

**UNIVERSIDADE DE UBERABA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

FAUSTO JESUS RODRIGUES COELHO

**EFEITO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICO-NORMOPROTEICA RESTRITA EM
CARBOIDRATOS OFERTADA EM DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO DE
RATAS WISTAR E SUAS NINHADAS**

UBERABA-MG

2015

FAUSTO JESUS RODRIGUES COELHO

**EFEITO DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICO-NORMOPROTEICA RESTRITA EM
CARBOIDRATOS OFERTADA EM DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO DE
RATAS WISTAR E SUAS NINHADAS**

Trabalho apresentado à Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Biopatologia

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior

UBERABA-MG

2015

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Coelho, Fausto Jesus Rodrigues

C672e Efeito de uma dieta hiperlipídico-normoproteica restrita em carboidratos ofertada em diferentes fases da gestação de ratas Wistar e suas ninhadas / Fausto Jesus Rodrigues Coelho. – Uberaba, 2015
50f.: fig.: quad.: tab.

Dissertação (mestrado) -- Universidade de Uberaba, Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. 2015.
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior

1. Dieta experimental. 2. Gestação. 3. Nutrição. 4. Ratas Wistar I. Thedei Júnior, Geraldo. II. Universidade de Uberaba. Programa de Mestrado em Odontologia. Área de Biopatologia. III. Título.

CDD 613.2038

FAUSTO JESUS RODRIGUES COELHO

**EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICO-NORMOPROTEICA RESTRITA EM
CARBOIDRATOS OFERTADA EM DIFERENTES FASES DA GESTAÇÃO DE
RATAS WISTAR E SUAS NINHADAS**

Trabalho apresentado à Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Biopatologia

Aprovado em: Uberaba (MG), _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Geraldo Thedei Júnior
Universidade de Uberaba
Orientador

Prof. Dr. César Penazzo Lepri
Universidade de Uberaba

Profa. Dra. Rosekeila Simões Nomelini
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Aos meus pais Osvaldo Luis Coelho e Maria de Lourdes Rodrigues Coelho.

Ao meu irmão Flávio Luis Rodrigues Coelho

À minha esposa Regina Oliveira Lacerda Almeida

À minha filha Júlia Lacerda Rodrigues Coelho

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Geraldo Thedei Junior, minha sincera gratidão pela contribuição inestimável à minha formação acadêmica e científica, e pela dedicação e empenho em sua missão de ensino.

À profa. Tania Mara Sarraff Souza Moreira pela contribuição ao longo do estudo.

À Universidade de Uberaba pela oportunidade de concretizar este sonho.

Aos meus pais, irmão, esposa e filha pelo apoio e compreensão que sempre tiveram comigo.

Aos professores do Mestrado por compartilharem seus conhecimentos e pela dedicação e disponibilidade aos mestrandos.

Aos alunos da Iniciação Científica Aline de Freitas Mateus, Isac Souza Silva Rodrigues, Jéssica Campos Sousa, Kátia Beatriz Campos Rocha, Luana Rezende Guimarães, Luis Marcos Ferreira Junior, Michelle Borges Resende, Rafaela Kizzy Inácio dos Reis, Vivian de Souza Lemos, pela colaboração no desenvolvimento do deste estudo.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos Reis pelas contribuições no decorrer do desenvolvimento deste estudo.

Ao Prof. Dr. Valdo José Dias da Silva pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.

À Profa. Dra. Adilha Misson Rua Micheletti por sua contribuição e presteza na análise histopatológica.

Aos docentes da Universidade Federal do Triângulo Mineiro por sua contribuição em minha formação profissional.

À Dra. Élia Cláudia de Souza Almeida pela colaboração na construção do texto e análise resultados.

Ao Luiz Fernando Vaz Oliveira - técnico do Biotério Central da UNIUBE, pela colaboração no trato e manutenção dos animais.

À Aline Aparecida de Oliveira pela contribuição ao longo desta pesquisa.

À Rayne Bernardes Estevam pelo processamento do material histológico.

Aos amigos construídos ao longo da Pós-Graduação, em especial, Maria de Fátima Valim, Prof. Dra. Ana Cláudia Chesca, Odelcina Lemes de Jesus Silva pelo apoio, atenção e amizade.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho recebeu auxílio financeiro da Universidade de Uberaba (PAPE/UNIUBE- CNPq 2013/23) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (processos CDS – 1282/05 e CDS - APQ-2542 - 4.08/07)

RESUMO

COELHO, Fausto Jesus Rodrigues. **Efeito de uma dieta hiperlipídico-normoproteica restrita em carboidratos ofertada em diferentes fases da gestação de ratas Wistar e suas ninhadas.** 2015. 50f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade de Uberaba, Uberaba (MG), 2015.

As últimas décadas assistiram às mudanças substanciais no estilo de vida do homem, entre as quais o aumento da ingestão calórica e redução da atividade física, que resultou no ganho de peso. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de uma dieta hiperlipídica, normoproteica e restrita em carboidratos, ofertada em diferentes semanas gestacionais, em ratas Wistar e suas ninhadas. Foram utilizadas 17 ratas Wistar adultas e suas ninhadas. As mães receberam dieta comercial para ratos nas 3 semanas gestacionais (grupo C) ou dieta experimental restrita em carboidrato (3,5%), hiperlipídica (77%) e normoproteica (10%), nas diferentes semanas de gestação. Na lactação todos os grupos foram mantidos com dieta comercial *ad libitum*. A paridade de filhotes vivos e a mortalidade ao nascer foram contabilizadas no dia do nascimento até o final da lactação. O peso das mães e filhotes foi monitorado durante a gestação e lactação e o Índice de Lee foi determinado. Os órgãos foram pesados após eutanásia e a presença de esteatose hepática foi pesquisada nos fígados maternos. Analisou-se também a glicemia, colesterol total e frações, triglicérides, ureia e creatinina. Na análise estatística utilizou-se os testes Kolmogorov Smirnov, Bartlett, Brown Forsythe e Kruskal – Wallis, com pós-teste de Dunn, Duncan e Tukey, com significância de $p < 0,05$. A análise estatística revelou que a dieta não afeta o peso corporal das mães, bem como o peso da maioria dos seus órgãos. Observou-se esteatose hepática micro e macro vesicular nos grupos alimentados com a dieta experimental nas semanas um e três e redução da glicemia no grupo C em relação aos grupos Exp.S1 e Exp.S2. O grupo Exp.S2 apresentou maior peso ao nascimento em relação ao grupo C, mas não foi suficiente para alterar o Índice de Lee ao final da lactação. Nas ninhadas observou-se que houve alteração do peso do baço, músculo femoral direito e rins. Ocorreram alterações bioquímicas diferentes semanas tanto para as mães quanto para as ninhadas. Dessa forma, conclui-se que a dieta hiperlipídica, normoproteica e hipoglicídica ofertada em fases distintas da gestação não foi suficiente para

comprometer a evolução da gestação, parição, lactação, bem o desenvolvimento da prole.

Palavras-chave: Dieta com restrição de carboidratos. Dieta hiperlipídica. Wistar. Gestação.

ABSTRACT

COELHO, Fausto Jesus Rodrigues. **Effect of a hyperlipidic-normal protein diet restricted in carbohydrates offered at different stages of pregnancy to Wistar rats and their litters.** 2015. 50f. Dissertation (Master in Odontology) – University of the Uberaba, Uberaba (MG), 2015.

The latest decades attended the substantial changes in the lifestyle of the man, including the increase in caloric intake and reduced physical activity, which resulted in weight gain. This study aimed to evaluate the effects of a hyperlipidic-normal protein diet restricted in carbohydrates in Wistar rats and gestation their litters, offered at different gestational weeks. 17 adult Wistar rats were used and their broods. Mothers received commercial diet for rats and experimental diet restricted in carbohydrates (3.5%) hyperlipidic (77%) and normoprotein diets (10%), in different weeks of gestation. On lactation all groups were held with commercial diet ad libitum. The parity of pups alive and mortality at birth were accounted for on the day of birth until the end of lactation. The weight of mothers and pups was monitored during pregnancy and lactation. The organs were weighed after euthanasia, and the presence of hepatic steatosis was searched in maternal livers. Also examined glucose, total and fractions cholesterol, triglycerides, urea and creatinine. In the statistical analysis used the Kolmogorov Smirnov test, Bartlett, Brown Forsythe e Kruskal-Wallis, with post-test Dunn, Duncan and Tukey, with significance of $p < 0.05$. Statistical analysis revealed that the diet does not affect the body weight of mothers, as well as the weight of most of its organs. It was observed hepatic steatosis vesicular in micro and macro groups fed with experimental diet in weeks one and three and glucose lowering in group C compared to Exp.S1 and Exp.S2 groups. The Exp.S2 group had a higher birth weight compared to C group, but it was not enough to change the Lee index at the end of lactation. In broods was observed that there was a change in spleen weight, right femoral muscle and kidneys. There was biochemical changes in different weeks for both mothers and for the litters. It is concluded that the high-fat diet, normal protein and low-carbohydrate offered at different stages of pregnancy was not enough to compromise the evolution of pregnancy, parturition, lactation, and the development of the offspring.

