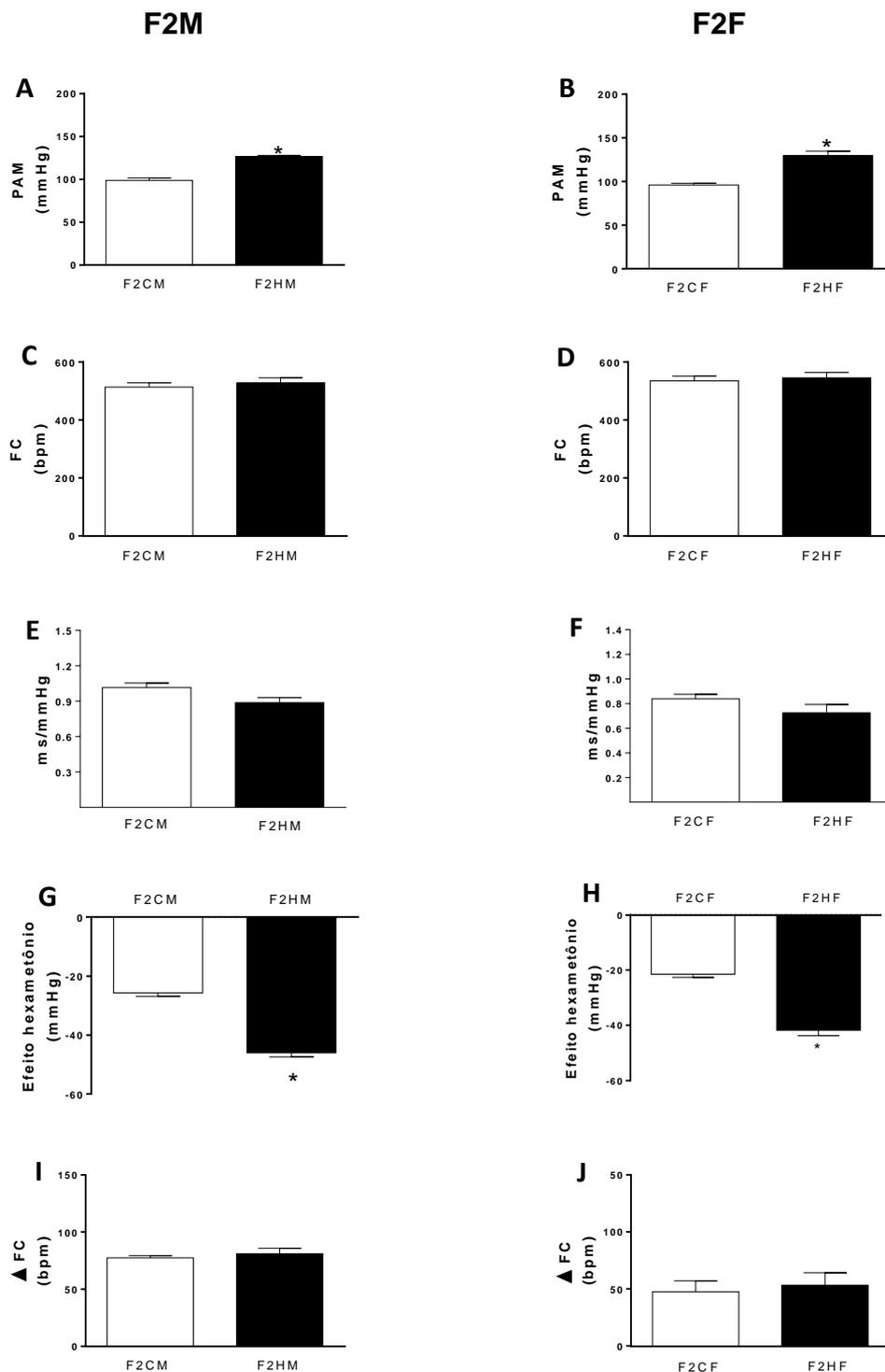


Figura 10: Parâmetros hemodinâmicos das proles macho (F2HM e F2CM; painéis A, C, E, G) e fêmea (F2HF e F2CF; painéis B, D, F, H) que consumiram dieta C após desmame até 90 dias de idade, oriundos de progenitores (G0HM e G0HF) ou (G0CM e G0CF) e de genitores (G1HM e G1HF) ou (G1CM e G1CF). * $p < 0,05$ comparado aos grupos F2CM e F2CF (teste *t* de *student*). Valores expressos como média \pm erro padrão da média. PAM (mmHg, painéis A e B), FC (bpm, painéis C e D), sensibilidade barorreflexa (ms/mmHg, painéis E e F), variação da PAM induzida pelo hexametônio (20 mg/kg, iv; Δ PAM, mmHg; painéis G e H) e (Δ FC bpm, painéis I e J). N= 10.

6 SUMÁRIO DOS RESULTADOS

6.1 Sumário dos progenitores e genitores G0 e G1

	G0HM	G0HF	G1HM	G1HF
Ingesta de água	↓	↑
Ingesta de ração	↓	↑
Ingesta calórica	=	=
Depósito de gordura inguinal	=	↑	=	=
Depósito de gordura retroperitoneal	=	↑	=	=
Depósito de gordura epididimal	=	=
Depósito de gordura marrom	=	↑	=	=
Adiposidade	=	↑	=	=
Índice de Lee	=	=	=	=
Massa corporal	↑	↑	=	=
Fígado	=	=	=	=
Rins	=	=	=	=
Coração	=	=	=	=
Pâncreas	=	↑	=	
Suprarrenais	=	=	=	=
Glicemia	=	↑	↑	↑
Colesterol Total	=	=	=	=
Triglicérides	=	↑	↑	↑
Glicemia TTOG	=	=	=	=
Insulina	=	=
Leptina	=	=
HOMA-IR	↑	=
HOMA-β	=	=
PAM basal	↑	↑	↑	↑
FC basal	↑	=	=	=

Legendas: ↑ aumento; ↓ redução; = semelhante; ... não se aplica

6.2 Sumário das proles F1 e F2

	F1HM	F1HF	F2HM	F2HF
Ingesta de água	↑	↑	↑	↑
Ingesta de ração	↑	↑	↑	↑
Ingesta calórica	↑	↑	↑	↑
Depósito de gordura inguinal	↑	=	↑	↑
Depósito de gordura retroperitoneal	↑	↑	↑	↑
Depósito de gordura epididimal	↑	↑
Depósito de gordura marrom	↑	=	↑	↑
Adiposidade	↑	↑	↑	↑
Índice de Lee	=	=	=	=
Massa corporal	↑	↑	↑	↑
Fígado	=	=	↑	↑
Rins	=	=	=	=
Coração	=	=	=	=
Pâncreas	=	=	=	=
Suprarrenais	=	=	=	=
Glicemia	↑	↑	↑	↑
Colesterol Total	=	↑	↑	↑
Triglicérides	↑	↑	↑	↑
Glicemia TTOG	=	↑	↑	↑
Insulina	=	↑
Leptina	=	↑
HOMA-IR	=	=
HOMA-β	=	=
PAM basal	↑	↑	↑	↑
FC basal	=	=	=	=
Bloqueio simpático pelo hexametônio (PAM)	↓	↓	↓	↓
Bloqueio simpático pelo hexametônio (FC)	=	=	=	=

Legendas: ↑ aumento; ↓ redução; = semelhante; ... não se aplica

7 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que as progenitoras que foram submetidas à dieta H durante o acasalamento, gestação e lactação (59 dias) apresentaram distúrbios característicos da SM que foram transmitidos aos seus descendentes F1 e F2, mesmo essas proles tendo se alimentado somente de dieta C após o desmame.

