

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

CAROLYNE DONEDA SILVA SANTOS

**A EXPOSIÇÃO MATERNA E DA PROLE À DIETA DE CAFETERIA
PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS TECIDO
ESPECÍFICAS**

CASCAVEL-PR

Janeiro/2017

CAROLYNE DONEDA SILVA SANTOS

**A EXPOSIÇÃO MATERNA E DA PROLE À DIETA DE CAFETERIA
PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS TECIDO
ESPECÍFICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Biociências e Saúde – Nível Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde.

Linha de Pesquisa: Fatores que influenciam a morfofisiologia orgânica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra L. Balbo
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Sabrina Grassioli

CASCADEL-PR

Janeiro/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

CAROLYNE DONEDA SILVA SANTOS

A EXPOSIÇÃO MATERNA E DA PROLE À DIETA DE CAFETERIA PROMOVE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS TECIDO ESPECÍFICAS

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Biociências e Saúde e aprovada em sua forma final pelo Orientador e pela Banca Examinadora.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Sandra L. Balbo _____
UNIOESTE

Prof^a. Dr^a. Patrícia Cristina Lisbôa da Silva _____
UERJ

Prof^a. Dr^a. Elaine Manoela Porto Amorim _____
UNIOESTE

AGRADECIMENTOS

Recebi tanto carinho e apoio durante esta jornada, que nenhuma palavra escrita aqui poderá descrever o quanto sou grata. Mas inicio agradecendo àquele que me deu o dom de ser, toda minha gratidão à Deus por estar à minha frente e me permitir realizar todos os sonhos que Ele mesmo sonhou para mim, obrigada por ser meu sustento. Ao meu esposo, Elion, meu amor e admiração, eu sempre soube que você é especial, mas após estes anos e tudo que enfrentamos juntos, eu tenho ainda mais certeza que Deus sabia exatamente o que eu precisava quando me deu você, neste tempo eu não fui tudo o que você merecia, mas você foi exatamente tudo o que eu precisava, amo você. Aos meus pais e minha família, que não perdem nenhuma oportunidade de demonstrar seu amor e fé em tudo que me proponho a fazer, suas orações e presença são essenciais para que eu consiga realizar o que desejo, sei que tenho para quem voltar sempre, mas o mais importante é que sei que irão comigo para onde eu for. Aos meus amigos que foram pacientes e entenderam minha ausência, torceram por mim e vibraram comigo à cada vitória, obrigada por estarem ao meu lado e por me aceitarem sempre. Aos meus colegas de laboratório, que aprendi a admirar e que me ensinaram um novo sentido de doação e companheirismo, vocês merecem todo o sucesso e alegria, vocês são muito especiais. Aos meus colegas de trabalho da Gastroclínica Cascavel, que me apoiaram em todas as etapas deste Mestrado, aceitando minha ausência e torcendo por mim em cada novo projeto. Finalmente, aos meus professores amados, que me formaram e me fizeram enxergar o quanto é bonita a forma que vocês têm, dentro desta Universidade, de dividir o conhecimento sem nenhum egoísmo, somente pela alegria de ver as pessoas crescerem. Sandra, tenho orgulho de ter sido escolhida por você e por contar com sua confiança, sua amizade é um presente. Angélica, sua delicadeza e dedicação, são dons especiais, te agradeço por todo tempo e paciência. Ana, encontrei uma amiga, pois só consideramos amigos aqueles que realmente admiramos muito, obrigada por tudo. Sabrina, sua determinação e inteligência me estimularam à ir além, sem seu apoio este trabalho não teria o mesmo brilho. Sara e Fábio, vocês iniciaram um projeto que conseguimos juntos finalizar, vocês me aceitaram, apoiaram e permitiram que através da idéia de vocês eu realizasse um sonho, muito obrigada.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a dieta de cafeteria durante o período pré e pós desmame altera as características histológicas do tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marron (TAM), e do fígado em filhotes machos adultos. Para isso, ratas *Wistar* com 21 dias de vida foram separadas em dois grupos: controle (CTL; ratas alimentadas com ração padrão para roedores) e cafeteria (CAF; ratas alimentadas com dieta de cafeteria durante todo seu período de vida). Aos 70 dias de idade as ratas foram acasaladas e mantiveram o mesmo padrão alimentar durante a gestação e amamentação. Após o nascimento, somente os filhotes machos (F1) foram separados em 4 grupos (8 filhotes/ninhada) e receberam dieta controle (CTL F1) ou dieta cafeteria (CAF F1) ao longo de suas vidas, conforme os seguintes grupos: CTL-CTL F1, filhotes alimentados com dieta controle, nascidos de mães que receberam dieta controle; CTL-CAF F1, filhotes alimentados com dieta cafeteria, nascidos de mães que receberam dieta controle; CAF-CTL F1, filhotes alimentados com dieta controle, nascidos de mães que receberam dieta cafeteria; CAF-CAF F1, filhotes alimentados com dieta cafeteria, nascidos de mães que receberam dieta cafeteria. Aos 100 dias de vida os animais foram eutanasiados e os parâmetros biométricos e metabólicos, bem como a histologia do fígado, TAB e TAM foram avaliados. Para avaliação dos dados obtidos foi realizada uma Análise de Componentes Principais, a qual demonstrou que a dieta de cafeteria maternal protegeu os filhotes dos efeitos deletérios provocados pela exposição à dieta obesogênica durante suas vidas, como demonstrada pela ausência de alterações no peso corporal e acúmulo de gordura, porém falhou em proteger o fígado e o TAM, sugerindo que o impacto da dieta de cafeteria maternal é tecido específico.

Palavras-chave: obesidade, programação metabólica, prole e histologia

ABSTRACT

We, herein, evaluated whether the exposure of rats to a cafeteria diet pre- and/or post-weaning, alters histological characteristics in the White Adipose Tissue (WAT), Brown Adipose Tissue (BAT), and liver of young adult male offspring. Female Wistar rats were divided into Control (CTL; rats fed on standard rodent chow) and Cafeteria (CAF; fed on cafeteria diet during their entire life). After birth, male offspring only (F1) were divided into four groups (8 pups/dams) and received the CTL or CAF diet during their entire lives: CTL-CTLF1, control offspring born from dams that were fed on control diet; CTL-CAF F1, cafeteria offspring born from dams that were fed on control diet; CAF-CTL F1, control offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet; CAF-CAF F1, cafeteria offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet. Biometrics, metabolic parameters, and liver, BAT and WAT histology were assessed. Data obtained were integrated using the Principal Component Analysis (PCA). PCA showed that maternal CAF diet protects offspring from the deleterious effects provoked by the exposure to an obesogenic diet during adult life, as demonstrated by the absence of alteration in body weight and fat accumulation, but failed to protect BAT and liver, suggesting that the impact of maternal CAF diet is tissue-specific.

Key words: obesity, dams, offspring and morphology

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA.....	7
1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 Obesidade.....	12
2.2 Programação Metabólica.....	13
2.3 Alterações morfofuncionais induzidas pela obesidade e programação metabólica.....	16
2.3.1 Obesidade e sua ação no fígado	17
2.3.2 Obesidade e sua ação no tecido adiposo	19
2.4 Modelos experimentais de obesidade	21
3. REFERÊNCIAS.....	30
4. ARTIGO.....	28
5. ANEXOS	48
5.1 Anexo A – Certificado de aprovação do projeto pelo CEEAAP	48
5.2 Anexo B – Normas da revista científica	49

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL – Ácidos graxos livres

CAF- Cafeteria

CCBS – Centro de Ciências
Biológicas e da Saúde

CTL- Controle

CEEAAP – Comitê de Ética em
Experimentação Animal e Aulas
Práticas

DHGNA – Doença hepática
gordurosa não alcoólica

DM – Diabetes melitus

DM1 – Diabetes melitus tipo 1

DM2 – Diabetes melitus tipo 2

F1 – Primeira geração

HE – Hematoxilina Eosina

IBGE – Instituto Brasileiro de
Geografia e Estatística

IL4 – Interleucina 4

IL5 – Interleucina 5

IL13 – Interleucina 13

IMC – Índice de massa corporal

LAFEM – Laboratório de Fisiologia
Endócrina e Metabolismo

MSG – Glutamato monossódico

NK – Natural killers

SM – Síndrome metabólica

SNS – Sistema nervoso simpático

TA – Tecido adiposo

TAB – Tecido adiposo branco

TAM – Tecido adiposo marrom

TAR – Tecido adiposo retroperitoneal

TG – Triglicerídeos

TNF- α – Fator de necrose tumoral

UNICAMP – Universidade Estadual
de Campinas

UNIOESTE – Universidade Estadual
do Oeste do Paraná

VIGITEL – Vigilância e fatores de
risco e proteção para doenças
crônicas por inquérito telefônico

VMH – Hipotálamo ventromedial

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como um acúmulo excessivo de gordura no tecido adiposo, condição frequentemente acompanhada de alterações metabólicas, hormonais e complicações no estado de saúde (WHO, 2000).

No boletim divulgado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em Julho de 2015, o crescente aumento da obesidade no mundo foi classificado como epidemia. Segundo estes dados, entre os anos de 1980 e 2013, a proporção de adultos com excesso de peso e obesidade aumentou aproximadamente 8,5% em ambos os sexos (NG *et al.*, 2013). O rápido avanço da obesidade também tem sido observado na população brasileira, conforme demonstram dados recentes obtidos pela Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL) (MS, 2015). De acordo com estes dados a frequência do excesso de peso na população adulta brasileira no ano de 2014 foi de 52,5%, sendo maior entre homens (56,5%) que em mulheres (49,1%). A obesidade por sua vez, incide sobre 17,9% da população avaliada, sendo minimamente maior no sexo feminino.

A obesidade é uma doença de origem multifatorial relacionado a fatores sociais, ambientais, culturais, genéticos e hormonais. Todavia, os estudos epidemiológicos claramente demonstram que os hábitos alimentares, atrelados ao sedentarismo são os principais determinantes para a atual epidemia de obesidade (BRAUN *et al.*, 2014; WHO, 2000; MS, 2015). Dentro deste contexto, pesquisas recentes indicam que a condição metabólica materna, em especial, o estado nutricional materno pré e pós gestacional podem afetar o feto em desenvolvimento influenciando o estado de saúde deste novo indivíduo ao nascimento e com repercussões para a homeostase energética na vida adulta (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015).

Estudos epidemiológicos demonstram que a incidência de obesidade entre as mulheres grávidas acompanha o crescimento da obesidade na população em geral, chegando a 25% em alguns países (GHELINCKX *et al.*, 2008). O estado nutricional e o consumo alimentar materno, em particular durante a gestação e lactação, podem influenciar o peso corporal do bebê ao nascimento tendo repercussões para a instalação de doenças crônicas na vida adulta, sendo denominado de programação metabólica (DESAI, JELLYMAN; ROSS, 2015). Estudo demonstrou que crianças expostas a programação metabólica, estarão

mais vulneráveis aos efeitos deletérios do atual estilo de vida, onde há predomínio na oferta de alimentos de alto teor calórico associados à redução da prática de atividade física (OLIVEIRA; FISBERG, 2003).

A super nutrição durante a gestação, associada à obesidade, promove resistência à insulina, intolerância à glicose, acúmulo de gordura visceral e dislipidemias, condições metabólicas que exercem impacto direto sobre o desenvolvimento do bebê e modulam o estado de saúde futuro deste indivíduo, favorecendo a instalação de doenças crônicas no adulto, em especial a Síndrome Metabólica (SM) (SMITH; RYCKMAN, 2015; ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

Diferentes modelos experimentais que manipulam o estado nutricional materno na gestação e/ou lactação tem sido usados para avaliar alterações metabólicas e histomorfológicas relacionadas à programação metabólica e seus efeitos deletérios sobre a prole, dentre os quais destacam-se o consumo de dieta hipercalórica. A dieta de cafeteria (CAF) apresenta composição semelhante à dieta hipercalórica consumida pelos humanos. Animais que consomem dieta CAF apresentam aumento de peso, alto teor de tecido adiposo branco, hiperglicemia e resistência à insulina, associada à inflamação severa do fígado, esteatose hepática, dislipidemia e disfunção das ilhotas pancreáticas. Deste modo, a dieta CAF é efetiva em reproduzir em modelos animais, as características da SM observada em humanos (SAMPEY *et al.*, 2011).

O consumo de dieta CAF durante os períodos pré-natal também é capaz de promover programação metabólica na prole, provocando alterações como: aumento de peso, distúrbios metabólicos e hormonais, esteatose hepática, inflamação do tecido adiposo branco e do fígado (HOWIE *et al.*, 2009; WHITE; PURPERA; MORRISON, 2009; LI; SLOBADE; VICKERS, 2011; ZOE *et al.*, 2014; JACOBS *et al.*, 2014).

Por outro lado, existem estudos contraditórios quanto aos efeitos da dieta CAF nestes períodos do desenvolvimento e seus efeitos à longo prazo. Em estudo realizado por Tamashiro *et al.*, 2009 conclui-se que a dieta CAF ofertada à prole após o desmame pode ter papel mais significativo no desenvolvimento da obesidade na vida adulta que a dieta CAF consumida durante a gestação e lactação pela mãe.