Key words: Diet, carbohydrate-restricted. Diet, high-fat. Wistar. Pregnancy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ponteira adaptada para coleta do lavado vaginal	25
Figura 2 -	Fotomicrografia apresentando o estro. Predomínio de células cornificadas	26
Figura 3 -	Filhote submetido à eutanásia	29
Figura 4 -	Fotomicrografia do fígado das mães com coloração Hematoxilina Eosina	34

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Composição aproximada da dieta controle – LABCIL®	23
Quadro 2 -	Composição aproximada da dieta experimental	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica com restrição de carboidratos ofertada às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) no peso das ratas ao longo da gestação (gest), no momento do parto, durante a lactação (lact) e no Índice de Lee	33
Tabela 2	Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica com restrição de carboidratos ofertada às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) no peso relativo dos órgãos e tecidos das ratas ao final da lactação	34
Tabela 3	Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica com restrição de carboidratos ofertadas às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) nos parâmetros bioquímicos das ratas ao final da lactação	35
Tabela 4	Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica e restrição de carboidratos ofertada às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) sobre o peso ao nascer, na eutanásia e Índice de Lee dos filhotes	36
Tabela 5	Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica e restrição de carboidratos ofertada às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) no peso relativo (g/100g de peso corporal) de órgãos e tecidos (adiposo e muscular) dos filhotes na eutanásia ao final da lactação	37
Tabela 6	Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica com restrição de carboidratos ofertadas às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3), nos parâmetros bioquímicos dos filhotes ao final da lactação	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM2	Diabetes mellitus Tipo 2
DHLP	Dieta Hiperlipídico Normoproteica
EXP.S1	Dieta Hiperlipídico Normoproteica ofertada na 1ª Semana de gestação
EXP.S2	Dieta Hiperlipídico Normoproteica ofertada na 2ª Semana de gestação
EXP.S3	Dieta Hiperlipídico Normoproteica ofertada na 3ª Semana de gestação
DHNA	Doença hepática não-alcoólica
GEST	Gestação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
LACT	Lactação
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
HLP	Hiperlipídico proteica
VLDL	Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	HIPÓTESE	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	OBJETIVO GERAL	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	LINHAGEM DE RATOS	23
3.2	DIETAS	23
3.2.1	Dieta padrão (balanceada)	23
3.2.2	Dieta experimental	23
3.3	DESENHO EXPERIMENTAL	24
3.4	TRATAMENTO DOS ANIMAIS E CRUZAMENTO	25
3.5	PADRONIZAÇÃO DO NÚMERO DE FILHOTES/FÊMEA	26
3.6	DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA DIETA	27
3.6.1	No número e componentes da ninhada	27
3.6.2	No peso dos animais	27
3.6.3	Nas dosagens bioquímicas	27
3.6.3.1	<i>Dosagem de HDL</i>	27
3.6.3.2	<i>Dosagem de LDL</i>	28
3.6.3.3	<i>Dosagem de colesterol</i>	28
3.6.3.4	<i>Dosagem de triglicérides</i>	28
3.6.3.5	<i>Dosagem de glicose</i>	28
3.6.3.6	<i>Dosagem de ureia e creatinina</i>	28
3.6.4	Eutanásia	28
3.6.5	Determinação do Índice de Lee	29
3.6.6	No peso dos órgãos	30
3.6.7	Análise histopatológica do fígado	30
3.6.8	Análise do fígado	31
3.6.9	Análise estatística	32
4	RESULTADOS	33
4.1	EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA, NORMOPROTEICA E RESTRITA EM CARBOIDRATOS NAS MÃES	33
4.2	EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA, NORMOPROTEICA E RESTRITA EM CARBOIDRATOS NOS FILHOTES	36
5	DISCUSSÃO	39

6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXOS	50
	ANEXO A - Termo do Comitê de Ética em Experimentação Animal	50

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, ocorreram mudanças substanciais no estilo de vida do homem, entre as quais o aumento da ingestão calórica e redução da atividade física. Nesse sentido, este novo estilo de vida ultrapassou a capacidade de adaptação ao ambiente pelo genoma, tornando a obesidade uma epidemia mundial, atingindo pessoas de diferentes níveis socioeconômicos (HEBER, 2010).

A obesidade atinge pessoas em todas as fases da vida e suas causas são atribuídas aos maus hábitos alimentares, sobretudo, ao consumo de alimentos altamente calóricos e ao sedentarismo, e pode estar associada à predisposição genética do indivíduo. Sabe-se que muitas enfermidades, como hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, apneia, algumas neoplasias, doenças endócrinas e problemas pulmonares estão relacionados ao sobrepeso (KORNER; ARONNE, 2003; PEREIRA; FRANCISCHI; LANCHI, 2003).

Recentes investigações associam a obesidade às outras doenças crônico-degenerativas, tais como: dislipidemia, hiperinsulinemia, diabetes mellitus tipo 2 (DM2), hipertensão, aterosclerose e mais recentemente a esteatose hepática não alcoólica e alguns tipos de câncer que, em conjunto, contribuem para o aumento da morbimortalidade em todo o mundo (DÂMASO, 2009).

A obesidade é um problema de saúde pública mundial que pode levar à morte, e desde 1985 é caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura. Considerada uma doença crônica, que não é uma condição adquirida imediatamente, mas diante de um conjunto de comportamentos de risco, é uma patologia que está associada aos distúrbios metabólicos/endócrinos e cardiovasculares, entre os quais se destacam o DM2, dislipidemias e hipertensão arterial (MARTINEZ, 2000; BRAY et al., 2005; MENDES et al. 2006).

A partir dos anos 80 a obesidade tem sido considerada uma desordem nutricional evidente nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, de acordo com relatório da World Health Organization (WHO, 2015) mais de 1,9 bilhões de adultos de 18 anos ou mais estão com sobrepeso, desses, 13% são obesos. Os países em desenvolvimento nas últimas décadas e atualmente passam por uma mudança nutricional que é caracterizada pela diminuição da desnutrição e o aumento vertiginoso da obesidade (AMUNA; ZOTOR, 2008).

A incidência de obesidade, caracterizada por índice de massa corporal $> 30 \text{ kg/m}^2$, aumentou acentuadamente nas últimas décadas no Reino Unido e em todo o mundo (SÉBERT et al., 2009; PICCHI et al., 2011). De acordo com o Portal Brasil (2015) verificou-se que no país, em 2014, 50,8% da população estavam acima do peso ideal, desses 17,5% são obesos, e dentre eles 47,4% pertenciam ao sexo feminino.

Hábitos alimentares não saudáveis estão presentes em todas as fases do ciclo vital e podem prejudicar ainda mais grupos populacionais vulneráveis, como mulheres no período da gestação. Entre os hábitos que promovem o ganho excessivo de peso está a ingestão de alimentos com alta densidade energética, os quais, em geral, são alimentos pobres em fibras, micronutrientes e água, e com alto teor de gordura, açúcar ou amido (MARTINS; BENICIO, 2011).

Durante a gestação acontecem várias alterações no organismo materno que objetivam garantir o crescimento/desenvolvimento fetal e manter a higidez da gestante. As modificações que ocorrem levam às maiores demandas nutricionais o que acarreta um aumento proporcional dos nutrientes da alimentação materna, tanto nos períodos pré como pós-natal (ROGERS; VELTEN, 2011).

A interpretação da magnitude do ganho de peso durante o período gestacional foi e ainda é um tema controverso, que tem sofrido alterações ao longo das últimas décadas, passando de aproximadamente quatro a seis quilogramas nas primeiras décadas do século passado, para aceitação de uma variação do peso materno, coerentemente com o estado nutricional pré-gestacional (ANDRETTO; SOUZA; FIGUEIROA, 2006).

De maneira geral, no primeiro trimestre gestacional praticamente não ocorre ganho de peso, podendo até haver perda. A partir do segundo trimestre o ganho de peso ocorre de maneira mais proeminente (ANDRETTO; SOUZA; FIGUEIROA, 2006).

Estudos revelam que doenças no adulto podem ter origem durante o desenvolvimento fetal, em consequência do estresse sofrido durante o período gestacional (CALKINS; DEVASKAR, 2011; ROGERS; VELTEN, 2011).

O ganho de peso excessivo durante a gestação predispõe à obesidade pós-parto e às suas complicações. Segundo Martins e Benicio (2011), estudos evidenciaram a associação positiva entre o ganho ponderal excessivo na gestação e a retenção de peso por até três anos após o parto. A relação entre o maior consumo

de calorias e a elevação do ganho ponderal na gestação já foi demonstrada na literatura desde a década de 90. Atualmente, estudos buscam relacionar características e padrões alimentares durante a gestação com o ganho ponderal nesse período e a retenção de peso pós-parto.

Segundo Rifas-Shiman et al. (2009), a dieta materna durante a gravidez pode influenciar os resultados da gravidez e da infância, tais como: duração da gestação, crescimento fetal, defeitos de nascimento, pré-eclâmpsia, diabetes gestacional. A dieta, no primeiro trimestre gestacional, pode ser mais importante para o desenvolvimento e diferenciação de vários órgãos. Um maior peso da mãe no início da gestação está associado com muitos resultados adversos na gravidez, inclusive maiores taxas de macrossomia fetal e diabetes gestacional.

Tanto a qualidade quanto a quantidade da gordura da dieta materna, durante a última semana gestacional e durante a lactação, afetaram de forma diferencial o crescimento da prole e o perfil metabólico basal (TAMASHIRO et al., 2009).

Ratos alimentados com uma dieta hiperproteica e hiperlipídica (55% de proteínas e 45% de lipídeos), e isenta de carboidratos, apresentaram menor ganho de peso corporal, que os ratos alimentados com dieta apenas com baixo teor de carboidratos ou normoglicídica. A explicação é que dietas pobres em carboidratos levam a um menor peso corporal em decorrência de menor deposição de gordura, bem como de menor consumo de energia (PICHON et al., 2006).

Além disso, Borba et al. (2011) apontaram que uma dieta hiperlipídico-proteica (HLP) com baixo teor de carboidratos, que em seres humanos é utilizada para perda de peso, induz a um significativo ganho de massa corporal, com aumento do tecido adiposo em ratos, quando comparada a uma dieta balanceada. A dieta HLP causa esteatose hepática e alterações em parâmetros bioquímicos, que representam uma piora da condição de saúde dos animais.

Burlamaqui et al. (2011) observaram que a esteatose hepática ocorreu em uma proporção muito maior em animais que receberam uma alimentação hipercalórica e hiperlipídica (72,7%) do que em animais que receberam dieta controle (18,2% lipídeos). O risco de esteatose foi maior no grupo experimental, visto que peroxidação lipídica favorece o desenvolvimento de DHNA (Doença hepática não-alcoólica).