Apesar de haver um consenso na literatura de que modelos experimentais com dietas ricas em carboidratos ou hiperlipídicas melhor mimetizam as alterações da SM humana, esses modelos apresentam grande variabilidade na ocorrência dos distúrbios cardiometabólicos devido à grande variação na proporção e/ou nos tipos de nutrientes que compõem as dietas e/ou devido as diferentes idades e/ou modelos animais utilizados (Matveyenko *et al.*, 2009; A Bakheet e M Attia, 2011; Silbernagel *et al.*, 2011; Pereira-Lancha *et al.*, 2012)

Dados anteriores de nosso laboratório (De Castro *et al.*, 2013) mostraram que ratos recém-desmamados (21 dias) submetidos à dieta H por um período de 13 semanas foi eficiente em induzir alterações bioquímicas, fisiológicas e histológicas características da SM humana. Diante desse estudo, optamos por utilizarmos a dieta H no presente estudo.

Um importante fator de risco para o desenvolvimento da SM é o aumento do TAB principalmente, aumento do tecido retroperitoneal. O TAB armazena lipídeos na forma de triglicérides e desempenha importante papel na regulação do sistema imune, reprodutivo e endócrino, nos processos inflamatórios sistêmicos e na sensibilidade da insulina (Fantuzzi e Chaer Nascimento, 2015). A expansão do TAB é caracterizada pela hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos e um subseqüente desenvolvimento de um processo inflamatório crônico de baixo grau no qual ocorre uma infiltração de macrófagos que secretam citocinas pró-inflamatórias (Kalupahana *et al.*, 2011). Já o tecido adiposo marrom (TAM) é um regulador do metabolismo energético que gera calor através do desacoplamento mitocondrial da oxidação de lipídeos (Matamala *et al.*, 1996; Virtanen *et al.*, 2009). O TAM é um depósito de lipídeos que se correlaciona inversamente com os distúrbios da obesidade e SM

(Cypess *et al.*, 2009; Saito *et al.*, 2009), devido ao fato de apresentar um padrão metabólico diferenciado e ser altamente rico em mitocôndrias. A termogênese no TAM é controlada pelo sistema nervoso simpático (SNS) (Cannon e Nedergaard, 2004; Villarroya *et al.*, 2011; Morrison *et al.*, 2014). A estimulação do SNS pode promover efeitos sobre o tecido adiposo marrom de forma aguda pela [lipólise e ativação de isoforma 1 da proteína desacopladora da cadeia respiratória (UCP-1)] e de forma crônica (transcrição do gene da UCP-1, biogênese mitocondrial, hiperplasia do TAM, recrutamento de adipócitos marrons em TAB) (Ruiz *et al.*, 2015).

A leptina age sobre o sistema nervoso central se ligando a receptores específicos que fazem uso da via JAK/STAT de transdução do sinal intracelular, a leptina modifica a expressão e a atividade de inúmeros peptídeos hipotalâmicos para controlar o consumo de alimentos, termogênese e ação reguladora da insulina sobre a expressão e secreção de múltiplos neurotransmissores e aumenta o tônus simpático. O SNS tem papel central na ação da leptina que age na secreção de insulina e no metabolismo da glicose no tecido adiposo marrom, músculo esquelético e no fígado (MORTON, 2011 ; MARINO e cols., 2011; GRAUTON, 2011). A leptina aumenta a oxidação de ácidos graxos e regula UCP-2 e UCP-3 no músculo esquelético, inibe a secreção de insulina, regula a UCP-2 e aumenta a oxidação de ácidos graxos no pâncreas. A leptina é conhecida como hormônio da saciedade, que ao ser liberado pelo TAB, atua no centro da fome induzindo redução da ingestão alimentar (YU e cols, 1997). A produção e concentração alimentar sérica de leptina estão relacionadas com o tamanho da massa do TAB e dos níveis de insulina, estado energético, hormônios sexuais e de uma variedade de mediadores inflamatórios (KRYSIK, OKOPIEN E HERMAN, 2005; LAGO e cols., 2007). A leptina atua como um fator de sinalização entre o tecido adiposo e o sistema nervoso central, regulando a ingestão alimentar, o gasto energético e, conseqüentemente, a massa corporal (ZHANG e cols, 1994; CAMPFIELD e cols., 1995).

Estudos da literatura mostram que em genitoras ratas (Wistar e *Sprague-Dawley*) (SRINIVASAN e cols., 2006, PRIEGO e cols., 2009, TAMASHIRO e cols., 2009, MASUYAMA e cols., 2016; HUANG e cols., 2017;

CHAMBERS e cols., 2016, ROZA e cols., 2016) e em camundongos (C57/BL6, camundongos ICR e Swiss) (JONES e cols., 2009, DUNN e cols., 2009, ASHINO e cols., 2010, MASUYAMA e cols., 2016) que consumiram dieta H, com teor de gordura variando entre 32 – 68%, por período de tempo variável entre 4, 8 e 16 semanas antes e durante o período de acasalamento, gestação e lactação apresentam diferentes distúrbios característicos da SM como aumento da ingesta energética, da massa corporal, do índice de adiposidade, HOMA-IR e elevação dos níveis plasmáticos de insulina, glicose e triglicerídeos e PAM nas próprias genitoras. Porém a grande maioria desses estudos apenas verificou a transferência desses distúrbios ocorridos nas progenitoras às proles F1 (MASUAYMA e cols., 2016; WHITE e cols., 2009; DESAI e cols., 2014; ARMITAGE e cols., 2007; ZHANG e cols., 2011; WHITE e cols., 2008) e poucos estudos foram avaliados na F2 (BURDGE e cols., 2011; DUNN e cols., 2011; FULLSTON e cols., 2012). O nosso presente estudo difere dos demais estudos da literatura citados acima devido ao fato que as progenitoras somente consumiram a dieta H por 59 dias que compreendeu o período de acasalamento, gestação e amamentação. E apesar de se alimentarem por apenas 59 dias, as progenitoras apresentaram vários distúrbios característicos da SM como RI, elevação do índice de adiposidade, da glicemia, HOMA-IR, aumento dos níveis de triglicérides e da PAM. Além disso, observamos nas progenitoras alimentadas com dieta H e filhas de genitoras alimentadas com dieta C aumento da massa corporal, do índice de adiposidade com maior aumento do depósito de gordura retroperitoneal e da ingesta energética, aumento relativo do pâncreas, da glicemia, do HOMA-IR, dos triglicérides e da PAM.

