

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E SAÚDE –
MESTRADO

VANESSA MARIELI CEGLAREK

**REPERCUSSÕES DA DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y DE ROUX MATERNA
SOBRE O TECIDO ADIPOSEO MARROM DA PROLE MASCULINA ADULTA**

CASCAVEL-PR
NOVEMBRO/2018

VANESSA MARIELI CEGLAREK

**REPERCUSSÕES DA DERIVAÇÃO GÁSTRICA EM Y DE ROUX MATERNA
SOBRE O TECIDO ADIPOSEO MARROM DA PROLE MASCULINA ADULTA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde-Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Área de concentração: Processo saúde-doença

Orientadora: Sabrina Grassioli

Co-orientadora: Maria Lúcia Bonfleur

CASCADEL-PR
NOVEMBRO/2018

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Ceglarek, Vanessa Marieli

Repercussões da Derivação Gástrica em Y de Roux materna sobre o tecido adiposo marrom da prole masculina adulta / Vanessa Marieli Ceglarek; orientador(a), Sabrina Grassioli; coorientador(a), Maria Lúcia Bonfleur, 2018. 81 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde, 2018.

1. Termogênese. 2. Obesidade. 3. Cirurgia bariátrica. 4. Programação metabólica. I. Grassioli, Sabrina. II. Bonfleur, Maria Lúcia. III. Título.



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Cascavel CNPJ 78680337/0002-65
Rua Universitária, 2069 - Jardim Universitário - Cx. P. 000711 - CEP 85819-110
Fone:(45) 3220-3000 - Fax:(45) 3324-4566 - Cascavel - Paraná



PARANÁ
GOVERNO DO ESTADO

VANESSA MARIELI CEGLAREK

Repercussões da derivação gástrica em Y de Roux materna sobre o tecido adiposo marrom de ratos descendentes adultos

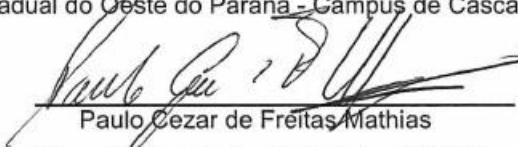
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Saúde em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia e Saúde, área de concentração Biologia, Processo Saúde-doença e Políticas de Saúde, linha de pesquisa Processo Saúde-doença, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:


Orientador(a) - Sabrina Grassioli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Elaine Manoela Porto Amorim

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)


Paulo Cezar de Freitas Mathias

Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Cascavel, 30 de novembro de 2018

“Uma pessoa inteligente resolve um problema, um sábio o previne.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradecer é demonstrar gratidão; é reconhecer um bem feito por outra pessoa.

A conclusão dessa pesquisa, que deu origem à minha dissertação e ao meu título de mestra, só foi possível porque eu não estive sozinha nesses dois anos de constante aprendizado. Sendo assim, gostaria de iniciar agradecendo a minha **mãe Celoni F. Gonçalves da Rocha** por me ensinar a sonhar, lutar, ser forte, ir além dos meus limites, buscar fazer sempre o melhor e sempre acreditar em mim. Foi devido a esses ensinamentos que a minha vida acadêmica se iniciou, se sustentou e espero que não tenha fim. Muito obrigada mãe, meu amor e gratidão são imensuráveis.

Manifesto a minha gratidão a minha **orientadora** professora Dra. **Sabrina Grassioli** por ser esse exemplo de profissional, pela excelente orientação, pelo apoio, pelos ensinamentos científicos e por sua inestimável confiança em mim. Contudo, agradecê-la referindo-se apenas ao perfil profissional não representaria o papel que ela realmente teve na minha vida. Todos esses anos de convivência só possibilitaram a minha evolução acadêmica, a qual não se limitou apenas ao caráter científico, devido ao ser humano que ela é. Foi uma imensa honra e orgulho tê-la como orientadora, amiga e “mamãe científica”. Grande parte de quem eu me tornei eu devo a você, MUITO OBRIGADA.

Agradeço também a toda a minha **família** por compreenderem a minha ausência sem criticá-la, sempre me apoiando independente das escolhas, tropeços e falhas, muito obrigada. Aos meus **amigos**, os quais ouviram muitos “eu não posso”, devido as tarefas do mestrado ou falta de dinheiro e mesmo assim continuaram ao meu lado, muito obrigada. Aos **colegas do LAFEM** pela companhia, estresses, neuras, congressos, suporte e muito aprendizado compartilhado, meus sinceros agradecimentos.

Quero agradecer a todos os **professores** do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Saúde pela paciência, dedicação e ensinamentos, aos **funcionários** da UNIOESTE pelo suporte, aos **membros da banca** pelas correções, sugestões e ensinamentos, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) por investir na educação e pesquisa, muito obrigada.

Por fim, sou muito grata às adversidades, pois elas me ensinaram a perseverança, a tolerância e o autocontrole. Minha sincera gratidão a todos que estiveram comigo nessa etapa, sem vocês isso não seria possível, MUITO OBRIGADA.

RESUMO

A ingestão de dieta rica em calorias durante a gestação e lactação induz a obesidade da prole, um evento que envolve a programação do tecido adiposo marrom (TAM). A cirurgia bariátrica (CB) é o método mais rápido de perda de peso e restabelecimento da homeostase energética em indivíduos obesos, um procedimento que poderia modular o desenvolvimento do feto, se realizado nas mães, tendo efeitos programadores sobre os descendentes na vida adulta. A CB materna modula o TAM da mãe e previne a obesidade na prole, porém seu impacto sobre o TAM dos descendentes é desconhecido. No presente estudo foram avaliados os aspectos histológicos e funcionais do TAM de descendentes de primeira geração (F1), machos adultos, de mães obesas submetidas à cirurgia de Derivação gástrica em Y de Roux (DGYR). Para tal, utilizamos a prole de ratas Wistar que receberam dieta cafeteria rica em calorias (CAF) ao longo da vida e aos 65 dias de vida foram submetidas a Falsa Operação (CAF-FO) ou a Derivação Gástrica em Y de Roux (CAF-DGYR) e a prole de ratas Controles (CTL), que receberam dieta padrão. Aos 30 dias de vida a prole foi desmamada, os machos foram separados (n=6/grupo) e os grupos de descendentes (F1) nominados conforme o tratamento materno, gerando 3 grupos experimentais: 1) CTL_{F1}; 2) CAF-FO_{F1} e 3) CAF-DGYR_{F1}. Todos os descendentes receberam dieta padrão ao longo da vida. Aos 120 dias de vida os descendentes foram eutanasiados, o TAM coletado e as análises histológicas e de expressão proteica da proteína desacopladora mitocondrial 1 (UCP1) e da cadeia transportadora de elétrons (CTE) foram realizadas. O TAM do grupo CAF-FO_{F1} apresentou maior acúmulo de gordura e área do adipócito, com redução da expressão do complexo I (CI) e complexo III (CIII) da CTE em relação ao grupo CTL_{F1} (p<0,05). Animais do grupo CAF-DGYR_{F1} apresentaram aumento na proliferação celular, acompanhado de redução dos estoques de gordura, aumento da expressão da UCP1 em relação aos animais CAF-FO_{F1}. A expressão do CI e CIII no TAM desses animais permaneceu reduzida em relação aos animais do grupo CTL_{F1}. O presente estudo mostra que a dieta materna CAF modula o TAM da prole, favorecendo maior deposição lipídica no tecido da prole adulta, contribuindo para a adiposidade elevada. O DGYR materna é capaz de prevenir a obesidade na prole adulta, provavelmente aumentando a expressão da UCP1, aumentando o gasto energético.

Palavras-Chaves: Cirurgia bariátrica. Obesidade. Termogênese.

EFFECTS OF MATERNAL ROUX-EN-Y GASTRIC BYPASS SURGERY ON BROWN ADIPOSE TISSUE OF ADULT MALE OFFSPRING

ABSTRACT

Intake of a hypercaloric diet during gestation and lactation induces offspring obesity, an event that involves the programming of brown adipose tissue (BAT). Bariatric surgery (BS) is the fastest method of weight loss and restoration of energetic homeostasis in obese individuals, a procedure that could modulate the development of the fetus, if performed in the mothers, having effects on offspring in adult life. The maternal BS modulates the mother's BAT and prevents obesity in the offspring, but its impact on BAT offspring is unknown. In the present study, the histological and functional aspects of the BAT of first generation (F1) adults descended from obese mothers submitted to Roux-en-Y gastric bypass surgery (RYGB) were evaluated. To that end, we used the offspring of Wistar rats who received a high-calorie cafeteria diet (CAF) throughout life and at 65 days of life were submitted to False Operation (CAF-FO) or Roux-en-Y Gastric Bypass (CAF- RYGB) and the offspring of rats Controls (CTL), which received standard diet. At 30 days of age the offspring were weaned, the males were separated ($n = 6$ / group) and the groups of offspring (F1) nominated according to maternal treatment, generating 3 experimental groups: 1) CTL_{F1}; 2) CAF-FO_{F1} and 3) CAF-RYGB_{F1}. All the offspring received standard diet throughout life. At 120 days of age the offspring were euthanized, the BAT collected, and the histological and protein expression analyzes of the mitochondrial decoupling protein 1 (UCP1) and the electron transport chain (ETC) were performed. The CAF-FO_{F1} BAT presented greater fat accumulation and adipocyte area, with a reduction in the expression of complex I (CI) and complex III (CIII) of the ETC in relation to the CTL_{F1} group ($p < 0.05$). Animals from the CAF-RYGB_{F1} group showed increased cell proliferation, accompanied by reduction of fat stocks, increased expression of UCP1 in relation to CAF-FO_{F1} animals. The expression of IC and CIII in the BAT of these animals remained reduced in relation to the animals of the CTL_{F1} group. The present study shows that maternal CAF modulates the offspring BAT, favoring greater lipid deposition in BAT from adult offspring, contributing to elevated adiposity. Maternal RYGB can prevent obesity in adult offspring, probably by increasing the expression of UCP1, increasing energy expenditure.

Keywords: Bariatric surgery. Obesity. Thermogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fosforilação oxidativa (OXPHOS).....	18
Figura 2: Desacoplamento mitocondrial no tecido adiposo marrom (TAM).....	20
Figura 3: Delineamento dos grupos experimentais.	31

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA** – Análise de Variância
- ADP** – Adenosina Difosfato
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- BG** – Banda gástrica ajustável
- CAF** – Dieta Cafeteria
- CAF-DGYR** – Dieta Cafeteria e Derivação Gástrica em Y de Roux
- CAF-FO** – Dieta Cafeteria e Falsa Operação
- CB** - Cirurgia bariátrica
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CI** – Complexo I
- CII** – Complexo II
- CIII** – Complexo III
- CIV** – Complexo IV
- CL** – Cardiolipina
- CV** – Complexo V
- CNA** – Comprimento naso-anal
- CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CTE** - Cadeia Transportadora de Elétrons
- CTL** - Controle
- DCNT** – Doenças crônicas não transmissíveis
- DCV** - Doenças Cardiovasculares
- DGYR** - Derivação Gástrica em Y De Roux
- DH** – Dieta hipercalórica
- DM2** - Diabetes Mellitus Tipo 2
- EDTA** - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EI** – Espaço intermembranas
- ERO** – Espécies Reativas de Oxigênio
- F1** – Descendentes de primeira geração
- FAD+** - Dinucleótido de Flavina e Adenina oxidado
- FADH2** - Dinucleótido de Flavina e Adenina reduzido

FMN – Nucleotídeo de Flavina
FO - Falsa Operação
GAPDH - Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GV – Gastrectomia vertical
H+ - Prótons
IMC – Índice de Massa Corporal
LAFEM - Laboratório de Fisiologia Endócrina e do Metabolismo
LHS - Lipase Hormônio Sensível
LPL - Lipoproteína Lipase
mtDNA – DNA mitocondrial
NAD+ - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina oxidado
NADH2 - Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina reduzido
NE – Norepinefrina
OMS - Organização Mundial da Saúde
OXPHOS - Fosforilação Oxidativa
PIG – Pequeno para a Idade Gestacional
PMSF - Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
RCIU - Restrição do Crescimento Intrauterino
RI - Resistência à Insulina
RPM - Rotações por minuto
SBCBM - Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica
SCs – Supercomplexos
SM - Síndrome Metabólica
SNA - Sistema Nervoso Autônomo
SNS - Sistema Nervoso Simpático
SUS - Sistema Único de Saúde
TAB - Tecido Adiposo Branco
TG - Triacilglicerídeos
TAM - Tecido Adiposo Marrom
UCP1 – Proteína Desacopladora 1
UNIOESTE - Universidade Estadual do Oeste do Paraná
VSM – Vasos sanguíneos e mitocôndrias
WB – Western blot

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos Específicos	10
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 Obesidade e Síndrome metabólica	11
3.2 Programação Metabólica	13
3.3 Tecido Adiposo Marrom e obesidade.....	16
3.4 Tecido Adiposo Marrom e Programação Metabólica.....	23
3.5 Cirurgia Bariátrica (CB)	24
3.6 Cirurgia bariátrica e Programação Metabólica	26
3.7 Tecido Adiposo Marrom e Cirurgia bariátrica	27
4. METODOLOGIA	29
4.1 Materiais e métodos.....	29
4.2 Procedimento cirúrgico de Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR) e pseudo-cirurgia	31
4.3 Coleta de dados	32
4.4 Coleta do Tecido Adiposo Marrom.....	32
4.5 Histologia e coloração Hematoxilina e Eosina (H&E).....	32
4.6 Análise das Imagens.....	33
4.7 Preparação de proteína e Western blot.....	33
4.8 Estatística.....	34
5. ARTIGO CIENTÍFICO.....	36
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7. ANEXO	75

1. INTRODUÇÃO

Insultos nutricionais ou hormonais em fases críticas do desenvolvimento, em particular gestação e lactação, tem efeitos sobre a saúde dos descendentes na vida adulta, evento conhecido como Programação Metabólica (GODFREY; BARKER, 2001; GUILLOTEAU et al., 2009). Deste modo, a nutrição e o metabolismo materno podem interferir no fenótipo dos filhos, tendo repercussões sobre o controle energético dos descendentes e predispondo o organismo destes indivíduos a eventos patológicos na vida adulta (ALFARADHI; OZANNE, 2011; MCMILLEN; ROBINSON, 2005).

Sendo assim, a obesidade materna eleva o risco para o desenvolvimento de obesidade e suas comorbidades em seus descendentes (GUPTA et al., 2011; JUONALA et al., 2011; PADILHA et al., 2007; PUDER; MUNSCH; 2010), prevendo incidência ou persistência da obesidade nas próximas gerações. Portanto, filhos de mães obesas tem maior chance de desenvolverem doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), em particular o Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e as doenças cardiovasculares (DCV) (ALFARADHI; OZANNE, 2011; MCMILLEN; ROBINSON 2005). Deste modo, evitar a obesidade materna é estratégia efetiva no combate às alterações do metabolismo na vida adulta dos filhos, bem como, método de melhorar a qualidade de vida da população no futuro.

Todavia, tratar a obesidade tornou-se um desafio, visto que a origem da doença tem caráter multifatorial (ABESO, 2016; GRUNDY, 1998; HEITMANN et al., 2012; WANDERLEY et al., 2010) e muitas anormalidades neuroendócrinas exigem respostas imediatas. Apesar da comprovada efetividade das dietas aliadas a atividade física para manutenção do peso corporal, tem-se aumentado a busca por métodos com resultado a curto prazo, em especial os procedimentos cirúrgicos (SBCBM, 2017a). Neste sentido, as cirurgias bariátricas (CB) modificam o trânsito e/ou a absorção alimentar, promovem perda de peso e favorecem o restabelecimento da homeostase energética (GARRIDO, 2000).

A Derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) é a técnica atualmente mais utilizada no mundo para perda de peso, em especial em pacientes com elevado grau de obesidade (KARRA; YOUSSEIF; BATTERHAM, 2010; RAMOS et al.,

2014). Dentre os diversos efeitos sobre o organismo, parece que parte da ação da CB sobre a redução do tecido adiposo branco está relacionado ao maior gasto energético, podendo envolver aumento da atividade termogênica (DADSON et al., 2018; RODOVALHO et al., 2017; VIJGEN et al., 2012). A termogênese, é um processo de queima de substratos energéticos e geração de calor, sendo que o Tecido Adiposo Marrom (TAM) é o principal responsável pelo processo (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000).

No TAM, este processo é altamente dependente da presença da Proteína Desacopladora 1 (UCP1)¹, expressa em elevada quantidade nas cristas mitocondriais. A UCP1 desvia o gradiente eletroquímico de prótons, gerados pelo do processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS)² da Cadeia Transportadora de Elétrons (CTE), resultando na formação de calor ao invés de ATP - Adenosina Trifosfato (CANNON; NEDERGAARD, 2004; RICQUIER; BOUILLAUD, 2000). A termogênese do TAM é sustentada por substratos bioquímicos oriundos da β -oxidação (catabolismo de ácidos graxos), um processo ativado pela norepinefrina (NE), a qual é liberada pelos terminais neurais do sistema nervoso simpático (SNS) (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Interessantemente, a **Erro! Fonte de referência não encontrada.** eleva a atividade termogênica, tanto em roedores quanto em humanos (CHEN et al., 2018; DADSON et al., 2018; HANKIR et al., 2015; RACHID et al., 2015; RODOVALHO et al., 2017; VIJGEN et al., 2012), sugerindo que adaptações do TAM estão envolvidas na perda de peso após CB.

Embora os estudos apresentem resultados promissores em indivíduos obesos submetidos à CB (AYOUB et al., 2011; GAMA, 2017; GELONEZE; PAREJA, 2006; LUZ; ENCARNAÇÃO, 2008; MANGO; FRISHMAN, 2006), os efeitos gerais destes procedimentos cirúrgicos não são completamente elucidados e muitos aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos permanecem desconhecidos, em especial sobre os seus descendentes. Apesar de já ter sido demonstrado que a CB materna tem efeitos sobre a condição de saúde dos filhos ao nascer e ao longo da vida (GALAZIS et al., 2014; GUÉNARD et al., 2013; SMITH et al., 2009), os estudos são escassos.

¹ Inglês: *Uncoupling Protein 1 (UCP1)* ou *Thermogenin* (Termogenina).

² Inglês: Oxidative phosphorylation ou electron transport-linked phosphorylation.

Considerando, que tanto a obesidade quanto a CB materna interferem no metabolismo da prole, e que a CB pode modular o TAM nos indivíduos operados, no presente estudo buscamos avaliar se a CB materna pode alterar a histologia e a expressão da UCP1 e dos complexos da CTE no TAM dos descendentes machos adultos. Nossa hipótese é que a CB materna eleva a termogênese no TAM dos filhos, promovendo redução da infiltração de gordura e aumento na expressão da UCP1.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar os efeitos da Derivação Gástrica em Y de Roux materna sobre aspectos histológicos e funcionais do TAM em descendentes machos adultos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da DGYR materna sobre o peso do TAM de ratos machos adultos;
- Investigar o impacto da DGYR materna sobre a quantidade de núcleos no TAM dos descendentes machos adultos;
- Caracterizar o perfil histomorfométrico dos adipócitos e o conteúdo de gordura no TAM dos descendentes machos adultos oriundos de mães submetidas à DGYR;
- Analisar se DGYR materna modifica a expressão proteica da UCP1 e da OXPHOS no TAM dos descendentes machos adultos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Obesidade e Síndrome metabólica

O acúmulo excessivo de tecido adiposo corporal é a característica principal da obesidade (WHO, 1999), a qual pode ser consequência de alterações na regulação do balanço energético. São vários os fatores que levam a obesidade, dentre eles estão os fatores genéticos, neurais, metabólicos, endócrinos, comportamentais e sociais, tendo, portanto, evidente aspecto multifatorial (ABESO, 2016; GRUNDY, 1998; HEITMANN et al., 2012; WANDERLEY et al., 2010). Porém, conforme apontam estudos epidemiológicos, os hábitos alimentares, em especial o elevado consumo de gordura e carboidratos associado a pouca atividade física, são fortes contribuintes à atual pandemia de obesidade, pois levam ao desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético (GOULARTE, 2011; WANDERLEY et al., 2010).