DHNA é o tipo mais comum de lesão hepática crônica em muitos países e suas manifestações variam de esteatose simples para esteato-hepatite não-alcoólica

(DHNA) até a fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular. A prevalência de DHNA, atualmente entre 15% e 40% em populações ocidentais e entre 9% e 40% em populações asiáticas, aumentou significativamente ao longo dos últimos 15 anos, principalmente em razão da sua associação com as duas maiores epidemias atuais do mundo: a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (BURLAMAQUI et al., 2011).

A patogênese da DHNA não é completamente compreendida, mas a resistência à insulina, estresse oxidativo e inflamação desempenham um papel importante no desenvolvimento e na progressão da doença. Além disso, níveis anormalmente elevados de ácidos graxos livres em circulação têm sido correlacionados com a gravidade da DHNA (BURLAMAQUI et al., 2011).

Picchi et al. (2011) submetem ratas Wistar a uma dieta hiperlipídica e com baixo teor de carboidratos e observaram que os animais que consumiram uma dieta rica em gordura ingeriram uma quantidade menor de alimentos, em contraste com a hipótese de que dietas com elevado teor de gordura promovem hiperfagia em roedores. Observou-se que a dieta de elevado teor de gordura não induziu maior ganho de peso, mas conduziu a um maior ganho de gordura hepática.

Uma dieta com 20% de proteína, 77% de gordura e 3% de carboidratos, oferecida durante todo o período de gestação reduz a taxa de prenhez, afeta negativamente a sobrevivência neonatal, afeta também os parâmetros bioquímicos e anátomo-patológicos de ratas Wistar e suas ninhadas (MOREIRA, 2012).

Além disso, a dieta hiperlipídica permite caracterizar o desenvolvimento da obesidade e a avaliação das intervenções antiobesidade num ambiente experimental *in vivo*, fisiopatologicamente muito semelhante à doença humana. Isto contribuiu imensamente para a compreensão da obesidade e da resistência à insulina provenientes da dieta e muitos conceitos fisiopatológicos no campo, por exemplo, a importância da deposição de gordura hepática, a interação entre inflamação e resistência à insulina (BUETTNER; SCHOLMERICH; BOLLHEIMER, 2007).

Diante do exposto apresenta-se a hipótese deste estudo.

1.1 HIPÓTESE

A hipótese nula deste estudo foi que a alimentação de ratas com uma dieta hiperlipídica, normoproteíca com restrição de carboidratos, ofertada em diferentes semanas da gestação, não atende as necessidades para o desenvolvimento adequado de gestação e lactação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta pesquisa foi determinar o efeito de uma dieta hiperlipídica, normoproteica e com restrição de carboidratos na gestação de ratas Wistar e suas ninhadas, quando a referida dieta for ofertada durante a primeira, segunda ou terceira semana de gestação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste estudo compreendem a determinação do efeito da oferta, em diferentes fases da gestação, de uma dieta hiperlipídico, normoproteica com restrição de carboidratos nos seguintes parâmetros:

- a) número de componentes da ninhada no nascimento e ao final da lactação;
- b) peso das mães (gestação e lactação);
- c) peso da ninhada (no nascimento e ao final da lactação);
- d) níveis bioquímicos (glicemia, trigliceridemia, colesterol e frações, ureia e creatinina) das ratas e seus filhotes ao final da lactação;
- e) parâmetros anatômicos (peso de órgãos e tecidos) das ratas e de seus filhotes, ao final da lactação;
- f) características histológicas do fígado das ratas ao final da lactação.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a realização desta pesquisa, o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade de Uberaba (UNIUBE) sob o número de 015/2010 de 14 de dezembro de 2010 (ANEXO A).

3.1 LINHAGEM DE RATOS

Foram utilizados machos e fêmeas de ratos Wistar adultos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade de Uberaba, pesando entre 250 a 300 gramas.

3.2 DIETAS

3.2.1 Dieta padrão (balanceada)

O grupo controle recebeu dieta comercial balanceada para ratos (LABCIL), composta por carbonato de cálcio, cloreto de sódio (sal comum), farelo de arroz, de soja, de trigo, melaço, milho integral moído, óleo de soja degomado e premix mineral e vitamínico. Cada 100g dessa ração fornece 290 Kcal, conforme indicação do fabricante.

Quadro 1 - Composição aproximada da dieta controle – LABCIL®.

INGREDIENTES	QUANTIDADE (%)
Carboidratos	55,57
Proteínas	22,93
Fibras	7,60
Gorduras	3,35

Fonte: Dados do fabricante (2014).

3.2.2 Dieta experimental

A dieta experimental, já padronizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade de Uberaba, teve a composição descrita no quadro 2, fornecendo 770 Kcal/100g.

Todos os componentes foram homogeneizados em batedeira industrial, obtendo-se uma formulação homogênea de consistência pastosa. Após o preparo, a ração foi separada em porções de aproximadamente 400g, etiquetada e congelada a -10°C, sendo descongelada previamente ao uso.

Quadro 2 - Composição aproximada da dieta experimental.

INGREDIENTES	G	% calórico
Banha de porco (comercial)	74,0	87,2
Caseína	19,10	9,4
Sacarose	6,90	3,4
Bitartarato de colina	0,25	
Colesterol	0,12	
Fibra (celulose microcristalina)	0,16	
L- cistina	0,30	
Mix mineral	3,50	
Mix vitamina	1,00	

Fonte: Dados coletados pelo autor (2014).

3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

Foram utilizados dois machos e 17 ratas Wistar, pesando entre 250 e 300 gramas, divididas aleatoriamente em quatro grupos de acordo com as dietas que foram oferecidas nas três semanas de gestação:

- **Grupo 1 (Controle):** composto por quatro ratas, que receberam dieta balanceada comercial durante as três semanas de gestação;
- **Grupo 2 (Exp.S1):** composto por quatro ratas, que receberam dieta experimental na primeira semana e dieta comercial balanceada na segunda e terceira semanas;
- **Grupo 3 (Exp.S2):** composto por cinco ratas, que receberam dieta experimental na segunda semana e dieta comercial balanceada na primeira e terceira semanas;
- **Grupo 4 (Exp.S3):** composto por quatro ratas, que receberam dieta experimental na terceira semana e dieta comercial balanceada na primeira e segunda semanas.

A lactação de todos os grupos foi feita com as mães se alimentando de dieta comercial balanceada.

3.4 TRATAMENTO DOS ANIMAIS E CRUZAMENTO

Os animais foram mantidos nas dependências do Biotério Central da Universidade de Uberaba, sendo tratados com água e ração “*ad libitum*”, em temperatura entre 22 e 26°C, com ciclo de iluminação de 12 horas claro e 12 horas escuro alojados em caixas de polietileno (largura 32 cm, profundidade 40 cm e altura 16 cm), forradas com maravalha autoclavada (121°C, por 20 minutos em autoclave vertical).

Antes do período experimental, os animais permaneceram no biotério por uma semana e durante esse período de adaptação as ratas foram vermifugadas pela administração de Fenbendazole 0,01ml/100g durante cinco dias, por gavagem.

Após o período de adaptação, as fêmeas foram aleatoriamente divididas entre os grupos 1 a 4 descritos acima.

O estro foi verificado por esfregaço vaginal.

Para verificação do estro utilizou-se lavado vaginal, esse foi realizado com auxílio de uma pipeta, adaptada de uma micropipeta e látex de garrote (Figura 1), que possa conter aproximadamente 1ml de solução salina 0,9%. As bordas da ponteira deveriam ser rombas a fim de não machucarem as paredes vaginais. A ponteira foi introduzida no orifício vaginal, instilou-se 1mL de solução salina na vagina das ratas. Imediatamente após, esta foi coletada e colocada em lâmina de vidro para visualização ao microscópio, com aumento de 100 e 400x, sem a utilização de lamínula (VILELA; SANTOS JÚNIOR; SILVA, 2007).

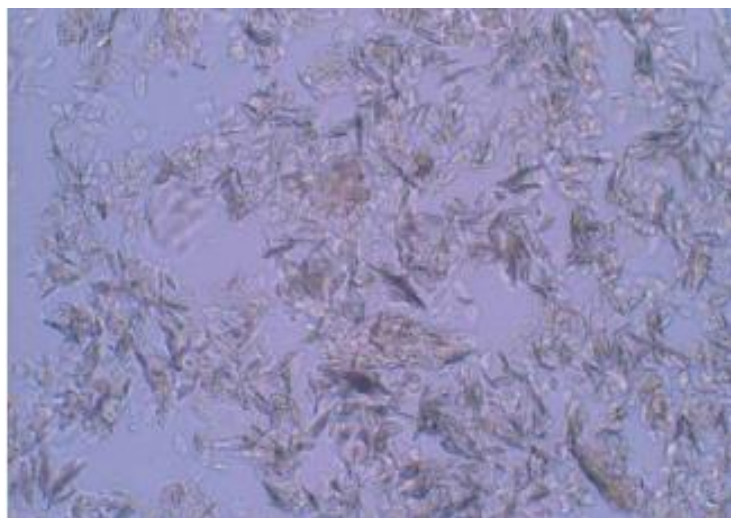
Figura 1 - Ponteira adaptada para coleta do lavado vaginal.



Fonte: Acervo do autor (2014).

A coleta foi realizada diariamente, até a verificação do estro (Figura 2). O reconhecimento do ciclo estral é importante para determinar o momento de fertilidade. Com a diminuição dos níveis hormonais do estradiol, característico do período ovulatório, as células apresentavam características de cornificação, com aspecto de “folhas secas” (VILELA; SANTOS JÚNIOR; SILVA, 2007).

Figura 2 - Fotomicrografia apresentando o estro. Predomínio de células cornificadas.



Fonte: Vilela, Santos Júnior e Silva (2007).

Após a verificação do estro, os machos foram alojados nas caixas junto com as fêmeas, na proporção de um macho para cada fêmea, por um dia. Ao fim desse tempo os machos foram retirados e as fêmeas submetidas novamente à coleta de esfregaço vaginal a fim de detectar a presença de espermatozoide no líquido vaginal. Quando presentes, as fêmeas foram consideradas como prenhas, e, então, separadas em caixas de polietileno individuais com maravalha autoclavada, nas quais permaneceram durante todo o período de gestação (21 dias) até o término da lactação (21 dias).