Considerando que a instalação da obesidade e o desenvolvimento da SM na vida adulta podem estar associados a alterações nutricionais que modulam períodos críticos do desenvolvimento, o presente estudo avaliou as adaptações

histomorfológicas no fígado, tecido adiposo unilocular e tecido adiposo multilocular, induzidas pelo consumo de dieta CAF na primeira geração (F1) oriunda de mães que consumiram dieta CAF na gestação e lactação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Obesidade*

A obesidade já é considerada a quinta causa de morte no mundo, em média, 5% da população mundial morre a cada ano em decorrência do sobrepeso e obesidade. Além deste número expressivo que pode caracterizar esta alteração do estado nutricional como uma pandemia, podemos relacionar o excesso de peso a diversas outras doenças, em 44% dos diabéticos, 23% dos indivíduos com cardiopatia isquêmica e 7% a 41% dos pacientes com câncer, a obesidade foi causa secundária para o desenvolvimento da patologia (WHO, 2011).

Estima-se que 500 milhões de pessoas no mundo são obesas e este aumento de peso é crescente, bem como a incidência de Diabetes mellitus (DM). Em 2011, a Federação Internacional de DM revelou que 366 milhões de pessoas tinham DM e 4,6 milhões morreram em consequência da doença no mundo todo. A previsão para 2030 é de um aumento de 43% na incidência desta doença. Adicionalmente estes dados também mostram que em 2011 existiam 280 milhões de indivíduos pré diabéticos e a previsão para 2030 é que 400 milhões de pessoas sejam portadoras desta doença (IDF, 2012) e ainda entre as complicações da obesidade, a DM aparece entre as 20 causas que podem diminuir a expectativa de vida (WHO, 2014)

A associação entre a DM e o excesso de tecido adiposo é decorrente do rompimento da homeostase glicêmica, promovida pela reunião de diferentes elementos sendo denominada atualmente de Síndrome Metabólica (SM). A SM caracteriza-se pela associação da obesidade, em particular o acúmulo de gordura visceral, intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemia e complicações cardiovasculares. A SM por sua vez eleva a chance de desenvolver DM, em especial, Diabetes Melitus tipo 2 (DM2), o qual representa cerca de 95% dos casos da doença no mundo todo (FILHO et al., 2006; GUARNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015; KAUR, 2014).

Segundo o projeto Diretrizes, da Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina (DITEN, 2011) a obesidade pode ser definida como uma doença crônica, inflamatória, endócrino-metabólica, heterogênea e multifatorial, caracterizada pelo excesso de gordura corporal. Dentre as diferentes formas de classificar a obesidade, a relação entre o peso e altura avaliada pelo Índice de

Massa Corporal (IMC)¹ tem sido a ferramenta mais usada, em especial em grandes estudos epidemiológicos (WHO, 1995).

No Brasil, o acompanhamento do estado nutricional da população, realizado pelo Ministério da Saúde (MS, 2015), demonstrou que entre 2006 e 2012 houve um crescimento contínuo do excesso de peso e obesidade na população adulta. Eventos que permaneceram estáveis entre os anos de 2012 e 2014. O aumento do peso corporal na população brasileira foi acompanhada de uma maior incidência de DM2, embora a prática de atividade física, melhora do consumo de frutas e verduras e redução do tabagismo também tenham sido observadas neste período.

Preocupantemente o excesso de peso e a obesidade são fenômenos que afetam a população mais jovem, incluindo crianças e adolescentes no mundo todo, tendo relação direta com hábito alimentar e sedentarismo. Por exemplo, nos EUA em média 1/3 das crianças americanas está acima do peso, eventos que parecem ser decorrente de fatores ambientais (GURNANI; BIRKEN; HAMILTON, 2015), tais como: aumento da ingestão de bebidas adoçadas com açúcar, consumo de fast-foods e lanches processados, tempo reduzido de sono, redução da prática de atividade física e estresse familiar (BROWN *et al.*, 2015).

O avanço da obesidade infantil também é observada em nosso país, sendo reflexo de mudanças nutricionais e sócio econômicas observadas nas últimas décadas conforme demonstram dados da Pesquisa e Orçamento Familiar (POF 2008-2009), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e Ministério da Saúde. Nesta pesquisa foi verificado que o aumento do consumo de carnes, produtos panificados, derivados de leite e bebidas pela população urbana, além de ressaltar o aumento do consumo de alimentos fora do domicílio. Ainda de acordo com esta pesquisa, a transição nutricional teve impacto direto nos índices de peso corporal, em particular na infância. De acordo com estes dados, os índices de obesidade apresentam aumento significativo, principalmente, em crianças com idade entre 5 a 9 anos. Entre os anos de 1989 e 2009, o sobrepeso entre meninos e meninas dobrou e a obesidade aumentou mais de 300% (MS, 2010)

Em estudo recente, Smith; Rickman, 2015 apresentam evidências de que a dieta e a saúde materna promovem modificações no feto em desenvolvimento,

¹IMC: Índice que é calculado pelo peso do indivíduo em quilogramas, dividido por sua altura em metros ao quadrado (kg/m²). Classifica o estado nutricional do adulto com valores de IMC abaixo de 18,5kg/m², em magreza graus I, II e III., eutrofia; com valores até 25kg/m²; pré-obesidade ou sobrepeso, com valores entre 25 e 30kg/m² e obesidade graus I, II e III, com valores acima de 30kg/m² (WHO, 1995).

afetando a condição ao nascimento e tendo repercussões tardias na saúde dos filhos, resultando em mecanismos que contribuem para o desenvolvimento da SM, DM2 e obesidade na vida adulta. Neste sentido, a manutenção de um ambiente intra-uterino saudável modula o metabolismo do organismo em desenvolvimento e previne ou atenua a possibilidade de instalação de doenças crônicas no futuro. A relação entre estados nutricionais materno e a condição de saúde futura do indivíduo tem sido explorada no conceito de Programação Metabólica e diferentes modelos animais têm sido amplamente utilizados para esclarecer as adaptações moleculares, fisiológicas e morfológicas que alicerçam esta hipótese.

2.2 Programação Metabólica

O interesse na origem da obesidade e de suas comorbidades têm crescido nos últimos anos. Evidências atuais demonstram que alterações nutricionais e/ou hormonais ocorridas em janelas críticas do desenvolvimento, em particular gestação e/ou lactação podem programar o metabolismo do feto em desenvolvimento ou recém-nascido, repercutindo para seu estado de saúde na vida adulta (SEDAGHAT; ZAHEDIASL; GHASEMIL, 2015; SMITH; RYCKMAN, 2015). O conceito essencial da “programação metabólica” significa que a nutrição, os fatores hormonais, ambientais e metabólicos podem alterar permanentemente a estrutura dos órgãos, respostas celulares, expressão gênica, metabolismo e fisiologia da prole. Essas alterações podem acontecer no feto, recém-nascido ou no adulto (ROSS; DESAI, 2013).

Dentro deste contexto, importante atenção ao metabolismo materno tem sido empregada, uma vez que a condição nutricional e metabólica materna, durante os períodos gestacional e lactacional pode acarretar alterações morfo-funcionais na prole, pois durante estes períodos, um organismo em desenvolvimento passa por fases de intensa proliferação e crescimento celular, acompanhando marcantes alterações funcionais (PEREIRA *et al.*, 2014).

Existem diferentes modelos experimentais de programação metabólica, dentre os quais se destacam a desnutrição e hiperalimentação gestacional e/ou lactacional e suas repercussões para a prole. Interessantemente similares impactos sobre o metabolismo tem sido observado nos descendentes ou primeira geração (F1) nestas duas condições opostas, incluindo alterações no peso corporal, acúmulo excessivo de gordura corporal, complicações na homeostase

glicêmica e lipídica e maior incidência de co-morbidades como DM2 e doenças cardiovasculares (SEGOVIA *et al.*, 2014; JI *et al.*, 2015)

Modelos experimentais com restrição de diversos nutrientes específicos, oxigênio e hormônios procuram avaliar seus efeitos no desenvolvimento da prole e suas consequências na vida adulta (SEDAGHAT; ZAHEDIASL ; GHASEMI, 2015). Neste sentido, a má nutrição é uma preocupação quando estudamos programação metabólica, a condição de restrição alimentar ou deficiência nutricional pode causar atraso no crescimento intra-uterino, distúrbios metabólicos, dislipidemias, risco de arterosclerose, enquanto a deficiência de micronutrientes como ácido fólico, vitamina B12, vitamina A, ferro, magnésio, zinco e cálcio podem afetar a saúde cardiovascular (SZOSTAK-WEGIEREK, 2014).

Porém, considerando a atual epidemia de obesidade, dados recentes têm ressaltado as complicações decorrentes da programação induzida pelo consumo de dieta rica em calorias pelas mães e seu impacto na prole F1, sugerindo que a obesidade materna durante a gravidez está associada ao risco de macrossomia e aumento do risco de obesidade e DM2 na vida adulta. As alterações no padrão de crescimento intra-uterino podem levar ao risco de desenvolvimento da SM na vida adulta da prole (ROSS; DESAI, 2013).

O estado metabólico e hormonal materno tanto no período gestacional quanto no lactacional tem repercussões para o organismo em desenvolvimento. Por exemplo, a obesidade materna e suas comorbidades desencadeiam um processo inflamatório e os mediadores inflamatórios liberados nesse processo, podem atingir o feto. As citocinas pró-inflamatórias afetam a função placentária alterando o fluxo de nutrientes e, indiretamente, podem prejudicar o desenvolvimento fetal. Dentro deste contexto foi demonstrado que a concentração de citocinas inflamatórias placentárias podem estar relacionados ao aumento do tecido adiposo visceral, do conteúdo lipídico hepatocelular e fluxo alterado de triglicerídeos da prole (INGVORSEN *et al.*, 2015; TARRADE *et al.*; 2015).

Quando aspectos relacionados a homeostase energética materna são avaliados, também são observados efeitos sobre a prole. Por exemplo, a hiperglicemia e hiperinsulinemia materna provocam uma sequência de eventos que conduzem à compensação das células β -pancreáticas do feto, provocando proliferação e hiperplasia das mesmas, podendo levar à exaustão, morte e disfunção destas células (CERF, 2014).

Em recente estudo, Sullivan *et al.*, 2015, também relacionaram a programação metabólica materna, induzida por dietas hiperlipídicas e hipercalóricas, com distúrbios de comportamento, como: déficit de atenção e hiperatividade, depressão, autismo, esquizofrenia e aumento da ansiedade na prole. Todas essas alterações seriam provenientes de alterações na formação neuroendócrina do feto.

Vários estudos em humanos correlacionam a mudança epigenética² ao risco de doenças metabólicas, porém seus resultados são limitados. A maioria dos estudos disponíveis sobre programação e epigenética baseia-se em modelos animais (VICKERS, 2014).

2.3 Alterações morfofuncionais induzidas pela obesidade e programação metabólica

Associado ao excesso de tecido adiposo e ao rompimento da homeostase glicêmica, a obesidade também é acompanhada de dislipidemia, caracterizada primariamente por aumento de ácidos graxos livres, triglicerídeos e colesterol total, resultando em processo inflamatório em diversos tecidos envolvidos na homeostase energética, incluindo tecido adiposo, músculo e fígado (DONATH *et al.*, 2013; PETRUZELLI; MOSCHETTA, 2010; ECKEL; GRUNDY; ZIMMET 2005),

Somado à presença do processo inflamatório, os tecidos periféricos também podem sofrer outras alterações importantes, em especial a instalação de resistência à insulina em diversos órgãos. A resistência insulínica hepática, por exemplo, altera a liberação de triglicerídeos e glicose pelo fígado, provocando um acúmulo de lipídeos neste órgão, caracterizando a esteatose hepática. Adicionalmente a resistência a insulina no próprio tecido adiposo reduz sua capacidade de extrair substratos da circulação, favorecendo acúmulo da gordura visceral, hipertrofia dos adipócitos e remodelação do tecido (IOZZO, 2015; GREGORIO *et al.*, 2013).

Deste modo, frequentemente as alterações metabólicas e endócrinas características da obesidade são acompanhadas de ajustes morfológicos nos três principais setores da homeostase glicêmica e lipídica, o tecido adiposo, o fígado e o pâncreas endócrino. É relevante notar que, estes setores estão entre os principais tecidos alvos da programação metabólica gestacional e lactacional com

²Epigenética se refere a mudanças hereditárias na função de um gene sem alterações na sequência de nucleotídeos. Modificações epigenéticas podem ser transmitidas entre células ou entre gerações de indivíduos (CERF, 2015)

repercussões na vida adulta (SAMPEY *et al.*, 2011; DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015).

2.3.1 Obesidade e sua ação no fígado

O fígado é um órgão que executa diversas funções essenciais para a homeostase corporal, tendo papel central no metabolismo, síntese, armazenamento e distribuição de nutrientes. Este órgão é composto por vários tipos celulares, sendo os hepatócitos responsáveis por 78% do volume do fígado e 70% de todas as células do fígado, sendo assim, a função deste órgão é dependente particularmente da atividade dos hepatócitos (GENTRIC; DESDOUETS, 2014).

Os hepatócitos em roedores e seres humanos têm uma vida útil longa e raramente se dividem em condições normais na vida adulta. Contudo, estas células tem uma notável capacidade de proliferação e regeneração em resposta a situações de estresse, como ressecção cirúrgica, exposição à substâncias tóxicas e infecção viral, além de hepatites crônicas B e C, exposição à sobrecarga de ferro e cobre e processos inflamatórios, como esteatose hepática (GUIDOTTI *et al.*, 2003).

O fígado contribui para a homeostase glicêmica, tanto no estado alimentado como em situações de estresse ou jejum. Em situações pós-prandiais o excesso de substratos, particularmente glicose, são armazenados no fígado sob a forma de glicogênio hepático. Adicionalmente o fígado também processa os lipídeos da dieta, armazenando ácido graxos hepáticos, na forma de triglicerídeos. A glicose armazenada no fígado provém essencialmente da dieta, enquanto a fonte hepática de lipídeos é oriunda da dieta (15%), da lipólise do tecido adiposo (59%) e também do processo de lipogênese (26%) (ONYEDWERE *et al.*, 2015). Durante o jejum, as concentrações glicêmicas são mantidos pela glicogenólise hepática e em situações de jejum prolongado também mantido pela síntese de glicose (gliconeogênese).