O equilíbrio energético é fundamental, pois quando a ingestão alimentar é maior que o gasto energético, o excesso de calorias ingeridas resulta no acúmulo de substratos energéticos, os quais serão direcionados principalmente aos adipócitos do tecido adiposo branco (TAB), onde são, via lipogênese, convertidos a triacilglicerol (TG) (ESCRIVÃO; LOPEZ, 1998; GUYTON; HALL, 2011). Esse último poderá ser mobilizado via lipólise em situações de déficit calórico, tal como jejum ou exercício físico intenso (CURI; ARAUJO, 2009). Entretanto, a regulação da lipogênese e lipólise no TAB são dependentes dos nutrientes circulantes, bem como de sinais aferentes dos sistemas neurais e hormonais, que ajustam o metabolismo de acordo com as necessidades energéticas (AHIMA, 2000).

O TAB frequentemente expande por processos de hiperplasia ou hipertrofia, mas quando ocorre um desequilíbrio na homeostase lipídica o resultado é o acúmulo de gordura em órgãos periféricos, processo conhecido como deposição ectópica de gordura (RIBEIRO FILHO et al., 2006). Esses dois eventos supracitados resultam na Síndrome Metabólica (SM), representada por um conjunto de alterações no metabolismo.

A SM tem como base a obesidade associada à resistência à insulina (RI), intolerância à glicose, dislipidemia e hipertensão (CANALE, et. al., 2013; DESPRÈS, 1997; RIBEIRO FILHO et al., 2006), eventos que aumentam a pré-disposição a estados patológicos, em especial o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) e doenças cardiovasculares (DCV), elevando a morbidade e a mortalidade dos indivíduos obesos (FRANCISCHI et. al., 2000; RIBEIRO FILHO et al., 2006).

Atualmente a obesidade é considerada a doença crônica mais comum na sociedade moderna e a sua prevalência tem aumentado de forma alarmante, acometendo mais de 13% da população mundial adulta (WHO, 2016), tornando-se um dos principais problemas de saúde pública em diversos países (BAHIA; ARAUJO, 2014). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), a obesidade triplicou entre 1980 e 2016 no mundo todo. Adicionalmente, estes dados mostraram que em média 60% da população adulta da região das Américas estão obesas, não poupando crianças e adolescentes, que entre 20% a 25% são afetados pelo excesso de peso ou obesidade. Logo, o continente americano está em 1º lugar com maior prevalência de excesso de peso entre adultos, crianças e adolescentes (WHO, 2016).

No Brasil, o levantamento realizado pela vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (Vigitel)³, indica que houve um aumento de 26% no número de pessoas com excesso de peso entre 2006 a 2016, deste modo mais de 50% da população brasileira adulta está acima do peso, enquanto quase 19% desta população é obesa. Além disso, a pesquisa destacou a obesidade como fator de risco para DCNT, tais como hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer, que além de sobrecarregar os sistemas de saúde (BAHIA; ARAUJO, 2014), respondem por mais de 70% dos óbitos no país (BRASIL, 2017). Adicionalmente, um dado alarmante apontado pela pesquisa foi de que metade das mulheres brasileiras em idade reprodutiva estão acima do peso e 20% estão obesas (BRASIL, 2017).

³ O levantamento dos dados foi realizado através do Índice de Massa Corporal (IMC), calculado através da divisão do peso em kg pela altura em metros elevada ao quadrado, kg/m², um dos indicadores usados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para verificação do estado nutricional. A classificação de sobrepeso e obesidade seguiu a proposta pela OMS, a qual considera que o indivíduo adulto está com excesso de peso quando o IMC é maior ou igual a 25kg/m² e está obeso quando o IMC é maior ou igual a 30kg/m².

O aumento de mulheres obesas em idade reprodutiva é um fator preocupante, uma vez que a obesidade interfere na qualidade de vida da gestante, elevando o risco de problemas durante o nascimento, mas principalmente repercutindo na saúde da criança no nascimento e ao longo da vida (ALFARADHI; OZANNE, 2011; MCMILLEN; ROBINSON 2005), podendo tornar-se um ciclo vicioso entre mães e filhos obesos por todas as próximas gerações.

Devido às complexidades dos eventos envolvidos no processo da obesidade, profissionais de diferentes áreas como Biólogos, Bioquímicos, Educadores Físicos, Enfermeiros, Farmacêuticos, Fisioterapeutas, Médicos, Nutricionistas, Psicólogos, entre outros, vêm trabalhando no desenvolvimento de estratégias para o combate à obesidade e suas comorbidades, tais como dietas, medicamentos, psicoterapia e exercícios físicos. Porém, devido à ação dos sistemas metabólicos, autonômicos e neuroendócrinos que protegem o organismo contra a perda de peso corporal (ROSENBAUM; LEIBEL, 2010), até o presente momento, os diferentes tratamentos isoladamente não têm sido suficientes para combater a obesidade e as complicações de saúde decorrentes de sua presença (PI-SUNYER, 2002).

Mediante a dificuldade em combater a obesidade e as complicações de saúde decorrentes de sua presença, atualmente, muitos indivíduos recorrem aos procedimentos cirúrgicos, com resultado a curto prazo (SBCBM, 2017a). Essas técnicas cirúrgicas visam modificar o trânsito e/ou a absorção alimentar e assim promover perda de peso e restabelecimento da homeostase energética (GARRIDO, 2000), assunto abordado no 3.6 -Cirurgia bariátrica e Programação Metabólica.

3.2 Programação Metabólica

O conceito de programação metabólica é baseado nos efeitos da nutrição e metabolismo materno sobre o fenótipo dos filhos ao nascer e ao longo do seu desenvolvimento. Assim, a condição de saúde materna em fases importantes da formação, como gestação e lactação, tem evidente papel no controle energético dos descendentes e influencia o risco de eventos patológicos na vida adulta

(GODFREY; BARKER, 2001), em especial o DM2 e DCV (ALFARADHI; OZANNE, 2011; MCMILLEN; ROBINSON 2005).

Uma das primeiras evidências do impacto de eventos nutricionais em janelas críticas do desenvolvimento sobre a saúde do indivíduo ao longo da vida foi proposta por Barker e colaboradores (1989). Esses pesquisadores mostraram relação entre o estado de desnutrição materna, o peso corporal do filho ao nascer e a maior incidência de estados patológicos na vida adulta. Posteriormente Hales e Barker (2001) criaram a hipótese do “fenótipo poupador”, através da qual explicam como as doenças crônicas na vida adulta estão relacionadas com o peso no nascimento. Segundo esta hipótese, os fetos que se desenvolvem em ambiente de desnutrição materna adaptam-se a um fornecimento deficiente de nutrientes, alterando a sua fisiologia, metabolismo e sensibilidade de tecidos, para poupar energia e garantir a sobrevivência, modificações que após o nascimento irão repercutir no estado de saúde na vida adulta.

A adaptação fetal a um ambiente nutricional anormal pressupõe mudanças na expressão gênica, que envolve a regulação de tecidos específicos. Um evidente exemplo deste fenômeno ocorre em indivíduos que passaram por processo de Restrição do Crescimento Intrauterino (RCIU), resultando em desnutrição fetal. Nestas situações, o feto é exposto à baixa disponibilidade de nutrientes durante o seu crescimento, com isso para garantir a sobrevivência ele desenvolve respostas preditivas adaptativas que podem exercer efeitos favoráveis ou desfavoráveis ao longo da vida (GLUCKMAN et al., 2005). Assim, indivíduos com RCIU quando expostos a ingestão altamente calórica ou excessiva, frequentemente, são mais predispostos à obesidade precoce e doenças metabólicas na vida adulta (GILBERT et al, 2006).

Embora os estudos iniciais sobre programação apresentassem como foco a desnutrição e sua consequência (BARKER, 1995; BARKER; OSMOND, 1986; HALES et.al., 1991), nos anos seguintes foi possível observar que a obesidade materna também poderia promover efeitos programadores sobre a prole (ALFARADHI; OZANNE, 2011; MCMILLEN; ROBINSON 2005; PADILHA et al., 2007). Com isso, Sookoian e colaboradores (2013) revisaram o impacto da programação metabólica materna sobre a prole, comparando efeitos de deficiência ou restrição nutricional versus efeitos de obesidade materna sobre a prole. Nesta revisão os autores demonstraram que enquanto a RCIU resulta em efeitos,

primariamente sobre estrutura e função do sistema cardiovascular na vida adulta, um ambiente materno supernutrido (obesidade materna) promove impacto sobre a homeostase glicêmica e lipêmica, elevando o risco futuro de SM, esteatose hepática e RI.

Estudos epidemiológicos têm confirmado que um ambiente uterino ou pós-natal adverso leva ao aumento da mortalidade na idade adulta, atribuída à maior incidência de DCV, como doença isquêmica cardíaca, além do maior risco de apresentar elementos da SM, DM2 e DCV (FORSÉN et al., 1999; SOOKOIAN et al., 2013). Considerando a importância do peso ao nascer, alguns estudos apontam que tanto o baixo (<2.500 g) quanto o elevado peso ao nascer (> 4.000 g) estão associados ao aumento do risco de DM2 ao longo da vida (HARDER et al., 2007).

Buscando mais informações, pesquisadores vêm desenvolvendo experimentos nos quais roedores são alimentados com dietas ricas em gorduras nas janelas críticas do desenvolvimento, tais como antes, durante e após a gestação e lactação, e os efeitos sobre os descendentes são avaliados. Usando esse tipo de delineamento experimental, Niculesco e Lupu (2009) mostraram que a obesidade materna induzida por dieta rica em gordura prejudica o crescimento intrauterino, levando ao nascimento de filhos com baixo peso. Corroborando, estudos mostraram que a alimentação materna altamente calórica nesses períodos prejudica o desenvolvimento somático e neurológico da prole, reduz o peso corporal e o crescimento corpóreo ao nascimento e modula o metabolismo lipídico, a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina, favorecendo a deposição de gordura, levando ao sobrepeso ao longo da vida (JAWERBAUM; WHITE, 2017; MENDES DA SILVA et al., 2014; NGUYEN et al., 2017; SIMINO et al., 2017).

Fortalecendo esse conceito, os estudos com humanos também demonstraram que a obesidade materna durante a gestação e/ou lactação induz alterações no feto, aumentando a probabilidade dos descendentes desenvolverem obesidade na infância e posteriormente na fase adulta, acrescendo os riscos de desenvolvimento de complicações, incluindo estresse psicossocial, DM2, hipertensão, dislipidemia e esteato-hepatite não alcoólica (GUPTA et al., 2011; JUONALA et al. 2011; MARTINS; CARVALHO, 2006; PUDER; MUNSCH, 2010). Desta forma, não há dúvidas de que a nutrição maternal e o metabolismo podem afetar o fenótipo dos filhos, levando ao aumento da prevalência de obesidade na

infância e na fase adulta e ao desenvolvimento de comorbidades relacionadas a esta síndrome.

Dentro desse contexto, existem estudos mostrando que a obesidade materna modula o gasto energético na prole, um processo que envolve alterações no processo termogênico (ALMEIDA et al., 2016; LIANG et al., 2016; XIAO et al., 2007). Em roedores o principal foco de termogênese é o Tecido Adiposo Marrom (TAM) (RICQUIER; BOUILLAUD, 2000) e a reativação do TAM em humanos adultos tem sido apontada, conforme revisão de Halpern e colaboradores (2014), como importante ferramenta no combate a obesidade.

3.3 Tecido Adiposo Marrom e obesidade

Tanto em roedores quanto em humanos, o TAM é bem desenvolvido ao nascimento e seus depósitos podem ser encontrados nas regiões interescapular, subescapular, axilar, intercostal, abdominal e torácica, variando em distribuição e quantidade de acordo com a espécie (YOUNG; ARCH; ASHWELL, 1984). Em roedores o TAM está presente durante toda a vida, enquanto em humanos ocorre uma regressão desse tecido durante os primeiros meses de vida (OBERKOFER et al., 1997). Deste modo, durante muitos anos, acreditava-se que adultos não apresentavam TAM ativo (ASTRUP et al., 1985). Porém, nas últimas décadas, trabalhos têm mostrado que o TAM pode ser reativado na vida adulta (CYPESS et al., 2009; VIRTANEN et al., 2009).

O TAM é altamente vascularizado e, histologicamente, seus adipócitos apresentam núcleos esféricos e ligeiramente excêntricos, além de aspecto multilocular, consequência do perfil dos depósitos citosólicos de lipídios. Assim, os lipídios intracelulares ficam dispersos pelo citosol dos adipócitos do TAM agregados em gotículas lipídicas de diferentes tamanhos. Porém a característica histológica e metabólica marcante do TAM é a elevada quantidade de mitocôndrias, nas quais ocorre a termogênese, garantida pela presença de grande quantidade da UCP1 (CANNON; NEDERGAARD, 2004)

O perfil das gotículas de gordura dispersas no citosol, o número de mitocôndrias, bem como a expressão da UCP1 no TAM são elementos diretamente modulados pela atividade do SNS, cuja inervação é intensa no tecido,

determinando, portanto a magnitude da termogênese (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Desde a descoberta da função termogênica do TAM, mecanismos moleculares foram sugeridos para compreender esse processo. Dentre os mecanismos, foi inferido que a termogênese era dependente de ATP. No entanto, foi observado posteriormente que as mitocôndrias do TAM têm baixa capacidade funcional de síntese de ATP, levando à conclusão de que o consumo de ATP não pode ser responsável pelo processo termogênico em adipócitos marrons. A formulação alternativa de que não é o ATP responsável pela oxidação, mas que a oxidação é "desacoplada", levando à identificação da proteína de desacoplamento 1, também conhecida como termogenina-UCP1 (CANNON; NEDERGAARD, 2004).

Em termos bioquímicos, o processo termogênico no TAM ocorre nas mitocôndrias, sendo dependente da presença dos complexos da CTE e da UCP1, todos localizados na membrana mitocondrial interna (BUSIELLO; SAVARESE; LOMBARDI, 2015). A energia que sustenta a termogênese mitocondrial é dependente da degradação bioquímica de substratos energéticos, em particular de lipídios, que depende de reações realizadas pelo processo de fosforilação oxidativa e de proteínas que compõem a CTE. Logo, as mitocôndrias desempenham outros papéis vitais nas células eucarióticas durante a OXPHOS, além da produção de ATP, discutido a seguir.

A OXPHOS é o principal processo bioquímico gerador nas células eucarióticas e esse processo é realizado por meio do fluxo de elétrons entre quatro enzimas, das quais três são bombas de prótons (NELSON; COX, 2014). A energia acumulada no gradiente de prótons sobre a membrana interna é utilizada para a síntese de ATP por um quinto complexo, a ATP sintase. Deste modo, sobre a ativação do SNS e liberação de NE, há estímulo para a lipólise, sendo os ácidos graxos metabolizados na matriz mitocondrial durante a β -oxidação. De maneira simplificada, os coeficientes redutores gerados durante esse processo (NADH e FADH_2)⁴ doam seus elétrons a OXPHOS, os quais, ao fluírem pelos complexos proteicos, ocasionam um bombeamento de prótons (H^+) ao espaço

⁴ Todos os elétrons que entram na cadeia de transporte vêm das moléculas de NADH e FADH_2 , produzidas durante os primeiros estágios da respiração celular: glicólise, oxidação do piruvato e do ciclo do ácido cítrico.

intermembranas (EI), gerando um gradiente eletroquímico cuja força motriz pode ser usada pra síntese de ATP (NELSON; COX, 2014).

A OXPHOS é composta por 5 complexos proteicos: NADH-Q oxidorreductase ou NADH-desidrogenase (Complexo I), succinato-Q redutase ou succinato-desidrogenase (Complexo II), citocromo c-oxidorreductase (Complexo III), citocromo c-oxidase (Complexo IV) e ATP sintase (Complexo V). Esses complexos são responsáveis pela remoção da energia dos elétrons (e^-) e transferência de H^+ , para o EI. Os e^- que entram na CTE são utilizados para redução do oxigênio (O_2) em água (H_2O) e a energia do gradiente de H^+ é utilizada para síntese de ATP (Figura 1) (NELSON; COX, 2014).

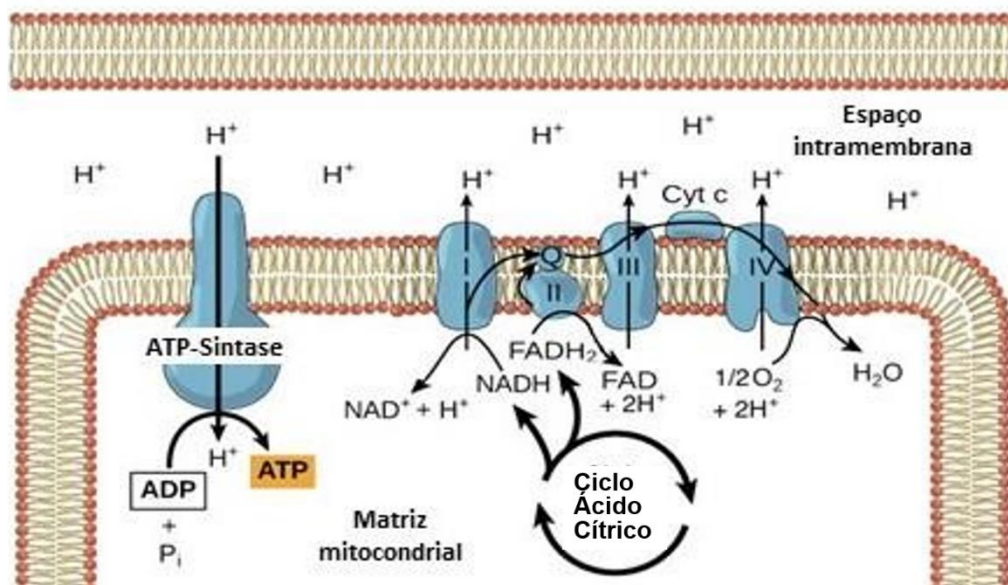


Figura 1: Fosforilação oxidativa (OXPHOS).

Complexos (I-V) do OXPHOS: CI, se liga ao substrato NADH, oriundo do Ciclo do ácido cítrico, e transfere elétrons (e^-) à ubiquinona (Q), resultando na translocação de prótons (H^+) ao espaço intramembrana (EI). CII transfere e^- à Q. CIII, oxida a Q em ubiquinol e bombeia H^+ para o EI. Os e^- do ubiquinol são passados ao citocromo c (Cyt c). CIV aceita e^- do Cyt c e os entrega ao oxigênio (O_2) para convertê-lo em duas moléculas de água ($2H_2O$), assim H^+ são bombeados para o EI. CV utiliza a energia dos H^+ do EI para transformar o ADP em ATP. Imagem modificada de Khan Academy (2018).

O CI é a maior enzima da CTE, a qual se liga ao substrato NADH e transfere dois elétrons, um de cada vez via Nucleotídeo de Flavina (FMN), à ubiquinona ligada na interface entre dois braços. A redução da ubiquinona induz alterações conformacionais no braço da membrana, resultando na translocação de quatro prótons através da membrana. O CII é o segundo ponto de entrada independente de elétrons para a cadeia respiratória. Ele oxida succinato e

transfere elétrons à ubiquinona. O complexo II não é uma bomba de prótons e não contribui diretamente para a formação do gradiente de prótons. O CIII oxida a ubiquinona em ubiquinol e como resultado pode bombear dois prótons para o espaço intramembrana. Os elétrons do ubiquinol são passados ao portador do citocromo c através dos citocromos b e c 1 do CIII. O CIV aceita elétrons do citocromo c e os entrega a uma molécula de oxigênio (O_2) para convertê-la em duas moléculas de água ($2H_2O$). Quatro prótons são bombeados para o espaço intramembrana durante esse processo. O CV utiliza a energia armazenada no gradiente de prótons, no espaço intramembrana, para transformar o ADP em ATP (CHABAN et al., 2014; LENAZ et al., 2010).