3.5 PADRONIZAÇÃO DO NÚMERO DE FILHOTES/FÊMEA

Uma vez verificado o nascimento de cada uma das ninhadas, foi retirado o número de filhotes necessário para que cada ninhada ficasse com a composição de oito filhotes. O número excedente foi eutanasiado imediatamente.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS EFEITOS DA DIETA

3.6.1 No número e componentes da ninhada

No período esperado para o nascimento das ninhadas, as fêmeas foram observadas diariamente, visando contabilizar o número de componentes da ninhada.

3.6.2 No peso dos animais

As ratas foram pesadas semanalmente durante o período de adaptação e durante a gestação e lactação. O controle de peso dos filhotes foi feito ao nascimento e ao final da lactação. Em todas as pesagens foi utilizada uma balança digital Filizolla® – Brasil com precisão de 0,5g.

3.6.3 Nas dosagens bioquímicas

A coleta do sangue, foi feita em veia cava caudal e todos os parâmetros bioquímicos do sangue foram determinados utilizando amostras de plasma não hemolisado e kits comerciais enzimáticos ou colorimétricos (Biotécnica® São Paulo), utilizando-se o método automatizado, com o aparelho Vital Scientific – Vitalab Selectra E®. As coletas foram realizadas no momento da eutanásia.

Em todas as dosagens foi feita uma curva de calibração com amostras fornecidas pelo fabricante. O LDL-colesterol foi determinado pela fórmula:

$$\text{Fórmula de Friedwald}$$
$$\text{LDL} = (\text{TCO} - \text{HDL}) - (\text{TG}/5)$$

3.6.3.1 Dosagem de HDL

A dosagem de HDL foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando o sistema enzimático Colesterol oxidase/peroxidase segundo as indicações do fabricante.

3.6.3.2 Dosagem de VLDL

A dosagem de VLDL foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando o sistema enzimático Colesterol oxidase/peroxidase, segundo as indicações do fabricante.

3.6.3.3 Dosagem de colesterol

A dosagem de colesterol foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando o sistema enzimático Colesterol oxidase/peroxidase, segundo as indicações do fabricante.

3.6.3.4 Dosagem de triglicérides

A dosagem de triglicérides foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, utilizando-se o sistema lipase lipoproteica/glicerolquinase/ glicerol-3-fosfato oxidase/peroxidase.

3.6.3.5 Dosagem de glicose

A dosagem de glicose foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, empregando o método Enzimático da Glicose oxidase, segundo as indicações do fabricante.

3.6.3.6 Dosagem ureia e creatinina

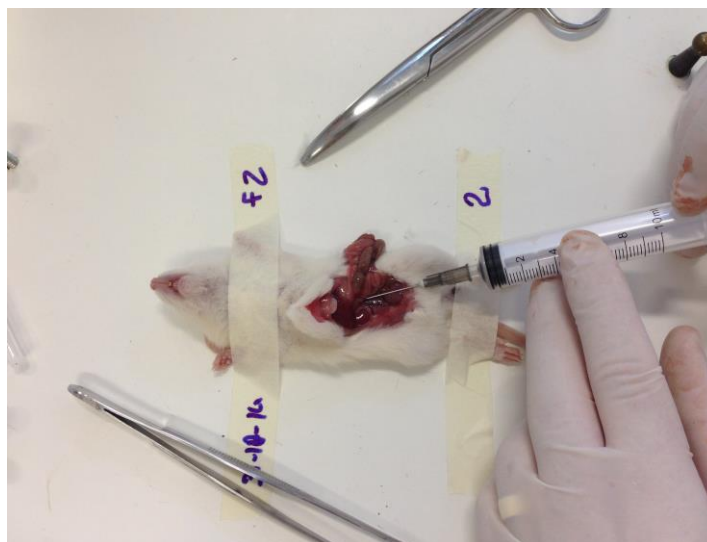
A dosagem da ureia foi realizada com Kit diagnóstico laboratorial, empregando o método Enzimático colorimétrico, segundo as indicações do fabricante.

3.6.4 Eutanásia

Ao final da lactação, as ratas e os filhotes de 21 dias foram mantidos por 12 horas em jejum e então anestesiados pela administração de 50 mg/Kg de Cetamina

e 10 mg/Kg de Xilazina, administrados na mesma seringa por via intraperitoneal. Após a confirmação da anestesia (por meio da ausência de sinais como reflexo da cauda e reflexo palpebral), os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica (tábua revestida com fórmica), os membros foram imobilizados e o animal foi submetido à laparotomia e exposição da cavidade abdominal. O sangue foi coletado pela veia cava caudal para as análises bioquímicas. O diafragma foi seccionado, provocando pneumotórax, que levaria o animal à morte por hipóxia. Em seguida, foi feita a perfusão com solução salina (aproximadamente 20mL) para lavagem do sistema vascular e com formol tamponado (20mL aproximadamente) para fixação dos órgãos.

Figura 3 - Filhote submetido à eutanásia.



Fonte: Acervo do autor (2014).

3.6.5 Determinação do Índice de Lee

Após a eutanásia dos animais (mães e filhotes após a lactação) mediu-se o comprimento naso-anal dos animais (cm) e determinou-se o peso (gramas). O Índice de Lee foi determinado pela seguinte fórmula conforme (ÁGUILA et al., 2002):

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{\text{peso em (g)}}}{\text{comprimento naso anal (cm)}} \times 1000$$

3.6.6 No peso dos órgãos

Os animais (mães e filhotes ao final da lactação) foram eutanasiados conforme descrito acima (item 3.6.4). Imediatamente, foi colhido o sangue e órgãos (baço, cérebro, coração, fígado, rins, útero, testículos), gordura visceral, peri-uterina, peri-epididimal, peri-renal, além de fragmento do músculo quadríceps femoral direito. Esses foram dissecados, pesados individualmente e fixados em formol tamponado. O peso de cada órgão foi expresso em g/100g de peso corporal do animal.

3.6.7 Análise histopatológica do fígado

Todos os fígados das mães foram submetidos à análise histológica.

Foi escolhido o maior lobo do fígado, a fim de garantir melhor qualidade do espécime. Desse lobo foi retirado um fragmento de aproximadamente 0,5cm x 0,5 cm x 0,3 cm de espessura, que incluísse parênquima hepático (sem a cápsula). Esse fragmento foi submetido ao processamento histológico de rotina do Laboratório de Histopatologia da Universidade de Uberaba, composto pelos seguintes passos:

- **Fixação:** o fragmento do maior lobo do fígado foi retirado para análise histopatológica e foi fixado em formaldeído por 24h;
- **Desidratação** a peça foi submetida aos banhos sucessivos de etanol em concentração crescente (70% -100%);
- **Diafanização:** a seguir o fragmento foi submetido ao álcool/xilol na concentração 1:1, por 30 minutos, seguido de banhos sucessivos de xilol: Xilol I - 25 minutos; Xilol II - 25 minutos; Xilol III - 25 minutos;
- **Impregnação pela parafina:** a seguir o fragmento foi submetido aos banhos de parafina (Histosec Pastilha – Merck®) a 60°C no interior da estufa por duas horas;
- **Inclusão:** posteriormente, o fragmento foi transferido para a forma com parafina fundida obtendo-se o bloco de parafina (Histosec Pastilha – Merck®);
- **Microtomia:** foram realizados cortes seriados de 5 µm de espessura, com o auxílio de um micrótomo (Leica RM 2145®), sendo utilizado um corte e na sequência desprezados 10 cortes, e assim sucessivamente.

- **Extensão:** os cortes foram esticados em banho de água 50°C e “pescados” com uma lâmina de microscópio para a retirada das rugas provenientes dos cortes. Levou-se a lâmina à platina aquecedora a 40°C, por cinquenta minutos para a fixação do corte à lâmina;
- **Hidratação e Coloração:** a parafina foi eliminada com banhos sucessivos de xilol I, II e III por 5 minutos cada. Em seguida os cortes foram hidratados em banhos decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%), posteriormente colocados em água por 5 minutos cada. Em seguida as lâminas foram coradas com hematoxilina (por 50 segundos), lavadas em água corrente por aproximadamente cinco minutos, coradas com eosina por 50 segundos, desidratadas em três banhos de etanol, em concentração crescente (70, 95 e 100%) por cinco minutos cada e em seguida com três banhos de xilol I, II e III por cinco minutos cada;
- **Montagem da lâmina:** ao final da preparação as lamínulas foram coladas sobre o corte usando Entellan (Merck®), deixando as lâminas secarem em temperatura ambiente para posterior análise histopatológica.

Após a confecção de cada lâmina, a análise das mesmas foi realizada às cegas, a fim de se impossibilitar o reconhecimento do grupo ao qual aquele corte pertencia, impedindo dessa forma uma leitura subjetiva dos resultados que pudesse influenciar a leitura final.

A leitura das lâminas foi realizada com o auxílio do microscópio de luz comum (AXIOSKOP - ZEISS), aumento de 400x e as imagens foram capturadas utilizando uma câmera digital Axion Cam ICc 1.

As lâminas foram avaliadas no sistema duplo-cego, sendo que cada um dos casos foi lido duas vezes, por avaliadores treinados e de forma padronizada.

3.6.8 Análise do fígado

Para análise dos cortes histológicos do lobo do fígado foi usado o software Axion Vision Rel.4.8.2. As lâminas foram observadas com aumento de 400x, em busca da ocorrência de esteatose, ou seja, quando os hepatócitos apresentam

acúmulo de gorduras neutras no citoplasma, na forma de vacúolos grandes, arredondados e opticamente vazios.

A avaliação da esteatose hepática foi realizada de forma semiquantitativa e classificada em ausente, discreta, moderada e acentuada. A presença de esteatose foi classificada em scores 0, 1, 2 e 3. Ausente - 0, discreta - 1, (>0% a 33%), moderada - 2 (> 33% a 66%) e acentuada - 3, (> 66%). Adaptado de Burlamaqui et al. (2011).