O controle das vias glicolíticas e lipogênicas hepática é diretamente modulado pela ação do hormônio insulina. A obesidade provoca a resistência insulínica hepática, promovendo liberação irregular de glicose e triglicerídeos. Adicionalmente, a hiperinsulinemia decorrente da resistência a insulina induz acúmulo de triglicerídeos no fígado (esteatose hepática), fibrose hepática, inflamação hepática e cirrose hepática (IOZZO, 2015).

A esteatose hepática que é caracterizada por um acúmulo de gordura nos hepatócitos, comprometendo mais de 5% no peso ou volume total do fígado, na

ausência do consumo de álcool e exposição à toxina ou doença viral é nomeada como Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica (DHGNA). Esta condição acomete 30% dos adultos de países desenvolvidos, possivelmente pelo aumento da obesidade e expectativa de vida na população (CALVO *et al.*, 2015). Esta associação entre obesidade, SM e função hepática pode ser observada pelo aumento do fator de crescimento do hepatócito, que acontece pelo acúmulo de gordura no fígado, tendo relação com o aumento do IMC e aumento dos adipócitos, paralelamente a um quadro de resistência à insulina (LINNEMANN; BAAN; DAVIS, 2014).

Existem algumas hipóteses para o aumento da concentração dos triglicerídeos nos hepatócitos e o acontecimento da esteatose hepática, são chamados de 3 “hits”³. No “primeiro hit” acontece um acúmulo metabólico de lipídeos, que leva à lipotoxicidade, estresse oxidativo e inflamação. No “segundo hit” acontece uma lesão tecidual e ativação de células estreladas, este processo é provocado por ativação de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento. O aumento da sinalização de TNF- α associado à síntese de colágeno hepático resulta em alterações da matriz extracelular e fibrose, desequilíbrio entre a taxa de morte e regeneração dos hepatócitos que promovem distorção na arquitetura do fígado caracterizando o “terceiro hit”. (ONYEKWERE *et al.*, 2015; WILLIAMS; KANG; WASSERMAN, 2015).

A extensão da esteatose hepática pode ser classificada pela presença de gordura nas seguintes proporções: leve (0 – 33%), moderada (34 – 66%) e grave (>66%) (EBERTZ *et al.*, 2014), esta avaliação pode ser feita através de exames de imagem, como tomografias e ecografias. As principais características histológicas da DHGNA são semelhantes às daquelas da doença hepática induzida pelo álcool e incluem esteato-hepatite (inflamação do fígado gorduroso, do parênquima, com ou sem o acompanhamento de necrose focal) e diferentes graus de fibrose, incluindo cirrose. A esteatose é predominantemente macrovesicular e, geralmente, é distribuída por todo o fígado, embora possam existir proeminências de esteatose microvesicular. Neutrofilia leve, alterações linfocitárias ou infiltrados inflamatórios mistos também podem ser observados (ONYEKWERE *et al.*, 2015; WILLIAMS; KANG; WASSERMAN, 2015; EL KADER; EL DEN ASHMAWY, 2015).

³“hits”: passos

O consumo de dieta CAF promove esteatose hepática, principalmente macrovesicular, associada à presença de diversas células inflamatórias, especialmente macrófagos (SAMPEY et al., 2011), um processo inflamatório também presente em animais programados metabolicamente.

2.3.2 Obesidade e sua ação no tecido adiposo

O tecido adiposo (TA) é dividido no organismo em tecido adiposo unilocular/branco e tecido adiposo multilocular/marrom, os quais apresentam funções e histologia diferentes. O tecido adiposo unilocular exerce um papel importante no metabolismo energético, o qual ocorre pelos processos bioquímicos de lipogênese e lipólise associados a eventos secretórios que modulam ingestão alimentar e gasto energético. Durante a lipogênese os adipócitos convertem o excesso de substratos energéticos (glicose e lipídeos) em triglicerídeos (TG), os quais são clivados em ácidos graxos livres (AGL) e glicerol durante a lipólise (SANCHEZ-DELGADO, *et al.*, 2015). Morfologicamente os adipócitos são caracterizados pelo grande vacúolo lipídico central, com núcleo achatado em direção à periferia celular (BLOOR ; SYMONDS, 2014).

De modo geral o tecido adiposo unilocular pode ser subdividido em: subcutâneo e visceral. A gordura subcutânea está localizada na hipoderme, enquanto a gordura visceral conecta órgãos internos e acumula-se no interior da cavidade abdominal (GHAZARIAN et al., 2015). A gordura é armazenada em forma de retroperitoneal e perigonadal, também pode ser armazenada na região intra-abdominal, que forma o tecido adiposo visceral. Ainda pode cercar alguns órgãos como coração e rins. Os roedores possuem ainda depósitos nas regiões: gonadal, epididimal e inguinal (BLOOR ; SYMONDS, 2014).

O tecido adiposo multilocular tem características funcionais e morfológicas distintas do unilocular. Metabolicamente os adipócitos do multilocular são especializados em dissipar energia sob a forma de calor, pela oxidação de glicose e lipídeos, um processo denominado termogênese. O controle deste processo é diretamente feito pela atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS), via norepinefrina. Morfologicamente este tecido é caracterizado pela coloração rosa claro à vermelho escuro, apresentando alta vascularização, presença de gotículas de gordura dispersas no citoplasma e grande número de mitocôndrias (SANCHEZ-DELGADO *et al.*, 2015; LEE; JUNG; CHOI, 2015; WHITTLE; LÓPEZ ; VIDAL-POING, 2011).

Em recente revisão Tupone, Maddem & Morris, 2014, afirmaram que a maior quantidade de tecido adiposo multilocular encontrada em indivíduos magros estava relacionada a maior gasto energético. Adicionalmente estes autores demonstram que o multilocular diminui com o aumento da idade, com a elevação do IMC bem como, com adiposidade visceral. Finalmente o maior teor de multilocular, pelo menos em humanos, é inversamente proporcional à presença de esteatose hepática e obesidade (PORTER; CHONDRONIKOLA; SIDOSSIS, 2015).

Com a instalação da obesidade e resistência insulínica, que são características da SM, os adipócitos sofrem uma remodelação, resultado do acúmulo de TG, que provoca disfunção secretória e associado à hiperinsulinemia promove proliferação e expansão do tecido adiposo. Assim, o número e área dos adipócitos são aumentados. O processo de hipertrofia do adipócito está diretamente relacionado ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , diferenciação e apoptose (SANCHES-DELGADO, 2015; BLOOR; SYMONDS, 2014; LEE; JUNG; CHOI, 2015).

O sistema imunológico tem papel importante no controle da estrutura do tecido adiposo e sua homeostase, inibindo a inflamação e remodelação do tecido. Esses processos tem relação direta com o acometimento da função endócrina e obesidade. Sob condições normais, sem excesso de peso, o tecido adiposo é povoado por várias células do sistema imunológico, principalmente macrófagos (WENSVEEN *et al.*, 2015). Os eosinófilos também tem papel importante no controle inflamatório e são residentes no tecido adiposo, controlando a ação de Interleucina 4 (IL-4) e Interleucina 5 (IL-5), citocinas anti-inflamatórias, sua deficiência provoca aumento de citocinas pró-inflamatórias, aumento da sensibilidade ao desenvolvimento da obesidade e resistência à insulina, tornando esse eixo, dominante no mecanismo de homeostase do tecido adiposo (GHAZARIAN *et al.*, 2015).

As células Natural killer (NK) representam uma segunda população de células imunes no TA, a sua falta conduz a concentrações reduzidas de IL-4 e IL-13 e aumento de citocinas pró-inflamatórias, na obesidade, sua resposta pode mudar, podendo até promover resistência à insulina (WENSVEEN *et al.*, 2015; COUSIN, *et al.*, 2015). As células T-reguladores, principalmente as células T CD4+, também estão envolvidas na inibição da inflamação no TA (GHAZARIAN *et al.*, 2015; WILLIAMS; KANG; WASSERMAN, 2015).

Uma dieta rica em calorias provoca no tecido adiposo visceral um aumento de gordura nos adipócitos, acúmulo de células imunológicas (neutrófilos, macrófagos e células NK), aumento da massa do adipócito, hipertrofia e hiperplasia do adipócito, redução da produção de adiponectina, menor captação de glicose. Todos estes elementos diminuem a sensibilidade do unilocular à insulina, bem como, também favorecem a instalação de resistência a insulina em outros tecidos (WENSVEEN *et al.*, 2015).

Estudos realizados em ratos Wistar mostraram um aumento de 3 vezes do unilocular nos animais que consumiram dieta CAF em relação à dieta controle; além disso, apresentou resultados de infiltração de macrófagos 14 vezes maior neste tecido em relação ao grupo controle (SAMPEY *et al.*, 2011)

No tecido adiposo, a adipogênese acontece no final da gestação e no início da vida pós-natal sendo sensível às condições uterinas, principalmente ao fornecimento deficientes ou excessivo de nutrientes (SEGOVIA *et al.*, 2014). Quando exposto a uma grande oferta de gorduras, açúcar e sal pela alimentação materna (ZELTSER, 2015), ocorrem alterações no unilocular do feto, podendo aumentar sua capacidade de armazenar lipídeos e redução na sua capacidade de termogênese, na fase adulta a produção de adipócitos é estabilizada, quando produzidos em excesso na primeira infância, podem levar à obesidade tardia (SEGOVIA *et al.*, 2014).

2.4 Modelos animais de obesidade experimental

Existem diversos modelos experimentais de obesidade utilizados para estudar a fisiopatologia desta doença e suas comorbidades. Dentre eles destacam-se os animais submetidos a lesão eletrolítica no hipotálamo ventromedial (VMH); ratos e camundongos tratados com glutamato monossódico (MSG); animais geneticamente obesos como ratos Zucker e camundongos ob/ob (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006; CESARETTI; JUNIOR, 2006).

Um modelo de dieta rica em gordura bastante estudado, baseado no aumento da proporção de lipídeos, é a dieta hiperlipídica (HIGA, *et al.*; 2014). Estudos demonstram a rapidez no ganho do peso, acúmulo de gordura, alterações inflamatórias, hipertrigliceridemia e hiperglicemia em animais submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica (PODRINI, *et al.*, 2013; HAIRI; THIBault, 2010).

As dietas hipercalóricas que são caracterizadas por proporção de carboidratos e gordura inadequados, também são amplamente utilizadas como

ferramenta para promover o ganho excessivo de peso nos animais. Um dos modelos utilizados para este fim é a dieta de CAF, pois reflete a realidade da dieta ocidental, fornecendo grandes quantidades de sal, gordura e açúcar. Este tipo de dieta promove hiperfagia, ganho rápido de peso, aumento da massa de gordura, alterações no metabolismo da glicose, níveis elevados de insulina e hipertrofia dos adipócitos (CASTELL-AUVÍ, 2011; HIGA *et al.*, 2014).

Estudos afirmam que este é um dos modelos mais confiáveis para promover efeitos semelhantes à SM em humanos, bem como, reproduzir a inflamação do TAB (SAMPEY *et al.*, 2011). Esta dieta também tem sido utilizada como modelo para programação metabólica, sendo ofertada às mães durante gestação e lactação, e promovendo alterações sobre parâmetros corporais, bioquímicos, hormonais e reprodutivos da prole (JACOBS *et al.*, 2014).

Durante o período de desenvolvimento do feto e até no crescimento inicial do recém nascido, estes são muito vulneráveis a estímulos nutricionais da alimentação materna, relacionadas à má ou super nutrição, resultando na mudança da estrutura dos órgãos, repostas celulares e expressão gênica que provoca impacto no metabolismo e fisiologia da prole. Esta programação pode ter efeitos imediatos ou tardios na vida do indivíduo (DESAI; JELLYMAN; ROSS, 2015).

O resultado desta programação é controverso. Estudo que avaliou os efeitos do consumo da dieta materna CAF e a oferta da mesma dieta à prole demonstrou aumento de peso e gordura retroperitoneal, colesterol, leptina e insulinemia em todos os grupos que consumiram dieta CAF, especialmente no grupo CTL-CAF, em que somente a prole consumiu dieta CAF, comprovando que nesta situação a dieta materna não teve efeito de programação metabólica. Este estudo ainda mostrou que estes efeitos foram mais expressivos em animais com 120 dias de vida que em animais com 30 dias de vida, esclarecendo que o maior efeito da dieta CAF ocorre na vida adulta (MUCCELLINI *et al.*, 2014).

Considerando que alterações nutricionais durante períodos críticos do desenvolvimento, tais como, a gestação e lactação podem programar o metabolismo da prole favorecendo a instalação de obesidade na vida adulta, é necessário avaliar a interação de efeitos entre a dieta materna e a da prole; sua repercussão nos aspectos histomorfológicos da prole na vida adulta o que permitirá caracterizar melhor o processo de programação metabólica, com o intuito de atenuar ou mesmo reverter suas consequências a longo prazo.

REFERÊNCIAS

BLOOR, T.D.; SYMONDS, M.E. Sexual dimorphism in White and brown adipose tissue with obesity and inflammation. **Hormones and Behavior**, 2014.. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde e IBGE – **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009**: Despesas, rendimentos e condições de vida. Rio de Janeiro, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **VIGITEL** -. Monitoramento de fatores de risco para as doenças crônicas por entrevistas telefônicas, 2015.