Descrevendo os complexos dessa maneira, parece que cada um funciona de maneira independente, o que foi proposto pelo modelo de difusão aleatória de transferência de elétrons. No entanto, evidências experimentais substituíram esse modelo por um modelo de organização supramolecular baseado em interações específicas entre complexos respiratórios individuais. Assim, os complexos OXPHOS podem interagir entre si formando estruturas de ordem superior, chamadas de supercomplexos (SCs) (LETTS; SAZANOV, 2017; SCHÄGGER, 2002; SIGNES; FERNANDEZ-VIZARRA, 2018)

No modelo de SCs, o CI forma um supercomplexo com CIII e CIV (SC I+III+IV, conhecido como o respirassoma), bem como com CIII sozinho (SC I+III). O CIII também forma um SC com CIV (SC III+IV). O CV forma dímeros, logo também é um SC. O papel funcional dos SCs pode ser a estabilização do CI, redução das mutações no Complexo III e IV e prevenção da geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) (EFREMOV; BARADARAN; SAZANOV, 2010). Porém, essas funções não estão completamente elucidadas (BARRIENTOS; UGALDE, 2013; MILENKOVIC et al, 2017).

O SC I+III se comporta como uma única unidade enzimática, e a inibição de qualquer um dos componentes provoca danos ao fluxo de elétrons e prótons, uma vez que CI é instável e se desmonta na ausência de uma organização SC (LENAZ et al., 2010). O determinante básico da formação de SC I–III por associação específica dos complexos individuais é representado pelo meio fosfolipídico das proteínas, uma vez que a quantidade de fosfolipídios na membrana mitocondrial interna não se liga naturalmente a grandes extensões, é a composição lipídica que pode ter efeitos profundos no estado de agregação.

Além disso, a cardiolipina (CL), fosfolípido que compõe a membrana mitocondrial interna, é especificamente necessária para associação SC e a perda da organização SC induz a formação excessiva de EROs (DENCHER et al., 2007; LENAZ; GENOVA, 2007). A redução de oxigênio em superóxido parece ocorrer em dois lugares, no CI e no FMN, sendo decorrente, principalmente, da perda de elétrons pelo CI. Por outro lado, quando se isola o CI, o FMN é considerado o principal doador de elétrons do oxigênio para formar o ânion superóxido (CAPE; BOWMAN; KRAMER, 2007; TURRENS, 2003; YIN; YANG; YU; YU, 2010).

Todavia no TAM, juntamente com a CTE, temos a presença da UCP1, a qual desacopla o gradiente de prótons, reduzindo a síntese de ATP pelo CV e liberando parte da energia como calor (Figura 2). Para tal, a UCP1 funciona como canal de prótons, desviando os mesmos que foram bombeados para o espaço intramembranoso pelos complexos II, III e IV (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Logo, com o funcionamento adequado do TAM mais substratos energéticos devem ser metabolizados para que ocorra a formação de ATP em outros tecidos.

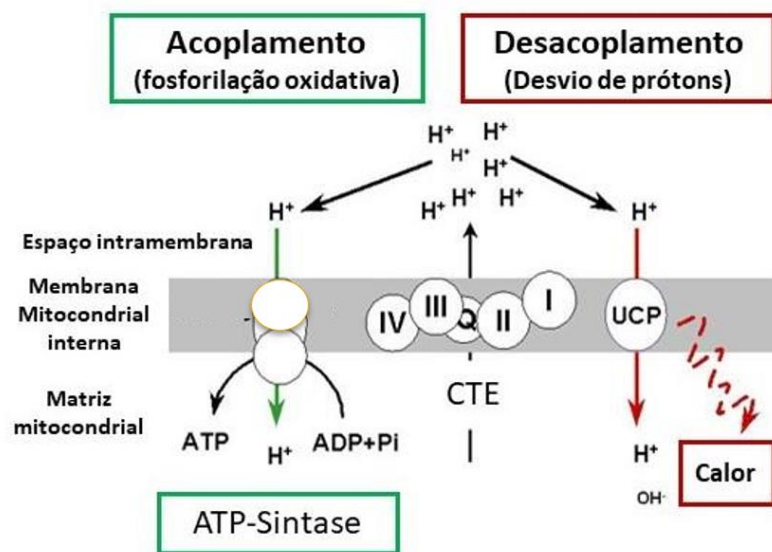


Figura 2: Desacoplamento mitocondrial no tecido adiposo marrom (TAM). Complexos (CI – CV) da cadeia transportadora de elétrons (CTE) no processo de OXPHOS, juntamente com a proteína desacopladora 1 (UCP1), desviando prótons (H^+) da ATP Sintase, que produz ATP, para produzir calor (termogênese). Imagem disponível no Google e adaptada pelos autores.

Considerando que o TAM utiliza a energia resultante das reações oxidativas de metabólitos, principalmente ácidos graxos, para gerar calor (LOWELL et al., 1993), a variação na expressão de UCP1 tem impacto significativo

sobre a eficiência energética e a deposição de tecido adiposo, favorecendo um acúmulo maior de tecido adiposo quando a expressão de UCP1 está comprometida (COMMINS et al., 1999). A atividade termogênica no TAM, incluindo a magnitude da lipólise e da expressão da UCP1, são diretamente moduladas pela NE via receptores β -adrenérgicos (CANNON; NEDERGAARD, 2004). Neste contexto, eventos que modulem o SNS, a expressão de receptores β -adrenérgicos e a expressão da UCP1 tem impacto na homeostase energética.

Em modelos animais de obesidade tem sido observado um déficit da termogênese no TAM. Ratos que passaram por remoção, parcial ou integral, do TAM desenvolveram obesidade sem hiperfagia (LOWELL et al., 1993). Por outro lado, os ratos que hiperexpressaram a UCP1 demonstraram ser resistentes a obesidade (KOPECKY et al., 1995).

Em humanos obesos observa-se, frequentemente, redução da taxa metabólica basal e menor atividade termogênica, resultantes de alterações no Sistema Nervoso Autônomo (SNA), um importante regulador do metabolismo corporal (PÉNICAUD et al., 2000). Assim parece que em humanos obesos há menor atividade do SNS, o que implica em sobra de energia e resulta em maior acúmulo de gordura (PENICAUD et al., 2000).

Conforme mencionado anteriormente, durante a ativação do SNS para o TAM ocorre a liberação de NE, a qual modula a proliferação e diferenciação celular, bem como a termogênese (BACHMAN et al., 2002). Estudo com adipócitos marrons isolados de camundongos demonstrou que na ausência de UCP1, a NE não consegue induzir a produção de calor (LOWELL et al., 1993).

Na obesidade têm-se observado redução da atividade termogênica do TAM, caracterizada por menor número de mitocôndrias, redução da atividade simpática e, conseqüentemente, menor expressão de UCP1 (COMMINS et al., 1999). Corroborando a ideia da importância do TAM para o metabolismo energético, evidências indicam que o desenvolvimento de complicações metabólicas da obesidade pode estar associado ao polimorfismo em alelos de genes específicos da UCP1, da lipoproteína lipase (LPL), bem como dos receptores β -adrenérgicos (PROENZA et al., 2000).

Fortalecendo a hipótese, uma importante evidência dos efeitos da NE sobre o TAM foi demonstrada em estudos usando roedores que não expressam ou não ativam os receptores β -adrenérgicos. Esses animais apresentaram

redução da taxa metabólica basal, tornando-se severamente obesos (BACHMAN et al., 2002). Portanto, a ação da NE no TAM depende de sua interação com os receptores β -adrenérgicos (CANNON; NEDERGAARD, 2004), confirmando a importância do TAM para o metabolismo energético. Com isso, a redução da termogênese no TAM contribui para o ganho de peso e adiposidade por diminuir o gasto energético, ao deixar de consumir prótons da OXPHOS para geração de calor, favorecendo a sobra de substratos energéticos que são direcionados ao tecido adiposo branco (TAB), uma vez que a síntese de ATP não terá que competir pelos prótons.

Todavia, além das consequências resultante de alterações na expressão da UCP1, as mitocôndrias, presentes em grandes quantidades no TAM, têm um papel central no desenvolvimento do processo de envelhecimento e na etiologia e patogênese da maioria das principais doenças crônicas (DIMAURO; SCHON, 2008; FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; FURUKAWA et al., 2004; LENAZ et al., 2006; REEVE; KRISHNAN; TURNBULL, 2008)

Adicionalmente, mutações do DNA mitocondrial (mtDNA) ou nuclear, que afetam os componentes do sistema OXPHOS, resultam em superprodução de EROs (LAX; TURNBULL; REEVE, 2006). Em particular, danos no mtDNA induzem alterações nos complexos respiratórios, com consequente diminuição na transferência de elétrons, levando à produção adicional de EROS e, assim, gerando um ciclo vicioso de estresse oxidativo e diminuição energética (SHARMA; LU; BAI, 2009). Essa queda da capacidade energética mitocondrial é considerada a causa do envelhecimento e das doenças degenerativas relacionadas à idade (LENAZ et al., 2006; REEVE; KRISHNAN; TURNBULL, 2008). Além disso, a geração aprimorada de EROs induz a dissociação do SC I-III com consequente ineficiência na canalização de elétrons do CI ao CIII (LENAZ et al., 2010), podendo ser a causa do desenvolvimento da obesidade crônica (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; FURUKAWA et al., 2004). Portanto, o sistema OXPHOS parece ser um alvo de drogas atraente no tratamento de doenças associadas a mitocôndrias.

Embora os mecanismos bioquímicos da termogênese e sua regulação estejam relativamente bem esclarecidos, muitos aspectos referentes ao impacto da termogênese sobre o metabolismo, em especial suas respostas frente a mudanças da homeostase energética, não estão completamente definidos.

3.4 Tecido Adiposo Marrom e Programação Metabólica

Conforme discutido anteriormente, a obesidade é uma patologia de origem multifatorial, a qual leva a alterações do funcionamento de diferentes órgãos. A exposição fetal à obesidade materna, além de aumentar a prevalência de obesidade na infância e na fase adulta, aumenta os riscos de desenvolvimento de comorbidades relacionadas.

Fortalecendo a hipótese do “fenótipo poupador”, o qual sugere que o ambiente uterino é o período de plasticidade fisiológica que ajuda a combinar os genes do feto em desenvolvimento com seu meio ambiente, Gluckman e Hanson (2004) sugeriram que as condições ambientais são detectadas pelo feto e neonato, que respondem adequadamente em busca sobrevivência. Ou seja, se o feto passar por restrição ao crescimento e posteriormente for exposto à abundância nutricional e excesso calórico na idade adulta, a obesidade se manifesta.

Estudo indica que o peso do indivíduo ao nascimento determina o desenvolvimento do tecido adiposo, sendo o baixo peso associado à diminuição da massa magra, bem como da massa gorda, podendo favorecer a instalação de obesidade (LAMPL et al., 2012). A massa gorda (tecido adiposo) desempenha um papel fundamental na regulação da temperatura corporal em lactantes. Ao contrário dos adultos humanos, os bebês não tremem, portanto precisam manter a temperatura corporal por outros meios (DAWKINS; SCOPES, 1965). Acredita-se que a gordura subcutânea desempenha um papel na isolação do bebê após mudança do ambiente, do útero ao meio externo (KUZAWA, 1998). Outro meio vital para prevenir a hipotermia e manter a temperatura corporal no início da vida é a termogênese que ocorre no TAM (DAWKINS; SCOPES, 1965).

Pesquisas demonstraram que a obesidade materna pode programar o TAM dos filhos afetando sua função e morfologia (ALMEIDA et al., 2016; LIANG et al., 2016; XIAO et al., 2007). Neste contexto um dos primeiros estudos foi desenvolvido por Xiao e colaboradores (2007), o qual mostrou que quando a prole é hipernutrida durante a lactação, a expressão da UCP1 no TAM aumenta, elevando o gasto de energia. Segundo estes autores, esta seria uma resposta metabólica adaptativa para elevar o gasto energético frente a maior ingestão calórica para evitar o ganho

de peso e a obesidade. Em contrapartida, White e colaboradores (2009) não observaram alteração na expressão da UCP1 na prole, em idade adulta, de ratas alimentadas com dieta hipercalórica (DH). No entanto, os pesquisadores observaram que a prole de ratas obesas alimentadas com DH apresentou níveis mais altos de expressão de receptores β -adrenérgicos do que descendentes de ratas não obesas alimentadas com dieta de baixa caloria. Logo, é possível observar que os efeitos da obesidade materna sobre os aspectos funcionais do TAM são ainda inconclusivos.

Posteriormente Xiao e colaboradores (2011) reforçaram a sua pesquisa inicial e mostraram que a supernutrição materna antes e durante a gestação compromete a atividade simpática no TAM da prole ao nascimento, por meio de uma reprogramação do circuito metabólico hipotalâmico que controla o ramo simpático para o TAM. Corroborando, Almeida e colaboradores (2016) também mostraram que o consumo de DH pelas mães aumenta a massa do TAM nos filhotes machos e fêmeas ao desmame, juntamente com hipertrofia dos adipócitos, aumento do acúmulo de lipídios e diminuição na expressão dos receptores β -adrenérgicos. Porém, os pesquisadores observaram aumento na expressão da UCP1 apenas em filhotes fêmeas, sugerindo perfis de modulações diferentes entre os sexos. No entanto, se compararmos o estudo de White e colaboradores (2009) com o de Almeida e colaboradores (2016), fica evidente que a obesidade materna modula o TAM e a termogênese, porém pode ser que ocorra por outra via e não pela UCP1.

Considerando que a obesidade materna tem impacto sobre a prole, podendo exercer efeitos sobre o TAM, o qual é importante para o metabolismo, e que o tratamento mais utilizado para redução de peso tem sido os procedimentos cirúrgicos, especialmente por mulheres ainda em idade reprodutiva, estudar os impactos da CB materna sobre o TAM dos filhos pode auxiliar na compreensão de doenças futuras, principalmente as envolvidas na SM. Até o presente momento não existem estudos sobre o impacto da CB sobre o TAM dos descendentes.

3.5 Cirurgia Bariátrica (CB)

No Brasil o número de CB realizadas anualmente está aumentando de maneira significativa. Segundo dados da Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica (SBCBM) foram realizadas mais de 430 mil cirurgias entre 2012 a 2016. Entretanto, poucas destas cirurgias foram realizadas em hospitais públicos e muitos dos pacientes obesos ainda precisam desse tratamento, em especial que possa ser realizado pelo Sistema Único de Saúde (SUS). No entanto, o valor gasto com CB aumentou em mais de 35% entre 2012 e 2016 (SBCBM, 2016) e apesar do elevado custo econômico das CB, o valor torna-se insignificante em relação à proporção do problema (SBCBM, 2017b).

Os procedimentos de CB, no entanto, são utilizados desde 1950 para o tratamento da obesidade e inicialmente resultavam apenas na redução da absorção alimentar (KREMEN et al., 1954). Entretanto, no fim da década de 1970 essas técnicas foram suspensas devido aos graves e frequentes efeitos colaterais. A partir de então passaram-se a utilizar os procedimentos que reduzem a ingestão de alimentos, seja pela restrição da capacidade do estômago ou por divisão e anastomose de segmentos intestinais, em particular o jejuno proximal (GARRIDO, 2000).

Atualmente podemos dividir a CB em três categorias: 1) Disabsortivas: caracterizadas pela retirada de partes do trato gastrointestinal, limitando à absorção de alimentos; 2) restritivas: nas quais há redução do tamanho do estômago, diminuindo a quantidade de alimento ingerido; 3) mistas: técnicas que associam um pouco de restrição com um pouco de disabsorção do bolo alimentar (OHTAS, 2005). Está última técnica tem sido o procedimento mais utilizado no mundo todo, sendo a operação bariátrica de derivação gástrica em Y de Roux (DGYR) considerada uma das mais efetivas e sustentáveis para perda de peso em obesos mórbidos (MACDONALD et al., 1997; KARRA; YOUSSEIF; BATTERHAM, 2010). No Brasil, desde a década de 60, a DGYR é a técnica bariátrica mais praticada, correspondendo a 75% das cirurgias realizadas, devido a sua segurança e eficácia, pois o paciente submetido à cirurgia perde de 70% a 80% do excesso de peso inicial (SBCBM, 2017c). O procedimento da técnica consiste no grampeamento de parte do estômago, reduzindo o espaço para o alimento, e um desvio do intestino inicial (SBCBM, 2017c).

Embora haja resultados promissores em indivíduos obesos submetidos à CB, que vão além da perda de peso, melhora na sensibilidade à insulina,

estabilização do controle glicêmico e lipêmico, melhora na função cardiovascular (GAMA, 2017; GELONEZE; PAREJA, 2006; LUZ; ENCARNAÇÃO, 2008; MANGO; FRISHMAN, 2006) e reversão da SM (AYOUB et al., 2011), os efeitos gerais destes procedimentos cirúrgicos não são completamente elucidados, e muitos aspectos fisiológicos, bioquímicos e morfológicos permanecem desconhecidos, particularmente seus efeitos a longo prazo.

Interessantemente, tem sido associado a perda de peso, mediante a técnicas bariátricas, a reativação do TAM (CHEN et al., 2018; DADSON et al., 2018; HANKIR et al., 2015; RACHID et al., 2015; RODOVALHO et al., 2017; VIJGEN et al., 2012). Logo, o TAM é um potencial órgão de estudos para tratar de doenças metabólicas, em especial as doenças crônicas resultantes da obesidade.

Considerando que muitas mulheres ainda em idade reprodutiva também recorrem aos procedimentos bariátricos (EDISON et al., 2016; EID et al, 2005; GOSMAN et al, 2010; MUSELLA et al, 2012), um importante aspecto da CB materna seria sua repercussão sobre os descendentes, em especial a longo prazo.

3.6 Cirurgia bariátrica e Programação Metabólica

A CB é o tratamento mais eficaz para a redução de peso a curto prazo, além de promover uma melhora na homeostase glicêmica e lipêmica (GAMA, 2017; GELONEZE; PAREJA, 2006; MANGO; FRISHMAN, 2006). Adicionalmente a CB promove alteração na expressão de genes envolvidos na ação da insulina, resultando em mudanças positivas na fisiopatologia da diabetes e obesidade (BERISHA et al., 2011; PARK et al., 2006). Entretanto, Luz e Encarnação (2008) analisaram diferentes estudos de pacientes após a CB e constataram que, embora a CB promova melhora da esteatose fibrose, redução dos riscos cardiovasculares e estabilização da glicemia de jejum e da albumina sérica, pode desencadear câncer gástrico, anemia ferropriva, deficiência de Vitamina B, colelitíase, hérnias incisionais, embolia pulmonar maciça, alopecia, baixa absorção de nutrientes (Cálcio e ácido fólico) mesmo com o uso do suplemento, depressão, compulsão alimentar, anorexia nervosa e alguns casos pode levar ao óbito. Deste modo, ficou evidente há necessidade de mais estudos a respeito do impacto da CB sobre os

indivíduos, em particular nas mulheres, e como esta condição de saúde pós-CB pode influenciar nos descendentes.

Atendendo os fatos supracitados, Smith et al. (2009) compararam filhos de mães obesas que nasceram antes da CB materna com filhos nascidos após CB materna, demonstrando que os últimos apresentam menor obesidade e adiposidade, maior sensibilidade à insulina, melhor controle da pressão arterial e melhor perfil lipídico. Posteriormente, estudo realizado por Guénard et al. (2013), o qual avaliou o perfil de metilação de genes entre irmãos nascidos antes e os irmãos nascidos após a CB, mostrou diminuição na metilação em alguns genes, incluindo os genes que controlam o metabolismo da glicose e sistema imunológico, sugerindo melhora do perfil de risco de DM2 nos que nasceram após CB.

Em revisão de literatura, Galazis et al. (2014) compararam a incidência de partos prematuros e o peso corporal do filho ao nascer entre mulheres obesas não operadas e mulheres obesas que tiveram filhos após a CB. O estudo concluiu que CB materna melhora os resultados da gravidez, mas potencialmente aumenta o risco de recém-nascidos pequenos para a idade gestacional (PIG), bem como eleva o número de partos prematuros, sugerindo efeito da CB materna sobre as condições ao nascer.

O peso ao nascer, interessante, é um dos mais importantes parâmetros para estimar efeitos de programação metabólica. Neste sentido, nascer PIG pode elevar a chance de DM2 e DCV na vida adulta (PESCADOR et al., 2001).

Logo, fica evidente que existem implicações da CB materna sobre a prole que precisam ser exploradas mais profundamente, em especial os efeitos sobre tecidos que regulam ou estão envolvidos na regulação do metabolismo desses descendentes, como o por exemplo o TAM.