3.6.9 Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado o programa Graphpad Prism 6.0[®]. Os dados quantitativos foram submetidos inicialmente ao teste de normalidade “Kolmogorov-Smirnov” e os de homogeneidade de variâncias “Bartlett” e de Brown-Forsythe (SNEDECOR; COCHRAN, 1989). Quando a suposição de normalidade e de homogeneidade forem satisfeitas, as variáveis de interesse foram estudadas quanto ao grupo e quanto ao período (nascimento e desmame) a partir de uma análise de variância dois fatores seguido de teste de comparações múltiplas de Duncan ou Tukey. Os dados foram apresentados como média e desvio-padrão. Quando as suposições acima não foram atendidas, utilizou-se a análise não paramétrica a partir do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de comparação múltipla de Dunn e os dados foram apresentados como mediana (mínimo e máximo). Quanto às variáveis categóricas obtidas da análise histológica foi empregado teste de Kruskal-Wallis para comparação de proporções entre os grupos em estudo. O nível de significância para todos os teste foi $p=0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA, NORMOPROTEICA E RESTRITA EM CARBOIDRATOS NAS MÃES

A dieta hiperlipídica, normoproteica e restrita em carboidrato ofertada em cada uma das semanas gestacionais não levou a diferença significativa no peso das ratas ao longo da gestação. O peso imediatamente após o parto também não apresentou diferença estatística significativa entre os grupos. Após o parto, as fêmeas foram alimentadas com dieta balanceada para ratos e também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Também não se observou diferença significativa ($p \geq 0,05$) no Índice de Lee das ratas ao final do período de lactação (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica com restrição de carboidratos ofertada às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) no peso das ratas ao longo da gestação (gest), no momento do parto, durante a lactação (lact) e no Índice de Lee.

Grupos	Controle	Exp.S1	Exp.S2	Exp.S3
Inicial	273 (16)	258 (2,6)	278 (14)	267 (18)
1ª sem gest	298 (31)	287 (4,8)	314 (20)	292 (25)
2ª sem gest	340 (40)	327 (23)	362 (23)	329 (36)
3ª sem gest	410 (46)	373 (38)	400 (30)	373 (24)
Pós-parto	329 (33)	284 (24)	320 (29)	295 (30)
1ª sem lact	317 (21)	295 (23)	318 (37)	310 (15)
2ª sem lact	311(7,1)	299 (25)	331 (19)	323 (9,3)
3ª sem lact*	274 (15)	263 (8)	292 (15)	263 (33)
Índice de Lee	31(1,1)	29(0,3)	31(1,1)	30(1,4)

*O peso medido na terceira semana de lactação corresponde ao peso na eutanásia. Os pesos são expressos em gramas.

- Foi utilizado o Teste *ONE-WAY ANOVA* sendo valores expressos em média \pm desvio padrão foram considerados significativos os valores $p < 0,05$.

A dieta experimental ofertada na gestação, não alterou de maneira significativa o peso da maioria dos órgãos e tecidos avaliados (Tabela 2). Apenas detectou-se que a gordura perivisceral foi significativamente maior nas ratas alimentadas com a dieta experimental na segunda semana de gestação em relação

àquelas ratas alimentadas com essa dieta na primeira semana. Além disso, o peso relativo do útero foi maior nas ratas alimentadas com a dieta experimental na primeira semana de gestação em relação àquelas alimentadas com dieta controle nas três semanas de gestação e àquelas alimentadas com a dieta experimental na semana dois da gestação ($p < 0.05$).

Tabela 2 - Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica com restrição de carboidratos ofertada às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) no peso relativo dos órgãos e tecidos das ratas ao final da lactação.

Peso dos órgãos/tecidos*	Controle	Exp.S1	Exp.S2	Exp.S3
Baço	0,4 (0,14)	0,38 (0,06)	0,43 (0,08)	0,4 (0,15)
Cérebro	0,54 (0,12)	0,55 (0,03)	0,48 (0,02)	0,54 (0,08)
Coração	0,51(0,08)	0,58 (0,18)	0,43 (0,08)	0,45 (0,06)
Fígado	4,5 (0,39)	4,9 (1,1)	4,5 (0,62)	5,2 (2)
Gordura peri-renal	0,67 (0,37)	0,83 (0,49)	1,4 (0,33)	0,72 (0,34)
Gordura peri-uterina	0,87 (0,48)	0,82 (0,57)	0,77 (0,5)	0,64 (0,52)
Gordura peri-visceral	1,3 (0,26)	0,54 (0,22) ¹	1,6 (0,75) ¹	0,66 (0,55)
Gordura total	2,9 (0,85)	2,2 (1,1)	3,8 (0,78)	2 (0,94)
Músculo quadríceps femoral	0,36 (0,08)	0,43 (0,95)	0,03 (0,16)	0,47 (0,1)
Rins	0,84 (0,05)	0,83 (0,08)	0,78 (0,1)	0,88 (0,13)
Útero	0,24 (0,03) ¹	0,33 (0,02) ^{1/2}	0,26 (0,03) ²	0,3 (0,02)

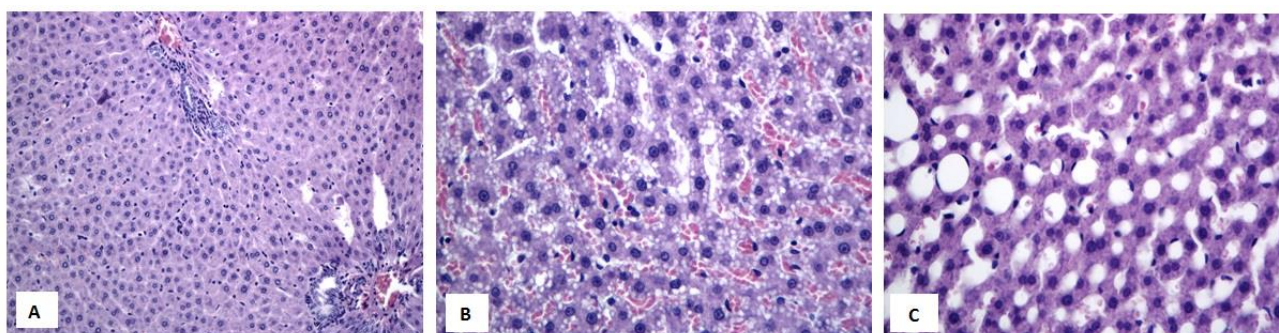
- Os pesos são expressos em gramas. Peso corrigido para 100g.

- Foi utilizado o Teste *ONE-WAY ANOVA* sendo valores expressos em média \pm desvio padrão.

- Na mesma linha, médias com números sobrescritos iguais são significativamente diferentes, $p < 0,05$.

Na análise do fígado de todas as mães foi observada a presença de esteatose micro e macro vesicular, caracterizada pela presença de micro e macro vesículas de gordura, espalhados no citoplasma do hepatócito (Figura 4).

Figura 4 – Fotomicrografia do fígado das mães com coloração Hematoxilina Eosina.



A - Fígado normal em ratas (200x). **B** - Esteatose microvesicular (400x). **C** - Esteatose macrovesicular (400x). **Fonte:** Acervo do autor (2014).

A análise estatística dos dados demonstrou maior incidência de esteatose nos grupos Exp.S1 e Exp.S3 em relação ao grupo controle, maior incidência de esteatose no grupo Exp.S1 em relação ao grupo Exp.S2 e deste grupo em relação ao grupo Exp.S3 ($p < 0,05$) diferença significativa entre os grupos ($p \leq 0,05$).

Quando a dieta experimental foi ofertada no início ou no final da gestação, ela induziu em maior ocorrência de esteatose hepática micro e macro vesicular.

A alimentação das ratas com a dieta experimental durante a gestação não afetou os parâmetros bioquímicos Colesterol Total, HDL, LDL, VLDL e Triglicérides das ratas ao final do período de lactação. Observou-se que os grupos Exp.S1 e Exp.S3 apresentaram glicemia significativamente menor que o grupo controle e que os níveis de ureia do grupo alimentado com dieta experimental na semana 1 de gestação foram significativamente maiores que os valores apresentados pelas mães alimentadas com dieta experimental na semana 3 da gestação (Tabela 3). Os grupos alimentados com a dieta experimental apresentaram: glicose: Controle > Exp.S1 e Exp.S3, e valores significativamente menores ($p < 0,05$), quanto à ureia o grupo Exp.S1 > Exp. S2 (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica com restrição de carboidratos ofertadas às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) nos parâmetros bioquímicos das ratas ao final da lactação.

Parâmetros Bioquímicos	Controle (mg/dL)	Exp.S1(mg/dL)	Exp.S2(mg/dL)	Exp.S3(mg/dL)
Colesterol total	103 (26)	92 (14)	93 (16)	91 (17)
HDL	35 (11)	35 (5,4)	36 (6,7)	34 (4)
LDL	57 (11)	49 (8,3)	50 (12)	49 (14)
VLDL	10 (5,2)	8,3 (2,8)	7 (1,2)	7,5 (4,4)
Creatinina	0,7 (0,08)	0,68 (0,09)	0,7 (0,07)	0,73 (0,05)
Glicose	215 (29) ^{1,2}	115 (29) ¹	186 (32)	175 (23) ²
Triglicérides	52 (27)	41 (15)	35,9 (6,8)	38 (22)
Ureia	49 (8,8)	62 (7,8) ¹	44 (4,4) ¹	55 (9)

- Os dados foram expressos em (mg/dL).

- Foi utilizado o Teste *ONE-WAY ANOVA*, sendo valores expressos em média \pm desvio padrão.

- Na mesma linha, médias com números sobrescritos iguais são significativamente diferentes, $p < 0,05$.

4.2 EFEITO DA DIETA HIPERLIPÍDICA, NORMOPROTEICA E RESTRITA EM CARBOIDRATOS NOS FILHOTES

Tabela 4 - Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica e restrição de carboidratos ofertada às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) sobre o peso ao nascer, na eutanásia e Índice de Lee dos filhotes.