A contribuição do pai não pode ser ignorada na transmissão da disfunção metabólica para a prole. Os espermatozoides e líquido seminal são influenciados pela dieta ou pelo estresse do acasalamento e isso pode afetar os fenótipos da prole (RANDO, 2012). No presente estudo os genitores que receberam dieta H no período de acasalamento (10 dias) apresentaram aumento da massa corporal e da PAM e FC (avaliada de forma indireta) em comparação aos genitores que se alimentaram de dieta C. De forma similar ao discutido acima em relação às genitoras sobre o tempo de submissão à dieta

H, não encontramos dados na literatura de pais se alimentando pelo curto período tempo de 10 dias (acasalamento). Porém, nossos dados estão de acordo estudos de SHEAU-FANGET e cols., 2009 que apesar dos ratos Sprague-Dawley, terem recebido dieta H (43% de gordura) por 13 semanas antes do acasalamento e durante o acasalamento (8 dias) ou seja com teor de gordura e tempo de dieta H muito maior em relação ao nosso estudo, foi observado aumento de peso nos genitores que consumiram dieta H.

Dados da literatura mostraram que a consequência direta da dieta H materna antes (4 a 16 semanas) e durante a gestação promove efeitos diretos na mãe (F0), no embrião da geração F1 (BENYSHEK e cols., 2006; SKINNER e cols., 2010; SKINNER e cols., 2011; VICKERS, 2014; AIKEN e OZANNE, 2013; DESAI e cols., 2015) e nas células germinativas que dará origem a geração F2 (LUMEY, 1992; LUMEY e cols., 1995;) associado com distúrbios metabólicos. A obesidade materna promove aumento da adipogênese e altera a região hipotalâmica aumentando o apetite na prole (FRIHAUF e cols., 2016; KJAERGAARD e cols., 2017; RAHMAN e cols., 2017; CHEN 2014) e promovendo alterações na função cerebral e cardiovascular, no rim e no tecido adiposo da prole (SYMONDS e cols., 2006; TAYLOR 2016; JOHNSON e cols., 2014).

Dados do presente estudo mostraram que as proles F1H (M e F), F2H (M e F) que logo após o desmame consumiram dieta C e oriundas, de genitoras (G0) que consumiram dieta H por um período de 59 dias (acasalamento, gestação e lactação) e de genitoras (G1), que consumiram dieta C por um período de 59 dias (acasalamento, gestação e lactação), respectivamente, apresentaram aumento da ingestão de água e da dieta, massa corporal, depósito de gordura retroperitoneal, índice de adiposidade, glicemia de jejum, triglicérides e PAM. Nossos dados estão de acordo com os estudos da literatura que mostraram que modelos experimentais (ratos Sprague e Dawley e camundongos ICR) filhos de genitores que receberam dieta H (42 a 62%) pelo período de (4, 11,12 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, triglicérides e tolerância à glicose alterada (BARBOSA e cols., 2015; MASUYAMA e cols., 2016; DESAI e cols., 2015).

Em nosso estudo na avaliação da função cardiovascular, os genitores G0HM e as proles F1HM, F1HF, F2HM e F2HF mostrou aumento da PAM, sem alteração da frequência cardíaca basal e da sensibilidade da bradicardia reflexa. No entanto, a avaliação da atividade simpática através do bloqueio ganglionar simpático pelo hexametônio, mostrou maior queda da PAM induzida pelo hexametônio nos genitores G0HM e nas proles F1HM, F1HF, F2HM e F2HF em relação aos respectivos animais que consumiram dieta C, sugerindo que o aumento da PAM se deva, pelo menos em parte, ao aumento da atividade simpática (GOMES e cols., 2017; SÁ e cols., 2016; LI e cols., 2015). Já esta bem estabelecido na literatura que o aumento da atividade simpática induz aumento dos níveis de PAM (AICHER e cols., 1995; HAN e cols., 1998), do tecido adiposo (FOUNTAINNE e cols., 2017; SCHUMANN e cols., 2017), resistência a insulina (GASTALDELLI e cols., 2017; YING e cols., 2017) e a maior ingesta de dieta (HE e cols., 2017; GUARINO e cols., 2017). Nossos dados sugerem o envolvimento do SNS no aumento do TAB, TAM, na ingesta de água, da dieta e calórica das proles F1HM, F1HF, F2HM e F2HF.

Em nosso presente estudo observamos aumento dos níveis plasmáticos de leptina e insulina nas ratas F1HF, sendo que não foi observado alteração nos ratos F1HM. Assim, pelo menos no grupo F1HF podemos sugerir a participação da leptina no aumento da atividade simpática e inibição do centro de saciedade. Estamos aguardando a chegada do kit para avaliarmos a leptina e insulina na prole F2. Além da leptina, o tecido adiposo expressa componentes do SRA, sendo que a produção de angiotensinogênio pelo tecido adiposo em roedores contribuiu para um terço dos níveis circulantes de angiotensinogênio (VELLOSO e cols., 2006; KAMIDE, 2014; ZHOU e cols., 2015). O aumento dos componentes do SRA no tecido adiposo pode estar associado, em parte, aos distúrbios metabólicos, inflamatórios e aumento da PAM relacionadas com a obesidade e SM (QUIGNARD, 2011; DOMINICI e cols., 2014; FAVRE, ESNAULT e VAN OBERGHEN, 2015). A Ang II tem um importante papel na regulação da ingestão de sódio e de água, assim como a ingestão de alimento (FITZSIMONS, 1998; FORMENTI e COLOMBARI, 2011).

COELHO e cols. (2010) mostraram elevados níveis plasmáticos de Ang II em ratos alimentados com frutose e sacarose, sugerindo a contribuição em estudos futuros da Ang II para o desenvolvimento da SM. Pretendemos averiguar a participação dos componentes do SRA brevemente nesses animais.

Adicionalmente, dados do nosso estudo mostraram que as proles F1HM, F1HF, F2HM e F2HF apresentaram aumento na glicemia e triglicérides, sendo que os animais F1HF, F2HM e F2HF apresentaram também aumento do colesterol total e alteração no TTOG, no tempo 30 minutos ocorreu um aumento dos níveis de glicose indicando um atraso na captação da glicose pela insulina. Nossos presentes dados estão de acordo com a literatura que mostrou que ratas Wistar F1 filhas de genitores que consumiram dieta H (45% de gordura) pelo período 4 semanas antes do acasalamento e durante o período de gestação e lactação ou seja teor de gordura e tempo de dieta maiores que o de nosso presente estudo, apresentaram aumento da massa corporal, do HOMA-IR, dos triglicérides, da leptina e da PAM (MASUYAMA e cols., 2016). A hiperglicemia está diretamente relacionada com a apoptose das células pancreáticas diminuindo ou abolindo a secreção de insulina. Essas alterações levam a um quadro de RI que está associado primeiramente a uma hiperinsulinemia e, posteriormente, pode levar a apoptose das células β com consequente diminuição na secreção de insulina. Essas alterações promovem o aumento da viscosidade do sangue e juntamente com a ativação do SNS, aumentando a resistência vascular periférica podendo levar à diabetes e hipertensão arterial (HAROLD e BAYS, 2014).

Observamos também em nosso presente estudo, aumento do peso relativo do fígado somente nos animais F2HM e F2HF. No quadro de SM ocorre o aumento dos ácidos graxos livres na circulação que podem ser absorvidos pelos hepatócitos. A absorção desses ácidos graxos em excesso levará a sua estocagem como triglicérides resultando em esteatose e fornecendo substrato para a oxidação lipídica. A esteatose hepática pode progredir para um quadro de fibrose e cirrose e esta progressão pode ocorrer devido ao dano causado pela peroxidação lipídica e a produção de espécies

reativas de oxigênio (URAKAWA e cols., 2003; MENON e cols., 2004; BRADBURY 2006).

Em nosso estudo anterior (De CASTRO e cols., 2013) mostramos que ratos alimentados com dieta H após o desmame por treze semanas e que apresentaram diversos distúrbios característicos da SM, apresentaram ingestão calórica similar aos ratos alimentados com dieta C, por ingerirem menor quantidade de dieta. Similarmente, no presente estudo, as progenitoras apresentaram uma redução da ingesta de água e alimentar e com ingesta calórica similar as progenitoras que consumiram dieta C. Já, as proles F1HM, F1HF, F2HM e F2HF apresentaram aumento da ingesta alimentar, de água e calórica comparados aos seus respectivos grupos controle. Nossos dados em relação às proles F2 estão de acordo com os estudos de DESAI e cols., 2014 onde proles F1 de ratos Sprague Dawley receberam dieta C por 18 semanas oriundos de genitoras que consumiram dieta H (60% de gordura) por 11 semanas antes do acasalamento e durante o período de gestação e lactação, ou seja, teor de gordura e tempo de dieta maiores ao de nosso presente estudo mostrou aumento da ingesta alimentar, da massa corporal. A dieta H materna no período da gestação e lactação pode influenciar a programação da estrutura e a função do núcleo arqueado e alterar o comportamento de apetite. Alterando o desenvolvimento das células tronco em neurônios e posteriormente na expressão de peptídeos orexigênicos ou anorexigênicos. O fenótipo obeso é um resultado da disfunção de vários níveis sobre vias de saciedade e apetite, como evidenciado pela reduzida resposta para leptina e aumentando resposta a fatores estimulatórios do apetite, por exemplo, a grelina (DESAI e cols., 2007; JIA e cols., 2008). Nossos dados em andamento sobre a mensuração dos níveis plasmáticos de leptina na prole F2 nos permitiria melhor compreensão de nossos resultados.

Em nosso estudo foi tomado o cuidado de se evitar a consanguinidade entre os grupos para que somente a dieta pudesse ser o fator influenciador de nossos resultados. Outra importante consideração a se fazer sobre o nosso estudo trata-se do tempo curto (59 dias no período de acasalamento, gestação e lactação) em que as genitoras foram submetidas à dieta H em relação aos demais estudos com dieta H da literatura. Nossos dados reforçam a

importância de uma dieta balanceada nessa fase da vida para que a prole tenha possibilidade de ter uma vida adequada e saudável.

8 CONCLUSÃO

Os resultados do nosso estudo mostram que a dieta H materna durante o acasalamento, gestação e lactação induziu distúrbios característicos da SM nas proles F1 e F2 mesmo estas sendo alimentadas com dieta C após desmame. Além disso, as progenitoras (G0) que se alimentaram de dieta H somente durante gestação e amamentação apresentaram distúrbios da SM, sendo que esses distúrbios induziram a programação perinatal e nos primeiros dias de vida nas proles F1 e F2. De forma relevante, esses distúrbios cardiometabólicos foram de maior extensão nas proles F2 em relação às proles F1.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A BAKHEET, S.; M ATTIA, S. Evaluation of chromosomal instability in diabetic rats treated with naringin. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2011, p. 365292, 2011. ISSN 1942-0994.

AICHER, S. A., O. S. KURUCZ, et al. (1995). "Nucleus tractus solitarius efferent terminals synapse on neurons in the caudal ventrolateral medulla that project to the rostral ventrolateral medulla." **Brain Res** 693: 51-63.

AIKEN, C. E. and S. E. OZANNE (2013). "Transgenerational developmental programming." **Hum Reprod Update** 20(1): 63-75.

ARMITAGE, J. A. et al. Programmed aortic dysfunction and reduced Na⁺, K⁺-ATPase activity present in first generation offspring of lard-fed rats does not persist to the second generation. **Exp Physiol**, 2007, v. 92, n.3, p.583-589.

ASHINO, N. G et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, 2012. ISSN 341-348.

BARKER, D. J. (1997). "Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life." **Nutrition** 13(9): 807-13.

BARBOSA, T. C. et al. High-fat diet reprograms the epigenome of rat spermatozoa and transgenerationally affects metabolism of the offspring. **Molecular Metabolism**. v.5, (2016) 184-197.

BENYSHEK, D. C., C. S. JOHNSTON, et al. (2006). "Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life." **Diabetologia** 49(5): 1117-9.

BORNSTEIN, S. R. and D. J. TORPY (1998). "Leptin and the renin-angiotensin-aldosterone system." **Hypertension** 32(2): 376-7.

BOULANGE, C. L., A. L. NEVES, et al. (2016). "Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease." **Genome Med** 8(1): 42.

BRADBURY, M. W and BERK, P. D.. Cellular uptake of long chain free fatty acids: the structure and function of plasma membrane fatty acid binding protein. **Adv Mol Cell Biol** 33: 47–81, 2004.

BRISTOW, J. D., A. J. HONOUR, et al. (1969). "Diminished reflex sensitivity in high blood pressure." **Circulation** 39: 48-54.

BRITTO, R. R., SANTOS, R.A.S., FAGUNDES-MOURA, C.R., KHOSLA, M.C., CAMPAGNOLE-SANTOS, M.J. (1997). " Role of Angiotensin-(1-7) in the Modulation of the Baroreflex in Renovascular Hypertensive Rats." **Hypertension** 30: 549-556.

BURDGE, G. C. et al. Progressive, transgenerational changes in offspring phenotype and epigenotype following nutritional transition. **Plos one**.2011, 6(11): e28282.

CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. and A. S. Haibara (2001). " Reflexos cardiovasculares e pressão arterial." **Rev Bras Hipertens** 8(1): 30-40.

CAMPFIELD L.A, et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science** 1995; 269: 546–549.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 277-359, Jan 2004. ISSN 0031-9333.

CARVALHO, T. H., C. T. BERGAMASCHI, et al. (2003). "Role of endogenous angiotensin II on glutamatergic actions in the rostral ventrolateral medulla in Goldblatt hypertensive rats." **Hypertension** 42(4): 707-12.

CYPESS, A. M. et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. **N Engl J Med**, v. 360, n. 15, p. 1509-17, Apr 2009. ISSN 1533-4406.

COELHO, M.S. et al. High sucrose intake in rats is associated with increased ACE 2 and angiotensin-(1-7) levels in the adipose tissue. **Regul Pept**, v.162, n. 1-3, p. 61-7, Jun 2010. ISSN 1873-1686.

CHAN, R. K. and P. E. SAWCHENKO (1998). "Organization and transmitter specificity of medullary neurons activated by sustained hypertension: implications for understanding baroreceptor reflex circuitry." **J Neurosci** 18(1): 371-87.

CHOI, S. W., K. J. CLAYCOMBE, et al. (2013). "Nutritional epigenomics: a portal to disease prevention." **Adv Nutr** 4(5): 530-2.

DE CASTRO, U. G., G. G. DE SOUSA, et al. (2012). "Nitric oxide at the CVLM is involved in the attenuation of the reflex bradycardia in renovascular hypertensive rats." **Nitric Oxide** 26(2): 118-25.

DE CASTRO, U. G. et al. Age-dependent effect of high-fructose and high-fat diets on lipid metabolism and lipid accumulation in liver and kidney of rats. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 136, 2013. ISSN 1476-511X.

DESAI M, et al.. Resistance to anorexogenic agent leptin in intrauterine growth restricted offspring. *Reprod Sci.* 2007;14(suppl):92A.

DESAI M, et al.. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. **Am J Obstet Gynecol** 211: 237 e231-237 e213, 2014.

DESAI, M.,et al. (2015). Programmed regulation of rat offspring adipogenic transcription factor (PPARgamma) by maternal nutrition. **J. Dev. Orig. Health Dis** 6, 530e538.

DESAI, M., J. K. JELLYMAN, et al. (2017). "Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome." **Int J Obes (Lond)** 39(4): 633-41.

DOMINICI, F. P., V. BURGHI, et al. (2014). "Modulation of the action of insulin by angiotensin-(1-7)." **Clin Sci (Lond)** 126(9): 613-30.

DUNN, G. A, BALE, T. L. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. **Endocrinology**, 2011,152(6): 2228-2236.

DUNN, G. A.& BALE, T. L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. **Endocrinology**, 2009, 150, 4999–5009.

FAGGIONI, R., K. R. FEINGOLD, et al. (2001). "Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition." **Faseb J** 15(14): 2565-71.

FANTUZZI, F.; CHAER NASCIMENTO, M. A. Prediction of Boron-Boron Triple-Bond Polymers Stabilized by Janus-Type Bis(N-heterocyclic) Carbenes. **Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 7814-9, May 2015. ISSN 1521-3765.

FANTUZZI, G. (2008). "Adiponectin and inflammation: consensus and controversy." **J Allergy Clin Immunol** 121(2): 326-30.

FELDMAN, J. L. and H. H. ELLENBERGER (1988). "Central coordination of respiratory and cardiovascular control in mammals." **Rev. Physiol** 50(593).

FERRARIO, C. M. (1990a). "The renin-angiotensin system: importance in physiology and pathology." **J Cardiovasc Pharmacol** 15 Suppl 3: S1-5.

FERRARIO, C. M., K. L. BARNES, et al. (1990b). "Pathways of angiotensin formation and function in the brain." **Hypertension** 15(2 Suppl): I13-9.

FERRARIO, C. M., M. C. CHAPPELL, et al. (1997). "Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7)." **Hypertension** 30(3 Pt 2): 535-41.

FERRARIO, C. M., A. J. TRASK, et al. (2005). "Advances in biochemical and functional roles of angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7) in

regulation of cardiovascular function." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 289(6): H2281-90.

FESTI, D., R. SCHIUMERINI, et al. (2014). "Gut microbiota and metabolic syndrome." **World J Gastroenterol** 20(43): 16079-94.

FLYNN, J. (2013). "The changing face of pediatric hypertension in the era of the childhood obesity epidemic." **Pediatr Nephrol** 28(7): 1059-66.

FONTES, M. A., M. C. MARTINS PINGE, et al. (1997). "Cardiovascular effects produced by microinjection of angiotensins and angiotensin antagonists into the ventrolateral medulla of freely moving rats." **Brain Res** 750(1-2): 305-10.

FOWDEN, A. L. and A. J. FORHEAD (2004). "Endocrine mechanisms of intrauterine programming." **Reproduction** 127(5): 515-26.

FOWDEN, A. L., C. SIBLEY, et al. (2006). "Imprinted genes, placental development and fetal growth." **Horm Res** 65 Suppl 3: 50-8.

FRAVE, G.A. et al. Modulation of glucose metabolism by the renin-angiotensin-aldosterone system. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.308, n. 6, p. E435-49, Mar 2015. ISSN 1522-1555.

FULLSTON, T. et al. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. **Human Reproduction**. v.27, n. 5, p. 1391-1400, 2012.

FURUHASHI, M., N. URA, et al. (2004). "Blockade of the renin-angiotensin system decreases adipocyte size with improvement in insulin sensitivity." **J Hypertens** 22(10): 1977-82.

GINSBERG, H. N. and L. S. HUANG (2000). "The insulin resistance syndrome: impact on lipoprotein metabolism and atherothrombosis." **J Cardiovasc Risk** 7(5): 325-31.

GLUCKMAN, P. D. and M. A. HANSON (2004). "The developmental origins of the metabolic syndrome." **Trends Endocrinol Metab** 15(4): 183-7.

GOMES, P. M et al. Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult wistar rats. **Scientific Reports**.v.10, 2017.

GROVE, K. L, SMITH MS. Ontogeny of the hypothalamic neuropeptide Y system. **Physiol Behav** 2003; 79: 47-63.

GUARINO, D. et al. The role of the autonomic nervous system in the pathophysiology of obesity. **Frontiers in Physiology**. v.8, 2017.

HALL, J. E. (2000). "Pathophysiology of obesity hypertension." **Curr Hypertens Rep** 2(2): 139-47.

HAN, Y. M. Y., Y. S. CHAN, et al. (1998). "Spontaneous activity and barosensitivity of the barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats induced by transection of aortic depressor nerves." **Brain Res** 813: 262-267.

HAYNES, W. G., D. A. MORGAN, et al. (1997). "Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin." **J Clin Invest** 100(2): 270-8.

HE, W. Sensory-specific satiety: Added insights from autonomic nervous system responses and facial expressions. **Physiology & Behavior**. v.170, 2017 12-18.

HENRIKSEN, E. J. (2007). "Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the renin-angiotensin system." **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 293(3): R974-80.

HOWARD, J. K., G. M. LORD, et al. (1999). "Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice." **J Clin Invest** 104(8): 1051-9.

HUANG, Y. H., T. T. YE, et al. (2017). "Maternal high-fat diet impairs glucose metabolism, β -cell function and proliferation in the second generation of offspring rats." **Nutr Metab (Lond)** 14: 67.

IRIGOYEN, M. C., F. M. CONSOLIM-COLOMBO, et al. (2001). "Controle cardiovascular: regulação reflexa e papel do sistema nervoso simpático." **Revista Brasileira de Hipertensão** 8(1).

JIA, Y. et al. Programmed alterations in hypothalamic neuronal orexigenic responses to ghrelin following gestational nutrient restriction. **Reproductive Sciences**. 2008, v.15, n. 7.

JOHNSON A.K, et al. The roles of sensitization and neuroplasticity in the long-term regulation of blood pressure and hypertension. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 309: R1309-1325, 2015.

JOHNSON, S. A., A. B. JAVUREK, et al. (2017). "Effects of a maternal high-fat diet on offspring behavioral and metabolic parameters in a rodent model." **J Dev Orig Health Dis** 8(1): 75-88.

JONES, P. H, DAVIDSON, M.H. Reporting rate of rhabdomyolysis with fenofibrate + statin versus gemfibrozil + any statin. **Am J Cardiol**. 2005;95(1):120–122.

KALUPAHANA, N. S.; CLAYCOMBE, K. J.; MOUSTAID-MOUSSA, N. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. **Adv Nutr**, v. 2, n. 4, p. 304-16, Jul 2011. ISSN 2156-5376.

KAMIDE, K. Role of Renin-Angiotensin- Aldosterone system in Metabolic Syndrome and Obesity-related Hypertension. **Curr Hypertens Ver**, Aug 2014. ISSN 1875-6506.

KOHLMANN, O. J., N. E. KOHLMANN, et al. (2000). "Estudo multicêntrico brasileiro de eficácia e tolerabilidade da associação de anlodipino e enalapril em formulação galênica única no tratamento da hipertensão leve a moderada." **Jornal Brasileiro de Nefrologia** 22(Supple 4): 1-16.

KRYSIAK, R., B. OKOPIEN, et al. (2005). "[Adipose tissue: a new endocrine organ]." **Przegl Lek** 62(9): 919-23.

KUMADA, M., N. TERUI, et al. (1990). "Arterial baroreceptor reflex: its central and peripheral neural mechanisms. ." **Prog. Neurobiol.** 35: 331-361.

LAGO, F., C. DIEGUEZ, et al. (2007). "Adipokines as emerging mediators of immune response and inflammation." **Nat Clin Pract Rheumatol** 3(12): 716-24.

LAUTNER, R. Q., D. C. VILLELA, et al. (2013). "Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system." **Circ Res** 112(8): 1104-11.

LEVIN, B. E. (1992). "Intracarotid glucose induced norepinephrine response and the development of diet induced obesity." **Int J Obes Relat Metab Disord** 16(6): 451-7.

LEWIS, G. F., A. CARPENTIER, et al. (2002). "Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes." **Endocr Rev** 23(2): 201-29.

LI, P. et al. Hexamethonium attenuates sympathetic activity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats. **Molecular Medicine Reports**. V, 12, 2015. ISSN 1791-2997.

LOPES, H. F. (2007). "Hipertensão e inflamação: papel da obesidade." **Revista Brasileira de Hipertensão** 14(4): 239-244.

LOWEY, A. W. (1981). Efferent connections of the ventral medula oblongata in the rat. S. J. H. Wallach. **3**: Pages 63-80.

LUMEY, L. H, et al. Timing of prenatal starvation in women and birth weight in their first and second born offspring: the Dutch Famine Birth Cohort study. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 1995; 61: 23–30.

LUMEY, L. H. Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944-1945. **Paediatr Perinat Epidemiol** 1992; 6: 240–253.

MARINO J.S, et al. Central insulin and leptin-mediated autonomic control of glucose homeostasis. **Trends Endocrinol Metab** 2011; 22: 275–285.

MARTINEZ-MALDONADO, M. (1991). "Pathophysiology of renovascular hypertension." **Hypertension** 17(5): 707-19.

MASUYAMA, H. et al. The effects of paternal high-fat diet exposure on offspring metabolism with epigenetic changes in the mouse adiponectin and leptin gene promoters. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 311: E236-245, 2016.

MATAMALA, J. C. et al. Changes induced by fasting and dietetic obesity in thermogenic parameters of rat brown adipose tissue mitochondrial subpopulations. **Biochem J**, v. 319 (Pt 2), p. 529-34, Oct 1996. ISSN 0264-6021.

MATTHEWS, D.R. et al. Homeostasis model assesment : insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. **Diabetologia**, v.28, n.7, p.412-9, Jul 1985. INSS 0012-186X.

MATVEYENKO, A. V. et al. Successful versus failed adaptation to high-fat diet-induced insulin resistance: the role of IAPP-induced beta-cell endoplasmic reticulum stress. **Diabetes**, v. 58, n. 4, p. 906-16, Apr 2009. ISSN 1939-327X.

MCCUBIN, J. W., J. H. GREEN, et al. (1956). " Baroreceptor function in chronic renal hypertension. ." **Clin. Res.** 4(2): 205-210.

McKITRICK, D. J. and F. R. CALERRESU (1997). "Reciprocal connection between nucleus ambiguus and caudal ventrolateral medulla. ." **Brain Research.** 742: 203-210.

MENON, R. K, et al Transplacental passage of insulin in pregnant women with insulin-dependent diabetes mellitus: its role in fetal macrosomia. **N Engl J Med** 1990;323:309–315.

MICHELINI, L. (2000). "Regulação momento a momento da pressão arterial na normo e na hipertensão." **Hipertensão** 3: 90-8.

MINAME, M. H. and A. P. M. Chacra (2005). "Síndrome metabólica." **Rev Soc Cardiol** 15(6): 482-9. .

MONTEZ, P., J. P. VAZQUEZ-MEDINA, et al. (2012). "Angiotensin receptor blockade recovers hepatic UCP2 expression and aconitase and SDH activities and ameliorates hepatic oxidative damage in insulin resistant rats." **Endocrinology** 153(12): 5746-59.

MORRISON, S. F.; MADDEN, C. J.; TUPONE, D. Central neural regulation of brown adipose tissue thermogenesis and energy expenditure. **Cell Metab**, v. 19, n. 5, p. 741-56, May 2014. ISSN 1932-7420.

OTERO, M., R. LAGO, et al. (2006). "Towards a pro-inflammatory and immunomodulatory emerging role of leptin." **Rheumatology (Oxford)** 45(8): 944-50.

OZANNE, S. E. and M. CONSTANCIA (2007). "Mechanisms of disease: the developmental origins of disease and the role of the epigenotype." **Nat Clin Pract Endocrinol Metab** 3(7): 539-46.

PENALVA, D. Q. F. (2008). "Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento." **Revista de Medicina** 87(4): 245–250.

PEREIRA-LANCHA, L. O.; CAMPOS-FERRAZ, P. L.; LANCHA, A. H. Obesity: considerations about etiology, metabolism, and the use of experimental models. **Diabetes Metab Syndr Obes**, v. 5, p. 75-87, 2012. ISSN 1178-7007.

PERKINS, J. M. and S. N. DAVIS (2008). "The renin-angiotensin-aldosterone system: a pivotal role in insulin sensitivity and glycemic control." **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes** 15(2): 147-52.

PRAY, L. A. (2004). "Epigenetics: Genome, meet your environment: as the evidence for epigenetics, researchers reacquire a taste for Lamarckism." **The Scientist** 18(13): 14+.

PRIEGO, T, et al. Sex-associated differences in the leptin and ghrelin systems related with the induction of hyperphagia under high-fat diet exposure in rats. **Horm Behav** 2009, 55:33–40.

PUTNAM, K., R. SHOEMAKER, et al. (2012). "The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome." **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 302(6): H1219-30.

RANDO, O. J. Daddy issues: paternal effects on phenotype. **National Institutes of Health**. v. 9, Nov 2012, 151(4):702-708.

REAVEN, G. M. (1988). "Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease." **Diabetes** 37(12): 1595-607.

REAVEN, G. M., H. LITHELL, et al. (1996). "Hypertension and associated metabolic abnormalities--the role of insulin resistance and the sympathoadrenal system." **N Engl J Med** 334(6): 374-81.

ROSS, C. A., D. A. RUGIERO, et al. (1984a). "Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline." **J Comp Neurol** 228: 168-185.

ROZA, N. A et al. Effect of long-term high-fat diet intake on peripheral insulin sensibility, blood pressure, and renal function in female rats. **Food & nutrition**, 2016, 60:28536.

RUIZ, J. R. et al. Regulation of energy balance by brown adipose tissue: at least three potential roles for physical activity. **Br J Sports Med**, v. 49, n. 15, p. 972-3, Aug 2015. ISSN 1473-0480.

SACKS, F. M., L. P. SVETKEY, et al. (2001). "Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group." **N Engl J Med** 344(1): 3-10.

SAITO, M. et al. High incidence of metabolically active brown adipose tissue in healthy adult humans: effects of cold exposure and adiposity. **Diabetes**, v. 58, n. 7, p. 1526-31, Jul 2009. ISSN 1939-327X.

SANTOS, J. M., G. MOHAMMAD, et al. (2011). "Diabetic retinopathy, superoxide damage and antioxidants." **Curr Pharm Biotechnol** 12(3): 352-61.

SANTOS, R. A., K. B. BROSNIHAN, et al. (1988). "Converting enzyme activity and angiotensin metabolism in the dog brainstem." **Hypertension** 11(2 Pt 2): 1153-7.

SANTOS, R. A. and M. J. CAMPAGNOLE-SANTOS (1994). "Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7)." **Braz J Med Biol Res** 27(4): 1033-47.

SANTOS, R. A., M. J. CAMPAGNOLE-SANTOS, et al. (2000). "Angiotensin-(1-7): an update." **Regul Pept** 91(1-3): 45-62.

SANTOS, R. A., A. J. FERREIRA, et al. (2008). "Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis." **Exp Physiol** 93(5): 519-27.

SANTOS, R. A., A. C. SIMOES E SILVA, et al. (2003). "Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas." **Proc Natl Acad Sci U S A** 100(14): 8258-63.

SCHUMANN, U. et al. Sympathetic nervous system activity and anti-lipolytic response to iv-glucose load in subcutaneous adipose tissue of obese and obese type 2 diabetic subjects. **Plos one**. 12(3): e 0173803, 2017.

SECKL, J. R. and M. C. HOLMES (2007). "Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology." **Nat Clin Pract Endocrinol Metab** 3(6): 479-88.

SHEAU-FANG, N. G et al. Chronic high-fat diet in fathers programs β - cell dysfunction in female rat offspring. **Research Letter**. V.467, 2009.

SHEK, E. W., M. W. BRANDS, et al. (1998). "Chronic leptin infusion increases arterial pressure." **Hypertension** 31(1 Pt 2): 409-14.

SKINNER, M. K, et al. Transgenerational epigenetic programming of the brain transcriptome and anxiety behavior. **PLoS ONE** 2008;3:e3745.

SKINNER, A. C., M. J. STEINER, et al. (2010). "Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood." **Pediatrics** 125(4): e801-9.

SKINNER, M. K. Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability. **Epigenetics** 2011; 6: 838–842.

SKINNER, M. K, et al: Ancestral dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) exposure promotes epigenetic transgenerational inheritance of obesity. **BMC Med** 2013; 11: 228.

SILBERNAGEL, G. et al. Effects of 4-week very-high-fructose/glucose diets on insulin sensitivity, visceral fat and intrahepatic lipids: an exploratory trial. **Br J Nutr**, v. 106, n. 1, p. 79-86, Jul 2011. ISSN 1475-2662.

SONG, D. et al. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension. **Hypertension**, v. 43, n.3, p. 667-72, Mar 2004. ISSN 1524-4563.

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** 2006;291:E792–E799.

STEINER, M. J., A. C. SKINNER, et al. (2011). "Fasting might not be necessary before lipid screening: a nationally representative cross-sectional study." **Pediatrics** 128(3): 463-70.

SYMONDS M. E, et al. (2013) Early life nutritional programming of obesity: mother–child cohort studies. **Ann Nutr Metab** 2013. 62, 137–145.

SYMONDS, M. E, et al. Nutritional programming of the metabolic syndrome. **Nat Rev Endocrinol**. 2009; 5:604–10.

TAMASHIRO, K. L. K, et al. Prenatal Stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. **Diabetes**, v. 58, May 2009.

TARTAGLIA, L. A., M. DEMBSKI, et al. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." **Cell** 83(7): 1263-71.

TAYLOR, P. A. The influence of maternal obesity on offspring cardiovascular control and insights from rodent models. **Parental Obesity: Intergenerational Programming and consequences**. 2016, p.307-334.

VELLOSO, L. A. et al. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. **Diabetes Metab Res Ver**, v.22, n.2, p. 98-107, 2006 Mar-Apr 2006. ISSN 1520-7552.

VICKERS, M. H. (2014). "Developmental programming and transgenerational transmission of obesity." **Ann Nutr Metab** 64 Suppl 1: 26-34.

VILLARROYA, J. et al. Thymidine kinase 2 deficiency-induced mitochondrial DNA depletion causes abnormal development of adipose tissues and adipokine levels in mice. **PLoS One**, v. 6, n. 12, p. e29691, 2011. ISSN 1932-6203.

VIRTANEN, K. A. et al. Functional brown adipose tissue in healthy adults. **N Engl J Med**, v. 360, n. 15, p. 1518-25, Apr 2009. ISSN 1533-4406.

WELLS, J. C. (2003). "The thrifty phenotype hypothesis: thrifty offspring or thrifty mother?" **J Theor Biol** 221(1): 143-61.

WILLIAMS, L., Y. SEKI, et al. (2014). "Animal models of in utero exposure to a high fat diet: a review." **Biochim Biophys Acta** 1842(3): 507-519.

WHITE, W. B. Cardiovascular effects of the cyclooxygenase inhibitors. **Hypertension**. 2007;49:408–18.

WHITE, C. L, et al. 2009 Maternal obesity is necessary for the programming effect of a high-fat diet on offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 296:R1464–1472

YU, W. H., M. KIMURA, et al. (1997). "Role of leptin in hypothalamic-pituitary function." **Proc Natl Acad Sci U S A** 94(3): 1023-8.

ZHANG, S. et al. Periconceptional nutrition and the early programming of a life of obesity or adversity. **Prog Biophys Mol Biol**. 2011;106:307–14.

ZHANG, H. F. et al. Protective effects of matrine against progression of high-fructose diet-induced steatohepatitis by enhancing antioxidant and anti-inflammatory defences involving Nrf2 translocation. **Food Chem. Toxicol.** 2013, 55, 70–77.

ZHENG, F., S. ZHANG, et al. (2014). "Regulation of insulin resistance and adiponectin signaling in adipose tissue by liver X receptor activation highlights a cross-talk with PPARgamma." **PLoS One** 9(6): e101269.

ZHOU, M. S et al. Skeletal muscle insulin resistance in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II activation of NFkB. **Cardiovasc Diabetol**, v.14, p.45, 2015. ISSN 1475-2840.

9) ANEXOS

**Anexo I – 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) 3550-1368 Fax: (31) 3550-1370
Email: ceua@ufop.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo do projeto com uso de animais nº. **2016/49**, intitulado *"Efeitos da exposição de ratas 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
Fischer	332	12 semanas	Macho e fêmeas	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 II – Protocolo da Dosagem de Insulina por ELISA

Protocolo da Dosagem de Insulina por ELISA

Pré-aqueça todos os reagentes à temperatura ambiente antes da realização do ensaio

1) 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).

2) 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.**

3) 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.

4) 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).

5) Adicione em duplicata **10 µL de Rat Insulin Standards** na ordem de concentração crescente aos poços apropriados.

6) Adicione **10 µL de QC1** e **10 µL de QC2** aos poços apropriados.

7) Adicione em duplicata **10 µL das amostras desconhecidas** aos poços restantes.

8) 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.

9) Remova o *plate sealer* e as soluções de decantação da placa por inversão. Bata levemente como antes para remover as soluções residuais no poço.

10) 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.

11) 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*.

12) Remova o *sealer*, descarte as soluções da placa por inversão e bata levemente a placa em toalha absorvente para remover o líquido residual.

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

14) Adicione **100 µL 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.

15) Remova o *sealer* e adicione **100 µL 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 III – Protocolo da Dosagem de Leptina por ELISA

Protocolo da Dosagem de Leptina por ELISA

Pré-aqueça todos os reagentes à temperatura ambiente imediatamente antes de realizar o ensaio.

1) 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).

2) 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.**

3) 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.

4) 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).

4) 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).

5) Adicione em duplicata **10 µL de Rat leptin Standards** na ordem de concentração crescente aos poços apropriados.

6) Adicione **10 µL de QC1** e **10 µL de QC2** aos poços apropriados.

7) Adicione em duplicata **10 µL das amostras desconhecidas** aos poços restantes.

8) 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.

- 9) Remova o *plate sealer* e as soluções de decantação da placa por inversão. Bata levemente como antes para remover as soluções residuais no poço.
- 10) 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.
- 11) Adicione **100 µL de *Enzyme Solution*** a cada poço. Cubra a placa com o *sealer* e incuba com agitação moderada à temperatura ambiente durante 60 minutos no *plate shaker* configurado para rodar a uma velocidade moderada, aproximadamente 400 a 500 rpm.
- 12) Remova o *sealer*, descarte as soluções da placa por inversão e bata levemente a placa em toalha absorvente para remover o líquido residual.
- 13) Lave os poços 3 vezes com ***diluted Wash Buffer***, 300 µL por poço por lavagem. Descarte e bata levemente depois de cada lavagem para remover o tampão residual.
- 14) Adicione **100 µL de *Substrate Solution*** a cada poço, cubra a placa com o *sealer* e agite no *plate shaker* durante 30 minutos.
- 15) Remova o *sealer*, descarte as soluções da placa por inversão e bata levemente a placa em toalha absorvente para remover o líquido residual.
- 16) Lave os poços 6 vezes com ***diluted Wash Buffer***, 300 µL por poço por lavagem. Descarte e bata levemente depois de cada lavagem para remover o tampão residual.
- 17) Adicione **100 µL 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 *Leptin Standards* com intensidade proporcional ao aumento das concentrações de leptin.
- 18) Remova o *sealer* e adicione **100 µL de *d Stop Solution*** [CUIDADO: SOLUÇÃO CORROSIVA] e agite a mão manualmente para garantir uma mistura completa da solução em todos os poços. A cor azul deve se transformar em amarelo após a acidificação. Limpe a parte inferior da placa de microtitulação para remover qualquer resíduo antes da leitura no leitor de placas. Leia na absorvância de 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 absorvância.