3.7 Tecido Adiposo Marrom e Cirurgia bariátrica

Em termos imediatos, não há dúvidas de que os procedimentos bariátricos sejam tratamentos eficazes para a obesidade e que indivíduos obesos submetidos a CB apresentam melhora na homeostase energética e redução do TAB. Porém, sabe-se que muitas alterações fisiológicas decorrentes da CB podem ocorrer antes

mesmo da perda peso, um evento que pode ser dependente de alterações hormonais e autonômicas promovidas por estas técnicas (SBCBM, 2017c). Neste sentido, parece que a CB pode modular a termogênese. A DGYR é a técnica bariátrica mais frequentemente realizada em pacientes obesos, tendo sido observados efeitos desta CB sobre a atividade termogênica, tanto em modelos animais quanto em humanos (CHEN et al., 2018; HANKIR et al., 2015; RACHID et al., 2015; RODOVALHO et al., 2017).

Adicionalmente, estudo recente em roedores associou perda de peso corporal no pós-operatório com aumento do volume e atividade do TAM e diminuição da frequência de troca respiratória. Nesse estudo os pesquisadores alimentaram camundongos com DH por 12 semanas e submeteram a diferentes procedimentos bariátricos, como banda gástrica ajustável (BG), gastrectomia vertical (GV), DGYR e realizaram uma falsa operação (FO) em um grupo para servir de controle. Na semana 4 pós-operatória o conteúdo e a atividade metabólica da TAM aumentaram em todos os grupos operados, sendo essa acompanhada de aumento nos fatores de diferenciação da célula adiposa marrom (GH/IGF-1), aumento no consumo de energia, com frequência de troca respiratória reduzidas (CHEN et al., 2018).

Interessantemente, trabalhos com humanos tem demonstrado resultados similares. Vijgen e colaboradores (2012) avaliaram a atividade do TAM ao frio, usando tomografia de emissão de positrões, de indivíduos obesos mórbidos antes da CB e um ano após a CB e viram que após a perda de peso os indivíduos apresentam significativamente maior termogênese sem tremores. Corroborando os dados, Dadson et al. (2018) mostrou diminuição no conteúdo de triglicérides, juntamente com o aumento da proporção de TAM, associando com a diminuição nos índices de adiposidade e um aumento na sensibilidade à insulina em mulheres com obesidade mórbida após 6 meses de perda de peso induzida por CB.

Em conjunto, os estudos têm demonstrado que parte da elevação do gasto energético em pacientes obesos submetidos a CB pode ser decorrente de uma reativação da atividade termogênica do TAM. Entretanto, o impacto destas adaptações em mães obesas submetidas a CB e suas consequências sobre o TAM da prole não foram exploradas até o presente momento.

4. METODOLOGIA

O presente estudo é de natureza experimental básica, descritiva e com abordagem quantitativa. A pesquisa é um recorte do projeto “Homeostase lipídica da prole de ratas obesas submetidas à cirurgia de derivação gástrica em Y de Roux (DGYR)” apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), no dia 13 de fevereiro de 2015, de acordo com a Resolução Normativa Nº 12 de 20/09/2013 (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**). Para o seu desenvolvimento foi utilizado o TAM da prole das ratas obesas submetidas à DGRY.

4.1 Materiais e métodos

Para obtenção da prole ratas Wistar (n=45) foram obtidas com 21 dias de vida do Biotério Central da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste) e mantidas no biotério setorial do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LAFEM) da Unioeste sob condições controladas de luminosidade (luz das 7:00 às 19:00 horas) e temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$). Os animais foram desmamados com 21 dias de vida e randomicamente separados em 2 grupos experimentais, conforme dieta ofertada. O grupo Controle (CTL; n=13) recebeu dieta padrão para roedores (BioBase, Brasil), conforme recomendação da AIN93 (Reeves et al., 1993) e o grupo Cafeteria (CAF; n=32) recebeu dieta de cafeteria, conforme protocolo estabelecido por Goularte et al. (2012). As respectivas dietas foram ofertadas a partir do desmame para ambos os grupos. Aos 65 dias de vida, as ratas do grupo CAF foram subdividas em 2 grupos: DGYR, aquelas submetidas à CB e FO, as submetidas à falsa operação. O procedimento bariátrico cirúrgico adotado foi a Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR), conforme protocolo estabelecido por Hao et al. (2013). Animais FO foram submetidos à anestesia e laparotomia exploratória. Deste modo, formaram-se 3 grupos de mães: Controles (CTL); Cafeteria - Falsa operação (CAF-FO) e Cafeteria - Derivação Gástrica em

Y de Roux (CAF-DGYR), com n=13/grupo. Aos 105 dias de vida (40 dias após a CB ou FO), ratas de todos os grupos foram acasaladas no sistema de harém (3 fêmeas/macho). Os machos para o acasalamento foram escolhidos aleatoriamente, sendo adultos jovens com 90 dias de vida, consumindo dieta padrão para roedores e sem nenhum procedimento cirúrgico. Constatada a prenhez as fêmeas foram separadas em caixas individuais e o momento do nascimento registrado. Durante a gestação e lactação as fêmeas continuaram recebendo suas respectivas dietas. Após o nascimento da prole, ou descendentes da primeira geração (F1), o tamanho da prole foi ajustado para 6 filhotes por mãe para garantir similar aporte nutricional, visto que alterações no número de filhotes da prole durante a lactação é um conhecido modelo de programação metabólica (XIAO et al., 2011). Para evitar influências hormonais do ciclo estral de ratas apenas os filhotes machos foram avaliados neste estudo. Assim, ao desmame (30 dias) os filhotes machos foram separados (n=6/grupo) e os grupos nominados conforme o tratamento materno, gerando 3 grupos experimentais: 1) CTL_{F1}: filhos de mães alimentadas com dieta padrão; 2) CAF-FO_{F1}: filhos de mães alimentadas com dieta CAF e submetidas à FO; e 3) CAF-DGYR_{F1}: filhos de mães alimentadas com dieta CAF e submetida à DGYR. O delineamento experimental está representado na Figura 3. Todos os descendentes receberam desde o desmame até a vida adulta (120 dias) ração padrão para roedores e água *ad libitum*. Os animais foram eutanasiados aos 120 dias de vida e o TAM coletado e armazenado adequadamente às técnicas histológicas e de expressão proteica, conforme descrito nos itens 4.4 a 4.7.

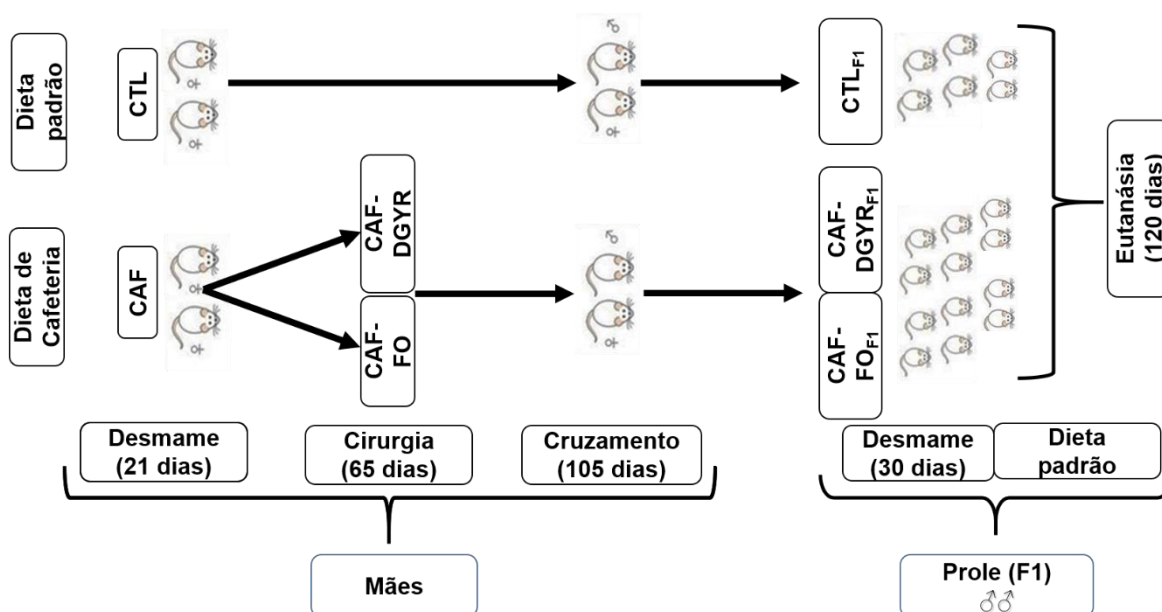


Figura 3: Delineamento dos grupos experimentais.

Grupo Controle (CTL), que recebeu dieta padrão ao longo da vida ($n=13$); Grupo cafeteria (CAF) que recebeu dieta de cafeteria ao longo da vida ($n=32$); Grupo Cafeteria – Falsa operação (CAF FO); Grupo Cafeteria submetido ao DGYR (CAF DGYR). Prole: CTL_{F1}: filhos de mães alimentadas com dieta padrão; CAF-FO_{F1}: filhos de mães alimentadas com dieta CAF e submetidas à FO; CAF-DGYR_{F1}: filhos de mães alimentadas com dieta CAF e submetida à DGYR ($n=6$ /grupos).

4.2 Procedimento cirúrgico de Derivação Gástrica em Y de Roux (DGYR) e pseudo-cirurgia

O procedimento bariátrico cirúrgico seguiu o protocolo estabelecido por Hao et al. (2013). Brevemente, uma semana antes da cirurgia, todos os grupos experimentais receberam dieta liquidificada, permanecendo em jejum de 12 a 16 horas antes dos procedimentos. Os animais foram anestesiados, com Isoflurano a (1%), via intubação nasotraqueal, sob oxigênio a 1 mL/min em ventilação espontânea. Após laparotomia do abdômen os dois ramos anterior e posterior dos vasos gástricos esquerdos foram ligados e o feixe esquerdo dos vasos gástricos separado do esôfago. O estômago foi seccionado e uma bolsa gástrica correspondendo a um volume de 5% do total do volume do estômago foi confeccionada. Em seguida o jejuno foi dividido e realizado a gastrojejunostomia e jejunojejunostomia. A alça aferente do jejuno teve, aproximadamente, 10 cm a partir do ligamento de Treitz, denominada como alça biliopancreática e a alça alimentar, entre a gastrojejunostomia e a jejunojejunostomia, teve

aproximadamente 15 cm de comprimento. A laparotomia foi fechada com sutura contínua. Para a falsa-cirurgia o abdômen foi aberto por uma incisão na linha média epigástrica de 4 cm. O jejuno foi dividido a uma distância de 25 cm distal ao ligamento de Treitz e foi reanastomosado. A laparotomia foi fechada conforme descrito anteriormente. A secção e reanastomose no trato gastrointestinal foram realizadas correspondendo à executada na derivação gástrica em Y de Roux, conservando o eixo gastrointestinal.

4.3 Coleta de dados

O peso corporal (g) da prole foi verificado em três momentos, ao nascimento, aos 30 e aos 120 dias de vida. Aos 120 dias de vida e após 12 horas (h) de jejum foram mensurados o comprimento naso-anal (CNA), realizado o índice de Lee [$\sqrt[3]{(\text{peso corporal})/\text{CNA}} \times 1000$] e os animais foram eutanasiados, sendo a cavidade abdominal laparatomizada e o depósito de TAB retroperitoneal (TAB-R) retirado e pesado. O TAM interescapular também foi retirado

4.4 Coleta do Tecido Adiposo Marrom

O depósito interescapular de TAM foi retirado, limpo, pesado e os dois lóbulos separados. Um dos seguimentos foi imediatamente imerso em solução fixadora (Paraformol 4%) para posterior análise histológica enquanto o outro segmento foi armazenado em RNA later e transferidos ao biofreezer (-80°C) para posterior técnica de Western Blot (WB).

4.5 Histologia e coloração Hematoxilina e Eosina (H&E)

Retirados do fixador paraformol 4%, o material foi lavado em água corrente por 24 horas para retirada do fixador. Ao final deste tempo de lavagem, os tecidos foram mantidos em fracos com álcool 70%. Posteriormente, os tecidos foram preparados para a parafinização, sendo necessárias as etapas prévias de

desidratação (com condições crescentes de álcool), diafanização (com xilol) e, finalmente, impregnação com parafina (Paraffin Wax), conforme protocolos histológicos de rotina. Após o emblocamento em parafina as peças foram submetidas à microtomia (cortes em 5 μ M) e montagem das lâminas para coloração com Hematoxilina e Eosina (H&E). Foram preparadas 3 lâminas com 3 cortes semi-seriados oriundos de 6 ratos por grupos.

4.6 Análise das Imagens

Após preparo das lâminas, elas foram fotografadas em microscópio de campo claro (Olympus BX41) com captura digital de imagens (Olympus DP71 equipada com o software DP-Controller) em objetiva de 40x. As imagens foram avaliadas com software livre Image-J. Quantitativamente foram avaliados a contagem de núcleos por campo e mensurado a área dos adipócitos. Com auxílio da ferramenta “count and measure objects” do Image J foi possível estimar a área total ocupada por núcleos, lipídios e a porcentagem ocupada pela área remanescente, que provavelmente representou vascularização (V), citosol (C) e tecido extracelular (E) também foi calculada e denominada VCE, cujos valores foram expressos em porcentagem de acordo com as diferenças nas tonalidades de cada tipo celular.

4.7 Preparação de proteína e Western blot

O TAM foi homogeneizado mecanicamente em tampão de extração, composto por Ureia (7M), Tiourea (2M), ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA, 5mM), Fluoreto de sódio (1mM), Pirofosfato (1mM), Ortovanadato de sódio (1mM), Fluoreto de Fenilmetilsulfonila (PMSF, 1mM) e Aprotinina (2mM). Em seguida foi adicionado Triton 10%, e as amostras centrifugadas a 12.000 rotações por minuto (rpm) durante 30 minutos e incubados em gelo (4°C) durante 40 minutos. Após o tempo de espera, as amostras foram levadas à centrífuga a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C. A concentração de proteína foi determinada utilizando o ensaio de proteína Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), utilizando albumina para

curva padrão e o reagente de Bradford (Bio-Agência Lab, Brasil). Após quantificação, as amostras foram armazenadas em solução com 40% do volume de Tampão Laemmli 5X (Azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M, glicerol 50%, SDS 10%). As amostras destinadas à expressão da UCP1 foram incubadas a 100°C por 5 minutos, em banho seco, antes de serem submetidas à eletroforese. As amostras destinadas à expressão da CTE não passaram por esse último processo supracitado. Posteriormente, foram submetidas à eletroforese em gel bifásico de poli(acrilamida) (SDS-PAGE 10%), em caixa de gel horizontal (Enduro™, EUA) contendo tampão de corrida (Trisma base 200mM, glicina 1,52M, EDTA 7,18mM, SDS 4%, água MilliQ) em temperatura ambiente a 90 V, e em seguida transferida para membranas de nitrocelulose (BioRad Laboratories) 90 minutos a 120 mV em gelo, banhada com tampão de transferência (Trisma base 25 mM, glicina 192 mM). Após transferência, as membranas foram bloqueadas com tampão de bloqueio (Albumina 5% em solução basal de TBS T) durante 1 hora em temperatura ambiente. As proteínas relacionadas ao estudo foram detectadas na membrana de Nitrocelulose por incubação durante 12 horas a 4°C, com anticorpo primário específico: OXPHOS (#ms604; abcam), UCP1 (#14670; Cell Signaling Technology), α -Tubulina (#3873; Cell Signaling Technology), GAPDH. A α -Tubulina foi utilizada como controle interno (1:30000) das amostras destinadas a expressão da UCP1 e GAPDH (#g9545; Sigma Aldrich) como controle interno (1:1000) das amostras destinadas a expressão da CTE/OXPHOS. Em seguida as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado com peroxidase. As bandas proteicas foram detectadas por exposição à substância quimioluminescente (luminol e peroxidase) seguida de revelação em uma foto documentadora GE. A quantificação das bandas foi feita por densitometria utilizando o um software livre de análise de imagem, ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij>). De 4 -6 ratos por grupo foram usados para WB de todas as proteínas testadas.

4.8 Estatística

Os resultados passaram pela análise da Distância de Cook, para verificação de dados fora da curva. Os pressupostos de normalidade e

Homocedasticidade foram testados a partir da análise Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Dados que estavam em normalidade foram expressos como média \pm erro padrão da média, analisados pela análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Bonferroni e $p < 0,05$ adotado como critério de significância. Dados que não estavam em normalidade foram expressos como média \pm erro padrão da média, analisados pelo teste Kruskal-Wallis com pós-Dunn e $p < 0,025$ adotado como critério de significância. Todas as análises foram realizadas com auxílio do programa R Core Team (2018 - www.R-project.org). Os gráficos foram construídos com auxílio do Program Graph Pad Prism (versão 6.0).

5. ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “**Maternal Roux-en-Y gastric bypass surgery reduces lipid deposition and increases UCP1 protein expression in the brown adipose tissue of offspring**” foi formatado de acordo com as normas para submissão da revista **Scientific Reports**.

Maternal Roux-en-Y gastric bypass surgery reduces lipid deposition and increases UCP1 protein expression in the brown adipose tissue of offspring

Vanessa Marieli Ceglarek*¹; Iala M. Bertasso¹; Carla B. Pietrobon¹; Nayara Carvalho Leite², Maria Lucia Bonfleur¹; Alan C. Faria Araújo¹; Sandra Lucinei Balbo¹; Sofia Pizzato Scomazzon³; Sabrina Grassioli¹.

¹Laboratory of Endocrine and Metabolic Physiology, Biosciences and Health Post-Graduate. University of West Parana, Cascavel - PR, Brazil.

²Obesity Comorbidities and Research Center, University of Campinas, Campinas - SP, Brazil.

³Medical Sciences: Endocrinology Post Graduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil.

*Corresponding author: Vanessa Marieli Ceglarek. E-mail:

vanessa.ceglarek@hotmail.com; Address: Sarmiento Leite, 500 - Farroupilha, Porto Alegre - RS, Zip code: 90050-170, Brazil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde – ICBS. Departamento de Fisiologia Sala 337, Laboratório 7 – Laboratório da Fisiologia Básica e da Cognição, 3º andar. Telephone: +55-45- 998090043 or +55-51-33083526.

SUMMARY: Maternal obesity and cafeteria diet (CAF) predispose offspring to obesity and metabolic diseases. Maternal bariatric surgery may avoid these alterations by modulating brown adipose tissue (BAT) morphology or function. Here, we evaluated the BAT in adult male rats born from obese female rats submitted to Roux-en-Y gastric bypass (RYGB). For this, adult male rat offspring were obtained from female rats that consumed standard diet, or CAF diet, and were submitted to simulated operation or RYGB. Analysis of offspring showed that, at 120 days of life, the maternal CAF diet induced adiposity and decreased the expression of mitochondrial Complex I (CI) and Complex III (CIII) in the BAT, resulting in higher accumulation of lipids than in BAT from offspring of CTL dams. Moreover, maternal RYGB increased UCP1 expression and prevented excessive deposition of lipids in the BAT of adult male offspring rats. However, maternal RYGB failed to reverse the effects of maternal diet on CI and CIII expression. Thus, maternal CAF promotes higher lipid deposition in the BAT of offspring, contributing to elevated adiposity. Maternal RYGB prevented obesity in offspring, probably by increasing the expression of UCP1.

INTRODUCTION

Nutritional and hormonal insults occurring during critical developmental periods, especially pregnancy and lactation, seem to explain the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD), particularly the high incidence of non-communicable diseases (NCDs), such as diabetes and cardiovascular diseases in adult life [1,2,3,4]. These early stages of development are important periods of vulnerability to nutritional, hormonal or stressor insults, since they are associated with intense cellular proliferation and differentiation, resulting in rapid changes in physiology, morphology and anatomy, which can persist into adulthood [5,6,7,8,9].

Maternal obesity exerts a recognized impact on foetal development and on the postnatal stages and has significant metabolic effects on offspring. Worryingly, excess white adipose tissue (WAT) and metabolic dysfunctions have often been observed in women during the reproductive period, including during the gestation and lactation periods, representing a risk factor for the health of the offspring. In this regard, maternal obesity is related to excessive visceral WAT, dyslipidaemia and glucose intolerance in offspring during adult life [1,2,3,4,10]. Interestingly, maternal obesity can also program the brown adipose tissue (BAT) of offspring, resulting in reduced thermogenesis and higher fat accumulation [11,12,13], resulting in lower energy expenditure, and contributing to obesity installation in adulthood.

Bariatric surgery (BS), especially the restrictive Roux-en-Y Gastric Bypass (RYGB) technique, has been the most efficient method for reducing body weight and restoring energy homeostasis in obese adults¹⁴. High energy expenditure is a characteristic of the post-BS period, an event that may involve increased thermogenesis in BAT [15,16,17]. As a result, many women of reproductive age resort to this method and, curiously, their offspring born after BS present a reduction in adiposity and lipid profile, compared to those born from the same mother before BS [18,19]. However, the long-term consequences of maternal BS on offspring are not completely clear, especially the action on BAT.

Reflecting its functional role, the BAT is characterized by a multilocular profile of lipid deposition, a high quantity of mitochondria, dense vascularization and innervations being a thermogenic specialized tissue [20]. The mitochondrial inner membrane of the BAT adipocyte presents a high expression of uncoupling

protein 1 (UCP1). The UCP1 generates and dissipates heat in a process known as thermogenesis. These process results of a proton gradient, due to oxidative phosphorylation (OXPHOS), mediated by the Electron Transport Chain (ETC): complexes NADH—Ubiquinone Oxidoreductase (CI), Ubiquinol—Cytochrome c Oxidoreductase (CIII) and Cytochrome c oxidase (CIV). The lipids are primary energetic substrates used to sustain the respiratory chain, thus lipolysis stimulated by norepinephrine (NE) from the Sympathetic Nervous System (SNS) is essential to maintain the thermogenesis process in BAT. Thus, histological aspects, as well as UCP1 expression, reflect the level of thermogenesis activity in BAT. However, maternal malnutrition and obesity can program the BAT of offspring, contributing to the disruption in energy homeostasis [11,12,13].

Considering the obesity frequently found in women of reproductive age and the long-term effects of BS on the energy metabolism of offspring, the effects of this procedure on thermogenesis and BAT (such as reduced obesity and increased energy expenditure) cannot be disregarded. Thus, in the present study, we evaluated, for the first time, the effects of maternal obesity and RYGB on histomorphological parameters (UCP1 and the ETC complex (CI-CV) expression) in the BAT of adult male offspring.

RESULTS

Biometric parameters of offspring of obese female rats submitted, or not, to RYGB

Table 1 shows the effects of maternal RYGB on the body weight and growth of male offspring at various growth stages. The maternal CAF diet did not significantly alter the body weight of offspring throughout life. However, maternal BS promoted a decrease in growth. Thus, the body weights of the CAF-SHAM_{F1} group at birth, weaning (30 days) and adulthood (120 days) were similar to the body weights of CTL_{F1} rats of the same ages. In contrast, the body weights of CAF-RYGB_{F1} rats were lower at birth [One-way ANOVA, $F_{(2,21)}=12.422$, $p=0.0001$, Bonferroni post hoc ($p<0.05$)], weaning [Kruskall-Wallis, $p=0.49$, Post-hoc Dunn ($p<0.05$)] and adulthood [One-way ANOVA, $F_{(2,21)}=7.936$, $p=0.003$, Bonferroni post hoc ($p<0.05$)], compared to CTL_{F1} and CAF-SHAM_{F1} rats.

The CAF maternal diet did not influence offspring growth. Thus, CTL_{F1} and CAF-SHAM_{F1} rats showed similar NAL at 120 days of life. On the other hand, CAF-

RYGB-F1 offspring presented a reduction in NAL, when compared to CTL_{F1} and CAF-SHAM_{F1} offspring, at 120 days of life [One-way ANOVA, $F_{(2,21)}=7.357$, $p=0.004$, Bonferroni post hoc ($p<0.05$)]. Neither maternal CAF diet nor BS significantly affected Lee's Index at 120 days of life [One-way ANOVA, $F_{(2,21)}=1.121$, $p=0.345$].

The maternal CAF diet caused adiposity in adult offspring, and this adiposity was modified by maternal RYGB. At 120 days of life, the offspring of the CAF-SHAM_{F1} group presented a higher WAT-R content than the CTL_{F1} offspring, while the offspring of female rats submitted to the RYGB showed a reduction in WAT-R, compared to offspring of non-operated female rats, resembling the CTL_{F1} group [One-way ANOVA, $F_{(2,21)}=6.14$, $p=0.008$, Bonferroni post hoc ($p<0.05$)].

Effects of maternal CAF diet and RYGB on BAT of adult male offspring

The maternal CAF diet increased the fat deposition in the BAT of male adult offspring, while maternal BS prevented this accumulation of fat (Figure 1). BAT weight was higher in animals of the CAF-SHAM_{F1} and CAF-RYGB_{F1} groups compared to the BAT of the CTL_{F1} group [(Figure 1a), One-way ANOVA, $F_{(2,14)}=7.519$, $p=0.0001$, Bonferroni post hoc ($p<0.05$)]. In CAF-SHAM_{F1} rats, reduction in nucleus number (Figure 1b). and increased adipocyte size (Figure 1c) was observed compared to the BAT of the CTL_{F1} group. Conversely, BS abolished these changes in the BAT of CAF-RYGB_{F1} rats (Figure 1f), which presented an increase in the number of nuclei (Figure 1b) [One-way ANOVA, $F_{(2,15)}=13.293$, $p=0.001$, Bonferroni post hoc ($p<0.05$)] and a reduction in adipocyte size (Figure 1c) [One-way ANOVA, $F_{(2,15)}=27.56$, $p=0.001$, Bonferroni post hoc ($p<0.05$)], compared to CAF-SHAM_{F1}, resembling the CTL_{F1} group.

As a result of these changes (Figure 2), the fat area in the BAT of the CAF-SHAM_{F1} group (Figure 2h) demonstrated an average of 51% of the total BAT area (Figure 2a). In contrast, the fat in the BAT of CAF-RYGB_{F1} rats (Figure 2i) was 30%, similar to that of CTL_{F1} rats [(28%), Figure 2g), One-way ANOVA, $F_{(2,15)}=54.23$, $p=0.001$, Bonferroni post hoc ($p<0.05$)]. Consequently, the percentage of BVM (Figure 2b) and nuclei (Figure 2c) decreased in the BAT of CAF-SHAM_{F1} rats to 47% (Figure 2k) and 2% (Figure 2n), respectively. Thus, the percentages of BVM (66%, Figure 2l) and nuclei (4%, Figure 2o) in the BAT of CAF-RYGB_{F1} rats were similar to the percentages of BVM (67%, Figure 2j) and nuclei (5%, Figure

2m) in the CTL_{F1} group [One-way ANOVA, $F_{(2,15)}=46.036$, $p=0.0001$ and $F_{(2,15)}=9.226$, $p=0.001$, respectively. Bonferroni post hoc ($p<0.05$)].

Maternal CAF diet did not alter the expression of UCP1 in offspring (Figure 3). Although a 33% reduction in the expression of UCP1 was observed in the BAT of CAF-SHAM_{F1} rats, this expression was statistically similar to that of CTL_{F1} rats. On other hand, maternal RYGB promoted changes in UCP1 expression. Thus, in the CAF-RYGB_{F1} group, the expression of UCP1 was increased by more than 300%, compared to the CTL_{F1} and CAF-SHAM_{F1} groups [One-way ANOVA, $F_{(2,9)}=14.604$, $p=0.001$. Bonferroni post hoc ($p<0.05$)]

The maternal CAF diet altered the protein expressions of the CI and CIII complexes in the BAT of male adult offspring rats and maternal BS did not modify this effect (Figure 4). Accordingly, a reduction of more than 85% in the expression of CI was observed in the BAT of the CAF-SHAM_{F1} and CAF-RYGB_{F1} groups, compared to the BAT of the CTL_{F1} animals [One-way ANOVA, $F_{(2,9)}=17.99$, $p=0.001$. Bonferroni post hoc ($p<0.05$)]. Similarly, the protein expression of CIII was reduced by 50% in the BAT of the CAF-SHAM_{F1} and CAF-RYGB_{F1} rats, compared to the BAT of the CTL_{F1} groups [One-way ANOVA, $F_{(2,9)}=22.039$, $p=0.0001$. Bonferroni post hoc ($p<0.05$)]. Although the mean expression of CIV was 50% and 75% higher in the CAF-SHAM_{F1} group, compared to the CTL_{F1} and CAF-RYGB_{F1} groups, respectively, this difference was not statistically significant [One-way ANOVA, $F_{(2,9)}=2.918$, $p=0.105$]. With regard to CII [One-way ANOVA, $F_{(2,9)}=0.659$, $p=0.541$] and CV expression [One-way ANOVA, $F_{(2,9)}=0.178$, $p=0.840$], there were no statistical differences between the groups.

DISCUSSION

The DOHaD is the study of how the early developmental stages, such as pregnancy and lactation, and early life environment can impact the risk of chronic diseases from childhood to adulthood and the mechanisms involved [5,6,7,8,9]. Here, in support of this hypothesis, we show that offspring of obese female rats fed on a CAF diet have high adiposity in adulthood. Similar findings were reported in a study that evaluated the offspring of female rats resistant to obesity that were fed western diet [27]. Data highlight the consequences of maternal diet on the adiposity of offspring and show that maternal CAF diet induces metabolic dysfunctions such as insulin resistance, glucose intolerance, dyslipidaemia, and hypertension,

resulting in metabolic syndrome development [1,2,3,4,7,8,9,10]. These effects create a vicious cycle of obesity in the next generations, which may explain the prevalence of obesity in the world and suggest that this pathology may further increase in the coming decades.

Thermogenesis in BAT is important for energy expenditure and adequate body weight control. Thus, reduced thermogenesis, greater lipid deposition and lower UCP1 expression in BAT occur frequently in obese rodent models [28,29]. Moreover, maternal obesity also results in the metabolic programming of BAT in offspring, although contradictory results have been observed [11,12,13]. Our data showed that the maternal CAF diet, from conception to lactation and weaning, modulated the BAT of the offspring, resulting in high lipid deposition, with hypertrophy of adipocytes and reduced proliferation of nuclei in the BAT of the adult offspring, suggesting hypofunction of the BAT. The lipids are the main energetic substrate for β -oxidation in BAT, a process directly stimulated by NE released from nerve terminals in the SNS [20]. Therefore, the reduction in β -oxidation decreases the magnitude of the proton gradient, resulting in lower UCP1 expression [20]. Although the reduction in UCP1, observed here in the BAT of offspring born from CAF dams was not statistically significant, this observation corroborates a study that showed that maternal HFD feeding during lactation reduces UCP1 expression in BAT of offspring, a response partly due to attenuation of cellular β 3-adrenergic signalling [13]. Therefore, it is possible that the offspring of obese female rats have lower lipid substrates due to reduced SNS activity in BAT and, consequently, lower thermogenesis.

Moreover, in the present study, for the first time, we showed that maternal obesity can programme the ETC in offspring, resulting in reductions in the expressions of CI and CIII in the ETC, and suggesting a reduced flux of energetic substrates to oxidative phosphorylation. The CI and CIII of ETC are part of supercomplex I-III, which exerts central functions in oxidative phosphorylation [30,31], but these complexes are often regarded as the major sites of mitochondrial reactive oxidative species (mtROS) production [32,33]. Studies have shown that mice fed with HFD demonstrated low activity and expressions of the OXPHOS subunits in the liver [34] and developed left ventricular hypertrophy, which was associated with a selective reduction in the activity of cardiac mitochondrial OXPHOS complexes I and III and increased malondialdehyde production, a marker

of oxidative stress [35]. Thus, maternal obesity appears to exert deleterious effects on the ETC of offspring, a factor that is associated with a reduction in UCP1 expression and predisposition to fat accumulation in BAT. These findings support those of previous studies demonstrating that obesity and obesity-associated pathologies are related to mitochondrial dysfunction, such as progression of aging in adipocyte mitochondria, diabetes [36] and Cushing's syndrome [37]. Findings emphasize the nutritional status of the mother on future diseases in offspring.

BS is currently the most widely adopted procedure to promote rapid weight loss and to correct metabolic abnormalities, particularly in morbid obesity [14]. RYGB is a disabsorptive procedure that significantly reduces visceral WAT content, restores insulin sensitivity and normalizes glucose and lipid homeostasis [38,39]. Children born from mothers that have undergone RYGB present a more adequate glycaemic and lipaemic profile and reduced adiposity, when compared to children born before the maternal BS procedure [18,19]. However, BS also promotes deleterious effects on maternal health, such as nutritional vitamins deficiency, increased risk of prematurity and predisposition to lower weight at birth [40]. In the present study, adult male rats born from dams undergoing RYGB demonstrated lower adiposity and reduced growth throughout life. Similar findings were reported following vertical sleeve gastrectomy in obese female rats fed on a high-fat diet (HFD), which increased the rate of small-for-gestational age offspring in rats [41], suggesting intrauterine growth restriction caused by BS.

Herein, we demonstrated for the first time, that maternal RYGB is able to avoid excessive lipid deposition in the BAT of offspring adult male rats born from obese dams rats. Interestingly, this effect appears to be exclusively dependent on overexpression of UCP1, without restoration of mitochondrial CI and CIII complex expression. These data reinforce the study of Cannon and Nedergaard [20], who showed that UCP1 is the most important protein for thermogenesis, where its activity and expression are directly related to the metabolic state and SNS activity. Thus, it is possible that adult male rats born from obese dams submitted to RYGB presented increased SNS activity and consequently higher BAT lipolysis rate, providing free acids to stimulate UCP1 expression or activity, resulting in elevated energy expenditure due to acceleration of the thermogenesis process. Thus, elevated thermogenesis in BAT from offspring of obese dams submitted to RYGB may explain the reduction in lipid area and increase in nuclei and BVM, as well as

the reduction in visceral WAT content, as observed in the present study. In addition, studies demonstrate that the increase in UCP2 in other organs occurs due to the increase in mtROS signalling, which works as a protective mechanism against oxidative stress [34,42]. Interestingly, Dimova et al [43] have shown that in addition to intrauterine oxidative stress promote intrauterine growth restriction, intrauterine oxidative stress promotes increased energy expenditure due to browning of WAT as indicated by higher Ucp1 expression, protecting the offspring against diet-induced adiposity, insulin resistance and hyperlipidemia. Thus, increased UCP1 expression in the offspring of female RYGB rats may constitute a mechanism to attempt to control mtROS production, since BS did not re-establish the expressions of CI and CIII.

Despite the important data reported in the present study, two limitations of the investigation should be pointed out. The offspring in this study were fed on a regular rodent diet throughout life and, thus, were not exposed to a hypercaloric environment throughout development, as proposed by Gluckman [44], in the predictive adaptive response. Moreover, BAT thermogenesis is more effectively activated by stressor conditions, such as, cold or exercise, and these situations could demonstrate thermogenic dysfunction in BAT more clearly.

In conclusion, in the present study, we demonstrated that maternal obesity can lead to BAT programming in offspring during adulthood, resulting in decreased expressions of CI and CIII in mitochondria, culminating in the excessive accumulation of lipids in the adipocyte of BAT, possibly mediated by reduced β -oxidation flow. This hypofunction of BAT probably contributes to the high adiposity found in the offspring of obese mothers. The maternal RYGB technique effectively reduces adiposity in adult offspring, restoring the thermogenesis of BAT, by promoting overexpression of UCP1, increasing β -oxidation and reducing fat accumulation in BAT. These data reinforce the need to further study the programming effect of maternal bariatric surgery on offspring.

METHODS

Animals: This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual do Oeste do Paraná in 13/02/2015. We evaluated the first generation of offspring (F1) obtained from earlier phases, as briefly described. Female 21-day-old Wistar female rats were randomly divided into two experimental

groups, according to the diet offered. The Control group (CTL; n = 13) received a rodent diet (BioBase, Brazil), as recommended by AIN93 [21]. The Cafeteria group (CAF; n = 32) received a cafeteria diet, according to a previously established protocol [22]. At 65 days of life, half of the female CAF group rats were submitted to RYGB, according to the protocol established by Hao et al. [23], while the other half of the CAF group underwent simulated surgery. Thus, three groups were formed: CTL, CAF-SHAM and CAF-RYGB (n = 13 / group). From 65 to 105 days of life, female rats remained with their respective diets when mated (3 females / 1 male). After pregnancy, the females were separated into individual cages until the birth of the pups. At birth, the numbers of pups in the offspring was adjusted to six male rats per mother and were weaned at 30 days of life. The diets were maintained during the pregnancy and lactation phases. The offspring (F1) were denominated, according to the maternal groups: CTL_{F1}: Offspring from mothers that consumed rodent chow diet throughout life and were not operated; CAF-SHAM_{F1}: Offspring from mothers that consumed the CAF diet throughout life and were submitted to SHAM surgery; CAF-RYGB_{F1}: Offspring from mothers that consumed the CAF diet throughout life and were submitted to RYGB. All offspring received, from 30 to 120 days of life, rodent diets (BioBase, Brasil) and water ad libitum, and were maintained in adequate conditions of luminosity (7:00 - 19:00 hours) and temperature (23±2°C). The experiments were conducted according to the guidelines of the National Council for Control of Animal Experiments (CONCEA), and norms for animal care and maintenance, as recommended by The Arrive Guidelines [24]. The experimental design is shown in Figure 5.

Biometric parameters and adiposity: The body weights (g) of the offspring were determined during three phases: at birth, at weaning and at 120 days of life. At 120 days of life, after a 12-hour fast, the naso-anal length (NAL; cm) was measured and the Lee Index [$\sqrt[3]{(\text{body weight}) / \text{NAL}} \times 1000$] was calculated [25]. After euthanasia, the abdominal wall was laparotomized and the retroperitoneal WAT depot (WAT-R) was excised and weighed. The interscapular BAT depot was also excised, weighed, cleaned and, subsequently, the two lobes were separated. One lobe was immersed in fixative solution (4% paraformaldehyde) and used for histological analysis, while the other lobe was transferred to RNAlater solution and preserved in a freezer (-80 °C) for the Western Blotting (WB) technique.

Histological and image analyses of BAT: After 24h in fixative solution, the BAT fragment was washed, dehydrated in increasing alcohol solutions, diaphanized in xylol and immersed in paraffin (Paraffin Wax). The tissues were sectioned into 5- μ m sections using a Reichert Jung rotary microtome (Leica RM 2025 Microsystems Inc., Wetzlar, Germany) and haematoxylin and eosin (H&E) were used for staining. Microscopic analysis of the stained preparations was performed using an Olympus BX51 (Olympus microscope, Japan) and digital photographs were taken with a 36-bit 1280x1024 pixel colour digital camera with a DP71 controller (Olympus). Image J 1.42q software (Bethesda, MD, USA), available on the NIH website (<http://rsb.info.nih.gov/ij>, accessed June 15, 2017), was employed for analysis of the number of nuclei and adipocyte area (size of adipocytes). Approximately 3-5 microscopic fields per section and three sections per animal (6 rats per group) were analysed. In addition, the images were treated with the aforementioned software tools, estimating the percentage (%) of the total area occupied by nuclei, lipid droplets and other components, which were grouped into the category of blood vessels and mitochondria (BVM).

Western blotting: The BAT fragment was thawed, washed in phosphate buffer solution (PBS) and immediately homogenized for total protein dosage by the Bradford method [26]. The samples were electrophoresed in SDS PAGE (10%), transferred to nitrocellulose membrane (BioRad Laboratories) and blocked with TBS, 5% albumin for 1 hour at room temperature. The nitrocellulose membrane was incubated for 12 hours at 4 °C with primary antibody: OXPHOS (#ms604; Abcam) or UCP1 (#14670; Cell Signalling Technology) (1: 1000 dilutions). Antibodies against α -Tubulin (#3873; Cell Signalling Technology) or GAPDH (#g9545; Sigma Aldrich) were used as internal controls. The membrane was then washed and incubated with secondary antibody; antibody dilution was performed according to the manufacturer's instructions in TRIS-Tween buffer containing 30 g/L dry skimmed milk. Band detection was performed by chemiluminescence (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) after incubation with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Band intensities were quantified by optical densitometry (Image J, National Institutes of Health, USA). Four rats per group were used for Western blotting analysis of all proteins tested.

Statistical analysis: Data were analysed by Cook's distance. Normality was verified by Shapiro-Wilk tests and homoscedasticity by the Levene test. Parametric

data were evaluated by analysis of variance (ANOVA) with Bonferroni post hoc ($p < 0.05$) and presented as means \pm standard deviation (SD). Nonparametric data were analysed by the Kruskal-Wallis test and Dunn's test ($p < 0.05$) and presented with median and 25th and 75th percentiles. R Core Team (2018 - www.R-project.org) and SPSS (PASW Statistics for Windows, version 18.0. Chicago) were used for statistical analysis and Graph Pad Prism (Prism version 6.00 for Windows, La Jolla California USA, www.graphpad.com) to display the graphs.

REFERENCES

1. Mendes-da-Silva, C. et al. Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. *Arq Neuropsiquiatr*, **72(2)**, 136–144 (2014); doi:10.1590/0004-282x20130220
2. Jawerbaum, A., White, V. Review on intrauterine programming: Consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild. *Placenta*, **52**, 21–32 (2017); doi:10.1016/j.placenta.2017.02.009
3. Nguyen, L. T., Saad, S., Tan, Y., Pollock, C., Chen, H. Maternal high-fat diet induces metabolic stress response disorders in offspring hypothalamus. *J Mol Endocrinol*, **59**, 81–92 (2017); doi:10.1530/jme-17-0056
4. De Paula Simino, L. A. et al. Lipid overload during gestation and lactation can independently alter lipid homeostasis in offspring and promote metabolic impairment after new challenge to high-fat diet. *Nutr Metab*, **14**, 16; 10.1186/s12986-017-0168-4 (2017).
5. Guilloteau, P., Zabielski, R., Hammon, H., Metges, C. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J physiol pharmacol*, **60(3)**, 17-35 (2009).
6. Godfrey, K. M., Barker, D. J. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr*, **4(2b)**; 10.1079/phn2001145 (2001).
7. Mcmillen, I. C., Robinson, J. S. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiol Rev*, **85(2)**, 571–633 (2005); doi:10.1152/physrev.00053.2003
8. Padilha, P. C. et al. Associação entre o estado nutricional pré-gestacional e a predição do risco de intercorrências gestacionais. *Rev Bras Ginecol Obstet*, **29(10)**, 511-518 (2007); doi.org/10.1590/S0100-72032007001000004
9. Alfaradhi, M. Z., Ozanne, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front Genet*, **2**, 27; 10.3389/fgene.2011.00027 (2011).
10. White, C. L., Purpera, M. N., Morrison, C. D. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **296(5)**, 1464–1472 (2009); doi:10.1152/ajpregu.91015.2008
11. Xiao, X. Q. et al. Excess Weight Gain during the Early Postnatal Period Is Associated with Permanent Reprogramming of Brown Adipose Tissue Adaptive

- Thermogenesis. *Endocrinology*, **148(9)**, 4150–4159 (2007); doi:10.1210/en.2007-0373
12. Almeida, M. M. et al. Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. *Br J Nutr*, **118(10)**, 788–803 (2017); doi:10.1017/s0007114517002884
 13. Liang, X. et al. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. *Sci Rep*, **6**, 1; 10.1038/srep34345 (2016).
 14. Karra, E., Yousseif, A., Batterham, R. L. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Trends Endocrinol Metab*, **21(6)**, 337–344 (2010); doi:10.1016/j.tem.2010.01.006
 15. Vijgen, G. H. E. J. et al. Increase in Brown Adipose Tissue Activity after Weight Loss in Morbidly Obese Subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, **97(7)**, 1229–1233 (2012); doi:10.1210/jc.2012-1289
 16. Rodovalho, S. et al. Impairment of body mass reduction-associated activation of brown/beige adipose tissue in patients with type 2 diabetes mellitus. *Int J Obes*, **41(11)**, 1662–1668 (2017); doi:10.1038/ijo.2017.152
 17. Dadson, P. et al. Brown adipose tissue lipid metabolism in morbid obesity: Effect of bariatric surgery-induced weight loss. *Diabetes Obes Metab*, **20(5)**, 1280–1288 (2018); doi:10.1111/dom.13233
 18. Smith, J. et al. Effects of Maternal Surgical Weight Loss in Mothers on Intergenerational Transmission of Obesity. *J Clin Endocrinol Metab*, **94(11)**, 4275–4283 (2009); doi:10.1210/jc.2009-0709
 19. Guénard, F. et al. Differential methylation in glucoregulatory genes of offspring born before vs after maternal gastrointestinal bypass surgery. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **110(28)**, 11439–11444 (2013); doi:10.1073/pnas.1216959110
 20. Cannon, B., Nedergaard, J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*, **84(1)**, 277–359 (2004); doi:10.1152/physrev.00015.2003
 21. Reeves, P. G., Nielsen, F. H., Fahey, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *J Nutr*, **123(11)**, 1939–1951 (1993); doi:10.1093/jn/123.11.1939

22. Goularte, J. F., Ferreira, M. B. C., Sanvitto, G. L. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J Nutr*, **108(08)**, 1511–1518 (2012); doi:10.1017/s0007114511006933
23. Hao, Z., Zhao, Z., Berthoud, H.-R., Ye, J. Development and Verification of a Mouse Model for Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery with a Small Gastric Pouch. *PLoS ONE*, **8(1)**, e52922; doi:10.1371/journal.pone.0052922 (2013).
24. Kilkenny, C., Browne, W., Cuthill, I. C., Emerson, M., Altman, D. G. Animal research: Reporting in vivo experiments: The ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol*, **160(7)**, 1577–1579 (2010); doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00872.x
25. Bernardis, L. L., Patterson, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J Endocrinol*, **40(4)**, 527–528 (1968); doi:10.1677/joe.0.0400527
26. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem*, **72(1-2)**, 248–254 (1976); doi:10.1006/abio.1976.9999
27. Frihauf, J. B., Fekete, É. M., Nagy, T. R., Levin, B. E., Zorrilla, E. P. Maternal Western diet increases adiposity even in male offspring of obesity-resistant rat dams: early endocrine risk markers. *A J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **311(6)**, R1045–R1059 (2016); doi:10.1152/ajpregu.00023.2016
28. Kuipers, E. N. et al. A single day of high fat diet feeding induces lipid accumulation and insulin resistance in brown adipose tissue in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. doi:10.1152/ajpendo.00123.2019 (2019).
29. Shan, T. et al. Lkb1 controla o crescimento do tecido adiposo marrom e a termogênese, regulando a localização intracelular do CRT3. *Nat Commun*, **7**, 12205; doi: 10.1038 / ncomms12205 (2016).
30. Letts, J. A., Sazanov, L. A. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nat Struct Mol Biol*, **24(10)**, 800–808 (2017); doi:10.1038/nsmb.3460
31. Signes, A., Fernandez-Vizarra, E. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes. *Essays biochem*, **62(3)**, 255-270 (2018); doi:10.1042/ebc20170098
32. Butow, R. A., Avadhani, N. G. Mitochondrial Signaling. *Mol Cell*, **14(1)**, 1–15 (2004). doi:10.1016/s1097-2765(04)00179-0

33. Sena, L. A., Chandel, N. S. Physiological Roles of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Mol Cell*, **48(2)**, 158–167 (2012); doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025
34. García-Ruiz, I. et al. High-fat diet decreases activity of the oxidative phosphorylation complexes and causes nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Dis model mech*, **7(11)**, 1287–1296 (2014); doi:10.1242/dmm.016766
35. Emelyanova, L. et al. High calories but not fat content of lard-based diet contribute to impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in C57BL/6J mice heart. *PLoS ONE*, **14(7)**, e0217045; 10.1371/journal.pone.0217045 (2019).
36. Gómez-Serrano, M. et al. Differential proteomic and oxidative profiles unveil dysfunctional protein import to adipocyte mitochondria in obesity-associated aging and diabetes. *Redox Biol*, **11**, 415–428 (2017); doi: 10.1016 / j.redox.2016.12.013
37. Hochberg, I. et al. Gene expression changes in subcutaneous adipose tissue due to Cushing's disease. *J mol endocrinol*, **55(2)**, 81–94 (2015); doi:10.1530/JME-15-0119
38. Gama, T. O. Efeitos da cirurgia bariátrica e de um programa de reabilitação na aptidão cardiorrespiratória e função pulmonar em mulheres obesas. In: Tese (Doutorado em Fisioterapia) Universidade Federal do Rio Grande do Norte. <https://repositorio.ufrn.br/jspui/handle/123456789/22718> (2017).
39. Geloneze, B., Pareja, J. C. Cirurgia bariátrica cura a síndrome metabólica? *Arq Bras Endocrinol Metabol*, **50(2)**, 400–407 (2006); doi:10.1590/s0004-27302006000200026
40. Galazis, N., Docheva, N., Simillis, C., Nicolaides, K. H. Maternal and neonatal outcomes in women undergoing bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **181**, 45–53 (2014). doi:10.1016/j.ejogrb.2014.07.015
41. Grayson, B. E., Schneider, K. M., Woods, S. C., Seeley, R. J. Improved rodent maternal metabolism but reduced intrauterine growth after vertical sleeve gastrectomy. *Sci transl med*, **5(199)**, 199ra112; 10.1126/scitranslmed.3006505 (2013).
42. Shadel, G. S., Horvath, T. L. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell*, **163(3)**, 560–569 (2015); doi:10.1016/j.cell.2015.10.001

43. Dimova, L. G. et al. Gestational oxidative stress protects against adult obesity and insulin resistance. *Redox biology*, **28**, 101329 (2020)
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101329>
44. Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Spencer, H. G. Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends Ecol Evol*, **20(10)**, 527–533 (2005);
[doi:10.1016/j.tree.2005.08.001](https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.08.001)

ACKNOWLEDGMENTS: This work was conducted during a scholarship supported by International Cooperation Program CAPES/COFECUB at the University of Western Paraná, Biosciences and Health Post-Graduate, Financed by CAPES – Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education within the Ministry of Education of Brazil.

FINANCIAL SUPPORT: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) process number 447190/2014-8 and CAPES/PROAP 0001.

AUTHOR CONTRIBUTIONS: Vanessa M. Ceglarek; Iala M. Bertasso; Carla B. Pietrobon; Nayara Carvalho Leite C. performed the experiments, data analysis and wrote the manuscript. Maria Lucia Bonfleur; Alan C. Faria Araújo; Sandra Lucinei Balbo and Sabrina Grassioli conceived of the presented idea and wrote the manuscript with collaboration of all authors. Sofia Pizzato Scomazzon helped with English language and revision.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT: The authors declare no conflicts of interest.

Figure 1: Effect of maternal obesity and RYGB on BAT weight and the nucleus number and adipocyte size in the BAT of male adult offspring rats.

CTL_{F1}, offspring of rats fed standard diet; CAF-SHAM_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to sham operation; CAF-RYGB_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to RYGB (n=6 animals/group). The data are mean \pm DP. Were analyzed the weight of BAT (Figure 1a), nucleus number (Figure 1b) and adipocyte size (Figure 1c). Different letters indicate statistical differences by one-way ANOVA and Bonferroni post-test ($p < 0.05$). Representative photomicrograph (insert) of BAT (40x), stained with H&E are showed in the figures 1d (CTL_{F1}), 1e (CAF-SHAM_{F1}) and 1f (CAF-RYGB_{F1}). Arrows indicate nuclei and boxes indicate adipocyte area.

Figure 2: Effect of maternal obesity and RYGB on the distribution of fat, nuclei and VCE in the BAT of male adult offspring rats.

CTL_{F1}, offspring of rats fed standard diet; CAF-SHAM_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to sham operation; CAF-RYGB_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to RYGB (n=6 animals/group). The data are means \pm SD. The percentages of the total area occupied by lipids (Figure 2a), BVM (Figure 2b) and nuclei (Figure 2c) were analyzed. Different letters indicate statistical differences by one-way ANOVA and Bonferroni post-test ($p < 0.05$). Representative photomicrograph (insert) of BAT (40x), stained with H&E are showed in the figures 2d (CTL_{F1}), 2e (CAF-SHAM_{F1}) and 2f (CAF-RYGB_{F1}). The images were processed with Image J Program as explained in methods section. Groups are in columns. CTL_{F1}, CAF-SHAM_{F1} and CAF-RYGB_{F1}. In rows original image (2d-2f), adipocytes in yellow (2g-2i), BVM in blue (2j-2l) and Nuclei in black (2m-2o). Fully treated image (2p-2r).

Figure 3: Effect of maternal obesity and RYGB on UCP1 expression in BAT of adult male offspring.

CTL_{F1}, offspring of rats fed standard diet; CAF-SHAM_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to sham operation; CAF-RYGB_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to RYGB (n=4 animals/group). Data are represented as means \pm SD. Different letters indicate statistical differences by one-way ANOVA and Bonferroni post-test ($p < 0.05$). UCP1, uncoupling protein 1.

Figure 4: Effects of maternal obesity and RYGB on the expression of complexes (CI-CV) of the electron transport chain in adult offspring

CTL_{F1}, offspring of rats fed standard diet; CAF-SHAM_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to sham operation; CAF-RYGB_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to RYGB (n=4 animals/group). Data are represented as means \pm SD. Different letters indicate statistical differences by one-way ANOVA and Bonferroni post-test ($p < 0.05$). ETC, electron transport chain. GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. CI, CII, CIII, CIV, CV, complex I-V.

Figure 5: Design of experimental groups.

Control Group (CTL), dams received standard diet throughout life (n=13); Cafeteria Group (CAF), dams received cafeteria diet throughout life (n=32); Cafeteria Group SHAM (CAF-SHAM; n=13), dams received cafeteria diet throughout life and were submitted to sham operation; Cafeteria submitted to RYGB (CAF-RYGB; n=13),

dams received cafeteria diet throughout life and were submitted to roux y gastric bypass. Offspring (F1): CTL_{F1}, offspring of rats fed on standard diet; CAF-SHAM_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to sham operation; CAF-RYGB_{F1}, offspring of rats fed on CAF diet and submitted to RYGB (n=6 - 12 rats/groups). ♀ Female; ♂ male. The square (black) indicates the experimental design of offspring.

Table 1. Effect of maternal obesity, induced by CAF, and RYGB on the anthropometric parameters of male adult offspring rats.

Parameters	CTL _{F1}	CAF-SHAM _{F1}	CAF-RYGB _{F1}	p-value
Body weight at birth (g)	0.012 ±0.002 ^a	0.013 ±0.003 ^a	0.007 ±0.001 ^b	0.0001
Body weight at weaning (g) #	36.5 [31.0 – 67.0] ^a	42.5 [34.0 – 58.0] ^a	23.0 [18.0 – 36.0] ^b	0.049
Body weight at adulthood (g)	373.6±31.3 ^a	379.8±45.6 ^a	303.7±44.5 ^b	0.003
NAL (cm)	22.63±0.57 ^a	22.67±0.82 ^a	21.42±0.74 ^b	0.004
Lee Index	0.318±0.005 ^a	0.319±0.007 ^a	0.314±0.006 ^a	0.345
WAT-R (g/100g)	0.615±0.21 ^a	0.950±0.34 ^b	0.482±0.18 ^a	0.008

Offspring (_{F1}): CTL_{F1}: Offspring from dams that consumed rodent chow diet throughout life and were not operated; CAF-SHAM_{F1}: Offspring from dams that consumed CAF diet throughout life and were submitted to SHAM surgery; CAF-RYGB_{F1}: Offspring from dams that consumed CAF diet throughout life and were submitted to RYGB (n=6 rats/groups). Data are means ± SD. Different letters represent statistical differences between the groups. One-way ANOVA, Bonferroni post-test (p<0.05). # Kruskal-Wallis, Dunn's test (p<0.05), median and 25th and 75th percentiles.

FIGURES

Figure 1

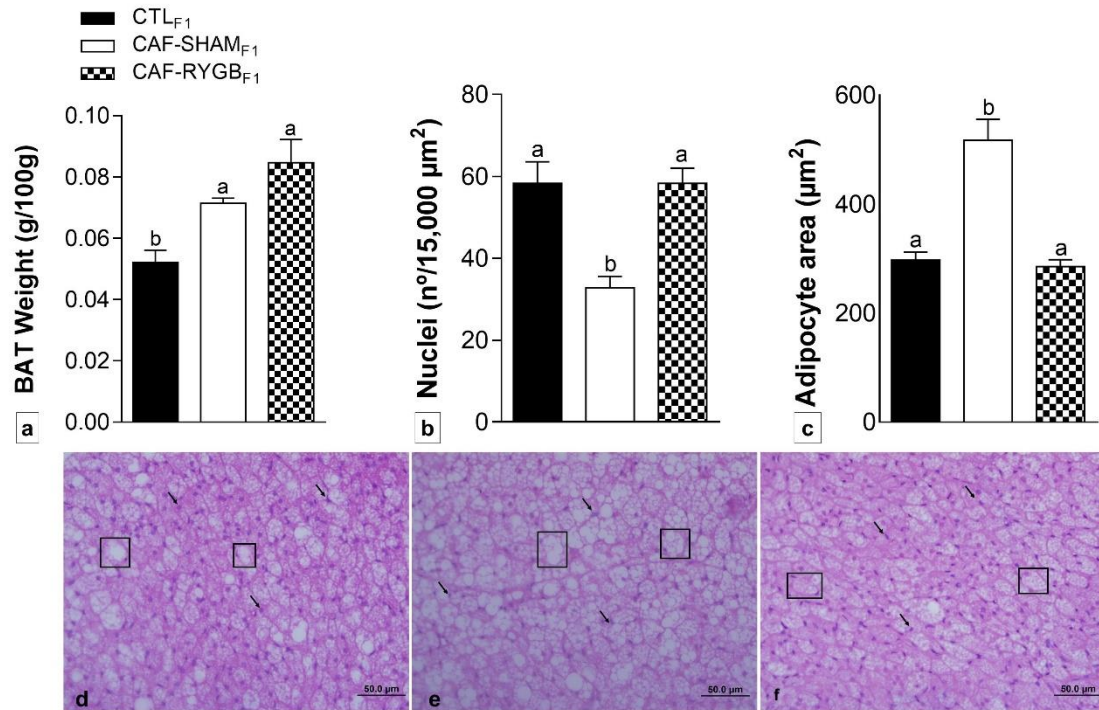


Figure 2

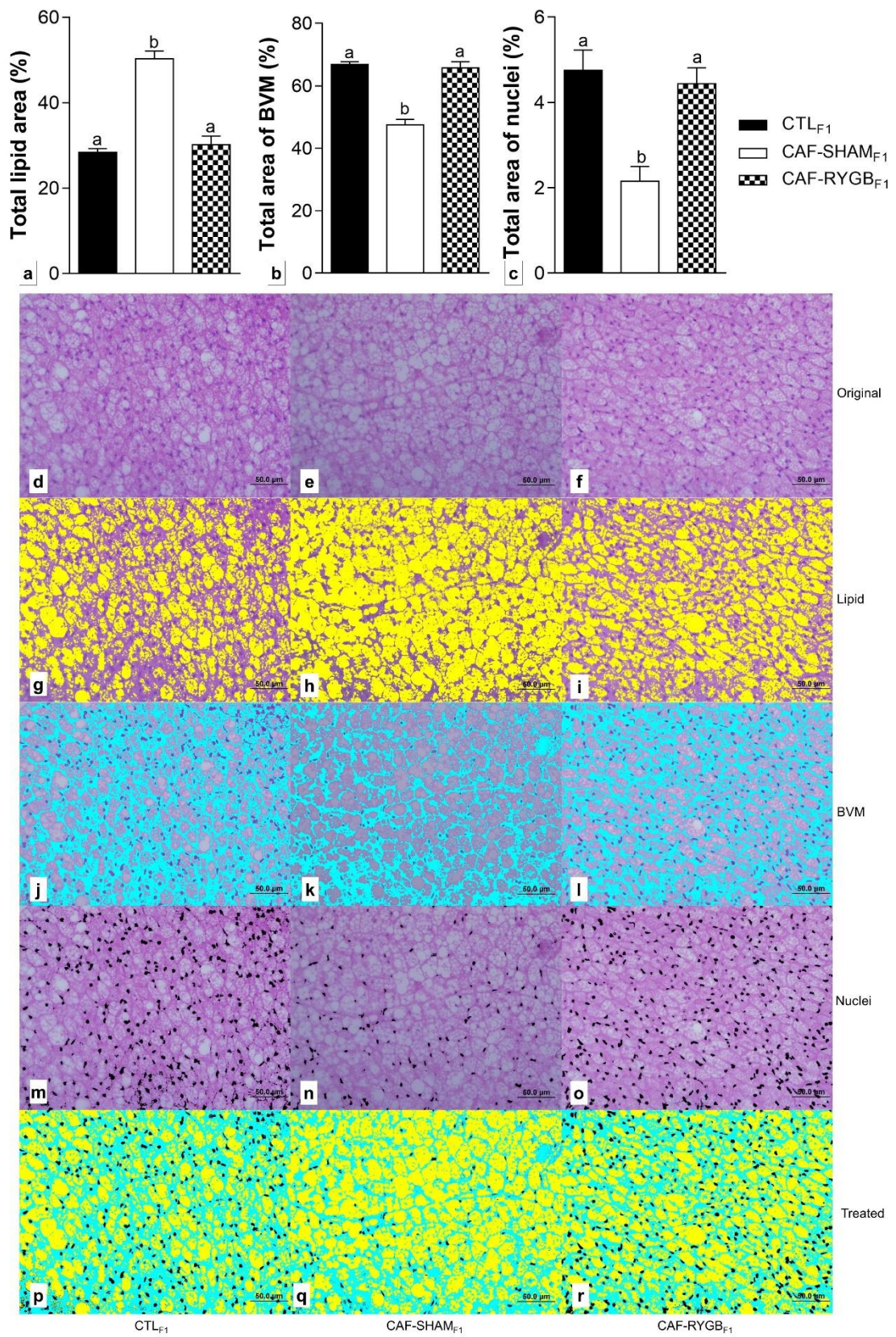


Figure 3

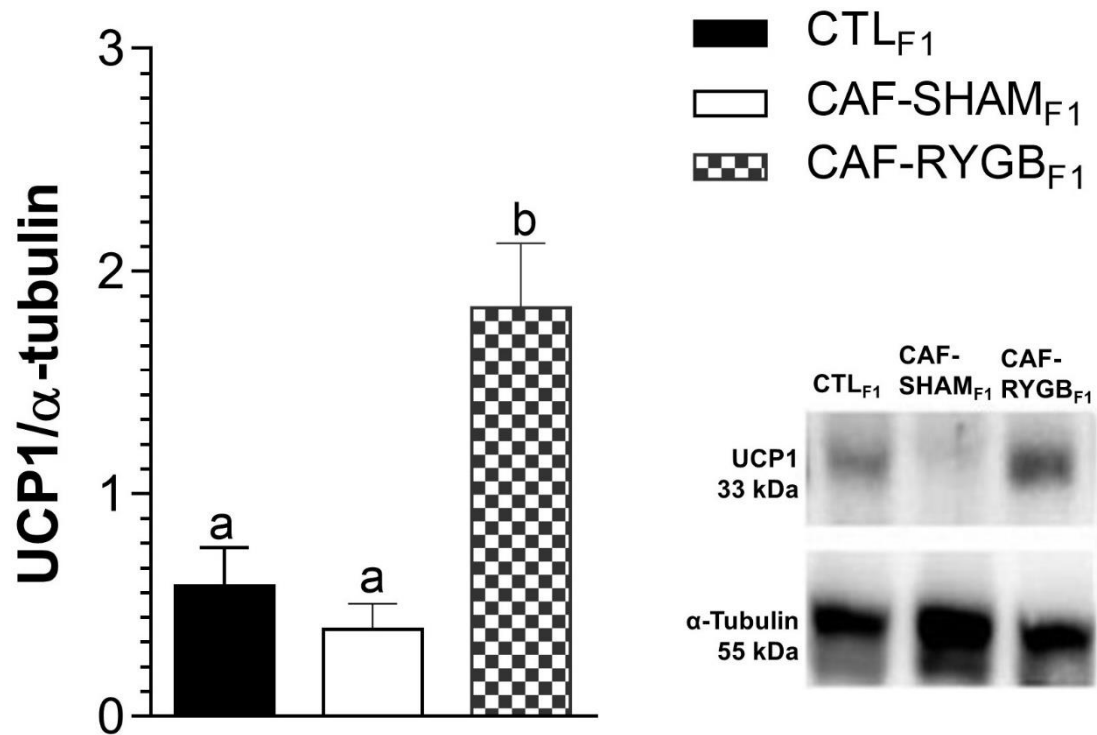


Figure 4

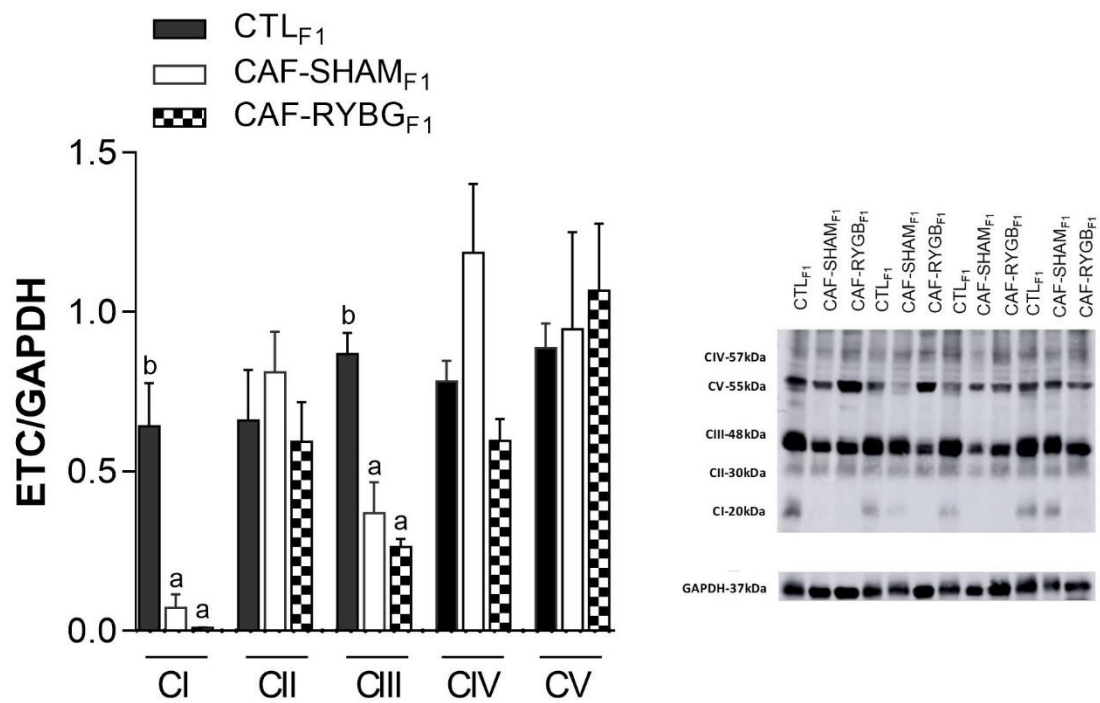
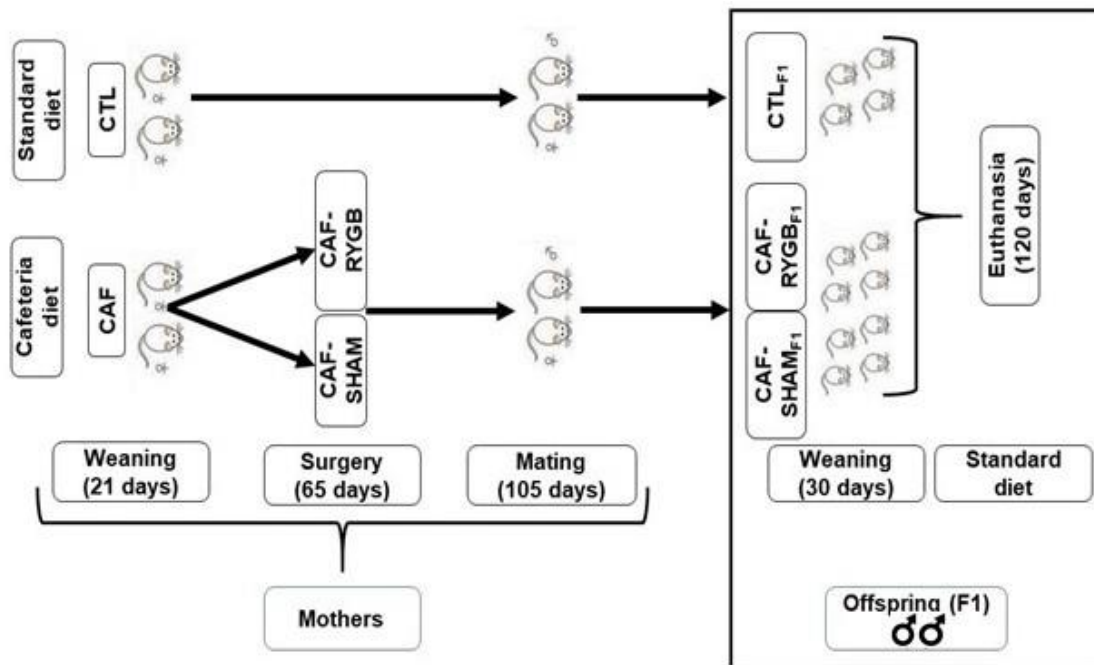


Figure 5



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica. *Diretrizes brasileiras de obesidade 2016*. ABESO, 4.ed. - São Paulo, SP, 2016. 188 p.

AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinology Metabolism*, v. 11, n. 8, p.327-32, 2000.

ALFARADHI, M. Z; OZANNE, S. E. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Frontiers in Genetics*, v. 2, n. 27, p. 1-13, 2011.

ALMEIDA, M. M.; DIAS-ROCHA, C. P.; FRANCO, J. G.; MENDONÇA, L. S.; PAZOS-MOURA, C. C.; TREVENZOLI, I. H. Maternal Obesity Programs Sex-Specific Alterations in Cannabinoid Receptors in White and Brown Adipose Tissue of Rat Offspring at Weaning. *Endocrine Society's, 98th Annual Meeting*, 2016.

ASTRUP, A.; BÜLOW, J.; MADSEN, J.; CHRISTENSEN, N. J. Contribution of BAT and skeletal muscle to thermogenesis induced by ephedrine in man. *American Journal of Physiology*, v. 248, n. 5, p. 507-515, 1985.

AYOUB, J. A. S.; ALONSO, P. A.; GUIMARAES, L. M. V. Efeitos da cirurgia bariátrica sobre a síndrome metabólica. *Arquivos Brasileiros De Cirurgia Digestiva*, São Paulo, v.24, n. 2, p. 140-143, 2011.

BACHMAN, E. S.; DHILLON, H.; ZHANG, C. Y.; CINTI, S.; BIANCO, A. C.; KOBILKA, B. K.; LOWELL, B. B.; β AR signaling required for diet-induced thermogenesis and obesity resistance. *Science*, v. 297, p. 843–845, 2002.

BAHIA, L. R.; ARAÚJO, D. V. Impacto econômico da obesidade no Brasil. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 13, n. 1, p. 13-17, 2014.

BAIGENT, C.; DUFFY, S.; RODGERS, A.; TOMINAGA, S.; CHAMBLESS, L.; DE BACKER, G.; WHITLOCK, G. Body-mass index and cause-specific mortality in 900 000 adults: Collaborative analyses of prospective studies. *The Lancet*, v. 373, p. 1083-1096, 2009.

BARKER D.J.P.; OSMOND C.; WINTER P.D.; MARGETTS B.; SIMMONDS. S.J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *The Lancet*, v.334, n.8663, p.577-580, 1989.

BARKER, D. J. A new model for the origins of chronic disease. *Medicine, Health Care and Philosophy*, v. 4, p. 31–35, 2001.

BARKER, D. J. P.: Fetal undernutrition and adult disease. *Highlights*, v.3, p.12–15, 1995.

BARKER, D. J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease. *England and Wales. Lancet*, v.1, n.8489, p. 1077-1081, 1986.

BARRIENTOS, A.; UGALDE, C. I function, therefore I am: overcoming skepticism about mitochondrial supercomplexes. *Cell metabolism*, v.18, e.2, p.147-149, 2013.

BERISHA, S. Z.; SERRE, D.; SCHAUER, P.; KASHYAP, S. R.; SMITH, J. D. Changes in whole blood gene expression in obese subjects with type 2 diabetes following bariatric surgery: A pilot study. *Plos One*, v. 6, n. 3, p.1-9, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Estimativas sobre frequência e distribuição sociodemográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais dos 26 estados brasileiros e no distrito federal em 2015*. Vigitel Brasil. Brasília, DF, 2017. 170 p.

BRUNETTO, A. F.; ROSEGUINI, B. T.; SILVA, B. M.; HIRAI, D. M.; GUEDES, D. P. Respostas autonômicas cardíacas à manobra de tilt em adolescentes obesos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 51, n. 5, p. 256-260, 2005.

BUSIELLO, R. A.; SAVARESE, S.; LOMBARDI, A. Mitochondrial uncoupling proteins and energy metabolism. *Frontiers in physiology*, v. 6 a.36 2015.

CANALE, P. M.; VILLAHERMOSA, S. M.; MARTINO, G.; NOCE, A.; DE LORENZO, A.; DI DANIELE, N. Obesity-Related Metabolic Syndrome: Mechanisms of Sympathetic Overactivity. *International Journal of Endocrinology*, v. 2013, p.1-12, 2013.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. *Physiological Reviews*, v. 84, p. 277-359, 2004.

CAPE, J. L.; BOWMAN, M. K.; KRAMER, D. M. A semiquinone intermediate generated at the Qo site of the cytochrome bc1 complex: importance for the Q-cycle and superoxide production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.104, e.19, p. 7887-92, 2007.

CHABAN, Y.; BOEKEMA, E. J.; DUDKINA, N. V. Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v.1837, n.4, p.418-426, 2014.

CHEN, Y.; YANG, J.; NIE, X.; NIE, X.; SONG, Z.; GU, Y. Effects of Bariatric Surgery on Change of Brown Adipocyte Tissue and Energy Metabolism in Obese Mice. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, v28, p. 4-5, 2018

COMMINS, S. P.; WATSON, P. M.; PADGETT, M. A.; DUDLEY, A.; ARGYROPOULOS, G.; GETTYS, T. W. Induction of uncoupling protein expression in brown and white adipose tissue by leptin. *Endocrinology*, v. 140, p. 292-300, 1999.

CURI, R.; ARAUJO FILHO, J. P. *Fisiologia básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

CYPESS, A. M.; LEHMAN, S.; WILLIAMS, G.; TAL, I.; RODMAN, D.; GOLDFINE, A. B.; KUO, F. C.; PALMER, E. L.; TSENG, Y. H.; DORIA, A.; KOLODNY, G. M.; KAHN, C. R. Identification and Importance of Brown Adipose Tissue in Adult Humans. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 15, p. 1509-1517, 2009.

DADSON, P.; HANNUKAINEN, J. C.; DIN, M. U.; LAHESMAA, M.; KALLIOKOSKI, K. K.; IOZZO, P.; PIHLAJAMÄKI, J.; KARLSSON, H. K.; PARKKOLA, R.; SALMINEN, P.; VIRTANEN, A. K.; NUUTILA, P. Brown adipose tissue lipid metabolism in morbid obesity: Effect of bariatric surgery-induced weight loss. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 20, n. 5, p.1280–1288, 2018.

DAWKINS, M. J.; SCOPES, J. W. Non-shivering thermogenesis and brown adipose tissue in the human new-born infant. *Nature*, v.206, p.201–202, 1965.

DENCHER, N. A.; FRENZEL, M.; REIFSCHNEIDER, N. H.; SUGAWA, M.; KRAUSE, F. Proteome Alterations in Rat Mitochondria Caused by Aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1100, e.1, p. 291–298, 2007.

DESPRÈS, J. P. Visceral obesity and dyslipidemia: contribution of insulin resistance and genetic susceptibility. *Exercise & Sport Sciences Reviews*, v. 25, p. 271–300, 1997.

DIMAURO, S.; SCHON, E. A. Mitochondrial Disorders in the Nervous System. *Annual Review of Neuroscience*, v. 31, e.1, p. 91–123, 2008.

EDISON, E.; WHYTE, M.; VLYMEN, J.; JONES, S.; GATENBY, P.; LUSIGNAN, S.; SHAW, J. Bariatric Surgery in Obese Women of Reproductive Age Improves Conditions That Underlie Fertility and Pregnancy Outcomes: Retrospective Cohort Study of UK National Bariatric Surgery Registry (NBSR). *Obesity Surgery*, v.26, n.12, p.2837, 2016.

EFREMOV, R. G.; BARADARAN, R.; SAZANOV, L. A. The architecture of respiratory complex I. *Nature*, v. 465, e.7297, p. 441–445, 2010.

EID, G. M.; COTTAM, D. R.; VELCU, L. M.; MATTAR, S. G.; KORYTKOWSKI, M. T.; GOSMAN, G.; HINDI, P.; SCHAUER, P. R. Effective treatment of polycystic ovarian syndrome with Roux-en-Y gastric bypass. *Surgery for Obesity and Related Diseases*, v. 1, p. 77– 80, 2005.

ESCRIVÃO, M. A. M. S.; LOPEZ, F. A. *Obesidade: conceito, etiologia e fisiopatologia*. In: NUNES, M. A. A.; APPOLINÁRIO, J. C. (Org.). *Distúrbios de nutrição*. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, A.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; BAUTISTA, M.; ESQUIVEL-SOTO, J.; MORALES-GONZÁLEZ, Á.; ESQUIVEL-CHIRINO, C.; ... MORALES-GONZÁLEZ, J. A. Inflammation, Oxidative Stress, and Obesity. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, e.5, p. 3117–3132, 2011.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo*, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FORSÉN, T.; ERIKSSON, J. G.; TUOMILEHTO, J.; OSMOND, C.; BARKER, D. J. Growth in utero and during childhood among women who develop coronary heart disease: longitudinal study. *British medical journal*, v. 319, p. 403–1407, 1999.

FRANCISCHI, R. P. P.; PEREIRA, L.O.; FREITAS, C. S.; KLOPPER, M.; SANTOS, R. C.; VIEIRA, P.; LANCHÁ JÚNIOR, A. H. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Revista de Nutrição*, v. 13, n. 1, p. 17-28, 2000.

FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHIMABUKURO, M.; IWAKI, M.; YAMADA, Y.; NAKAJIMA, Y.; ... SHIMOMURA, I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, v; 114, e.12, p.1752–1761, 2004.

GALAZIS, N., DOCHEVA, N., SIMILLIS, C., & NICOLAIDES, K. H. Maternal and neonatal outcomes in women undergoing bariatric surgery: a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v.181, p.45-53, 2014.

GAMA, T. O. *Efeitos da cirurgia bariátrica e de um programa de reabilitação na aptidão cardiorrespiratória e função pulmonar em mulheres obesas*. Tese (Doutorado em Fisioterapia). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017, 148 p.

GARRIDO JÚNIOR, A. B. Cirurgia em Obeso Mórvidos: Experiência pessoal. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo*, v. 44, n. 1, p. 106- 110, 2000.

GELONEZE, B.; PAREJA, J. C. Cirurgia bariátrica cura a síndrome metabólica? *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo*, v. 50, n. 2, p. 400- 407, 2006.

GILBERT, J. S.; COX, L. A.; MITCHELL, G.; NIJLAND, M. J. Nutrient restricted fetus and the cardio-renal connection in hypertensive off springs. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*, v. 4, n. 2, p. 227-238, 2006.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; SPENCER, H. G. Predictive adaptive responses and human evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 20, n.10, p.527–533, 2005.

GLUCKMAN, P. D; HANSON, M. A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science*, v.305, p.1733– 1736, 2004.

GODFREY, K. M.; BARKER, D. J. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutrition*, v. 4, n. 2, p. 611-624, 2001.

GOSMAN, G. G.; KING, W. C.; SCHROPE, B.; STEFFEN, K. J.; STRAIN, G. W.; COURCOULAS, A. P.; FLUM, D. R.; PENDER, J. R.; SIMHAN, H. N. Reproductive Health of Women Electing Bariatric Surgery. *Fertility and sterility*, v. 94, n. 4, 2010.

GOULARTE, J. F. *Efeitos da modificação alimentar e exercício físico sobre alterações produzidas pela dieta de cafeteria em ratas*. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas: Fisiologia). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto alegre, 2011. 76p.

GOULARTE, J. F.; FERREIRA, M. B. C.; SANVITTO, G. L. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats, *British Journal of Nutrition*, v.108, n.8, p.1511–1518, 2012.

GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *The American journal of clinical nutrition*, v. 67, n. 3, p. 563S-572S, 1998.

GUÉNARD, F.; DESHAIES, Y.; CIANFLONE, K.; KRAL, J. G.; MARCEAU, P.; VOHL, M. C. Differential methylation in glucoregulatory genes of offspring born before vs. after maternal gastrointestinal bypass surgery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v. 110, n. 28, p. 11439-11444, 2013.

GUILLOTEAU, P.; ZABIELSKI, R.; HAMMON, H.; METGES, C. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *Journal of physiology and pharmacology: an official journal of the Polish Physiological Society*, v.60, n.3, p.17-35, 2009.

GUPTA, R.; BHANGOO, A.; MATTHEWS N. A. V.; ANHALT, H.; MATTA, Y.; LAMICHHANE, B.; MALIK, S.; NARWAL, S.; WETZLER. G.; TEN, S. The prevalence of non-alcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome in obese children. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, v. 24, p. 907-911, 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2011.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. *British Medical Bulletin*, v. 60, p. 5–20, 2001.

HALES, C. N.; BARKER, D. J.; CLARK, P. M.; COX, L. J.; FALL, C.; OSMOND, C.; WINTER, P. D. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *British Medical Journal*, v.303, n.6809, p.1019–1022, 1991.

HANKIR, M. K.; BRONISCH, F.; HINTSCHICH, C.; KRÜGEL, U.; SEYFRIED, F.; FENSKE, W. K. Differential effects of Roux-en-Y gastric bypass surgery on brown and beige adipose tissue thermogenesis. *Metabolism*, v. 64, n.10, p.1240–1249, 2015.

HAO, Z.; BERTHOUD, H. R.; JIANPING, Y. Development and Verification of a Mouse Model for Roux-en-Y Gastric Bypass Surgery with a Small Gastric Pouch. *PLoS ONE*, v. 8, p.1-9, 2013.

HARDER, T.; RODEKAMP, E.; SCHELLONG, K.; DUDENHAUSEN, J. W.; PLAGEMANN, A. Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: a meta-analysis. *American Journal Epidemiology*, v. 165, p. 849–857, 2007.

HEITMANN, B. L.; WESTERTERP, K. R.; LOOS, R. J. F. SØRENSEN, T. I. A.; O'DEA, K.; MCLEAN, P.; JENSEN, T. K.; EISENMANN, J.; SPEAKMAN, J. R.; SIMPSON, S. J.; REED, D. R.; WESTERTERP-PLANTENGA M. S. Obesity: lessons from evolution and the environment. *Obesity reviews*, v. 13 p. 1-13, 2012.

JAWERBAUM, A. WHITE, V. Review on intrauterine programming: Consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild. *Placenta*, v. 52, P. 21-32, 2017.

JUONALA, M.; MAGNUSSEN, C. G.; BERENSON, G. S. Childhood adiposity, adult adiposity, and cardiovascular risk factors. *New England Journal of Medicine*, v. 365, p. 1876-1885, 2011.

KARRA, E.; YOUSSEIF, A.; BATTERHAM, R. L. Mechanisms facilitating weight loss and resolution of type 2 diabetes following bariatric surgery. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 21, n. 6, p. 337-344, 2010.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S.; Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 89, p. 2548–2556, 2004.

KLAUS, S.; CASTEILLA, L.; BOUILLAUD, F.; RICQUIER, D. The uncoupling protein UCP: a membranous mitochondrial ion carrier exclusively expressed in brown adipose tissue. *International Journal of Biochemistry*, v. 23, n. 9, p. 791-801, 1991.

KOPECKY, J.; CLARKE, G.; ENERBÄCK, S.; SPIEGELMAN, B; KOZAK, L. P. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity. *Journal of Clinical Investigation*, v. 6 p. 2914–2923, 1995.

KREMEN, A. J.; LINNER, J. H.; NELSON, C. H. An experimental evaluation of the nutritional importance of proximal and distal small intestine. *Annals of Surgery*, v. 140, p. 439-448, 1954.

KUZAWA, C. W. Adipose tissue in human infancy and childhood: an evolutionary perspective. *American Journal of Physical Anthropology*, v.27, p.177–209, 1998.

LAEDERACH-HOFMANN, K.; MUSSGAY, L.; RÚDDEL, H. Autonomic cardiovascular regulation in obesity. *Journal of Endocrinology*, v. 164, n. 1, p. 59-66, 2000.

LAMPL, M.; LEE, W.; KOO, W.; FRONGILLO, E. A; BARKER, D. J.; ROMERO R. Ethnic differences in the accumulation of fat and lean mass in late gestation. *American Journal of Human Biology*, v.24, p.640–647, 2012.

- LANDSBERG, L. Obesity and the insulin resistance syndrome. *Hypertension Research*, v. 19, p. 51-55, 1996.
- LAX, N. Z.; TURNBULL, D. M.; REEVE, A. K. Mitochondrial mutations: newly discovered players in neuronal degeneration. *The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, v. 17, e.6, p. 645-58, 2011.
- LENAZ, G.; BARACCA, A.; BARBERO, G.; BERGAMINI, C.; DALMONTE, M. E.; DEL SOLE, M.; ... SOLAINI, G. Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1797, p. 633-640, 2010.
- LENAZ, G.; BARACCA, A.; FATO, R.; GENOVA, M. L.; SOLAINI, G. New Insights Into Structure and Function of Mitochondria and Their Role in Aging and Disease. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 8, p. 417-437, 2006.
- LENAZ, G.; GENOVA, M. L. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 292, e. 4, p.1221-1239, 2007.
- LETTS, J. A.; SAZANOV, L. A. Clarifying the supercomplex: the higher-order organization of the mitochondrial electron transport chain. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 24, e.10, p.800-80, 2017.
- LIANG, X.; YANG, Q.; ZHANG, L.; MARICELLI, J. W.; RODGERS, B. D.; ZHU, M. J.; DU, M. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. *Nature*, v.6, n.34345, 2016.
- LOWELL, B. B.; S-SUSULIC, V.; HAMANN, A.; LAWITTS, J. A.; HIMMS-HAGEN, J.; BOYER, B. B.; KOZAK, L. P.; FLIER, J. S. Development of obesity in transgenic mice after genetic ablation of brown adipose tissue. *Nature*, v. 366, p. 740-742, 1993.
- LUZ, D. M. D.; ENCARNAÇÃO, J. N. Vantagens e desvantagens da cirurgia bariátrica para o tratamento da obesidade mórbida. *Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento*, v. 2, n. 10, p. 376-383, 2008.
- MANGO, V. L.; FRISHMAN, W. H. Physiologic, psychologic, and metabolic consequences of bariatric surgery. *Cardiology Review*. v. 14, n. 5, p. 232-237, 2006.
- MARTINS, E. B.; CARVALHO, M. S. Associação entre peso ao nascer e o excesso de peso na infância: revisão sistemática. *Caderno de Saúde Pública*, v. 22, n. 11, p. 2281-2300, 2006.
- MCMILLEN, I. C.; ROBINSON, J. S. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological Reviews*, v. 85, p. 571-633, 2005.
- MENDES DA SILVA, C.; GIRIKO, C. Á.; MENNITTI, L. V.; HOSOUME, L. F.; SOUTO, T. D. S.; SILVA, A. V. DA. Maternal high-fat diet during pregnancy or

lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v.72, p.136-144, 2014.

MILENKOVIC, D.; BLAZA, J. N.; LARSSON, N. G.; HIRST, J. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex. *Cell Metabolism*, v. 25, e.4, p. 765–776, 2017.

MUSELLA, M.; MILONE, M.; BELLINI, M.; SOSA FERNANDEZ, L. M.; LEONGITO, MILONE, F. Effect of bariatric surgery on obesity-related infertility. Surgery for M.; *Obesity and Related Diseases*, v. 8, p. 445– 449, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NGUYEN, L. T.; SAAD, S.; TAN, Y.; POLLOCK, C.; CHEN, H. Maternal high-fat diet induces metabolic stress response disorders in offspring hypothalamus. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.56, p.81-92, 2017.

NICULESCU, M. D.; LUPU, D. S. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 27, p.627–633, 2009.

OBERKOFER, H.; DALLINGER, G.; LIU, Y. M.; HELL, E.; KREMLER, F.; PATSCH, W. Uncoupling protein gene: quantification of expression levels in adipose tissues of obese and non-obese humans. *Journal of Lipid Research*, v. 38, n. 10, p. 2125-2133, 1997.

OHTAS. ONTARIO HEALTH TECHNOLOGY ASSESSMENT SERIES. Bariatric surgery: an evidence-based analysis. *Ontario Health Technology Assessment Series*. v.5, n.1, p.7-13, 2005.

OLIVEIRA, M. L. *Estimativa dos custos da obesidade para o Sistema Único de Saúde do Brasil*. Tese (Doutorado em Nutrição Humana) Universidade de Brasília, Brasília, 2013, 95 p.

PADILHA, P. C.; SAUNDERS, C.; MACHADO, R. C. M.; SILVA, C. L.; BULL, A.; SALLY, E. O. F.; ACCIOLY, E. Associação entre o estado nutricional pré-gestacional e a predição do risco de intercorrências gestacionais. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, v. 29, n. 10, p. 511-518, 2007.

PARK, J. J.; BERGGREN, J. R.; HULVER, M. W.; HOUMARD, J. A.; HOFFMAN, E. P. GRB14, GPD1, and GDF8 as potential network collaborators in weight loss – induced improvements in insulin action in human skeletal muscle. *Physiological Genomics*, v. 27, n. 2, p. 114–121, 2006.

PENICAUD, L.; COUSIN, B.; LELOUP, C.; LORSIGNOL, A.; CASTEILLA, L. The autonomic nervous system, adipose tissue plasticity, and energy balance. *Nutrition*, v. 16, p. 903-908, 2000.

PESCADOR, M. V. B.; STREHER, A. A. F.; SILVA, J. M. F. DA.; VALENTE, G. C.C.; NAKAGIRI, M.; BOGUSZEWSKI, M. C. S. Aspectos endocrinológicos das crianças e adultos nascidos pequenos para a idade gestacional. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 45, n. 1, p. 15-23, 2001.

PETERSON, H. U.; ROTHSCHEID, M.; WEINBERG, C. R.; FELL, R. D.; MCLEISH, K. R.; PFEIFER, M. Body fat and the activity of the autonomic nervous system. *New England Journal of Medicine*, v. 318, p. 1077-1083, 1988.

PI-SUNYER, F. X. The obesity epidemic: pathophysiology and consequences of obesity. *Obesity Research*, v. 10, p. 97-104, 2002.

PROENZA, A. M.; POISSONNET, C. M.; OZATA, M.; OZEN, S.; GURAN, S.; PALOU, A.; STROBERG, A. D. Association of sets of alleles of genes encoding β 3- adrenoreceptor, uncoupling protein 1 and lipoprotein lipase with increased risk of metabolic complications in obesity. *International Journal Obesity*, v. 24, p. 93–100, 2000.

PUDER, J. J.; MUNSCH, S. Psychological correlates of childhood obesity. *International Journal Obesity*, v. 34, p. 37-43, 2010.

RACHID, B.; VAN DE SANDE-LEE, S.; RODOVALHO, S.; FOLLI, F.; BELTRAMINI, G. C.; MORARI, J.; AMORIM, B. J.; PEDRO, T.; RAMALHO, A. F.; BOMBASSARO, B.; TINCANI, A. J.;... VELLOSO, L. A. Distinct regulation of hypothalamic and brown/beige adipose tissue activities in human obesity. *International Journal of Obesity*, v.39, n.10, p.1515–1522, 2015.

RAMOS, A. C.; SILVA, A. C. S.; RAMOS, M. G.; CANSECO, E. G. C.; GALVÃO-NETO, M. dos P.; MENEZES, M, de A.; GALVÃO, T. D.; BASTOS, E. L. de S. Bypass Gástrico Simplificado: 13 anos de experiência e 12.000 pacientes operados. ABCD, *Arquivo Brasileiro De Cirurgia Digestiva*, v. 27, n.1, p. 2-8, 2014.

REEVE, A. K.; KRISHNAN, K. J.; TURNBULL, D. M. Age related mitochondrial degenerative disorders in humans. *Biotechnology Journal*, v. 3, e.6, p. 750–756 2008.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, JR. G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. *The Journal of Nutrition*, v. 123, p. 1939–1951, 1993.

RIBEIRO FILHO, F. F.; MARIOSIA, L. S.; FERREIRA, S. R. G.; ZANELLA, M. T. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo*, v. 50, n. 2, p. 230-238, 2006.

RICQUIER D.; BOUILLAUD F. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *The Journal of Physiology*, v.529, p. 3-10, 2000.

RODOVALHO, S.; RACHID, B.; de-LIMA-JUNIOR, J. C.; VAN de SANDE-LEE, S.; MORARI, J.; CARVALHO, H. M.; AMORIM, B. J.; TINCANI, A. J.; CHAIM, E.; PAREJA, J. C.; SAAD, M. J.; FOLLI, F.; RAMOS; C .D.; GELONEZE, B.; VELLOSO, L. A. Impairment of body mass reduction-associated activation of

brown/beige adipose tissue in patients with type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Obesity*, v.41, n.11, p.1662-1668, 2017.

ROSENBAUM, M.; LEIBEL, R. L. Adaptive thermogenesis in humans. *International Journal of Obesity*, v. 34, p. 47–55, 2010.

SANCHEZ-DELGADO, G.; MARTINEZ-TELLEZ, B.; OLZA, J.; AGUILERA, C. M.; GIL, Á.; RUIZ, J. R. Role of Exercise in the Activation of Brown Adipose Tissue. *Annals of Nutrition Metabolism*, v. 67, p. 21-32, 2015

SBCBM. Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. *Número de cirurgias bariátricas no brasil cresce 7,5% em 2016*, 2017a. Disponível em: <<http://www.sbcbm.org.br/wordpress/numero-de-cirurgias-bariatricas-no-brasil-cresce-75-em-2016>>. Acesso em: 30 jul 2017

SBCBM. Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. *Falta de cirurgia bariátrica mata até 45 mil no país por ano*, 2017b. Disponível em: <<http://www.sbcbm.org.br/wordpress/falta-de-cirurgia-bariatrica-mata-ate-45-mil-no-pais-por-ano/>>. Acesso em: 02 ago 2017.

SBCBM. Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. *Técnicas Cirúrgicas*, 2017c. Disponível em: <<https://www.sbcbm.org.br/tecnicas-cirurgicas/>>. Acesso em: 20 nov 2018.

SBCBM. Sociedade Brasileira de Cirurgia Bariátrica e Metabólica. *Volume cirurgias bariátricas (por ano)*, 2016. Disponível em: <<http://www.sbcbm.org.br/wordpress/imprensa-2/releases/evolucao-das-cirurgias-bariatricas-no-brasil/>>. Acesso em: 10 jul 2017.

SCHÄGGER, H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1555, p.154–159, 2002.

SHARMA, L. K.; LU, J.; BAI, Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. *Current medicinal chemistry*, v. 16, e.10, p.1266-77, 2009.

SIGNES, A.; FERNANDEZ-VIZARRA, E. Assembly of mammalian oxidative phosphorylation complexes I-V and supercomplexes. *Essays in biochemistry*, v.62, e.3, p. 255-270, 2018.

SIMINO, L. A. D. P.; FANTE, T.; FONTANA, M. F.; BORGES, F. O.; TORSONI, A. M.; MILANSKI, M.; VELLOSO, A. L.; SOUZA, A. T. Lipid overload during gestation and lactation can independently alter lipid homeostasis in offspring and promote metabolic impairment after new challenge to high-fat diet. *Nutrition & Metabolism*, v.14, p.1-16, 2017.

SMITH J.; CIANFLONE, K.; BIRON, S.; HOULD, F. S.; LEBEL, S.; MARCEAU, S.; LESCELLEUR, O.; BIERTHO, L.; SIMARD, S.; KRAL, J. G.; MARCEAU, P. Effects of maternal surgical weight loss in mothers on intergenerational transmission of obesity. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 94, n. 11, p. 4275–4283, 2009.

SOOKOIAN S.; GIANOTTI T. F.; BURGUEÑO A. L.; PIROLA C. J. Fetal metabolic programming and epigenetic modifications: a systems biology approach. *Pediatric Research*, v. 73, p. 531–542, 2013.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*, v. 552, e. 2, p. 335–344, 2003.

VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D.; VANHOMMERIG, J. W.; SMULDERS, N. M.; DROSSAERTS, J. M.; KEMERINK, G. J.; BOUVY, N. D.; SCHRAUWEN, P.; TEULE, G. J. Cold-activated brown adipose tissue in healthy men. *New England Journal of Medicine*, v. 360, p. 1500–1508, 2009.

VANDERLEI, L. C. M.; PASTRE, C. M.; FREITAS JUNIOR, I. F.; GODOY, M. F. Índices geométricos de variabilidade da frequência cardíaca em crianças obesas e eutróficas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 95, n. 1, p. 35-40, 2010.

VIJGEN, G. H.; BOUVY, N. D.; TEULE, G. J.; BRANS, B.; HOEKS, J.; SCHRAUWEN, P.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D. Increase in Brown Adipose Tissue Activity after Weight Loss in Morbidly Obese Subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.97, n.7, p.1229–1233, 2012.

VIRTANEN, K. A.; LIDELL, M. E.; ORAVA, J.; HEGLIND, M.; WESTERGREN, R.; NIEMI, T.; TAITTONEN, M.; LAINE, J.; SAVISTO, N-J.; ENERBÄCK. S.; NUUTILA, P. Functional brown adipose tissue in healthy adults. *New England Journal of Medicine*, v. 360, p. 1518-1525, 2009.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. Obesidade: uma perspectiva plural. *Ciências e Saúde coletiva*, v. 15, n. 1, p. 185-194, 2010.

WHITE, C. L.; PURPERA, M. N.; MORRISON, C. D. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *American journal of physiology. Regulatory integrative and comparative physiology*, v. 296, n.5, p.1464-72, 2009.

WHO. World Health Organization. *Obesity and overweight*, 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 24 de abr 2017.

WHO. World Health Organization. *Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity*. Geneva: 1999.

WU, J.; BOSTRÖM, P.; SPARKS, L. M.; YE, L.; CHOI, J. H.; GIANG, A. H.; KHANDEKAR, M.; VIRTANEN, K. A.; NUUTILA, P.; SCHAART, G.; HUANG, K.; TU, H.; VAN MARKEN LICHTENBELT, W. D.; HOEKS, J.; ENERBÄCK, S.; SCHRAUWEN, P.; SPIEGELMAN, B. M. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*, v. 150, n. 2, p. 366-376, 2012.

XIAO, Q. X.; WILLIAMS, S. M.; GRAYSON, B. E.; GLAVAS, M. M.; COWLEY, M. A.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L. Excess Weight Gain during the Early Postnatal

Period Is Associated with Permanent Reprogramming of Brown Adipose Tissue Adaptive Thermogenesis. *Endocrinology*, v.148, n.9, p.4150–4159, 2007.

YIN, Y.; YANG, S.; YU, L.; YU, C. A. Reaction mechanism of superoxide generation during ubiquinol oxidation by the cytochrome bc1 complex. *The Journal of biological chemistry*, v. 285, e.22, p.17038-17045, 2010.

YOUNG, P.; ARCH, J. R. S.; ASHWELL, M. Brown adipose tissue in the parametrial fat pad of the mouse. *FEBS Letters*, v. 167, 169, p.10-14, 1984.

7. ANEXO

Autorização do CEUA



PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado "Homeostase glicêmica e lipídica da prole de ratos obesos submetidos à derivação gástrica em Y de Roux", sob vossa coordenação, foi avaliado pelo CEUA como **APROVADO** para execução.

ATENÇÃO!

O Certificado Experimental deste Protocolo, somente será emitido após o encerramento das atividades previstas e após o encaminhamento do Relatório Final ao CEUA. Este Parecer **NÃO** tem valor como Certificado Experimental.

Cascavel, 13/02/2015



Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2729/2014 - GRE