Peso	Controle	Exp.S1	Exp.S2	Exp.S3
Ao nascer (mediana min./máx.)	5,9 ¹ (5,5–6,1)	6,0 ² (5,3–6,8)	6,6 ^{1/2/3} (6,3–7.0)	6,0 ³ (5–6,1)
Na eutanásia (média (DP))	39 (11)	44 (7,1)	45 (9,3)	46 (7)
Índice de Lee	324 (17)	316 (8,2)	314 (13)	323 (20)

- Os pesos são expressos em gramas. Peso corrigido para 100g.

- Números sobrescritos iguais na mesma linha, indicam diferenças entre si, $p < 0,05$.

- Foi utilizado o Teste *ONE-WAY ANOVA*, sendo valores expressos em mediana (mín./máx.), média \pm desvio padrão.

Os filhotes das ninhadas cujas mães foram alimentadas com a dieta experimental na segunda semana de gestação apresentaram maior peso ao nascimento do que os demais grupos ($p < 0,0001$). Já aos 21 dias de vida, não houve diferença estatisticamente significativa para esse parâmetro entre os grupos em estudo, bem como quando foi comparado o Índice de Lee ($p > 0,05$) (Tabela 4).

A análise do peso da gordura total, cérebro, coração, fígado e testículos dos filhotes ao final da lactação não mostrou diferença significativa entre os grupos. Já o peso do baço dos filhotes cujas mães foram alimentadas com dieta experimental durante a primeira semana foi significativamente maior do que o observado para os animais cujas mães foram alimentadas durante toda a gestação com dieta controle ($p = 0,0139$) e do que observado para os filhotes cujas mães foram alimentadas com dieta experimental na terceira semana de gestação ($p = 0,021$). O peso do músculo quadríceps femural direito corrigido para 100g foi significativamente maior nos animais cujas mães foram alimentadas com dieta experimental durante a semana um em comparação ao grupo Exp.S2 ($p = 0,0093$). Quanto aos rins, observou-se que os animais do grupo Exp.S2 apresentaram aumento significativo em relação ao grupo Exp.S3 ($p = 0,0042$). Finalmente, o peso do útero dos filhotes do grupo controle

foi significativamente menor do que o dos demais grupos ($p=0,0015$; $0,0419$; $0,0394$ para os grupos Exp.S1, Exp.S2 e Exp.S3, respectivamente) (Tabela 5).

Tabela 5 - Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica e restrição de carboidratos ofertada às nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3) no peso relativo (g/100g de peso corporal) de órgãos e tecidos (adiposo e muscular) dos filhotes na eutanásia ao final da lactação.

Órgão/tecido	Controle (g)	Exp.S1 (g)	Exp.S2 (g)	Exp.S3 (g)
Gordura total	0.0 (0-0.87)	0.0 (0-0.68)	0.0 (0-0.85)	0.13 (0-0.88)
Baço	0,49 (0,4-0,7) ¹	0,57 (0,5-0,8) ^{1,2}	0,49 (0,3-0,8)	0,43 (0,34-0,69) ²
Cérebro	2,8 (0,69)	2,7 (0,3)	2,6 (0,79)	2,0 (0,91)
Coração	0,7 (0,52-1)	0,71(0,48-0,81)	0,67 (0,51-1)	0,62(0,55-0,87)
Fígado	4,1 (0,52)	4,0 (0,27)	4,2 (0,68)	3,9 (0,45)
M. femural direito	0,41 (0,28 - 0,76)	0,53 (0,37-0,85) ¹	0,4 (0,28-0,62) ¹	0,45 (0,32-0,76)
Rins	1,2 (0,7-1,5)	1,2 (1-1,6)	1,3 (1,1-1,5) ⁵	1,1 (0,78-1,4) ⁵
Testículos	0,61 (0,06)	0,78 (0,21)	0,71 (0,13)	0,62 (0,09)
Útero	0,3 (0,2-,33) ^{1,2,3}	0,43 (0,37-0,87) ¹	0,4 (0,27-0,62) ²	0,39 (0,24-0,62) ³

- Os pesos são expressos em gramas e corrigidos para 100g de peso corporal.

- Números sobrescritos iguais na mesma linha, indicam diferenças entre si, $p<0,05$.

- Foi utilizado o Teste *ONE-WAY ANOVA*, sendo valores expressos em mediana (mín./máx.), média \pm desvio padrão.

Quanto aos parâmetros bioquímicos dos filhotes, a análise dos resultados não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos para os parâmetros Colesterol total, HDL, LDL e Creatinina. Observaram-se níveis superiores de VLDL no grupo controle e ExpS2 em relação aos grupos Exp.S1, níveis de glicemia superiores no grupo Exp.S2 em relação ao grupo Exp.S1, trigliceridemia superior no grupo controle em relação aos grupos Exp.S1 e Exp.S3 e no Exp.S2 em relação ao grupo Exp.S1. Finalmente, os níveis de ureia foram inferiores no grupo Exp.S2 em relação ao grupo controle (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito da dieta hiperlipídico-normoproteica com restrição de carboidratos ofertadas às mães nas diferentes semanas gestacionais (S1, S2 e S3), nos parâmetros bioquímicos dos filhotes ao final da lactação.

Parâmetros Bioquímicos	Controle(mg/dL).	Exp.S1(mg/dL).	Exp.S2(mg/dL).	Exp.S3(mg/dL).
Colesterol total	169 (45)	167 (37)	188 (53)	158 (34)
HDL	45 (9)	45 (5,8)	46 (6,1)	44 (6,1)
LDL	71 (25)	95 (38)	89 (40)	75 (21)
VLDL	47 (24) ¹	27 (9,1) ^{1/2}	53 (16) ²	39 (14)
Creatinina	0,42 (0,08)	0,46 (0,1)	0,4 (0,09)	0,43 (0,04)
Glicose	162 (111-260)	151 (118-187) ¹	194 (144-293) ¹	164 (127-275)
Triglicerídeos	288 (151) ^{1/2}	136 (45) ^{1/3}	266 (77) ³	196 (73) ²
Ureia	34 (26-54) ¹	30 (24-48)	26 (21-38) ¹	29 (23-41)

- Os dados foram expressos em (mg/dL).

- Números sobrescritos iguais na mesma linha indicam diferenças entre os grupos, $p < 0,05$.

- Foi utilizado o Teste *ONE-WAY ANOVA*, sendo valores expressos em mediana (mín./máx.), média \pm desvio padrão.

5 DISCUSSÃO

Independentemente da semana gestacional na qual a dieta experimental normoproteica, hiperlipídica e hipoglicídica foi ofertada às ratas prenhas, não se observou alteração na evolução do peso. Além disso, no final da lactação as ratas retornam ao peso do início do experimento, mostrando que elas são resistentes ao acúmulo de gordura, mesmo se a elas for ofertada uma dieta com potencial obesogênico. Para ratos Wistar machos, foi observado, em estudo anterior, que uma dieta semelhante induz maior peso corporal a partir da segunda semana de tratamento, porém com diferença estatisticamente significativa somente a partir da quinta semana de acompanhamento (BORBA et al., 2011). A mesma dieta utilizada neste estudo, se ofertada durante as três semanas da gestação, também não provocou alteração do peso durante a gestação (MOREIRA, 2012). Esses dados sugerem que a oferta da dieta desbalanceada durante um curto período de tempo da gestação das ratas não é suficiente para indução da obesidade.

Além disso, deve-se considerar que no período de gestação o gasto energético das ratas está aumentado, contribuindo também para os dados obtidos. Não foi observado também diferença no peso pós-parto das fêmeas, sugerindo que a oferta da dieta experimental durante uma das semanas de gestação não compromete de maneira significativa as reservas energéticas das fêmeas, fato que pode ser observado quando essa dieta é ofertada durante as três semanas de gestação (MOREIRA, 2012).

A redução das reservas energéticas sugere sua mobilização na manutenção da gestação e da homeostase do animal (SILVA et al., 1999), o que nos leva a sugerir que neste estudo essa mobilização não foi necessária. Além disso, os níveis elevados de lipídios da dieta experimental poderiam oferecer ácidos graxos para o metabolismo em geral e glicerol como substrato para a gliconeogênese (CHAMPE et al., 2009), como sugerido por outros autores (KOSKI; HILL; LÖNNERDAL, 1990).

Ratas alimentadas com a dieta experimental durante a segunda semana de gestação apresentaram quantidade significativamente maior de gordura perivisceral do que as ratas alimentadas com essa dieta na primeira semana de gestação, sugerindo que o período de oferta da dieta experimental, embora não tenha afetado o peso do animal como um todo pode afetar as proporções relativas das reservas corporais. Foi demonstrado que uma dieta rica em gordura reduziu a atividade

lipolítica induzível em células do tecido adiposo periepididimal de ratos (TEPPERMAN; DEWITT; TEPPERMAN, 1986).

Os resultados deste estudo, aliados a essa observação sugerem que esse efeito é susceptível também à fase da gestação onde a dieta rica em gordura é oferecida às ratas.

Usualmente, a restrição de carboidratos promove a utilização de proteína corporal como substrato para a gliconeogênese (CHAMPE et al., 2009), mas neste estudo demonstra-se que o peso relativo do músculo quadríceps femural direito, não foi afetado de maneira significativa. Apesar de não poder ser excluída a possibilidade de outros músculos terem sido utilizados como fonte de aminoácidos para a gliconeogênese, há suporte, como explanado acima, para a hipótese da utilização dos lipídios como fonte de energia.

Como o peso dos animais não foi significativamente diferente, a proporção relativa de outros componentes corporais pode ter sido reduzida, embora não se tenha detectado redução significativa em nenhum dos órgãos avaliados nos animais desse grupo. Ao contrário, encontrou-se um peso uterino significativamente maior no grupo alimentado com a dieta experimental durante a segunda semana de gestação (Exp.S2) em relação aos grupos controle e alimentado com a dieta experimental na semana três (Exp.S3) de gestação. Foi demonstrado anteriormente que a oferta de uma dieta rica em gordura para porcas pré-púberes pode levar a aumento no peso e comprimento uterino (ZHUO et al., 2014).