BRAUN, M.; SCHELL, J.; SIEGFRIED, W.; MULLER, M.J.; RIED, J. Re-entering obesity prevention: a qualitative-empirical inquiry into the subjective aetiology of extreme obese adolescents. **BMC Public Health**, 2014.

BROWN, C.L.; HALVORSON, E.E.; CHOHEN, G.M.; LAZORICK, S.; SKELTON, J. Addressing childhood obesity: opportunities for prevention. **Pediatric Clin N Am**, pag.1241-1261, 2015.

CALVO, M.; BELTRÁN-DELSÓN, R.; RODRÍGUEZ-GALLEGO, E.; HERNÁNDEZ-AGUILERA, A.; GUIRRO, M.; MARINÉ-CASADÓ, R.; MILLÁ, L.; ALEGRET, J.M.; SABENCH, F.; CASTILHO, D.; VINAISCA, M.; RODRÍGUEZ, M.A.; CORREIG, X.; GARCÍA-ÁLVAREZ, R.; MENENDEZ, J.A.; CAMPS, J.; FORIN, J. Liver fat deposition and mitochondrial dysfunction in morbid obesity: Na approach combining metabolomics with liver imaging and histology. **World Journal of Gastroenterology**, pag. 7529-7544, June, 2015.

CASTELL-AUVÍ, A.; CEDÓ, L.; PALLARÉS, V.; BLAY, M.; ARVÉDOL, A.; PINENT, M. The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. **British Journal of Nutrition**, pag. 1155-1162, 2012.

CERF, M.E. High fat programming of beta cell compensation, exhaustion, death and dysfunction. **Pediatric Diabetes**, 2015.

CESARETTI, M.L.R.; JUNIOR, O.R. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: lições aprendidas. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. Vol. 50, n. 2. Abril, 2006.

COUSIN, B.; CASTEILLA, L.; LAHARRAGUE, P.; LUCHI, E.; LORSIGNOL, A.; CUMINETTI, V.; PAUPERT, J. Immuno-metabolism and adipose tissue the key role of hematopoietic stem cells. **Biochimie**, 2015.

DESAI, M.; JELLYMAN, J.K.; ROSS, M.G. Epigenomics, gestacional programming and risk of metabolic syndrome. **International Journal of obesity**, pag. 622-641, 2015.

DIEMEN, V.V.; TRINDADE, E.N.; TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta cirúrgica brasileira**. vol. 21, 2006.

DONATH, M.Y.; DALMAS, E.; SAUETR, N.S.; SONI-SCHNETZLER, M. Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. **Cell Metabolism**, 2013.

EBERTZ, C.E.; BONFELUR, M.L.; BERTAM, I.M.; MENDES, M.C.; LUBACZEUSKI, C.; ARAÚJO, A.C.F.; PAES, A.M.; AMORIM, E.M.P.; BALBO, S.L. Duodenal jejunal bypass attenuates non-alcoholic fatty liver disease in western diet-obese rats. **Acta Cir. Bras.** Vol 29. n. 9. SP, September, 2014.

ECKEL, R.H.; GRUNDY, S.M.; ZIMMET, P.Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, vol. 365, April 2005.

EL-KADER, S.M.A.; ASHMAWEY, E.M.S.E.D. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. **World Journal of Hepatology**, pag. 846-858, Abril, 2015.

FILHO, F.F.R.; MARIOSA, L.S.; FERREIRA, S.R.G.; ZANELLA, MT. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.** v. 50 n.2. Abril, 2006.

GENTRIC, G.; DESDOUETS, C. Polyploidization in liver tissue. **The American Journal of Pathology**. Vol. 184 n.2 February, 2014.

GHAZARIAN, M.; LUCK, H.; REVELO, X.S.; WINERS, S.; WINER, D.A. Immunopathology of adipose tissue during metabolic syndrome. **Turk Patoloji Der**, 2015.

GUELINKX, I.; DEVLIEGER, R.; BECKERS, K.; VANSAT, G. Maternal obesity: pregnancy complication, gestacional weight gain and nutrition. **Obesity reviews**, 2008.

GUIDOTTI, J.E.; BRÉGERIE, O., ROBERT, A.; DEBERY, P.; BRECHOT, C.; DESDOUETS, C. Liver cell polyploidization: A pivotal role for binuclear hepatocytes. **The Journal of Biological Chemistry**. Pag. 278 n.21. May, 2003.

GUARNANI, M.; BIRKEN, C.; HAMILTON, J. Childhood obesity: causes, consequences, and management. **Pediatr Clin N Am**, pag. 821-840, 2015.

HAIRI, N.; THIBAUT, L.; High fat diet induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, pag. 270-299, 2010.

HIGA, T.S.; SPINDOLA, A.V.; ALANIZ, M.H.F.; EVANGELISTA, F.A. Comparison between cafeteria and high-fat diets in the induction of metabolic dysfunction in mice. **Int Physiol Pathophysiol Pharmacol**, pag. 47-54, 2014.

HOWIE, G.J.; SLOBODA, D.M.; DAMAL,T.; VICKERS, M.H. Maternal nutrition history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **J. Physiol.** Pag. 905-915, 2009.

IDF. **Diabetes Atlas**. 5th. ed. International Diabetes Federation, 2012.

INGVORSEN, C.; BRIX, S.; OZANNE, S.E.; HELLGREN, L.I. Infect of maternal inflammation on foetal programming of metabolic disease. **Acta Physiol**, pag. 440-449, 2015.

IOZZO, P. Metabolic imaging in obesity: underlying mechanisms and consequences in the whole body. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 2015.

JACOBS, S.; TEIXEIRA, D.S.; GUILHERME, C.; ROCHA, C.F.K.; ARANDA, B.C.C.; REIS, A.R.; SOUZA, M.A.; FRANCI, C.R.; SANVITTO, G.L. The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. **Physiology & Behavior**, pag. 280-286, 2014.

JI, Y.; WU, Z.; DAI, Z.; SOL, K.; WANG, J.; WU, L. Nutritional epigenetics with a focus on amino acids: implications for the development and treatment of metabolic syndrome. **J Nutr Biochem**. Aug, 2015.

KAUR, J.A. Comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology Research and Practice**, 2014.

LEE, Y.; JUNG, Y.S.; CHOI, D. Recent advance in brown adipose physiology and its therapeutic potential. **Experimental & Molecular Medicine**, 2014.

LI, M.; SLOBODA, D.M.; VICKERS, M.H. Maternal obesity and developmental programming of disorders in offspring: Evidence from animal models. **Experimental Diabetes Research**, 2011.

LINNEMANN, A.K.; BAAN, M.; DAVIS, D.B. Pancreatic β - cell proliferation in obesity. **American society for nutrition**. Adv. Nutr., pag. 278-288, 2014.

MUCELINI, A.B.; GOULARTE, J.F.; CUNHA, A.C.A.; CACERES, R.C.; NOSCHANG, C.; BENETTI, C.S; SILVEIRA, P.P.; SANVITTO, G.L. Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats. **British Journal of Nutrition**. pag. 1499-1506, 2014.

NG, M. The GDB 2013 Obesity Collaboration Global, regional and national prevalence of overweight and obesity in children and adults 1980-2013: a systematic analysis. **Lancet**. Pag. 766-781, 2014.

OLIVEIRA, C.L.; FISBERG, M. Obesidade na infância e adolescência – uma verdadeira epidemia. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol**. Vol.47 n.2. Abril, 2003.

ONYEKWERE, C.A.; OGBERA, A.O.; SAMAILA, A.A.; BALOGUN, B.O.; ABDULKAREEN, F.F. Nonalcoholic fatty liver disease: synopsis of current developments. **Nigerian Journal of Clinical Practice**. Vol.18 n.6, 2015.

PEREIRA, T.J.; MOYCE, B.L.; KERELUIK, S.M.; DOLINSKY, V.W. Influence of maternal overnutrition and gestational diabetes on the programming of metabolic health outcomes in the offspring: experimental evidence. **Biochem. Cell Biol**. vol. 93 pag. 438-451, 2015.

PETRUZELLI, M.; MOSCHETTA, A. Intestinal ecology in the metabolic syndrome. **Cell Metabolism**. Elsevier. May, 2010.

PODRINI, C.; CAMBRIDGE, E.L.; LELLIOTT, C.J.; CARRAGHER, D.M.; ESTABEL, J.; GERDIN, A.K.; KARP, N.A.; SCUDAMORE, C.L.; PROJECT, S.M.G.; SOLIS, R.R.; WHITE, J.K. High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice. **Mamm Genome**, pag. 240-251, 2013.

PORTER, C.; CHONDRONIKOLA, M.; SIDOSSILL, L.S. The therapeutic potential of brown adipocytes in human. **Frontiers in Endocrinology**. vol. 6. October, 2015.

PROJETO DIRETRIZES, volume IX. São Paulo: Associação Médica Brasileira; Distrito Federal: Conselho Federal de Medicina, 2011.

ROSS, M.G.; DESAI, M. Developmental programming of offspring obesity, adipogenesis, and appetite. **Clinical obstetrics and gynecology**. Vol. 56 n.3 pag. 529-536. September, 2013.

SAMPEY, B.P.; VANHOOSE, A.M.; WINFIELD, H.M.; FREEMEXMAN, A.J.; MUEHLBAUER, M.J.; FUEGER, P.T.; NEWGARD, C.B.; MOKOWSKI, L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. **Obesity**. Vol. 19 n.6 June, 2011.

SANCHEZ-DELGADO, G.; MARTINEZ-TELLEZ, B.; OLGA, J.; AGUILERA, C.M.; GIL, A.; RUIZ, J.R. Role of exercise in the activation of brown adipose tissue. **Ann Nutr Metab**, pag. 21-32, 2015.

SEDAGHAT, K.; ZAHEDIASL, S.; GASEMI, A. Intrauterine programming. **Iranian Journal of Basic medical sciences**. vol. 18. pag. 212-220, 2015.

SEGOVIA, A.S.; VIKERS, M.H.; GRAY, C.; REYNOLDS, C.M. Maternal obesity, inflammation, and development programming. **Bio Med Research International**, 2014.

SMITH, C.J.; RYCKMAN, K.K. Epigenetic and developmental influence on the risk of obesity, diabetes, and metabolic syndrome. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**. pag. 295-302. June, 2015.

SULLIVAN, E.L.; KIPER, K.M.; LOCKARD, K.; VALLEARU, J.C. Maternal high-fat diet programming of the neuroendocrine system and behavior. **Hormones and Behavior**, 2015.

SZOSTAK-WEGIEREK, D. Intrauterine nutrition: long-term consequences for vascular health. **International Journal of Women's health**. pag. 647-656. July, 2014.

TAMASHIRO, K.L.K.; TERRILON, C.E.; HYUN, J.; KOENIG, J.I.; MORAN, T.H. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rats offspring. **Diabetes**. vol. 58. May, 2009.

TARRADE, A.; PANCHENKO, P.; JUNIEN, C.; GABORY, A. Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. **The Journal of experimental Biology**, 2015.

TUPONE, D.; MADDEN, C.J.; MORRISON, S. Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. **Frontiers in Neuroscience**. February, 2014.

VICKERS, M.H. Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease. **Nutrients**. Vol.6 pag. 2165-2178, 2014.

WENSVEEN, F.M.; VALENTIC, S.; SISTAN, M.; WENSVEEN, T.T.; POLIC, B. The "Big Bang" in obese fat: Events initiating obesity-induced adipose tissue inflammation. **Eur. J. Immunol**. Vol.45, pag. 2446-2456, 2015.

WHITE, C.L.; PURPERA, M.N.; MORRISON, C.D. Maternal obesity for programming effect on high fat diet offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. pag. 1464-1472. May, 2009.

WHITTLE, A.J.; LÓPEZ, M.; VIDAL-PUIG, A. Using brown adipose tissue to treat obesity the central issue. **Trends in Molecular Medicine**, vol.17 n.8. August, 2011.

WILLIAMS, A.S.; KANG, L.; WASSERMAN, D.H. The extracellular matrix and insulin resistance. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. Vol.58 n.7. July, 2015.

World Health Organization – WHO. **Physical status: the use and interpretation of anthropometry**, 1995.

World Health Organization – WHO. Consultation on obesity. **Obesity: preventing and managing the global epidemic: report of a WHO consultation**. Genova, 2000.

World Health Organization – WHO. **Noncommunicable diseases country profiles**, 2011.

World Health Organization – WHO. **World Health Statistics**, 2014.

World Health Organization – WHO. **Global status report on noncommunicable diseases**, 2014.

ZELTSER, L.M. Developmental influences on circuits programming susceptibility to obesity. **Frontiers in neuroendocrinology**, 2015.

ZOE, C.D.; AKYOL, A.; MCMULLER, S.L.; EVAM, S.C.L. Exposure of neonatal rats to maternal cafeteria feeding during suckling alters hepatic gene expression and DNA methylation in the insulin signalling pathway. **Genes Nutr.**, 2014.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

**THE MATERNAL AND OFFSPRING EXPOSURE TO CAFETERIA
DIET PROMOTES TISSUE-SPECIFICS MORPHOLOGICAL
CHANGES**

Life-long Maternal Cafeteria Diet Promotes Tissue-Specific Morphological Changes in Male Offspring Adult Rats.

Carolynne Doneda Silva Santos¹, Sandra Lucinei Balbo¹, Ana Tereza Bittencourt Guimarães¹, Sara Cristina Sagae², Fábio Negretti³, Sabrina Grassioli¹,

1 Program of Biosciences and Health, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, Paraná, Brazil

2 Center of Biological Sciences and Health, Universidade Estadual do Oeste do Paraná,

Cascavel, Paraná, Brazil

3 Pathologist, Cascavel, Paraná, Brazil

Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, PR, Brazil CEP: 858119-110

Correspondent author: caroldoneda@hotmail.com

Abstract

We, herein, evaluated whether the exposure of rats to a cafeteria diet pre- and/or post-weaning, alters histological characteristics in the White Adipose Tissue (WAT), Brown Adipose Tissue (BAT), and liver of young adult male offspring. Female Wistar rats were divided into Control (CTL; rats fed on standard rodent chow) and Cafeteria (CAF; fed on cafeteria diet during their entire life). After birth, male offspring only (F1) were divided into four groups (8 pups/dams) and received the CTL or CAF diet during their entire lives: CTL-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on control diet; CTL-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on control diet; CAF-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet; CAF-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet. Biometrics, metabolic parameters, and liver, BAT and WAT histology were assessed. Data obtained were integrated using the Principal Component Analysis (PCA). PCA showed that maternal CAF diet protects offspring from the deleterious effects provoked by the exposure to an obesogenic diet during adult life, as demonstrated by the absence of alteration in body weight and fat accumulation, but failed to protect BAT and liver, suggesting that the impact of maternal CAF diet is tissue-specific.

Key words: obesity, dams, offspring and histology

Introduction

Maternal over nutrition during pregnancy and lactation increases the risk of obesity, Metabolic Syndrome (MS) and Type 2 Diabetes (T2D) in the offspring during adulthood [1]. These early effects of the nutritional maternal environment on the growth and metabolism of offspring and their long-term impact on health are defined as metabolic programming [1,2,3]; a concept previously established by Barker and colleagues. These authors showed that an adverse fetal environment, followed by an obesogenic diet in postnatal life, may lead to chronic disease in adulthood [4]. Moreover, post-weaning exposure to hypercaloric diet induces the development of obesity, disruption in glucose-insulin homeostasis, dyslipidemia, liver steatosis, and cardiovascular diseases [5,6,7]. As such, experimental obesity can be produced by maternal or post-weaning dietary manipulations. The cafeteria diet (CAF) is a reliable model of dietary obesity in humans, promoting voluntary hyperphagia, body weight gain, exacerbated adipose tissue expansion, hyperglycemia and hyperinsulinemia, and inflammatory processes in the liver and adipose tissue [6,8]. It is well known that maternal life-time exposure to CAF diet induces body weight gain, higher adipose tissue content and metabolic abnormalities, such as hypercholesterolemia, hyperinsulinemia and hyperleptinemia [6]. This maternal state can induce metabolic programming in adult offspring, culminating in obesity and its associated metabolic disorders [9,10,11,12,13]. As such, the programmed metabolic phenotype, found in the offspring, could be exacerbated during growth, in particular when offspring are also exposed to a life-long obesogenic diet [6]. However, while the effects of maternal over nutrition on weight gain and metabolism in offspring, before weaning, are well characterized [1,3], their persistent effects on adipose tissue content, glucose tolerance, insulin resistance and liver abnormalities in adulthood are contradictory [5,6,14,15]. Thus, an understanding as to how pre- and post-natal environment interactions affect the growth and development of offspring is fundamental, since the timing of an insult determines which organ or systems will be altered, when obesity occurs and the severity of diseases, later in life [16,17,18]. As such, some tissues appear to be more vulnerable to nutritional insults during development. Thus, marked programming effects have been observed in White Adipose Tissue (WAT), Brown Adipose Tissue (BAT) and liver [19,20]. Surprisingly, it was recently shown that maternal over nutrition could protect against the deleterious effects of the obesogenic diet during adulthood [6]. In the present study, we evaluated whether the exposure to a CAF diet, pre- and post-

weaning (alone or combined), modifies the histological characteristics of the WAT, BAT and liver of young adult male offspring.

Materials and Methods

Experimental methods

The Committee on Ethics in Animal Experimentation of the State University of Western Parana approved all experiments (CEUA-10/12/2013). All animals used in this study were housed under controlled room temperature ($23\pm 3^{\circ}\text{C}$), light (12 h light/dark cycle), and had free access to food and water. At 21 days of age, 16 Wistar female rats were randomly divided into two dietary experimental groups: (1) Control group (CTL), fed on standard rodent chow (12.39 kJ/g — NuvilabTM, Colombo, Brazil) and water *ad libitum*; and (2) Cafeteria group (CAF), fed on a cafeteria diet. The CAF diet used in this study was adapted from previous studies [21,22]. Detailed information about the nutritional value and ingredients of all foods used in this model, demonstrating that the CAF diet, when introduced at weaning, is able to induce obesity in adult female rats, has been previously published [6].

At 70 d of age, CTL and CAF female rats ($n=16$) were mated with a control male ($n=8$) in a harem system (ratio of 2 females to 1 male) during approximately two weeks. The pregnant females were housed in individual cages until delivery. After birth, the litter size was adjusted to eight pups/dam, to maximize lactation performance. After weaning, these offspring (F1) were fed with CTL or CAF diets for 11 weeks and were allocated to the groups:

CTL-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on control diet

CTL-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on control diet

CAF-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet

CAF-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet.

Importantly, in all experimental groups the number of animals analyzed was 5-7 per group from five different litters. The experimental design is represented in Figure 1.

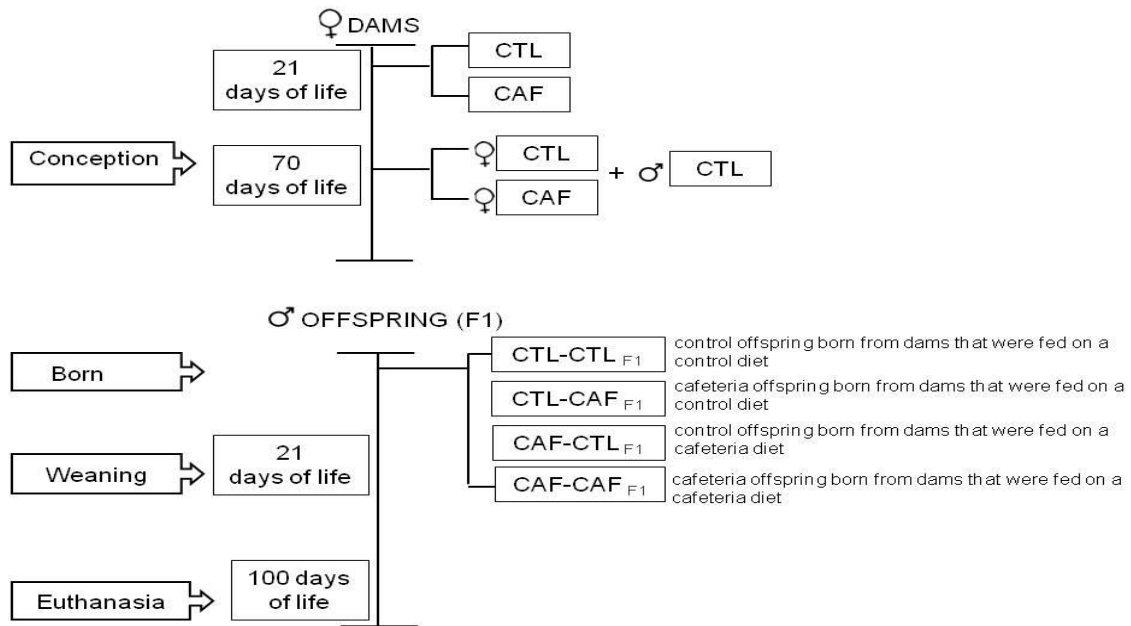


Figure 1 – Experimental design. After weaning (day 21), offspring were allocated to the groups: CTL-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on control diet; CTL-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on control diet; CAF-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on cafeteria diet; CAF-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on cafeteria diet.

Body Weight, Adipose Tissue Content and Plasma Metabolic Parameters

At 100 d of age, after 8 h of fasting, the body weights (b.w) of adult F1 offspring were evaluated. Rats were submitted to euthanasia, total blood was collected and the plasma separated by centrifugation. The concentrations of total cholesterol, triglycerides and glucose were quantified by a colorimetric method (LaborLab). The retroperitoneal fat depot was removed, weighed and values expressed as g/100g of bw. This fat depot was used as representative of WAT for histological analysis. Brown Adipose Tissue (BAT) and liver were also removed for histological analysis.

Histological Analysis

After removal of the retroperitoneal fat depot, BAT and liver were weighed, washed in saline solution and prepared for histological analysis. The liver was sectioned into 3 parts by transverse cuts in its major axis. The BAT was sectioned into 2 parts with cross sections in its major axis. The retroperitoneal fat depot was cut in 2 portions of 0.5 cm in diameter and 0.5 cm thick with the aid of a mold. Briefly, dissected tissues were fixed in 10% neutral buffered formalin (Merck, Buenos Aires, Argentina) for 72 h. Dehydration was performed by passing the samples through ethanol solutions of increasing graduation (70, 80, 90 and 100%), diafanization in xylol and final embedding in paraffin. The tissues were cut into 5-µm sections on a Reichert Jung rotary microtome (Leica RM 2025 Microsystems Inc., Wetzlar,

Germany) and Hematoxilin and Eosin (H&E) were used for staining. The slides were photographed using a light microscope (Olympus BX 50), coupled to a digital camera (SAMSUNG SHC-410NAD) using photo Micro 5.6 software. Sections were photographed along their entire length, field to field and the images captured were analyzed using the Image J 1.48v program, which was previously calibrated to 100x and 200x and standardized for the analysis of each image (Corel Draw X7 program). All analyzes were performed by a single observer.

Histological measurements were carried out for each tissue evaluated. The retroperitoneal fat depot was photographed at a magnification 100x and an adipocyte nuclei count performed. Additionally, all adipocytes in all the sections were circled and the adipocyte area (mm^2) was measured. For the BAT images were photographed at 200x magnification and cell proliferation evaluated by the adipocyte nuclei count (3 sections/slide). Qualitative analysis of the fat depot was also performed to assess fat droplets in the adipocyte cytoplasm. Finally, the diameters of the areas evaluated were delimited in the hepatic tissue (0.5 cm) using a default template. Areas were photographed at a magnification 100x and images were used for qualitative analysis of the presence of infiltrated fat in the hepatocyte cytosol. For this analysis, at least 20 photos were assessed by a single observer.

Statistical analysis

The body weight, weight of the retroperitoneal fat depot, triglycerides, cholesterol and glucose were assessed for normality by Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by the Levene test. The variables were compared by two-way ANOVA, maternal diet (CTL and CAF) and offspring diet (CTL_{F1} and CAF_{F1}) as factors to evaluate the effects of isolated factors and their interaction (F values) on the metabolic state of offspring. The Tukey-HSD post-hoc test used. Associations of biometric, metabolic plasma parameters and histological variables with maternal and offspring diet was made by Principal Components Analysis (PCA) [23]. Analyses were performed using the Prism 6.0 software (GraphPad Prism version 6.05 for Windows; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) and Past [24]. Differences were considered as significant when $p < 0.05$.

Results

Effect of maternal and offspring CAF diets on body weight, Liver, BAT, retroperitoneal adipose tissue content, triglycerides, glucose, and total plasma cholesterol in male adult F1 offspring, at 100d of age.

As shown in Table 1, at 100d of age, body weight was affected by the interaction between offspring and maternal diets ($F_{1,18}=7.423$; $p= 0.014$), as well as by the isolated effects of exposure to maternal ($F_{1,18}=5.86$; $p= 0.026$) or offspring diet ($F_{1,18}=61.11$; $p<0.0001$). Neither maternal nor offspring diets affect significantly the weight of liver and BAT in adult offspring at 100d of age. Thus, adult F1 offspring in the CTL-CAF_{F1} and CAF-CAF_{F1} groups presented higher body weights than the animals of the CTL-CTL_{F1} and CAF-CTL_{F1} groups. Retroperitoneal fat depot weight was influenced only by the offspring diet ($F_{1,18}=15.77$; $p= 0.0009$). Thus, adult F1 offspring in CTL-CAF_{F1} group presented higher retroperitoneal content compared with those of the CTL-CTL_{F1} and CAF-CTL_{F1} groups.

Table 1. Body weight, retroperitoneal adipose tissue content, liver weight, BAT weight, triglycerides, total cholesterol and plasma glucose concentrations in male adult F1 offspring aged 100 d.

	CTL-CTL	CTL-CAF	CAF-CTL	CAF-CAF	p-value mother	p-value offspring	p-value interaction
Body weight (g)	211.2±4.0 b,d	256.4±4.99 ^{a,c} d	212.5±3.76 ^b d	234.3±4.32 ^a b,c	0.026	<0.0001	0.014
Retroperitoneal fat weight (g/100g)	1.0±0.29 b	1.9±0.11 a,c	0.9±0.10 b	1.6±0.21	0.299	0.0009	0.580
Liver weight (g/100g)	3.25±0.19 b	3.87±0.05 a	3.59±0.10	3.58±0.12	0.860	0.033	0.030
BAT weight (g/100g)	0.25±0.08	0.19±0.02	0.21±0.02	0.29±0.03	0.574	0.806	0.151
Triglycerides (mg/dL)	181.0±25.9 b	450.0±106.9 a,c,d	116.0±7.6 b	219.1±28.1 b	0.041	0.009	0.353
Cholesterol (mg/dL)	51.1±4.4 b,d	75.3±5.9 a	62.9±1.7 d	91.0±8.2 a,c	0.027	0.0002	0.735
Glucose (mg/dL)	131.9±3.2 ^{b,c}	207.6±29.4 ^a	91.3±3.8 ^c	164.5±8.4 ^{a,b}	0.0052	<0.0001	0.926

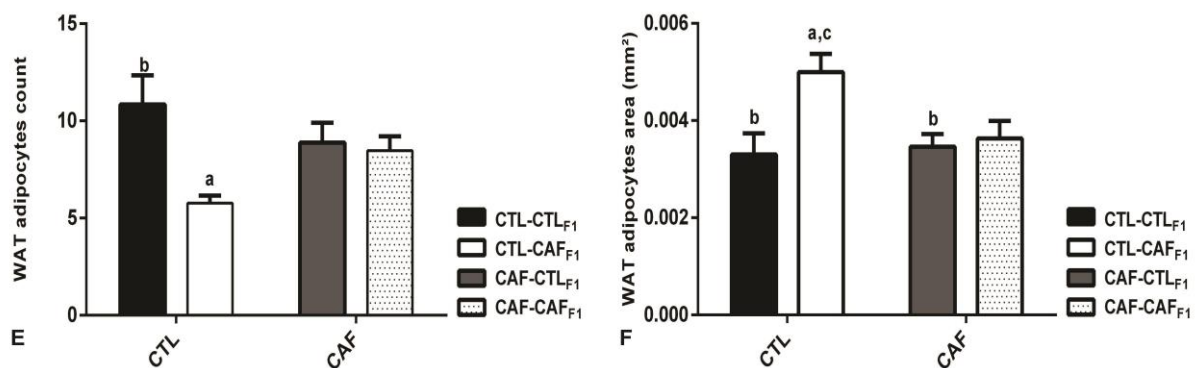
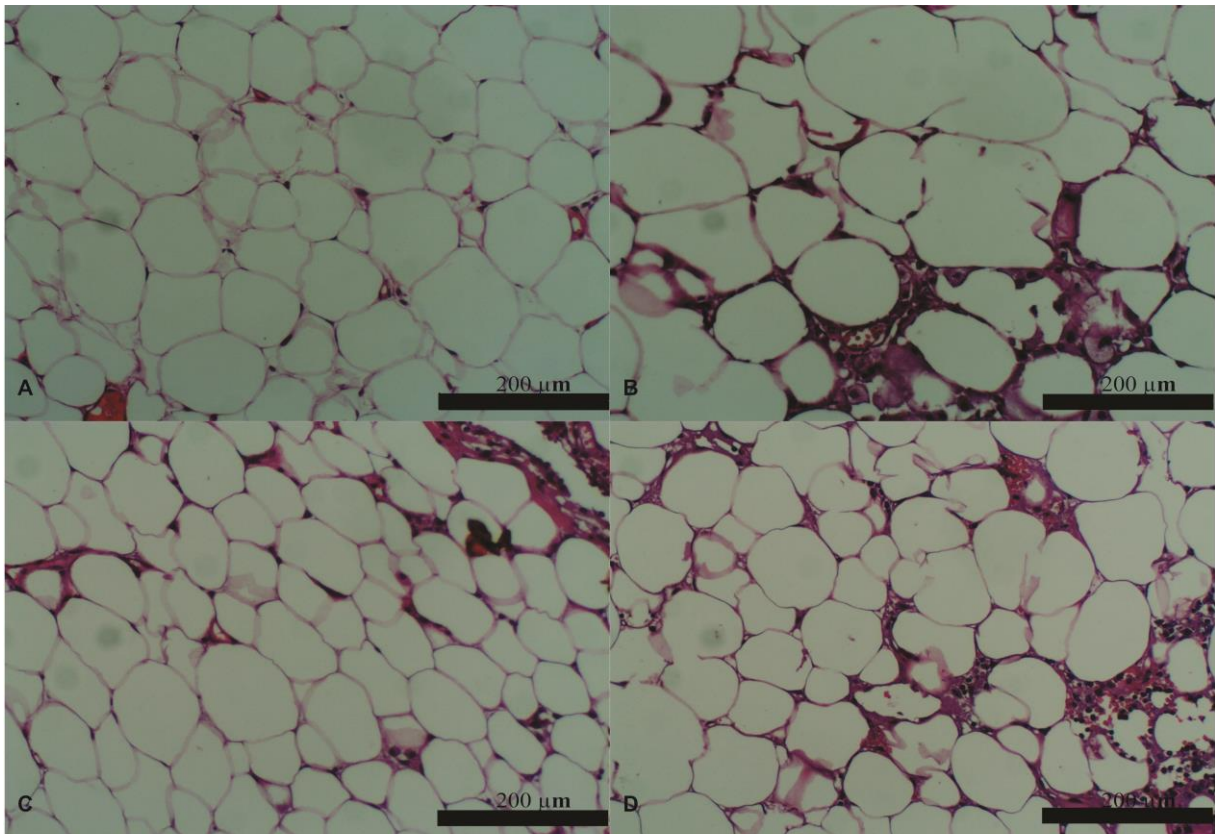
Data are mean ± SEM of each group. The letters above numbers represent statistical differences in Two-way ANOVA with Tukey post- test ($p<0.05$). ^a CTL-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on control diet; ^b CTL-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on control diet; ^c CAF-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet; ^d CAF-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet.

The exposure of the mothers to the CAF diet promoted isolated effects on plasma triglyceride levels, total cholesterol, and glucose ($F_{1,17}=10.66$; $p=0.004$; $F_{1,18}=5.84$; $p=0.02$; $F_{1,18}=4.94$, $p=0.039$; respectively). Similarly, the exposure of offspring to the diets also promoted isolated effects on the plasma triglyceride levels, total

cholesterol, and glucose ($F_{1,17}=16.87$; $p=0.0007$; $F_{1,18}=21.11$; $p=0.0002$; $F_{1,18}=19.99$, $p=0.0003$, respectively). No interactions between maternal and offspring diets were observed, as shown in Table 1. Thus, the concentration of triglycerides in plasma was significantly higher in CTL-CAF_{F1}, compared with other groups ($p<0.05$). In addition, at 100 d of age, the adult CTL-CAF_{F1} and CAF-CAF_{F1} groups displayed hypercholesterolaemia and hyperglycemia, compared with CTL-CTL_{F1}.

Some histological aspects of the retroperitoneal fat depot were altered only by post-weaning exposure to CAF diet. Adult F1 offspring in the CTL-CAF_{F1} group presented lower numbers of adipocytes and larger individual adipocyte sizes, in the retroperitoneal fat depot, when compared with adipocytes of the CTL-CTL_{F1} rats ($p<0.05$). Both adipocyte numbers ($F_{1,17}=7.76$; $p=0.01$; Figure 2E) and adipocyte size ($F_{1,17}=6.59$; $p=0.02$; Figure 2F) were affected only by post weaning exposure to CAF diet. Neither maternal nor post weaning exposure to the CAF diet altered inflammatory processes in the retroperitoneal fat depot (data not shown). The histological analyses of BAT are shown in Figure 3A-E. Cell proliferation in BAT was analyzed quantitatively by counting nuclei, revealing no significant difference between groups. Isolated effects of maternal or offspring diet, and no interactions were observed ($F_{1,18}=0.67$; $p=0.42$) (Figure 3E). Qualitative analysis demonstrated that only adult F1 offspring exposed to the CAF diet post weaning induced lipid accumulation in BAT. Thus, increased lipid droplet counts were found in BAT from adult F1 offspring of the CTL-CAF_{F1} and CAF-CAF_{F1} groups, compared with those of the CTL-CTL_{F1} and CAF-CTL_{F1} groups. However, the exposure of rats to the CAF diet, during the pre- or post-natal phases, resulted in fat deposition in the liver. Thus, in the CTL-CAF_{F1}, CAF-CTL_{F1} and CAF-CAF_{F1} groups lipid accumulation was found in the liver (Figure 4A-D).

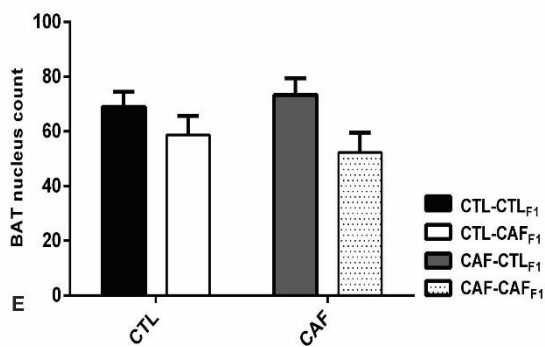
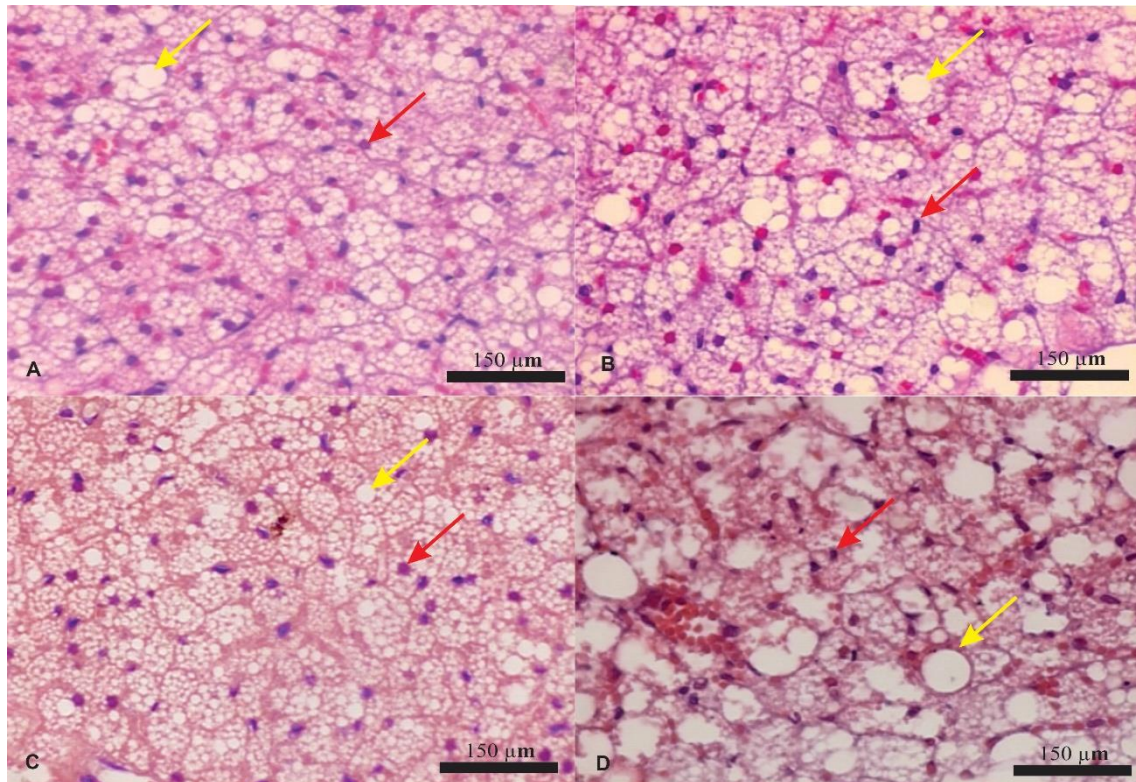
Figure 2. Effects of exposure to CAF diet during pre and post weaning, alone or in combination, on histological aspects of the retroperitoneal adipose tissue depot of male adult F1 offspring at 100d of age.



WAT adipocyte count/area

Representative histology of retroperitoneal adipose tissue depot with H&E staining (100X magnification); Figure 2A – D; Scale bars: 200 μ m. Histological data for adipocyte area (Figure 2E), measured for all cells, and adipocyte number (Figure 2F), expressed as mean \pm SEM. The letters above the bars represent statistical differences by Two-way ANOVA with the Tukey post- test ($p < 0.05$). a CTL-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on a control diet; b CTL-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on a control diet; c CAF-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet; d CAF-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet.

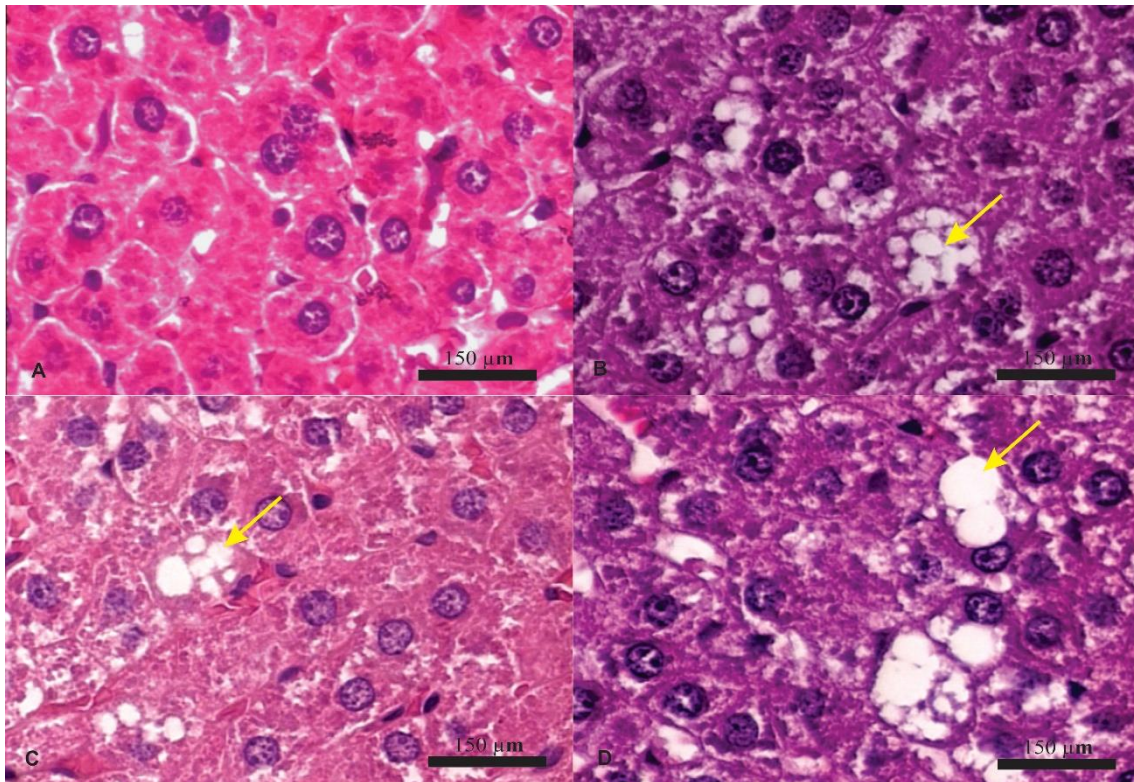
Figure 3. Effect of exposure to CAF diet pre and post weaning, alone or in combination, on histological aspects of BAT from male adult F1 offspring at 100d of age.



BAT nuclei count

Representative histology of BAT with H&E staining (200X magnification); Figure 3A – D; Scale bars: 150 μm. Qualitative histological analysis to evaluate the profile of lipid droplets in the cytosol of adipocytes. Quantitative analysis was performed of by nuclei counts and expressed as mean±SEM (Figure 3E). Nuclei are indicated by red arrows and lipid droplets are indicated by yellow arrows. The letters above bars represent statistical differences; Two-way ANOVA with Tukey post- test ($p < 0.05$). a CTL-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on a control diet; b CTL-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on a control diet; c CAF-CTL_{F1}, control offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet; d CAF-CAF_{F1}, cafeteria offspring born from dams that were fed on a cafeteria diet.

Figure 4. Effect of exposure to CAF diet pre and post weaning, alone or in combination, on histological aspects of the liver pf male adult F1 offspring at 100d of age.



Representative image of livers with H&E staining (200X magnification); Figure 4A – D; Scale bars: 150 μ m. Qualitative histological analyses evaluated the profile of lipid infiltration in the hepatocyte cytosol. Lipid droplets are indicated by yellow arrows.

Discussion

An adequate nutritional environment, during pregnancy and lactation, is critical for optimal offspring development [9,17,25]. As such, the current epidemics of MS and T2D in adulthood may result from maternal obesogenic diet during these critical phases of development [1]. However, the mechanisms underpinning maternal obesity and how they interfere in the programming of obesity risk, in adult offspring, are not well defined [6,15]. Here, we evaluated whether post-weaning exposure to a CAF diet would result in the amplification of this phenotype in the adult F1 offspring of dams exposed to a life-time of CAF diet. In particular, the histological aspects of the WAT, BAT and liver tissues of these offspring were compared. Surprisingly, adult F1 offspring, derived from dams exposed to life-long CAF diet, including during pregnancy and lactation periods, did not present alterations in body weight, adipose tissue content, and some plasma parameters. Our results are in agreement with those of other reports that have used an almost identical experimental design, and did not observe significant modifications in offspring [6,15], or only a marginal effect in the exacerbation of the obesity phenotype, in adult F1 offspring [5]. However, our findings contrast with data from other studies showing that offspring derived from

dams submitted to maternal hypercaloric diets display obesity and metabolic abnormalities in adult life [2,7,9]. In this sense, to evaluate the impact of CAF diet on maternal metabolism is important, once that, this state will determine the degree of metabolic programming on adult offspring. Using same CAF maternal diet in the present study, Sagae et al. 2015 and Mucellini et al. 2014 showed that the consume of CAF diet by female at long of life promotes rises in body weight associated with greater white adipose tissue accumulation; confirming the effectiveness of this diet to induce obesity in mothers. Moreover, Mucellini et al. 2014 also showed that maternal cafeteria diet does not alter glycemia or triglycerides levels, although induces hyperinsulinemia and the increase of total cholesterol. Therefore, it is important to keep in mind that the degree of mismatch between the pre- and postnatal environments may be crucial to metabolic programming. Thus, the initial adaptive physiological changes in fetal and pre-natal periods, necessary to guarantee survival, may be maladaptive in later life [26,27]. Nevertheless, our findings show that, independently of maternal diet, post-weaning exposure to the CAF diet promotes obesity, hyperglycemia, and dyslipidemia in adult F1 offspring. Mucellini et al. 2014, using the same experimental design that we used, including the same cafeteria diet, analyzed the offspring immediately after weaning (21 days of age) and evidenced no difference in the body weight of animals whose mothers were fed with cafeteria diet or standard diet; an effect also observed at 30 days of age. However, at 30 days of age, offspring fed with cafeteria diet showed higher visceral fat, without maternal diet influence. In rats, intense adipogenesis occurs during the last week of pregnancy and also during lactation; showing that these periods are particularly sensitive to the developmental programming of adiposity [16]. The expansion of WAT is morphologically characterized by increases in the sizes of individual adipose cells (hypertrophy) or augmented adipocyte numbers (hyperplasia) [16,28,29]. Any imbalance in this mechanism favors chronic inflammatory processes in this tissue, which are the hallmark of obesity and metabolic disorders [30]. Interestingly, we found the worst morphological profile in the WAT of adult F1 offspring exposed to the CAF diet just during post weaning; these alterations were characterized by adipocyte hypertrophy and a reduction in adipocyte numbers. Furthermore, the combined effect of maternal CAF diet with the post-weaning CAF diet (CAF-CAF_{F1} group) prevented morphological changes in the adipocytes in the adult F1 offspring, showing that maternal CAF diet did not exacerbate the obesity phenotype (induced by exposure to the CAF diet) during post

weaning. In fact, the maternal obesogenic diet appears to protect the WAT in adult F1 offspring. This protective effect of maternal overnutrition on adult F1 offspring has been previously reported [26,31], where authors suggested that the maternal obesogenic diet alters hypothalamic leptin signaling, programming the metabolism of adult offspring to minimize the degree of diet-induced obesity [25,30]. However, as described below, the impact of early life exposure to maternal CAF diet on morphological tissue aspects, in adult F1 offspring, appears to be tissue-specific.

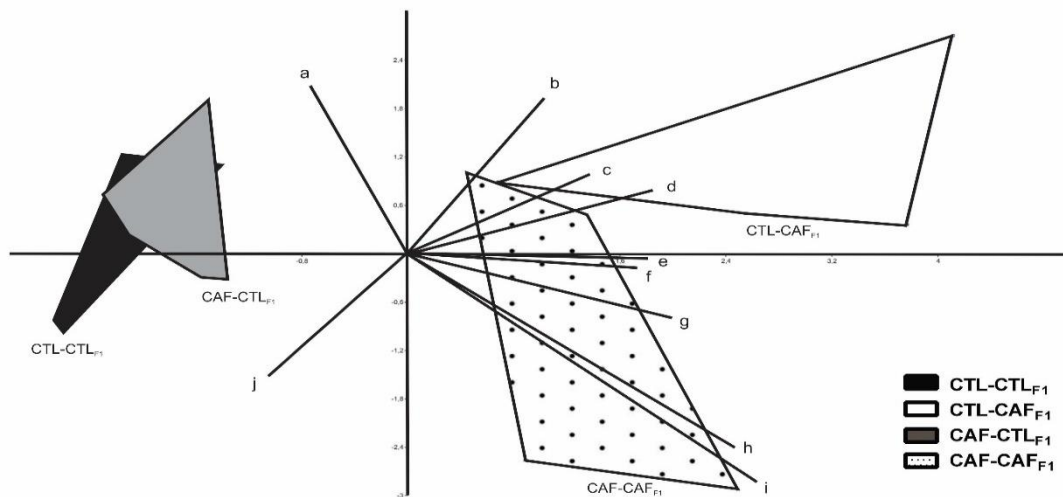
The development of BAT starts during pregnancy, with intense recruitment occurring during the lactation and post-weaning phases [31,32]. Thus, nutritional insults during these critical periods can reduce thermogenic activity in the BAT, thereby suppressing energy expenditure and, ultimately, promoting obesity in adulthood [33]. BAT adipocytes contain numerous smaller lipid vesicles, dispersed throughout the cytosol, giving a multilocular morphological aspect to this depot [28]. The profile of lipid droplets in the cytosol of BAT adipocytes reflects the degree of thermogenic activity and, indirectly, represents increased sympathetic flux driven to the tissue [34]. Maternal overnutrition induces functional and morphologic changes in the BAT of adult offspring, leading to fat deposition, inflammation, and alterations in the activity of sympathetic nerves [16]. However, our results show that the maternal exposure to CAF diet did not affect morphologic aspects in the BAT of adult F1 offspring that consumed a normal diet at post weaning. These results contrast with those obtained by others, where maternal CAF dietary was found to promote significant alterations in BAT in adult offspring that were not reversed by the exposure to a normal post-weaning diet [35,36]. As expected, we observed that post-weaning exposure to a CAF diet induces lipid overload in the BAT of adult F1 offspring, an effect that is independent of the maternal diet profile. Thus, in contrast to observations in the retroperitoneal depot, the maternal CAF diet did not protect adult offspring that were also exposed to a life-long CAF diet. In a recent review, BAT was reported to be vulnerable to nutritional insults, especially those occurring during the pre- and post-natal periods of life, as important autonomic sympathetic input and gene expression profiles are established during these periods [36,37]. Considering that WAT and BAT depots have different embryological origins, and employ different pathways of proliferation and differentiation during pregnancy and lactation, it is probable that the windows of vulnerability to nutritional insults are depot-specific, resulting in different morphological adjustments when animals are fed on a CAF diet, later on in life.

Taken together, we can draw two important conclusions from these results. Firstly, the maternal CAF diet does not modulate the metabolism, adipose tissue content or histological aspects of the retroperitoneal fat and BAT in adult offspring, at 100d of age, suggesting that maternal CAF diet, alone, does not alter the programming in these tissues. Secondly, while the exposure to maternal CAF diet, associated with post-weaning CAF exposure, protects WAT in adult F1 offspring, CAF diet exposure during the post-weaning period has a deleterious effect on the BAT, independently of the maternal diet. Considering that, at 100d of age, the rats are young adults, it is possible that the deleterious effects of programming in these tissues may occur at a more advanced age. This hypothesis is supported reports that the effects of maternal programs are found in adult offspring at 140-155d of age [9,38]. In addition, the impact of maternal diet on adult offspring is sex dependent, as females appear to be more sensitive to the effect of maternal diet programming, when compared with males [39].

In contrast to the observations in WAT and BAT, maternal exposure to a CAF diet exerts programming effects on the liver in adult F1 offspring, at 100d of age. Glucose and lipid homeostasis are dependent on liver metabolism and these events are intimately coupled to hepatic tissue function [40]. As such, abnormal lipid deposition in hepatocytes results in hepatic steatosis, a pathological state related to liver abnormalities, such as the nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD is the most common chronic liver disease present in obese subjects, and is closely associated with manifestations of MS [41,42]. Although hepatic steatosis is a key histological feature in this process, variations in morphological aspects have been observed; thus hepatocellular steatosis is usually classified as either macrovesicular or microvesicular [43]. Our data confirm the impact of the maternal CAF diet on the liver programming effect in adult F1 offspring, as previously demonstrated by others [44,45]. For example, it has been demonstrated that the administration of a hypercaloric diet to dams, during pregnancy and lactation, induces hyperlipidemia, increasing hepatic triglycerides and resulting in fat liver accumulation and, consequently, hepatic steatosis in offspring [19,43]. The maternal obesogenic diet can induce lipid deposition in the fetal liver before birth, a crucial event in metabolic disease during adult life [46]. Recently, using an identical experimental design to that of our study, a programming effect of maternal high fat diet was demonstrated on the liver of adult offspring [47]. Interestingly, in this study, the plasma metabolic parameters, body weight, and adipose tissue content were not programmed by

maternal obesogenic diet, corroborating our findings. Finally, in our study, we used a method denominated Principal Component Analysis (PCA), a classical multivariate exploratory tool that highlights common variation between variables, allowing conclusions to be made about the possible biological meaning of associations between them, without pre-establishing cause-effect relationships (Figure 5).

Figure 5. Principal Components Analysis (PCA) Diagram.



The letters in PCA represent a: Nucleus count in BAT; b: Adipocyte area in the retroperitoneal fat depot; c: Triglycerides; d: Body weight; e: Hepatic lipid accumulation; f: Glucose; g: Weight of retroperitoneal fat depot; h: Lipid infiltration in hepatocyte cytosol; i: Cholesterol; j: Adipocyte count in retroperitoneal fat depot.

Based on PCA, we conclude that post-weaning exposure to the CAF diet induces evident characteristics of MS in adult F1 offspring, such as an increase in body weight, and higher fat deposition in the WAT, BAT and liver. This culminates in adipocyte hypertrophy and deposition of fat in the liver, which probably contributes to hyperglycemia and dyslipidemia, present in these groups. Moreover, the PCA also indicates that life-long maternal CAF diet protects offspring from the deleterious effects provoked by exposure to life-long CAF diet. Thus, adult F1 offspring, in the CAF-CAF_{F1} group (representing the combined effect of maternal obesogenic CAF and post weaning CAF diet) are less predisposed to body weight gain and to retroperitoneal fat accumulation, resulting in better glycemia and plasma triglyceride levels, in relation to exposure only to the CAF diet during the post-weaning phase. However, the maternal CAF diet fails to protect BAT and liver, suggesting that the impact of the maternal obesogenic diet on adult F1 offspring is tissue-specific. This

study emphasizes the importance of the maternal diet during animals' entire life for establishing tissue-specific effects in the offspring in response to an obesogenic diet during adulthood.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Balbo; S. L. and Grassioli; S. designed the study. Santos; C.D. S.; Negretti, F. and Sagae; S. C. collected the data. Guimarães, A.T.B. analysed the data. Balbo; S. L.; Grassioli; S.; Santos; C.D. S. wrote the paper and performed corrections. All authors read and approved the final manuscript.

COMPETING INTERESTS

This manuscript describes original work and is not under consideration by any other journal. All authors approved the manuscript and this submission. None of the authors declared a conflict of interest.

FUNDING

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Doctor Antonio Carlos Boschero for performed corrections and Nicola Conran for editing English

References

1. Smith CJ, Ryckman KK. Epigenetic and developmental influences on the risk of obesity , diabetes , and metabolic syndrome. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy*. 2015;8:295–302.
2. Desai M, Jellyman JK, Ross MG. Epigenomics , gestational programming and risk of metabolic syndrome. *International Journal of Obesity*. 2015;39:633–641. doi:10.1038/ijo.2015.13.
3. Sedaghat K, Zahediasl S, Ghasemi A. Intrauterine programming. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015;18:212–220.
4. Barker, DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr* 23, *Suppl 6*: 588S–595S, 2004
5. King V, Norman JE, Seckl JR, Drake AJ. Post-weaning diet determines

- metabolic risk in mice exposed to overnutrition in early life. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2014;12(73):1–7. doi:10.1186/1477-7827-12-73.
6. Mucellini AB, Goularte F, Carla A, Araujo D, Noschang C, Benetti S, et al. Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats *British Journal of Nutrition*. *British Journal of Nutrition*. 2014;111:1499–1506. doi:10.1017/S0007114513003838.PLOS 9/12
7. Li M, Reynolds CM, Segovia SA, Gray C, Vickers MH. Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease : The Effect of Early Life Nutrition on Susceptibility and Disease Severity in Later Life. *BioMed Research International*. 2015;2015:1–12. doi:10.1155/2015/437107.
8. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freemerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation : Comparison to High-Fat Diet.
9. Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol*. 2009;4:905–915. doi:10.1113/jphysiol.2008.163477.
10. Li M, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal Obesity and Developmental Programming of Metabolic Disorders in Offspring : Evidence from Animal Models. *Experimental Diabetes Research*. 2011;2011:1–9. doi:10.1155/2011/592408. *Obesity*. 2011;19(6):1109–1117. doi:10.1038/oby.2011.18.
11. White CL, Purpera MN, Morrison CD. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296:1464–1472. doi:10.1152/ajpregu.91015.2008.
12. Daniel ZC, Akyol A, McMullen S, Langley-evans SC. Exposure of neonatal rats to maternal cafeteria feeding during suckling alters hepatic gene expression and DNA methylation in the insulin signalling pathway. *Genes Nutr*. 2014;9(365):1–10. doi:10.1007/s12263-013-0365-3.
13. Jacobs S, Teixeira DS, Guilherme C, Claudio FK, Aranda BCC, Reis AR, et al. *Physiology & Behavior* The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. *Physiology & Behavior*. 2014;129:280–286. doi:10.1016/j.physbeh.2014.03.003.
14. Tamashiro K, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. Prenatal Stress or High-Fat Diet Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Rat Offspring. *Diabetes*. 2009;58(May):1116–1125. doi:10.2337/db08-1129.

15. Akyol A, McMullen S, Langley-evans SC. Glucose intolerance associated with early-life exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon post-weaning diet. *British Journal of Nutrition*. 2012;107:964–978. doi:10.1017/S0007114511003916.
16. Lukaszewski Ma, Eberl´e D, Vieau D, Breton C. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(4):E1195–E1207. doi:10.1152/ajpendo.00231.2013.
17. Lee Hs. Impact of Maternal Diet on the Epigenome during In Utero Life and the Developmental Programming of Diseases in Childhood and Adulthood. *Nutrients*. 2015;7:9492–9507. doi:10.3390/nu7115467.
18. Ramírez-Lopez MT, Berrios MV, Gonzalez RA, Noemi R, Velilla B, Decara J, et al. El papel de la dieta materna en la programación metabólica y conductual: revisión de los mecanismos biológicos implicados. *Nutrición Hospitalaria*. 2015;32(6):2433–2445. doi:10.3305/nh.2015.32.6.9716.
19. Bringhenti I, Ornellas F, Martins MA, Mandarim-de lacerda CA, Aguila MB. Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice. *Nutrition Research*. 2015;35(2):136–145. doi:10.1016/j.nutres.2014.11.006.
20. Kayser BD, Goran MI, Bouret SG. Perinatal Overnutrition Exacerbates Adipose Tissue Inflammation Caused by High-Fat Feeding in C57BL / 6J Mice. *PlosOne*. 2015;10(4):1–15. doi:10.1371/journal.pone.0121954.
21. Reeves PG. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. In: *Simposium: Animal Diets for Nutritional and Toxicological Research*; 1997. p. 838–841. PLOS 10/12
22. Goularte F, Ferreira MBC, Sanvitto GL. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats *British Journal of Nutrition*. *British Journal of Nutrition*. 2012;108:1511–1518. doi:10.1017/S0007114511006933.
23. Hair JF, Black WC, Babin BJ, Anderson RE. *Multivariate Data Analysis*. vol. 7ed; 1998. Available from: <http://www.pearsonhighered.com/educator/product/Multivariate-Data-Analysis/9780138132637.page>.
24. Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*. 2001;4(1):9–18. doi:10.1016/j.bcp.2008.05.025.
25. Couvreur O, Ferezou J, Gripois D, Serougne C, Cr´epin D, Aubourg A, et al. Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams

- against obesity induced by a sucrose-rich diet. *PLoS ONE*. 2011;6(3). doi:10.1371/journal.pone.0018043.
26. Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic syndrome. *Physiology and Behavior*. 2006;88(3):234–243. doi:10.1016/j.physbeh.2006.05.039.
27. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS, Spencer HG. Predictive adaptive responses in perspective. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2008;19(4):109–110. doi:10.1016/j.tem.2008.02.002.
28. Cinti S. The adipose organ. *Disease Models & Mechanisms*. 2012;73:9–15. doi:10.1016/j.plefa.2005.04.010.
29. Bezpalko L, Gavrilyuk O, Zayachkivska O. Inflammatory response in visceral fat tissue and liver is prenatally programmed: experimental research. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2015;66(1):57–64.
30. Rosen ED, Spiegelman BM. NIH Public Access. *Nature*. 2006;444(7121):847–853. doi:10.1126/scisignal.2001449.Engineering.
31. Ferezou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007;293:R1056–R1062. doi:10.1152/ajpregu.00117.2007.
32. Giralt M, Martin I, Iglesias R, Vĩnas O, Villarroya F, Mampel T. Ontogeny and perinatal modulation of gene expression in rat brown adipose tissue to environmental temperature at birth. *Eur J Biochem*. 1990;193:297–302.
33. Cannon B, Nedergaard JAN. Brown Adipose Tissue : Function and Physiological Significance. *Physiol Rev*. 2004;84:277–359. doi:10.1152/physrev.00015.2003.
34. Tupone D, Madden CJ, Morrison SF. Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: Potential clinical applications for altering BAT thermogenesis. *Frontiers in Neuroscience*. 2014;8(8 FEB):1–14. doi:10.3389/fnins.2014.00014.
35. Dinh CHL, Szabo A, Yu Y, Camer D, Zhang Q, Wang H, et al. Bardoxolone Methyl Prevents Fat Deposition and Inflammation in Brown Adipose Tissue and Enhances Sympathetic Activity in Mice Fed a High-Fat Diet. *Nutrients*. 2015;7:4705–4723. doi:10.3390/nu7064705. PLOS 11/12
36. Barbato DL, Tatulli G, Vegliante R, Cannata SM, Bernardini S, Ciriolo MR, et al. Dietary fat overload reprograms brown fat mitochondria. *Frontiers in Physiology*. 2015;6(SEP):1–12. doi:10.3389/fphys.2015.00272.

37. Bayol AS, Farrington SJ, Stickland NC. A maternal 'junk food' in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and greater propensity for obesity in rat offspring. *British Journal of Nutrition*. 2007. Doi 10.1017/S0007114507812037.
38. Shankar, K, Harrell, A, Liu, X, Gilchrist, JM, Ronis, MJJ, Badger, TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R528–R538, 2008.
39. Onyekwere CA, Ogbera AO, Samaila AA, Bologum BO. Nonalcoholic fatty liver disease: synopsis of current developments. *Nigerian Journal of Clinical practice*. Nov-Dez 2015. Vol 18. Issue 6.
40. Zeltser LM. Developmental influences on circuits programming susceptibility to obesity. *Frontiers in Endocrinology*. 2015;39(Oct):17–27.
41. Calvo N, Beltran-debon R, Rodriguez-gallego E, Hernandez-aguilera A, Guirro M, Marine-casado R, et al. Liver fat deposition and mitochondrial dysfunction in morbid obesity : An approach combining metabolomics with liver imaging and histology. *World Journal of Gastroenterology*. 2015;21(24):7529–7544. doi:10.3748/wjg.v21.i24.7529.
42. Linnemann AK, Baan M, Davis DB. Pancreatic β -Cell Proliferation in Obesity 1, 2. *Advances in nutrition*. 2014;5:278–288. doi:10.3945/an.113.005488.278.
43. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2005;41(6):1313–1321. doi:10.1002/hep.20701.
44. Podrini C, Cambridge EL, Lelliot CJ, Carragher DM, Estabel J, Gerdin AK, et al. High-fat feeding rapidly induces obesity and lipid derangements in C57BL/6N mice. *Mamm Genome*. 2013;24:240–251. doi:10.1007/s00335-013-9456-0.
45. Bouane, S, Merzouk, H, Benkalfat, NB, Souliman, N, Merzouk, SA, Gusti, J, Tessier, C, Narci, M. Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. *Metabolism clinical and experimental*. 2010 (59):1701-1709.
46. Ingvorsen C, Brix S, Ozanne SE, Hellgren LI. The effect of maternal Inflammation on foetal programming of metabolic disease. *Acta Physiologica*. 2015;2:440–449. doi:10.1111/apha.12533.
47. Ito J, Nakagawa K, Kato S, Miyazawa T, Kimura F, Miyazawa T. The combination of maternal and offspring high-fat diets causes marked oxidative

stress and development of metabolic syndrome in mouse offspring. *Life Sciences*.
2016;151:70–75. doi:10.1016/j.lfs.2016.02.089.

5.1 ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO CEEAAP



unioeste

Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA

PARECER DE PROTOCOLO

O protocolo intitulado “Efeito da programação metabólica durante a gestação sobre aspectos reprodutivos dos filhotes”, 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, 10/12/2013

Profa. Dra. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA
Portaria nº 2861/2012-GRE

5.1 ANEXO B – NORMAS DA REVISTA CIENTÍFICA

Language editing

Hindawi has partnered with Editage to provide an English-language editing service to authors prior to submission. Authors that wish to use this service will receive a 10% discount on all editing services provided by Editage. To find out more information or get a quote.

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online Manuscript Tracking System. Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact tswj@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to tswj@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Microarray Data Submission

For any article that includes microarray data, this data should be deposited in an appropriate database such as Gene Expression Omnibus (GEO) or Array Express, and an entry name or accession number must be included in the manuscript prior to its publication. Microarray data should be MIAME compliant. During the reviewing

process, submitting authors are committed to provide the editor and the reviewers handling his/her manuscript with the login information by which they can access this information in the database.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

The Scientific World Journal is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of The Scientific World Journal, please visit the Article Processing Charges information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts.

If there is no conflict of interest, authors should state that “The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.”

Clinical Study

When publishing clinical studies, Hindawi aims to comply with the recommendations of the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) on trials registration. Therefore, authors are requested to register the clinical trial presented in the manuscript in a public trials registry and include the trial registration number at the end of the abstract. Trials initiated after July 1, 2005 must be registered prospectively before patient recruitment has begun. For trials initiated before July 1, 2005, the trial must be registered before submission.

International Commission on Zoological Nomenclature

When publishing papers which describe a new zoological taxon name, Hindawi aims to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN). Therefore, for all papers that include the naming of a new zoological taxon, authors are requested to contact Zoobank, the online registration system for the International Commission on Zoological Nomenclature, to obtain a Life Science Identifier (LSID). Moreover, authors are requested to insert the following text in the “Materials and Methods” section, in a subsection to be called “Nomenclatural Acts”:

The new names contained in this article are available under the International Code of Zoological Nomenclature. This work and the nomenclatural acts it contains have been registered in ZooBank. Zoobank Life Science Identifier (LSID) for this publication is: urn:lsid:zoobank.org:pub: XXXXXXXX. The LSID registration and any associated information can be viewed in a web browser by adding the LSID to the prefix "http://zoobank.org/."

Ethical Guidelines

In any studies that involve experiments on human or animal subjects, the following ethical guidelines must be observed. For any experiments on humans, all work must be conducted in accordance with the Declaration of Helsinki (1964). Papers describing experimental work which carries a risk of harm to human subjects must include a statement that the experiment was conducted with the human subjects' understanding and consent, as well as a statement that the responsible Ethical Committee has approved the experiments. In the case of any animal experiments, the authors must provide a full description of any anesthetic or surgical procedure used, as well as evidence that all possible steps were taken to avoid animal suffering at each stage of the experiment.