Aliado com os dados coletados pode-se inferir que esse efeito da dieta rica em gordura pode ser obtido em um tempo tão pequeno quanto uma semana, durante o período gestacional.

Conjuntamente, a análise do peso dos órgãos não mostra um padrão para o efeito da dieta experimental no peso dos órgãos maternos, uma vez que a dieta experimental causou alterações significativas em poucos órgãos/tecidos e não houve correlação entre a semana na qual a dieta foi ofertada e essas alterações. Sabe-se que uma dieta de alto teor de gordura pode afetar órgãos distintos de maneira diferente, uma vez que esse tipo de dieta levou a uma redução da sensibilidade à insulina no músculo, mas, não apresentou efeito nesse parâmetro no tecido adiposo (BARNEA et al., 2006).

Quanto às dosagens bioquímicas, observou-se ao final da lactação níveis significativamente menores de glicose nas ratas alimentadas com dieta experimental

na primeira e na terceira semanas de gestação em relação ao grupo controle. Alguns autores demonstraram que não há diferença significativa entre os níveis plasmáticos de glicose, corpos cetônicos, insulina plasmática, ácidos graxos livres no plasma de ratas submetidas à dieta hiperlipídica durante a gestação, desde que esses metabólitos sejam medidos ao longo da gestação, contrariando aparentemente nossos resultados (LETURQUE et al., 1987). No entanto, a composição das dietas não foi exatamente a mesma e os parâmetros foram medidos após três semanas de lactação, numa situação metabólica diferente daquela presente no período gestacional. Estudos anteriores com ratos machos mostraram que uma dieta rica em gordura e proteína causa um aumento nos níveis plasmáticos de glicose, associados a um estado de resistência à insulina (RAMIREZ et al., 1990).

Outro estudo demonstrou que ratos alimentados com uma dieta rica em gordura tiveram menores índices de glicemia e níveis plasmáticos de insulina superiores ao grupo alimentado com dieta balanceada (BAKE; MORGAN; MERCER, 2014), enquanto que ratos alimentados com uma dieta hiperlipídica durante quatro semanas tiveram os níveis de glicose, colesterol total, triglicerídeos e LDL-C elevados, enquanto os níveis de HDL-C foram reduzidos (JIA et al., 2013).

Neste estudo, observaram-se níveis de glicose menores em dois grupos experimentais, fato que aparentemente discorda dos estudos descritos acima. No entanto, deve-se considerar que os estudos citados avaliaram os efeitos da dieta hiperlipídica imediatamente após sua administração e neste estudo os efeitos estão sendo avaliados por três semanas após o término da administração da dieta hiperlipídica sendo que durante essas três semanas as ratas estavam sendo alimentadas com dieta balanceada para ratos. Dessa forma, o efeito da dieta hiperlipídica oferecida durante a gestação parece ter efeitos prolongados nas ratas, hipótese que deve ser testada com estudos posteriores.

Na maioria dos grupos estudados encontrou-se a presença de esteatose microvesicular no fígado das mães, indicando que a dieta hiperlipídica teve influência no desenvolvimento de esteatose como relatado em outros estudos (BUETTNER; SCHOLMERICH; BOLLHEIMER, 2007; CHARBONNEAU; UNSON; LAVOIE, 2007; BURLAMAQUI et al. 2011), provavelmente pelo curto período de tempo de administração, esse efeito foi menos intenso.

Quanto aos filhotes, observou-se que as ninhadas cujas mães foram alimentadas com a dieta experimental durante a segunda semana de gestação

apresentaram maior peso ao nascimento do que todos os demais grupos, sugerindo que o excesso de gordura dietética pode afetar o desenvolvimento intrauterino dos filhotes (MOREIRA, 2012). No entanto, essa alteração não é observada ao final do período de lactação, período no qual as mães receberam dieta balanceada para ratos, sugerindo uma recuperação dos padrões metabólicos e do peso corporal dos animais. Muitos estudos, no entanto, mostram que dietas desbalanceadas durante a gestação afetam o metabolismo dos animais na idade adulta (KHALYFA et al., 2013; BOENGASSER et al., 2014; ISGANAITIS et al., 2014; MACPHERSON et al., 2015).

Ao considerar que a segunda semana de gestação no rato seja equivalente ao segundo trimestre da gestação em humanos e sabendo que esse período é o de maior intensidade de crescimento fetal, a oferta de uma dieta desbalanceada poderia ter consequências metabólicas que levem ao crescimento fetal aumentado, pois, como já mencionado anteriormente, a dieta hiperlipídica induz uma situação de resistência à insulina, hormônio que pode levar ao crescimento fetal aumentado (PARIZZI; FONSECA, 2010). Estudos relatam que filhotes de ratas obesas tiveram peso menor do que filhotes de ratas não obesas (ROLLS; ROWE, 1982), discordando dos resultados deste estudo, possivelmente, porque as ratas usadas nesta pesquisa não estavam obesas no início da lactação, e nem mesmo desenvolveram obesidade durante esse período.

A oferta de uma dieta hiperlipídica, normoproteica e restrita em carboidratos causou aumento significativo apenas no peso do baço e do útero dos filhotes ao final da lactação, quando comparado com o grupo controle. Isso sugere que o tempo de oferta da dieta não foi suficiente para comprometer de maneira significativa o desenvolvimento dos demais órgãos, uma vez que dietas desbalanceadas podem comprometer de maneira significativa esse parâmetro no fígado (KIKI et al., 2007; GUO; JE, 1995).

De qualquer modo, é necessário lembrar que esses parâmetros foram medidos ao final da lactação e que durante esse período as ratas foram alimentadas com dieta balanceada. Em outras palavras, os efeitos observados referem-se a um tipo de imprint genético determinado pela dieta utilizada pelas mães durante a gestação e que se mantém nos filhotes por um longo tempo, como relatado em vários estudos (BUCKEY et al., 2005; PARENTE; AQUILA; MADARIM DE LACERDA, 2008; MACPHERSON et al., 2015).

Ao confirmar a ocorrência do imprint genético, observou-se que a dieta hiperlipídica ofertada às mães no período gestacional tem algum efeito sobre os parâmetros bioquímicos dos filhotes ao final da lactação, uma vez que os níveis de triglicérides dos filhotes cujas mães foram alimentadas com a dieta experimental nas semanas um ou três da gestação apresentaram níveis de triglicérides reduzidos em relação ao grupo controle. Tal situação é descrita na literatura por vários autores (BUCKEY et al., 2005).

Em adição a esses resultados, este trabalho ainda mostra que os níveis de VLDL e glicose dos animais cujas mães foram alimentadas com a dieta experimental durante a primeira semana de gestação foram menores do que os apresentados pelos animais do grupo controle, e sugere que diferentes parâmetros podem ser afetados de maneira diferente em função do período em que a dieta experimental foi ofertada às mães.

6 CONCLUSÃO

A dieta hiperlipídica normoproteica hipoglicídica ofertada às mães em diferentes semanas gestacionais:

- a) não afetou o número de componentes da ninhada ao nascimento e ao final da lactação;
- b) não afetou a evolução do peso das mães ao final da gestação ou da lactação;
- c) promoveu alteração significativa no peso dos filhotes ao nascimento quando a referida dieta (experimental) foi ofertada na segunda semana porém sem efeito ao final da lactação.
- d) não promoveu alterações significativas no lipidograma e creatinina das mães, mas induziu redução estatisticamente significativa na glicemia dos grupos Exp.S1 e Exp.S3 em relação ao controle. Quanto aos filhotes no final da lactação, induziu redução do VLDL no grupo Exp.S1, Triglicérides nos grupos Exp.S1 e Exp.S3 e ureia no grupo Exp.S2
- e) promoveu nas mães o aumento da gordura peri-visceral no grupo Exp.S2 em relação ao grupo Exp.S1 e aumento do peso uterino do grupo Exp.S1 em relação aos grupos controle e Exp.S2. Já nos filhotes ao final da lactação, promoveu alterações significativas no peso relativo do baço, músculo quadríceps femural e útero.
- f) Promoveu a ocorrência de esteatose nas mães, quando ofertada nas semanas 1 ou 3 da gestação

Em conjunto, os dados nos permitem concluir que a dieta hiperlipídica, normoproteica e restrita em carboidratos pode induzir alterações anatômicas e bioquímicas tanto nas mães quanto nas ninhadas, mesmo que ofertada em apenas uma das semanas gestacionais, sendo ainda os efeitos dependentes da semana gestacional em que a dieta é oferecida às ratas gestantes.

REFERÊNCIAS

- ÁGUILA, M. B. et al. Metabolismo lipídico de ratos alimentados com diferentes tipos de lipídios. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 1, p.25-31, 2002.
- AMUNA, P.; ZOTOR, F. B. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. **The Proceedings of Nutrition Society**, London, v. 67, n. 1, p. 82-90, feb. 2008.
- ANDRETTO, L. M.; SOUZA, A. I.; FIGUEIROA, J. N. Fatores associados ao ganho ponderal excessivo em gestantes atendidas em um serviço público de pré-natal na cidade de Recife, Pernambuco, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, p. 2401-2409, nov. 2006.
- BAKE, T.; MORGAN, D. G.; MERCER, J. G. Feeding and metabolic consequences of scheduled consumption of large, binge-type meals of high fat diet in the Sprague-Dawley rat. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 128, n. 100, p. 70-79, apr. 2014.
- BARNEA, M. et al. A high-fat diet has a tissue-specific effect on adiponectin and related enzyme expression. **Obesity**, Silver Spring, v. 14, n. 12, p. 2145-2153, dec. 2006.
- BOENGASSER, S. J. et al. High fat diet and in utero exposure to maternal obesity disrupts circadian rhythm and leads to metabolic programming of liver in rat offspring. **PLoS One [electronic resource]**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e84209, jan. 2014.
- BORBA, A. J. et al. Dieta hiperlipídico-protéica utilizada para emagrecimento induz obesidade em ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 519-528 jul./ago. 2011.
- BRAY, G. A. et al. Beyond energy balance: there is more to obesity than kilocalories. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v. 105, n. 5, suppl. 1, p. S17-S23, 2005.
- BUCKEY, A. J. et al. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. **Metabolism: clinical and experimental**, New York v. 54, n. 4, p. 500-507, apr. 2005.
- BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, Silver Spring, v. 15, n. 4, p. 798-808, abr. 2007.
- BURLAMAQUI, I. M. et al. Hepatic and biochemical repercussions of a polyunsaturated fat-rich hypercaloric and hyperlipidic diet in Wistar rats. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 48, N. 2, p. 153-158, apr./jun. 2011.

CALKINS, K.; DEVASKAR, S. U. Fetal origins of adult diseases. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, St. Louis, v. 41, n. 6, p. 158-176, jul. 2011.

CHAMPE, P. C. et al. **Bioquímica ilustrada**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2009.

CHARBONNEAU, A.; UNSON, C. G.; LAVOIE, J. M. High-fat diet-induced hepatic steatosis reduces glucagon receptor content in rat hepatocytes: potential interaction with acute exercise. **The Journal of Physiology**, London, v. 579, pt. 1, p. 255-267, feb. 2007.

DÂMASO, A. **Obesidade**. 2. ed. Rio de Janeiro: Manole, 2009.

GUO, F.; JE, K. L. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 57, n. 4, p. 681-686, apr. 1995.

HEBER, D. An integrative view of obesity. **The American Journal Clinical Nutrition**, Houston, v. 91, suppl., p. 280S-283S, jan. 2010.

ISGANAITIS, E. et al. Developmental programming by maternal insulin resistance: hyperinsulinemia, glucose intolerance, and dysregulated lipid metabolism in male offspring of insulin-resistant mice. **Diabetes**, New York, v. 63, n. 2, p. 688-700, feb. 2014.

JIA, Y. J. et al. Dyslipidemia in rat fed with high-fat diet is not associated with PCSK9-LDL-receptor pathway but ageing. **Journal of Geriatric Cardiology: JGC**, Beijing, v. 10, n. 4, p. 361-368, dec. 2013.

KHALYFA, A. et al. Effects of Late Gestational High Fat Diet on Body Weight, Metabolic Regulation and Adipokine Expression in Offspring. **International Journal of Obesity**, London, v. 37, n. 11, p. 1481-1489, nov. 2013.

KIKI, I. et al. Effect of high fat diet on the volume of liver and quantitative feature of Kupffer cells in the female rat: a stereological and ultrastructural study. **Obesity Surgery**, Oxford, v. 17, n. 10, p. 1381-1382, oct. 2007.

KORNER, J.; ARONNE, L. J. The emerging science of body weight regulation and its impact on obesity treatment. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 111, n. 5, p. 565-570, mar. 2003.

KOSKI, K. G.; HILL, F. W.; LÖNNERDAL, D.O. Altered lactational performance in rats fed low carbohydrate diets and its effect on growth of neonatal rat pups. **The Journal of Nutrition**, Springfield, v. 120, n. 9, p. 1028-1036, sep. 1990.

LETURQUE, A. et al. Effect of feeding a high-fat diet during pregnancy on glucose metabolism in the rat. **Metabolism: clinical and experimental**, New York, v. 36, n. 1, p. 66-70, jan. 1987.

MACPHERSON, R. E. et al. A maternal high fat diet has long-lasting effects on skeletal muscle lipid and PLIN protein content in rat offspring at young adulthood. **Lipids**, Chicago, v. 50, n. 2, p. 205-217, feb. 2015.

MARTINEZ, J. A. Body-weight regulation: causes of obesity. **Proceedings of the nutrition society**, London, v. 59, n. 3, p. 337-345, 2000.

MARTINS, A. P. B.; BENICIO, M. H. D. Influência do consumo alimentar na gestação sobre a retenção de peso pós-parto. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 45, n. 5, Out. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-89102011000500008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 27 ago. 2014.

MENDES, M. J. F. L. et al. Associação de fatores de risco para doenças cardiovasculares em adolescentes e seus pais. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 6, supl. 1, p. 49-54, maio 2006.

MOREIRA, T. M. S. **Efeito da concentração de proteínas em uma dieta hiperlipídica e com restrição de carboidratos no metabolismo de ratas gestantes e suas ninhadas**. 2012. 103f. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) - Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba (MG), 2012.

PARENTE, L. B.; AQUILA, M. B.; MADARIM DE LACERDA, C. A. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. **Clinical Nutrition**, Edinburgh, v. 27, n. 4, p. 623-634, aug. 2008.

PARIZZI, M. R.; FONSECA, J. G. M. Nutrição na gravidez e na lactação. **Rev Med Minas Gerais**, Belo Horizonte, v. 20, n. 3, p. 341-353, 2010.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHI, A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 111-127, abr. 2003.

PICCHI, M. G. et al. A high-fat diet as a model of fatty liver disease in rats. **Acta Cirurgica Brasileira**, São Paulo, v. 26, supl. 2., p. 25-30, 2011.

PICHON, L. et al. A highprotein, high-fat, carbohydrate-free diet reduces energy intake, hepatic lipogenesis, and adiposity in rats. **The Journal of Nutrition**, Rockville v. 136, n. 5, p. 1256-1260, may. 2006.

PORTAL BRASIL. Saúde. **Brasil estabiliza taxas de sobrepeso e obesidade**. Brasília: Portal Brasil, 2014. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2014/04/brasil-estabiliza-taxas-de-sobrepeso-e-obesidade>. Acesso em: 23 jan. 2015.

RAMIREZ, R. et al. Effects of high-carbohydrate or high-fat diet on carbohydrate metabolism and insulin secretion in the normal rat. **Diabetes Research**, Edinburgh, v. 15, n. 4, p. 179-183, dec. 1990.

RIFAS-SHIMAN, S. L. et al. Dietary quality during pregnancy varies by maternal characteristics in project viva: a US Cohort. **Journal of The American Dietetic Association**, Chicago, v. 109, n. 6, p. 1004-1011, jun. 2009.

ROGERS, L. K.; VELTEN, M. Maternal inflammation, growth retardation, and preterm birth: Insights into adult cardiovascular disease. **Life Sciences**, Oxford, v. 89, n. 13-14, p. 417-421, 2011.

ROLLS, B. J.; ROWE, E. A. Pregnancy and lactation in the obese rat: effects on maternal and pup weights. **Physiology & Behavior**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 393-400, mar. 1982.

SÉBERT, S. P. et al. Maternal nutrient restriction between early and midgestation and its impact upon appetite regulation after juvenile obesity. **Endocrinology**, Washington, v. 150, n. 2, p. 634-641, fev. 2009.

SILVA, M. P. et al. Efeitos da desnutrição intrauterina e da recuperação nutricional sobre respostas metabólicas ao exercício crônico em ratos jovens. **Motriz**, Rio Claro, v. 5, n. 2, p. 152-153, dez. 1999.

SNEDECOR, G., COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 8th. ed. Iowa State: University Press, 1989.

TAMASHIRO, K. L. K. et al. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-Induced obesity in rat offspring. **Diabetes**, Maryland, v. 58, n. 5, p.1116-25, maio 2009.

TEPPERMAN, H. M.; DEWITT, J.; TEPPERMAN, J. Effect of a high fat diet on rat adipocyte lipolysis: responses to epinephrine, forskolin, methylisobutylxanthine, dibutyryl cyclic AMP, insulin and nicotinic acid. **The Journal of Nutrition**, Springfield. v. 116, n. 10, p. 1984-1991, Oct. 1986.

VILELA, M. G.; SANTOS JÚNIOR, J. L.; SILVA, J. G. C. Determinação do ciclo estral em ratas por lavado vaginal. **Femina**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 10, p. 667-670, out. 2007.

WHO: WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. Geneva: WHO; 2015 Jan; 311. Disponível em:<
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 17 jan. 2015.

ZHUO, Y. et al. Feeding prepubescent gilts a high-fat diet induces molecular changes in the hypothalamus-pituitary-gonadal axis and predicts early timing of puberty. **Nutrition**. Burbank, v. 30, v. 7-8, p. 890-896, jul./ago. 2014.

ANEXOS

ANEXO A - Termo do Comitê de Ética em Experimentação Animal.



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-018/2010

Uberaba, 14 de dezembro de 2010

Ilmo. Prof.

Geraldo Thedei Jr.

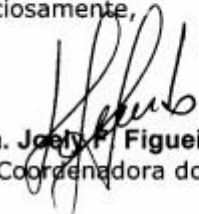
Assunto: Encaminha processo nº 0015/2010, sobre o protocolo de pesquisa "*Efeito da concentração de proteínas em uma dieta hiperlipídica com restrição de carboidratos no metabolismo de ratas gestantes e suas ninhadas*".

Prezado Professor,

Em resposta a sua solicitação, informo que o protocolo acima referido foi submetido à avaliação do CEEA-UNIUBE na reunião do dia 08/12/2010, sendo considerado **aprovado**, com o seguinte parecer:

- Observar o número de animais descritos no item critério de definição da amostra. Pois o número de animais grupo não está coerente com o número total de animais que serão utilizados.

Atenciosamente,


Prof. Joely F. Figueiredo Bittar
Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE

Ofício CEEA-018/2010

Uberaba, 14 de dezembro de 2010

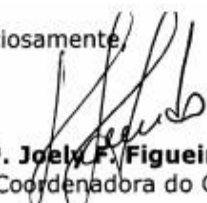
CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 0015/2010 relativo ao projeto intitulado "**Efeito da concentração de proteínas em uma dieta hiperlipídica com restrição de carboidratos no metabolismo de ratas gestantes e suas ninhadas**" que tem como responsável **Prof. Geraldo Thedei Júnior**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.704/09.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 0015/2010 related to the project entitled "**Effect of protein concentration in a high-fat diet with carbohydrate restriction on the metabolism of pregnant rats and their pups**", under the supervision of **Prof. Geraldo Thedei Júnior**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.704/09.

Atenciosamente,



Prof.ª. Joely F. Figueiredo Bittar
Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE