

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GLÍCIA MARÍLIA ZAMBROTI GRECO

**DIETA HIPERPROTEICA NA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS E SEUS EFEITOS
NA MÃE E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE FILHOTES**

Alfenas/MG
2017

GLÍCIA MARÍLIA ZAMBROTI GRECO

**DIETA HIPERPROTEICA NA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS E SEUS EFEITOS
NA MÃE E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE FILHOTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Aplicadas à Saúde da Universidade Federal de
Alfenas-MG como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Biotecnologia Aplicadas à Saúde. Área de
concentração: Fisiopatologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andréa Mollica do Amarante Paffaro

Alfenas/MG
2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Greco, Glicia Marilia Zambroti

Dieta hiperproteica na gestação de camundongos e seus efeitos na mãe e no desenvolvimento inicial de filhotes / Glicia Marilia Zambroti Greco. -- Alfenas/MG, 2017.

102 f.

Orientadora: Andrea Mollica do Amarante Paffaro

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2017.

Bibliografia.

1. Dieta de alto teor proteico. 2. Prenhez. 3. Rim. 4. Tecido Adiposo. Desenvolvimento - Camundongos. I. Paffaro, Andrea Mollica do Amarante. II. Título.

CDD-571.81

GLÍCIA MARÍLIA ZAMBROTTI GRECO

“DIETA HIPERPROTEICA NA GESTAÇÃO DE CAMUNDONGOS E SEUS EFEITOS
NA MÃE E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DE FILHOTES”.

A Banca Examinadora, abaixo-assinada, aprova a
Dissertação apresentada como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Biociências
Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de
Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração:
Fisiopatologia.

Aprovado em: 02/03/2017

Profa. Dra. Andréa Mollica do Amarante Paffaro. Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL



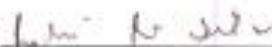
Profa. Dra. Débora C. Damasceno M. dos Santos. Assinatura: _____

Instituição: Universidade Estadual Paulista – UNESP



Profa. Dra. Roberta Ribeiro Silva. Assinatura: _____

Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL



AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço **aos meus pais**, por tornarem toda essa jornada possível, por me incentivar emocional e financeiramente. Obrigada por abdicar de muitos dos seus sonhos para proporcionar os meus! Tudo isso é por vocês, com vocês e em vocês!

Aos meus irmãos, pelos feriados ausente, pelos telefonemas não atendidos e pela compreensão inquestionável, vocês sofreram junto comigo o árduo trabalho a ser feito! Você são os meus primeiros e melhores amigos inseparáveis.

Ao meu namorado, que estava sempre, incansavelmente, de prontidão para me ajudar, com todo o carinho do mundo! Obrigada por estar comigo em mais essa jornada! Espero que possamos continuar sempre caminhando e crescendo juntos.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Andrea Mollica do Amarante Paffaro pela confiança e companheirismo! Muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos e estar sempre do meu lado! Você é uma mulher na qual eu me espelho pessoalmente e profissionalmente!

Aos meus companheiros diários no laboratório, Leilane, Joseana, Rafael, Délcio, Renato, Rodrigo, Guilherme. Obrigada pela companhia e amizade! Vou sentir saudade dos nossos dias divertidos!

Aos meus amigos, em especial, Ana Patrícia, Elaine, Jefferson, Ariane, obrigada pelos conselhos, dúvidas, experimentos, alegrias e tristezas compartilhadas! Espero ter podido ajudar ao menos um pouco de tudo que vocês me ajudaram durante este percurso!

A minha amiga querida Fernanda Oliveira, pela paciência e companheirismo sempre. Tudo ficou mais leve desde que estamos juntas!

A minha companheira de laboratório e de casa, Évila Salles, pela ajuda acadêmica e emocional, desde o início, antes mesmo do começo!

Aos meus colegas de laboratório: Vitória, Thais, Tais, Adrieli, Letícia, Breno, Paulo, Pablo. Vocês sempre tornaram o trabalho mais prazeroso e leve! Foi um prazer dividir bancada e a vida com vocês!

As nossas queridas assistentes Neuza e Isabel pelo cuidado incansável conosco e com nosso laboratório! Obrigada pela paciência e carinho sempre!

Ao Prof. Dr. Valdemar Antônio do Paffaro Jr., pela colaboração intelectual, financeira e amiga durante todo o trabalho, além dos ensinamentos para o desenvolvimento do trabalho e para a vida pessoal!

Aos professores, em especial Prof^a Dr^a Adriana Dias, Prof^a Dr^a Silvia Ruginsk, Prof^a Dr^a Talita Mazzoni, Prof^a Dr^a Marisa Ionta, Prof^a Dr^a Márcia Bizinotto, Prof^a Dr^a Ester Caixeta, ao Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva pela ajuda intelectual e por ceder equipamentos e reagentes necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

A Universidade Federal de Alfenas e ao Laboratório de Biologia Animal Integrativa, por ceder o espaço para os experimentos e pelo suporte financeiro concedido.

As agências de fomento, FAPEMIG e CAPES, também pelo apoio financeiro cedido durante todo o experimento.

A Deus, acima de tudo, por me guiar, guardar e proteger em todas situações, sendo meu maior apoio durante toda a vida!

RESUMO

A gestação é um momento marcado por intensas alterações no organismo materno. Com o intuito de amenizar essas mudanças e diminuir o ganho de peso, algumas mulheres utilizam de dietas nutricionalmente desbalanceadas, sendo frequente a maior ingestão de determinadas substâncias e a diminuição de outras. Porém, o uso desse artifício para controle de peso durante a gestação culmina em problemas não bem elucidados pela comunidade acadêmica, visto que o estado nutricional adequado da mãe é essencial para uma gestação saudável. Objetivando verificar uma possível influência da ingestão de uma dieta hiperproteica (HP) na prenhez de camundongos swiss e no desenvolvimento inicial da prole, o regime alimentar das fêmeas prenhes foi alterado para uma dieta contendo 42% de proteína, sem perda dos demais nutrientes. A dieta foi alterada por todo o período de prenhez, sendo a ingestão alimentar e o ganho de peso das fêmeas acompanhados diariamente. Os animais foram organizados em quatro grupos experimentais, sendo que em dois deles a prenhez foi interrompida no 19º. dia de gestação (ddg), para coleta de rim fetal e placentas (Controle-19 e HP-19). Nos demais grupos (controle e HP), a gestação chegou a termo e foi analisado o desenvolvimento físico e neurológico inicial dos filhotes durante o primeiro mês de vida, bem como seu crescimento e ganho de peso. No 32º dia pós-nascimento, os filhotes foram eutanasiados, via deslocamento cervical, juntamente com as mães, para avaliação morfológica e morfométrica do tecido adiposo marrom, tecido adiposo branco e rim. Análises de peroxidação lipídica renal e hepática foram realizadas em tecidos maternos, fetais e dos filhotes. Todos os dados foram analisados quanto à normalidade e seguidos para testes específicos, dentre eles Teste T, Mann Whitney e ANOVA Two-Way seguido de pós-teste Bonferroni. A ingestão e o ganho de peso materno durante a gestação foi menor/// em mães alimentadas com dieta HP, assim como a área média dos adipócitos brancos, número de glomérulos renais e quantidade de proteína nos rins. Filhotes fêmeas e machos de mães HP tiveram a abertura de olho tardia, o que ocorreu também com a abertura da vagina em filhotes fêmeas. A proporção rim/tíbia dos filhotes foi alterada de maneira contrária em filhotes machos e fêmeas. O ganho de peso em filhotes fêmeas e o crescimento naso-caudal de filhotes machos também sofreram alterações. A área média de adipócitos marrons apresentou-se menor em filhotes do sexo masculino, concomitantemente com um aumento da área em adipócitos brancos. A dieta não alterou a quantidade de proteína no tecido renal e hepático de fetos e neonatos, porém evidenciou uma diminuição da peroxidação lipídica renal e em placentas de 19º. ddg. O tratamento materno com a dieta HP não provocou alterações na placentação ou na morfologia deste órgão. Em conclusão, os dados apontam que a dieta HP pode afetar o organismo materno, a homeostase gestacional e o desenvolvimento

inicial dos filhotes, podendo, possivelmente, acarretar maiores problemas a longo prazo na vida destes animais.

Palavras-chave: Dieta hiperproteica. Prenhez de camundongos. Desenvolvimento inicial da prole. Tecido adiposo. Rim.

ABSTRACT

Pregnancy is a period of intense changes in the mother's body. In order to minimize these changes and decrease weight gain pregnant women can use nutritionally unbalanced diets. However, this kind of diet during pregnancy can generate several problems to the mother and fetus, as an appropriate nutritional status of the mother is essential to maintaining the homeostasis during pregnancy. Here we aim to evaluate the influence of the high-protein diet intake (HP) on Swiss mice pregnancy, as well in the initial development of the puppies. Thus we have used a diet containing 42% protein, without loss of other nutrients, throughout the gestational period, measuring the food intake and maternal weight gain. The animals were randomized in four experimental groups and in two of them the gestation was interrupted on the 19th. gestational day (gd) to fetus, kidney and placenta dissection (Control-19 and HP-19). On further groups (Control and HP) gestational period was concluded and during first month of life of the puppies, their physical and neurological development were analyzed, as well as, their growth rate and weight gain. At 32 days post-birth, the puppies and mothers were euthanized, through cervical dislocation, for morphological and morphometric evaluations of brown adipose tissue, white adipose tissue and kidney. Analyses of renal and hepatic lipid peroxidation were conducted on mothers, fetal and puppies tissues. All data were analyzed for normality and by specific tests, including t-test, Mann Whitney and ANOVA Two-Way followed by Bonferroni post-test. The intake and body weight gain during pregnancy was lower in mothers fed with HP diet, as well as the white adipocytes average size, number of glomeruli and protein amount in the kidneys. Females and males puppies of HP mothers had the eye opening later than the controls, which also occurred with the vagina opening on females. The kidney/tibia proportion was altered in an opposite way between male and female puppies. The weight gain on female puppies and the nose/tail growth in male puppies have also changed. Brown adipocytes average area was also lower in male puppies, differently to the area increased of white adipocytes. The diet did not alter the amount of protein in renal and hepatic tissues of pups and fetuses, but showed a decrease of the lipid peroxidation in female kidney and 19th. gd placenta. Maternal treatment with HP diet did not alter the placenta morphology. In conclusion, these data indicate that the HP diet has effect on mother's organism, gestational homeostasis and initial development of puppies can possibly leading to greater long-term problems in the lives of these animals.

Keywords: High-protein diet. Mice pregnancy. Offspring early development. Adipose tissue. Kidney.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Observação de rolha vaginal e armazenamento dos animais em biotério.....	30
Figura 2 – Rótulo detalhado da ração hiperproteica	33
Figura 3 – Metodologia utilizada para as análises morfométricas renais	39
Figura 4 – Morfometria placentária.....	40
Figura 5 – Marcação padronizada dos filhotes para os testes de desenvolvimento físico e de reflexos neurológicos.....	44
Figura 6 – Parâmetros físicos analisados neste trabalho	45
Figura 7 – Testes de reflexo da prole.....	47
Figura 8 – Gráfico da análise de ingestão alimentar, proteica e ganho de peso materno durante o período gestacional.....	50
Figura 9 – Análise da quantidade média e peso médio de prole no 1º dpn	51
Figura 10 – Análise de desenvolvimento físico de filhotes ao longo do primeiro mês de vida	52
Figura 11 – Análise do desenvolvimento de reflexo neurológico dos filhotes ao longo da infância e adolescência	53
Figura 12 – Ganho de peso dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida	56
Figura 13 – Crescimentos naso/caudal, naso/anal e anus/genital de filhotes de mães submetidas à dieta controle e HP	57
Figura 14 – Análise do peso de órgãos maternos.....	58
Figura 15 – Peso médio de tecido adiposo branco e marrom de filhotes com 32 dias pós-nascimento	59
Figura 16 – Análise da proporção rim/tíbia de filhotes com 32 dias pós-nascimento.....	60
Figura 17 – Análise do peso renal dos fetos aos 19 dias de prenhez.....	60
Figura 18 – Análise da área média de adipócitos brancos e marrons provenientes de mães HP e Controle	62
Figura 19 – Morfometria renal de mães.....	63
Figura 20 – Morfometria de tecido adiposo branco de filhotes	64
Figura 21 – Morfometria de tecido adiposo marrom de filhotes	65
Figura 22 – Morfometria renal de filhotes com 32 dias pós-nascimento.....	66

Figura 23 –Morfometria renal fetal	67
Figura 24 –Morfologia placentária aos 19 dias de gestação	69
Figura 25 –Morfometria placentária aos 19 dias de gestação	70
Figura 26 –Quantificação proteica em órgãos de maternos.....	71
Figura 27 –Quantificação proteica em rim e fígado de filhotes com 32 dias pós-nascimento	72
Figura 28 –Quantificação proteica placentária	73
Figura 29 –Análise da peroxidação lipídica em órgãos maternos	74
Figura 30 –Análise da peroxidação lipídica renal e hepática de filhotes de 32 dias pós-nascimento	75
Figura 31 – Análise da peroxidação lipídica placentária	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal (g/100g de ração) das rações utilizadas neste trabalho	31
Tabela 2 – Análise calórica da dieta base AIN 93G	31
Tabela 3 – Análise calórica da dieta controle utilizada nos experimentos.....	32
Tabela 4 – Análise calórica da dieta HP utilizada nos experimentos.....	32
Tabela 5 – Rótulo detalhado da ração controle	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN	- Instituto Americano de Nutrição
ANOVA	- Análise de variância
AP	- Aparecimento de pelo
AV	- Abertura de vagina
BHT	- 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
BSA	- Albumina Bovina Sérica
CEUA	- Comitê de ética em experimentação animal
ddg	- Dia de gestação
dpn	- Dia pós-nascimento
DO	- Descolamento de orelha
DT	- Descida de testículos
EROS	- Espécies Reativas de Oxigênio
FIESP	- Federação das Indústrias do Estado de São Paulo
g	- Gramas
HCl	- Ácido clorídrico
HE	- Hematoxilina e Eosina
HP	- Hiperproteica
IBOPE	- Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística
ICB	- Instituto de Ciências Biomédicas
Kg	- Quilogramas
LABAInt	- Laboratório de Biologia Animal Integrativa
MDA	- Malondialdeído
mg	- Miligrama
N	- Número experimental
nm	- Nanômetros
PBS	- Tampão Fosfato Salina
pH	- Potencial hidrogeniônico
PMSF	- Fluoreto de Fenilmetilsulfonila
RII	- Rompimento de incisivo inferior
RIS	- Rompimento do incisivo superior
RPM	- Rotação por minuto

SDS	- Duodecil Sulfato de Sódio
SEM	- Desvio padrão da média
TAB	- Tecido adiposo branco
TAM	- Tecido adiposo marrom
TBA	- Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	- Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UCP-1	- Uncoupling Protein 1
UNIFAL	- Universidade Federal de Alfenas
μm²	- Micrômetro quadrado
μL	- Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	DIETA HIPERPROTEICA NA GESTAÇÃO	19
2.2	CAMUNDONGOS COMO MODELO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO	25
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	OBJETIVO GERAL	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5	MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1	ANIMAIS.....	29
5.2	DIETAS.....	30
5.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS	34
5.4	ANÁLISE DA INGESTÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO MATERNO.....	35
5.5	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	35
5.6	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	36
5.7	COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)	37
5.8	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO ADIPOSEO	37
5.9	ANÁLISE MORFOMÉTRICA RENAL	38
5.10	ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PLACENTA	39
5.11	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	40
5.11.1	Determinação da peroxidação lipídica	40
5.11.1.1	Mensuração da concentração de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e mensuração da massa proteica.....	41
5.12	ANÁLISE DA PROLE	42
5.12.1	Teste de desenvolvimento	43
5.12.2	Teste de reflexos neurológicos	46
5.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
6	RESULTADOS	49

6.1	ANÁLISE DA INGESTÃO E GANHO DE PESO DAS FÊMEAS PRENHES.....	49
6.2	ANÁLISE DA QUANTIDADE E PESO DOS FILHOTES	51
6.3	TESTES DE DESENVOLVIMENTO FÍSICO E DE REFLEXOS NEUROLÓGICOS.....	51
6.3.1	Testes de desenvolvimento	51
6.3.2	Testes de desenvolvimento de reflexo neurológico.....	52
6.4	ANÁLISE DO GANHO DE PESO DOS FILHOTES.....	54
6.5	ANÁLISE DO CRESCIMENTO DA PROLE	54
6.5.1	Crescimento Naso/Caudal.....	54
6.5.2	Crescimento Naso/Anal.....	55
6.5.3	Crescimento Anus/Genital.....	55
6.6	ANÁLISE DO PESO DOS ÓRGÃOS	58
6.6.1	Análise do peso dos órgãos maternos e proporção rim/tíbia	58
6.6.2	Análise do peso dos órgãos dos filhotes e proporção rim/tíbia	59
6.7	ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMETRICA DE ÓRGÃOS MATERNOS	60
6.7.1	Morfometria de tecido adiposo.....	61
6.7.2	Histologia e morfometria renal materna.....	61
6.8	MORFOMETRIA DE ÓRGÃOS DOS FILHOTES	63
6.8.1	Tecido adiposo.....	63
6.8.2	Morfometria renal de filhotes de 32 dias pós-nascimento.....	66
6.8.3	Morfologia e morfometria renal de fetos	67
6.8.4	Morfologia e morfometria placentária	67
6.9	QUANTIFICAÇÃO PROTEICA	70
6.9.1	Quantificação proteica materna	71
6.9.2	Quantificação proteica em filhotes	71
6.9.3	Quantificação proteica de placentas	73
6.10	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	73
6.10.1	Peroxidação lipídica materna.....	73
6.10.2	Peroxidação lipídica em filhotes	74
6.10.3	Peroxidação lipídica placentaria	76
7	DISCUSSÃO	77
8	CONCLUSÃO	90

ANEXOS	91
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A gestação é um fenômeno único, sendo responsável por diversas modificações metabólicas, físicas e psicológicas no organismo da gestante. Como consequência a essas tantas modificações, a gestação é referenciada por alguns autores como um momento facilitador do ganho excessivo de peso corporal materno (VITOLLO, 2008). Sabe-se que uma gestante com peso ideal deve ter um ganho de, em média, de 12 a 15 quilogramas durante a gestação, mantendo um estoque energético no segundo semestre gestacional, constituído principalmente de lipídio, o qual deverá ser destinado à nutrição fetal (VITOLLO, 2008; PARIZZI; FONSECA, 2010). No entanto, Guelinckx e colaboradores (2008), mostraram que cerca de 20% das mulheres grávidas de sua pesquisa estavam acima do peso e que apenas 27% delas encontravam-se já obesas quando engravidaram, sendo assim, 73% das mulheres obesas desenvolveram esse quadro durante o período gestacional. Desta maneira, fica evidente que o estado gravídico, para muitas mulheres, passa a ser preocupante devido a possibilidade de ganho de massa. Fato este que culmina na necessidade de controle alimentar para evitar o ganho excessivo de peso corporal durante a gestação. Neste cenário aparecem diferentes dietas nutricionalmente desbalanceadas, baseadas em aumento da ingestão de alguma substância e restrições parciais ou totais de outros componentes alimentares., podendo assim, tornarem-se prejudiciais ao indivíduo, principalmente se tratando de uma gestante.

Existem diversas dietas conhecidas com alterações de algum macronutriente, tais como dietas hipo e hiperlipídicas, hipo e hipercalóricas, diversos tipos de restrições alimentares, dietas de cafeteria, entre outras. Dentro deste contexto, associada ao foco deste trabalho, destaca-se a Dieta Dukan, muito utilizada atualmente, a qual é baseada na diminuição drástica da ingestão de carboidratos e lipídios concomitante a um aumento excessivo da ingestão de proteínas (DUKAN, 2012). Como aspecto positivo desta dieta pode-se ressaltar que a ingestão de altos níveis de proteínas está relacionada com a perda de peso corporal, pois induz à saciedade, aumenta a termogênese, diminuindo a necessidade de recorrer a novos alimentos (KUCIA et al., 2010). No entanto, dietas com alto índice proteico podem estar associadas a diversos problemas metabólicos (QUIAN SHEN; et al., 2011; MAREDSOUS, 2016; ANDREASYAN; et al., 2007) e provavelmente estes índices representam um complicador a mais, muitas vezes não computado, principalmente no caso de gestantes.

Sabe-se que a qualidade da alimentação materna exerce grande influência no período gestacional e no desenvolvimento embrio/fetal (GODFREY; BARKER, 2000; FOWLES,

2006). Uma dieta materna inadequada, particularmente durante o primeiro trimestre gestacional, exerce grande influência não apenas no desenvolvimento do embrião como também no desenvolvimento placentário. Vale salientar que, nesta fase, ocorre intensa proliferação e diferenciação celular, processos estes que são sensíveis tanto ao excesso quanto à falta de alguns macronutrientes (FOWLES, 2006). Segundo Robinson e colaboradores (1994), o excesso de ingestão de nutriente na fase inicial da gestação humana pode suprimir o crescimento placentário, resultando em uma placenta com tamanho deficiente, o que pode ser prejudicial ao desenvolvimento fetal devido à dificuldade de aporte metabólico para o feto, principalmente nas etapas finais de seu desenvolvimento.

Com relação a dietas contendo alta dosagem de proteínas na prenhez e na lactação de roedores, é importante salientar que alguns dados experimentais encontrados na literatura apontam alterações na função renal da progenitora, retardo do crescimento intrauterino, diminuição da viabilidade gestacional e alteração na constituição do leite materno, deixando-o menos efetivo para a nutrição do filhote (QUIAN SHEN; et al., 2011).

No entanto, a literatura é rica em dados acerca das consequências do aumento da ingestão de proteínas para um adulto, seja ele roedor ou humano, porém, fica clara a escassez de dados sobre esta conduta durante o período gestacional. Além da intercorrência de poucos dados, existe incoerência entre as pesquisas que averiguaram a influência do excesso de proteína na formação dos sistemas do embrião/feto e também no desenvolvimento inicial dos filhotes. Frente a essa lacuna na literatura, este trabalho buscou investigar possíveis efeitos da dieta hiperproteica no organismo materno e no desenvolvimento físico e neurológico de filhotes de camundongos contribuindo assim com novos conhecimentos para área de pesquisa de interação materno fetal e possibilitando direcionar novos estudos sobre programação fetal e epigenética.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção, serão abordados os temas centrais necessários para melhor entendimento deste trabalho.

2.1 DIETA HIPERPROTEICA NA GESTAÇÃO

Durante a gestação humana é comum e necessário haver um ganho de peso corporal, que permeia os 12 a 15 quilogramas (VITOLLO, 2008). Porém, em grande parte das gestações o ganho de peso ultrapassa a normalidade, culminando assim em um ganho excessivo de peso corporal pelas gestantes. Segundo Guelinckx e colaboradores (2008), cerca de 21% das mulheres grávidas apontadas neste estudo mostravam-se acima do peso sendo que apenas 27% delas já encontravam-se obesas quando engravidaram, reiterando ainda mais a influência da gestação como indutora do ganho de peso.

Dentro deste contexto, frente a contínuas e acentuadas modificações corporais na gestação, algumas mães, tentando controlar o ganho de peso, optam por dietas nutricionalmente desbalanceadas, com excesso de algum macronutriente e diminuição de outros. Esta prática, no entanto, pode vir causar danos à gestante e ao concepto, pois, tanto o excesso quanto a carência de nutrientes podem acarretar algum prejuízo ao bem-estar gestacional (FELICIONI, 2014; QUIAN SHENet al., 2011)

Em outro contexto, ainda associado ao padrão nutricional da gestante, mulheres atletas que utilizam suplementação proteica afim de ganhar massa muscular, quando se vêm frente a uma gestação, também podem optar pela continuação da ingestão proteica em excesso, muitas vezes por falta de informação sobre as possíveis consequências para sua própria saúde e do filho.

De acordo com uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Opinião Pública e Estatística (IBOPE) em associação à Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP), para manter o peso ideal, a maioria dos indivíduos não se preocupam em procurar uma orientação médica adequada e optam por diversos métodos populares ou empíricos de dieta, sendo que muitos deles mostram-se prejudiciais à saúde. Com este enfoque, uma das dietas atualmente considerada como um dos métodos mais eficazes para perda de peso no mundo é a

Dieta Dukan, alicerçada no aumento expressivo da ingestão proteica e a diminuição drástica da ingestão de lipídeos e carboidratos. Este método de emagrecimento é estruturado em quatro diferentes etapas conhecidas como fase de ataque, fase cruzeiro, fase de consolidação e fase de estabilização, onde as duas primeiras fases objetivam a perda de peso relativamente rápida e, as duas últimas, a estabilização dos valores. Em todas as fases o aumento da proteína na alimentação é evidente, principalmente na primeira onde o indivíduo se alimenta praticamente somente de proteínas (DUKAN, 2012). No entanto, para Soenen e colaboradores (2012), a manutenção de peso corporal através da alimentação parece ser dependente somente dos níveis de proteína ingeridos, sem estar relacionado com níveis de carboidratos, visto que dietas hiperproteicas, porém isocalóricas e isolipídicas vem sendo utilizadas com sucesso para melhorar parâmetros metabólicos.

Em uma dieta hiperproteica, um dos mecanismos chaves para a perda de peso é a manutenção da saciedade, pois a taxa metabólica basal é mantida, assim como os níveis dos hormônios insulina e glucagon, porém, um balanço energético negativo é gerado, sendo o gasto então maior que a ingestão calórica, culminando em perda de peso corporal (PESTA; SAMUEL, 2014). A partir dessas informações, é importante salientar que o macronutriente mais saciante é a proteína, seguidos de carboidratos e gorduras (SOENEN; WESTERTER-PLATENGA, 2008). A mesma hierarquia acontece quando trata-se da capacidade termogênica, onde as proteínas também são consideradas como o macronutriente mais termogênico, ou seja, com capacidade de acelerar o metabolismo, culminando em maior produção de calor (PESTA; SAMUEL, 2014).

A homeostase da gestação é dependente de um estado nutricional materno adequado e o aporte nutricional deve ser suficiente para suprir adequadamente as necessidades da mãe e do concepto que aumentam exponencialmente suas exigências nutricionais de acordo com a progressão da gravidez (FOWLES, 2006; PARIZZI; PARISI; LAORETI; CETIN, 2014; FONSECA, 2010;). Além disso, em mamíferos, os únicos suprimentos nutricionais destinados ao embrião/feto são advindos da alimentação e das reservas maternas, o que novamente confirma a importância do padrão alimentar materno para o desenvolvimento, crescimento e diferenciação celular e tecidual do embrião/feto em formação (RIFAS-SHIMAN et al., 2006). Frente a tal cenário, é muito importante ressaltar que durante toda a prenhez a mãe sofre mudanças de apetite e de absorção intestinal aumentando e/ou modificando as exigências nutricionais para manutenção equilibrada da gestação (PARIZZI; FONSECA, 2010).

Uma frente relativamente nova da literatura, denominada origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD), pontua que fatores ambientais podem agir como possíveis

influenciadores da expressão genética, durante o desenvolvimento embrio/fetal e o período neonatal, o que pode culminar em padrões diferenciados de saúde/doença na vida posterior do indivíduo (SILVEIRA, 2007). Ainda segundo Silveira (2007), podem ser considerados como fatores ambientais variações de temperatura, humidade, pressão, estresse, alimentação materna a exposição a diferentes agentes químicos, poluentes entre outros parâmetros.

É importante ressaltar ainda que o desenvolvimento embrio/fetal, a infância e a adolescência são períodos de desenvolvimento físico e metabólicos críticos e, uma alteração de caráter ambiental significativa pode gerar consequências, produzindo alterações persistentes no funcionamento do organismo. Em animais, tais influências ambientais conseguem atingir o embrião/feto pela placenta, sendo capaz também de influenciar na vida do neonato através do leite materno, promovendo alterações fisiológicas que podem alterar a vida do indivíduo ainda jovem ou adulto. (SILVEIRA, 2007).

Desde o surgimento da DOHaD, várias hipóteses surgiram acerca da influência da nutrição durante a vida fetal e o risco de doenças adultas (MOORE, 2016). Assim, existem teorias que defendem que a nutrição é capaz de modificar a estrutura da cromatina, principalmente em períodos críticos, alterando assim a expressão gênica (MATHERS, 2007).

Complementando os dados expostos acima, estudos em humanos demonstram que a ingestão de níveis inadequados de nutrientes durante o desenvolvimento fetal pode estar associada inclusive a um processo de reprogramação gênica acarretando no feto um quadro de predisposição a algumas doenças crônicas que surgem na infância ou até mesmo na vida adulta (GODFREY; BARKER, 2000). Em suma, de acordo com Parisi e colaboradores (2014), alterações nutricionais na gestação podem levar a diversas falhas gestacionais, como parto prematuro, alteração no processo de placentação, falhas no crescimento e desenvolvimento fetal, diminuição do peso dos filhotes e complicações de curto ou longo prazo no desenvolvimento da prole.

Sabe-se que a necessidade de ingestão de proteína ao longo de diferentes fases da vida de mulheres sofre variação, sendo que durante a lactação existe uma maior demanda, decrescendo durante a gestação e diminuindo significativamente na fase adulta não gravídica, respectivamente (BROW, 2010). A recomendação diária de ingestão de proteínas para uma mulher adulta saudável, não grávida, é de 0,8g proteína/kg e, em contrapartida, uma gestante necessita de, em média, 1,1g/Kg de proteínas por dia (OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; SHILS; OLSON; SHIKE, 2006; STEPHENS et al., 2014).

No entanto, mesmo sendo descrita uma maior necessidade de proteína durante a gestação, existem evidências de que o consumo proteico em excesso pode causar parto

prematureo em mulheres (ROSSO; CRAMOY, 1979). Porém, é importante salientar que alterações dietéticas ou suplementação proteica podem ser necessárias em situações em que ocorram deficiências específicas (PARISI; LAORETI; CETIN, 2014).

De acordo com a literatura, uma dieta rica em proteínas pode influenciar diretamente no peso da prole. Andreyan e colaboradores (2007), mostraram que o consumo diário de 10 gramas de proteínas na fase final da gestação humana está diretamente relacionado com uma redução de 18,8 gramas no peso de recém-nascidos. Essa influência também é descrita por Maredous e colaboradores (2016) no ganho de peso em camundongos onde filhotes de mães tratadas com dieta hiperproteica (55%) durante a prenhez apresentaram menor ganho de peso. Estes mesmos pesquisadores, descrevem que o ganho de peso da prole também reduziu quando a dieta hiperproteica foi administrada apenas no período de lactação. Visto a influência direta da dieta altamente proteica sobre o peso do neonato, estudos que relacionam a alimentação materna com o tecido adiposo da prole devem ser considerados e o metabolismo deste tecido melhor compreendido.

Em mamíferos são descritos dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM) (MINAMINO; NAGASAWA; OHSURU, 2008). Os adipócitos constituintes do TAB estocam energia na forma de triglicerídios, advindos da alimentação; já as células adiposas do TAM são responsáveis por utilizar a energia acumulada no TAB, afim de gerar calor e manter a termogênese corporal em situações ambientais adversas, tais como, o frio e algumas alterações alimentares, dentre elas o aumento da ingestão lipídica (BARTELT et al., 2011; HARMS; SEALE, 2013; KROTT et al., 2016). O processo de termogênese executada pelo TAM é dependente de uma proteína localizada no interior da membrana mitocondrial, chamada Uncoupling Protein 1 ou Termogenina (UCP-1), a qual transporta os elétrons para produção energética com consequente produção de calor. Esse calor produzido é de extrema importância para grandes mamíferos em momentos de hibernação e para filhotes pequenos que nascem sem cobertura de pelos (KROTT et al., 2016). A habilidade de queimar triglicerídeos altamente energéticos como combustível para geração de calor, permite que o TAM diminua a hipertrofia do TAB, a partir do aumento do gasto energético acumulado, culminando na diminuição de peso, e se tornando assim um alvo em potencial para a diminuição da obesidade e de outras doenças metabólicas, como diabetes tipo II e hipertensão (ARIAS et al., 2015; KROTT et al., 2016).

Além da associação da alimentação rica em proteínas com o tecido adiposo, comumente o aumento de consumo proteico também é relacionado com uma sobrecarga e problemas renais. Menalich e colaboradores (2000) correlacionam o peso corporal ao número de glomérulos

renais em humanos onde quanto menor o peso, menos glomérulos existem no rim do recém-nascido. Em adultos, Abdel-Hakeem e colaboradores (2008), associaram o número glomerular como um fator de grande importância e influência frente a hipertensão, sendo que segundo os pesquisadores, pacientes hipertensos apresentaram uma redução de 46% do número glomerular. Confrontando os dados descritos, Zimanyi em associação com outros pesquisadores (2002), não observaram diferença no número de glomérulos na estrutura renal de ratos filhotes provenientes de mães alimentadas durante a gestação e em um período da lactação com ração hiperproteica (52%). Sabe-se portanto, que o efeito negativo exercido pelo aumento de proteína no rim parece estar relacionado com a necessidade de trabalho exacerbado na filtração glomerular frente ao excesso proteico (APARÍCIO et al., 2013).

É sabido que uma má formação renal pode estar associada a casos de insuficiência deste órgão, sendo a insuficiência renal conceituada como a ausência ou diminuição das funções renais, tais como a manutenção do equilíbrio eletrolítico e ácido-base, a excreção de catabólitos e as funções de regulação hormonal. Diversas patologias podem ser decorrentes de insuficiência renal onde pode-se salientar a deficiência imunológica, quadros de hipertensão, anemia, hemorragias, desordens no metabolismo de lipídios, carboidratos e proteínas e até mesmo, a intolerância à glicose (BERGSTRÖM, 1997; MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999; MCGRATH et al., 1995).

Além dos efeitos já mencionados, a alimentação hiperproteica também pode acarretar um aumento das espécies reativas ao oxigênio (EROS) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). As EROS alteram as estruturas dos ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios das membranas celulares, através da captura de seus elétrons, rompendo-a e ultrapassando os limites membranares, possibilitando assim a oxidação de estruturas intracelulares, como o núcleo. Este processo pelo qual as EROS danificam a membrana celular é denominado peroxidação lipídica (HALLIWEL, 2007). Como consequência deste processo, a membrana plasmática pode perder sua seletividade iônica e sua estrutura pode ser alterada, culminando na liberação do conteúdo das organelas (como enzimas hidrolíticas), além da formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, como o Malondialdeído (MDA, $C_3H_4O_2$), sugerindo um possível estresse oxidativo celular (ANTUNES et al., 2008; LIMA; ABDALLA, 2001). É importante frisar que a peroxidação lipídica é um fenômeno natural que acontece constantemente no organismo, em baixos níveis. Porém, o estresse oxidativo se dá quando a produção de EROS se sobressai à defesa antioxidante do corpo (HALLIWEL, 2007). A presença do MDA tecidual pode ser utilizada como um indicador da ação de radicais livres no organismo, portanto sua mensuração é considerada na literatura como um indicativo de

peroxidação lipídica (ANTUNES; et al, 2008; JANERO, 1990). A peroxidação lipídica por sua vez, pode ser considerada como um importante indicador para mensuração do nível do estresse oxidativo celular (LUZ et al., 2011).

Alterações nutricionais maternas durante a gestação são diretamente relacionadas com o crescimento e desenvolvimento dos seus descendentes (BUCKLEY; JAQUIERY; HARDING, 2005). Já se sabe que gestação e lactação são momentos importantes nos quais ocorrem intenso crescimento e desenvolvimento do sistema nervoso central, onde alterações nutricionais mostram-se como o primeiro fator não genético capaz de afetar o desenvolvimento deste sistema, possibilitando, inclusive, uma diminuição do desenvolvimento cognitivo, alterando sua normalidade (BELLUSCIO et al., 2014; MORGANE; MOCKLER; GALLER, 2002). Fica então explícito a influência da dieta materna no desenvolvimento cerebral da prole. Além deste fato, existem estudos demonstrando que padrões físicos como crescimento e ganho de peso do encéfalo podem também sofrer alterações frente a diferentes formas de alimentação da progenitora (MAREDSOULS et al., 2016). Kanitz e colaboradores (2012), demonstraram que uma dieta rica em proteínas contendo 30% de proteína e com baixo teor de carboidratos administrada a fêmeas de suíno prenhes desencadeia um aumento do tamanho cerebral dos filhotes. Porém, muito pouco se sabe a respeito do que estas alterações poderiam acarretar no crescimento e desenvolvimento destes animais. Segundo Castro (2004), avaliações acerca do desenvolvimento fetal, que incluem observações de aparecimento de sinais físicos e neurocomportamentais são importantes ferramentas para analisar o efeito de algum agente que possivelmente influencie a formação e funcionamento do sistema nervoso nas fases pré e pós-natal. A interação materno/fetal por si só já é muito importante para o desenvolvimento somático e comportamental do filhote, pois pode alterar o comportamento emocional e resposta a estresses na vida adulta (HUOT et al., 2004).

Atualmente a comunidade acadêmica não observa mais a alimentação somente como a forma de manter o metabolismo, pelo contrário, o padrão alimentar vem sendo relacionado com o controle da expressão de determinados genes, tanto a níveis transcricionais quanto pós-transcricionais, influenciando no desenvolvimento ao longo de toda a vida (REMELY et al., 2015). Este conhecimento culminou com a criação de uma área específica de estudo que enfoca a relação entre a alimentação e os nutrientes com o genoma, conhecida como Nutrigenômica (KAPUT, 2006; VIRGILLI; PEROZZI, 2008). Este ramo tem auxiliado no reconhecimento de nutrientes epigeneticamente ativos ou dietas específicas que podem alterar a herança transgeracional e predisposições pré e pós natais relacionadas com o risco e a manifestação de

diversas doenças, tais como o aumento do câncer, síndromes metabólicas e doenças neurodegenerativas (REMELYetal., 2015).

Frente a tantos dados, observa-se então a importância de uma análise detalhada acerca da alimentação suplementada de proteína sobre a gestação e o desenvolvimento físico e neuropsicomotor do filhote.

2.2 CAMUNDONGOS COMO MODELO DE PESQUISA EM REPRODUÇÃO

Para realização deste trabalho foi utilizado como modelo de pesquisa a gestação de camundongos, devido a semelhança de interações realizadas entre o organismo materno e fetal durante todo o período gestacional com a espécie humana. Este fato se deve principalmente a primatas e roedores possuem a placenta do tipo hemocorial onde as células trofoblásticas interpõem-se entre as células maternas e as células do embrião/feto, regendo suas intermediações durante toda a gestação (AMARANTE, 1997; AMARANTE-PAFFARO, 2011; ENDERS; WELSH, 1993; GEORGIADES; FERGUSON-SMITH; BURTON, 2002; WANG; DEY, 2006).

Outros fatores importantes que também corroboram com a escolha deste modelo de pesquisa é a facilidade de manipulação e manutenção destes animais em biotérios experimentais (LAPICHIK; MATTARAIA; KO, 2009). Além do fato da prenhez de camundongos poder ser dividida em três períodos distintos, sendo eles: Período pré-embriônico (1° ao 6° dia de gestação - ddg), Período Embrionário (7° ao 14° ddg) e Período fetal (15° ao 21° ddg), relativamente rápidos, permeando 21 dias no total (DAMASCENO, 2008; ROMAN, 2011). Este curto período de desenvolvimento gestacional, associado ao grande número de filhotes nascidos por prole (em média 12) e o curto intervalo entre as ninhadas vem propiciando a comunidade científica análises mais completas e respostas importantes em um período relativamente curto de tempo (SANTOS, 2002).

Em média, cada um dos filhotes de camundongos da linhagem Swiss nasce com cerca de 1 a 1,5 gramas (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007), porém, é bem descrito na literatura que os filhotes de roedores continuam seu desenvolvimento e maturação após o nascimento (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA; 2002; MORGANE; MOCKLER; GALLER, 2002;), sendo o sistema nervoso, por exemplo, mais imaturo que a espécie humana ao nascimento. Mas toda a maturação e desenvolvimento dos sistemas corpóreos pode ser

acompanhada rapidamente pois, com 30 dias temos o adulto jovem já na puberdade (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA; 2002; CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007).

Acompanhando o desenvolvimento físico pós natal é possível observar, no momento do nascimento, que a genitália externa já formada permite a diferenciação sexual, realizada através da medida da distância anus/genital (distância entre o órgão genital e o ânus) a qual se mostra maior em machos do que em fêmeas. Em relação ao desenvolvimento físico, neonatos de camundongos nascem com ausência total de pelos, olhos fechados, pavilhão auricular preso à cabeça e desprovidos de dentes. Tais parâmetros começam a ser observados ao longo da primeira infância destes animais, sendo o descolamento de orelha o primeiro a acontecer, por volta do 3º dia pós-nascimento (dpn) (CALVINO-NUNEZ, DOMÍNGUEZ DEL TORO; 2014), seguido pelo aparecimento de pelos, que se inicia com três dias de idade, mas se completa em torno de oito a nove dias; rompimento dos incisivos superiores e inferiores, permeando os 11 dias de vida e, por fim, abertura dos olhos que normalmente ocorre em torno de 12 a 14 dpn (BELLUSCIO et al., 2014; LAPICHIK; MATTARAIA; KO, 2009).

A puberdade e o desenvolvimento sexual das fêmeas pode ser observado parcialmente por volta do 24º ao 28º dpn, onde a vagina começa a se abrir e a partir da corneificação do epitélio, em algumas espécies, já pode ser detectado o estro (fase do ciclo estral onde as fêmeas se tornam receptivas à cópula). Porém, a idade da puberdade em si varia, sendo que o estro completo inicia apenas alguns dias mais tarde, acompanhado da abertura completa da vagina. No macho, a maturação sexual também pode ser observada, acompanhando-se a descida dos testículos para a bolsa escrotal, que ocorre em torno de 25 a 30 dias de vida. Em geral, a idade da puberdade é variável tanto em machos quanto em fêmeas, sendo que em machos é descrita por volta dos 35 dias de idade, com maturidade completa com 50 dias, e em fêmeas com 60 dias (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007; LAPICHIK; MATTARAIA; KO, 2009). No entanto, é importante destacar que a maturação sexual se mostra muito variável entre diferentes linhagens e colônias de camundongos devido ao fato de ser influenciada por variações ambientais, como temperatura, estações e iluminação (LAPICHIK, MATTARAIA, KO; 2009).

3 JUSTIFICATIVA

Sendo a gestação um momento propiciador do ganho excessivo de peso, observa-se, geralmente, a busca por dietas para controlar o ganho de massa corpórea. Uma das dietas utilizadas, com este intuito, atualmente é a Dieta Dukan, baseada na ingestão de proteínas e eliminação de outros macronutrientes. Em um outro contexto, o uso de suplementos alimentares de base proteica objetivando o aumento da massa muscular em mulheres atletas ou busca por um corpo modelo também pode exercer influência frente à gravidez. Porém, ainda pouco se sabe a respeito da possível influência de uma alimentação HP na gestação, tanto para a progenitora, quanto para o neonato.

Sabe-se, porém que a nutrição durante a gestação é um fator que não apenas influencia no desenvolvimento intrauterino mas também pode ser considerado determinante para o bom desenvolvimento da prole da primeira infância a vida adulta. Trabalhos com esta temática têm surgido no meio científico, principalmente na última década, no entanto, existem ainda muitas lacunas a serem desvendadas. Elucidar os possíveis efeitos da dieta hiperproteica ministrada durante a gestação sobre os sistemas urinário, no ganho de peso, no desenvolvimento físico e de reflexo dos filhotes, parece ser de grande importância para compreensão da ocorrência de distúrbios posteriores no desenvolvimento da prole, assim como alertar para os riscos maternos frente a esta conduta alimentar.

4 OBJETIVOS

Seguem, detalhados abaixo, o objetivo geral e específicos do presente trabalho.

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os possíveis efeitos da ingestão de dieta hiperproteica (42%), durante a prenhez no organismo materno e no desenvolvimento da prole de camundongos.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar possíveis alterações devido a ingestão da dieta HP durante a prenhez de camundongos:

- a) No ganho de massa corpórea assim como no total da ingestão alimentar das fêmeas prenhes;
- b) No número de filhotes nascidos vivos;
- c) No tamanho e peso da ninhada;
- d) Na ocorrência de alterações morfológicas nos tecidos adiposos marrom e branco da mãe e da prole;
- e) Na morfologia renal materna, em fetos e nos filhotes jovens;
- f) No desenvolvimento de parâmetros físicos e de reflexos da prole durante o primeiro mês de vida;
- g) Nas taxas de peroxidação lipídica das placentas, rins e fígados das mães e dos filhotes.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), mais especificamente no Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento nas dependências do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt). Apenas as leituras da peroxidação lipídica e a quantificação proteica foram efetuadas no Laboratório de Bioquímica e no Laboratório de Microbiologia do mesmo Instituto.

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 20 fêmeas prenhes, 60 filhotes e 5 machos adultos, da linhagem Swiss, para a obtenção dos dados apresentados neste trabalho. Os animais utilizados foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), e mantidos no Biotério de Experimentação Animal do LABAInt durante todo o período de experimentação.

As fêmeas foram acasaladas com machos da mesma linhagem, a partir do método de harém, na proporção fêmea:macho de 3:1. O dia que se constatou a presença do tampão vaginal (Figura 1A), foi considerado como 1º dia de gestação (ddg).

Durante todo o período experimental os animais foram acondicionados em caixas de polietileno forradas com cama de maravalha, guardadas em estantes ventiladas com temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12/12 horas (Figura 1B-C). O acesso à água e alimentação foi *ad libitum* para todos os animais, porém, as fêmeas prenhes do grupo experimental tiveram a ração rotineira trocada pela hiperproteica, a partir do 1º (ddg) (ver item 5.3). Todos os procedimentos experimentais foram avaliados e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UNIFAL-MG, sob protocolo 668/2015 (Anexo I).



Figura 1- Observação de rolha vaginal e armazenamento dos animais em biotério.

Fonte: Da autora

Nota: A. Detecção da rolha vaginal, considerando assim o 1º ddd; B. Armazenamento individual das fêmeas prenhes; C. Estantes ventiladas para armazenamento das gaiolas dos camundongos

5.2 DIETAS

A ração hiperproteica utilizada neste trabalho, foi constituída de aproximadamente 42% de proteína (sendo o conteúdo proteico a base de caseína), 7% de lipídeos e 41% de carboidratos, sendo adquirida na empresa PRAG Soluções – biociência©. Vale salientar que nesta dieta, apesar da porcentagem menor de carboidratos, os valores de carboidratos e lipídeos permaneceram nos níveis de normalidade (Tabela 1).

Tabela 1- Composição centesimal (g/100g de ração) das rações utilizadas para execução deste trabalho

	PROTEÍNAS	CARBOIDRATOS	LIPÍDEOS
RAÇÃO CONTROLE (NUV-LAB COMERCIAL)	~ 22 gramas	~ 46 gramas	~ 4 gramas
RAÇÃO HIPERPROTEICA (HP)	~ 42 gramas	~ 41 gramas	~ 7gramas

Fonte: Da autora

A ração controle utilizada foi uma ração comercial utilizada como padrão no laboratório de pesquisa onde este trabalho foi desenvolvido (NUV-Lab CR-1 AUTOCLAVÁVEL). Ambas as rações foram disponibilizadas aos animais no formato de pellets, na proporção de 50 gramas/dia por animal, facilitando assim o acesso dos mesmos e a quantificação da alimentação.

Para selecionar a dieta utilizada os valores calóricos das dietas selecionadas foram avaliados e comparados com os valores da dieta base para camundongos grávidos – AIN 93G, previamente estabelecida pelo AIN, *American Institute of Nutrition* (NEVES et al., 2013). (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise calórica da dieta base AIN 93G

AIN 93G	Valor Calórico (Kcal/100g)	Distribuição calórica (%)	Densidade Calórica (Kcal/g) da dieta
PROTEÍNA	80	22,79	
CARBOIDRATO	208	59,25	3,51
LIPÍDEO	63	17,94	

Fonte: Da autora

Tabela 3 – Análise calórica da dieta controle utilizada nos experimentos

CONTROLE	Valor Calórico (Kcal/100g)	Distribuição calórica (%)	Densidade Calórica (Kcal/g) da dieta
PROTEÍNA	88	28,57	
CARBOIDRATO	184	59,7	3,08
LIPÍDEO	36	11,68	

Fonte: Da autora

Tabela 4 – Análise calórica da dieta HP utilizada nos experimentos

HP	Valor Calórico (Kcal/100g)	Distribuição calórica (%)	Densidade Calórica (Kcal/g) da dieta
PROTEÍNA	168	42,5	
CARBOIDRATO	163,8	41,5	3,95
LIPÍDEO	63	15,94	

Fonte: Da autora

É importante salientar que está presente nas duas rações disponibilizadas o antioxidante Butil-Hidroxi-Tolueno (BHT), em concentrações semelhantes, o que descarta uma possível influência deste nos resultados referentes a peroxidação lipídica descritos posteriormente (Figura 2 e Tabela 5).



Manipulador

Formula Dieta Hiperproteica HP

Dose (g ou ml) 2.200

Dose (Kg ou L) 2,20 Vezes: 1 X

Cód	Produto	Quantidade prescrita	Fornecedor	Fator correção	Lote	Validade	Quantidade prod. (g/ml)	Pesados prod. (g/ml)	Verif OK
	AMIDO DE MILHO	17,75000%	Ingredion	1	990522	13/10/16	390,500	390,500	
	CASEINA	42,00000%	MSI	1	19130T100	21/03/16	924,000	924,000	
	AMIDO DEXTRINIZADO	13,20000%	Ingredion	1	909110	29/02/16	290,400	290,400	
	SACAROSE	10,00000%	GA	1	0407	04/07/16	220,000	220,000	
	OLEO DE SOJA	7,00000%	Cocamar	1	811502	05/03/2016	154,000	154,000	
	CELULOSE MICROCRISTALINA	5,00000%	Farmos	1	D23279	30/07/2017	110,000	110,000	
	MIX MINERAL AIN 93 G	3,50000%	PragSoluções	1	180515	18/05/16	77,000	77,000	
	MIX VITAMINICO AIN 93	1,00000%	PragSoluções	1	240415	24/04/16	22,000	22,000	
	L CISTINA	0,30000%	Farmos	1	104604	03/06/2018	6,600	6,600	
	BITARTARATO DE COLINA	0,25000%	Farmos	1	3006290	30/07/19	5,500	5,500	
	BHT	0,0014%	Oficinalis	1			0,031	0,031	
		100,00140%					2.200	2.200	

diluições: 1/0000 em sacarose

Figura 2 - Rótulo detalhado da ração hiperproteica

Fonte: Cedido pela empresa PRAG SOLUÇÕES

Tabela 5 - Rótulo detalhado da ração controle

COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO	QUANTIDADE
PROTEÍNA BRUTA	220 g/kg
EXTRATO ESTÉREO	50 g/kg
MATERIAL MINERAL	90 g/kg
FIBRA BRUTA	70 g/kg
CÁLCIO	10-14g/kg
FÓSFORO	6.000 mg/kg
VITAMINA A	13.000 µl/kg
VITAMINA D3	2.000 µl/kg
VITAMINA E	34 µl/kg
VITAMINA K3	3mg/kg
VITAMINA B1	5 mg/kg
VITAMINA B2	6 mg/kg
VITAMINA B6	7 mg/kg
VITAMINA B12	22 mcg/kg
NIACINA	60 mg/kg
PANTOTENATO DE CÁLCIO	21 mg/kg
ÁCIDO FÓLICO	1 mg/kg
BIOTINA	0,05 mg/kg
COLINA	1.900 mg/kg
SÓDIO	2.700 mg/kg
FERRO	50 mg/kg
MANGANÊS	60 mg/kg
ZINCO	60 mg/kg
COBRE	10 mg/kg
IODO	2 mg/kg
SELÊNIO	0,05 mg/kg
COBALTO	1,5 mg/kg
FLUOR	60 mg/kg
LISINA	12 g/kg
METIONINA	4.000 mg/kg
BHT	100 mg/kg (0,01%)

Fonte: Da autora

5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS

As fêmeas prenhes foram distribuídas em quatro grupos experimentais sendo: (1) Grupo Controle - constituído pelas fêmeas alimentadas com ração comumente utilizada no biotério (ver ítem 5.2), em regime *ad libitum* até o nascimento da prole (n=5); (2) Grupo HP - composto por fêmeas alimentadas com a ração hiperproteica (42%) durante toda a prenhez, até o nascimento dos filhotes (n=5); (3) Grupo HP 19 (n=5), constituído de fêmeas alimentadas com

ração hiperproteica até o 19º ddg quando a gestação foi interrompida; e (4) Grupo Controle 19 (n=5), no qual as fêmeas foram alimentadas com ração controle até o 19º ddg, sendo a prenhez também interrompida no 19º ddg. Nos grupos onde houve o nascimento da prole (Controle e HP), as fêmeas foram alimentadas com a ração controle durante toda a fase de lactação. Em todos os grupos os filhotes e fetos foram avaliados macroscopicamente em busca de má-formações externas.

O planejamento estatístico para determinação do número de animais (N) utilizado em cada experimento foi realizado como demonstrado pelo CEUA da Universidade Federal do ABC (CEUA-UNB, 2011) adaptado de Eng (2003).

5.4 ANÁLISE DA INGESTÃO ALIMENTAR E GANHO DE PESO MATERNO

A ingestão de ração das fêmeas prenhes do grupo Controle e HP foi quantificada diariamente. Uma vez que o consumo médio diário de ração por camundongo adulto é em torno de cinco gramas (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007), foram pesadas e distribuídas porções diárias de aproximadamente 50gramas ($\pm 1g$) de ração por gaiola o que permitiu às fêmeas dispostas individualmente em cada gaiola, ter livre acesso a alimentação. Toda manhã a sobra da ração foi pesada e o resto ingesta calculado, subtraindo a sobra das 50 gramas oferecidas inicialmente. Depois de calculado o montante do consumo diário (ingestão alimentar diária), a ração disponibilizada era completada para 50 gramas novamente. O ganho de peso das fêmeas foi averiguado diariamente a partir do 2º ddg até o final da prenhez, visando a comparação direta entre os grupos Controle e HP.

5.5 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

As mães do grupo Controle e HP foram eutanasiadas, através da técnica de deslocamento cervical, 32 dias após o nascimento da prole (32º dia pós-nascimento – dpn), através da técnica de deslocamento cervical e laparatomizadas para coleta do tecido adiposo branco perigonadal (TAB), rins e fígado, sendo na sequência posicionada dorsalmente para retirada do Tecido adiposo marrom intra-escapular (TAM). Os rins esquerdos e parte do lóbulo

central do fígado foram destinados às análises bioquímicas enquanto os rins direitos foram destinados a estudos morfológicos e morfométricos, assim como todo o tecido adiposo. A tibia esquerda também foi coletada e medida através de paquímetro digital (MARBERG 200 mm), apenas com o fito de normalização do tamanho do animal, sendo descartada na sequência.

Todo o material biológico coletado destinado às análises morfológicas e morfométricas foram fixados por imersão em paraformaldeído 4% por 3 horas, lavados em PBS 0,05M e mantidos em álcool 70% para posterior inclusão rotineira em parafina.

Os órgãos separados para análises bioquímicas foram coletados a fresco e transferidos uma solução de congelamento (13 mL) contendo 10 mL Tampão Tris-HCl, pH 7,2, 1,5 mL de anti-oxidante (Butil-hidroxi-tolueno – BHT 0,4%) e 1,5 mL de anti-protease (Fenilmetilsulfonyl – PMSF 5%) e congelados em biofreezer (-80° C), para posterior análise.

As proles nascidas dos grupos Controle e HP, foram analisadas macroscopicamente em busca de más-formações externas e submetidos aos testes de análise de desenvolvimento físico e neurológico (ver item 5.12), foram também sacrificados no 32° dpn para coleta de rins (direito e esquerdo), tecido adiposo (TAM e TAB), tibia esquerda e fígado, todos acompanhando os mesmos procedimentos descritos anteriormente para as mães. Para a coleta destes órgãos, foram utilizados 3 filhotes fêmeas e 3 machos de cada prole, possibilitando um n=15 de filhotes de cada sexo.

Em relação ao grupo Controle 19 e HP 19, as mães foram eutanasiadas no 19° ddg, visando a retirada dos cornos uterinos para coleta das placentas e fetos. Os fetos foram observados macroscopicamente em busca de má formações externas e foram coletadas duas placentas de cada mãe sendo destinadas uma para análise morfológica e morfométrica e a segunda para a análise bioquímica. Um feto de cada ninhada foi dissecado para retirada do rim esquerdo, destinado a análise histológica e morfométrica. É importante ressaltar aqui, que a tibia não foi coletada pela impossibilidade física, decorrente do tamanho dos fetos nesse dia de gestação. Assim como descrito acima, os órgãos destinados à morfologia foram fixados e processados para parafina para futura análise microscópica e as placentas destinadas às análises bioquímicas foram armazenadas como já explicitado anteriormente.

Todos os órgãos coletados foram avaliados no momento da eutanásia em busca de alterações macroscópicas, lavados em PBS 0,05M e pesados antes de serem destinados aos procedimentos específicos.

5.6 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Para análise morfológica, depois de fixados por imersão em paraformaldeído 4% por 3 horas, os rins, tecidos adiposos marrom e branco (maternos e dos filhotes) e placentas, foram lavados três vezes (10 minutos cada) em PBS 0,05M, desidratados em bateria crescente de etanol (70%, 95%, Absoluto I e II – 30 minutos em cada), diafanizados em Xilol (dois banhos – 20 minutos cada) e embebidos em parafina (PARAPLAST - Sigma) 1:1 com xilol ao longo de 40 minutos na estufa a 60° C. Após dois banhos em parafina pura, de 30 minutos cada, os cortes foram então incluídos em parafina histológica (Paraplast – Sigma). Os blocos obtidos foram identificados e acoplados a uma base de madeira para posterior corte em micrótomo. Os cortes histológicos de placenta, TAM e TAB foram obtidos de maneira semi-seriada com 7 µm e os rins com 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica RM 2135). Todos os cortes foram coletados em lâminas histológicas previamente tratadas com poli-L-lisina (Sigma) a 1% (Sigma-St.Louis/EUA).

5.7 COLORAÇÃO COM HEMATOXILINA E EOSINA (HE)

As lâminas contendo as secções teciduais foram desparafinizadas em xilol (dois banhos de 20 min), desidratadas em bateria de etanol (Absoluto I e II, 95% e 70% - 5 min cada), coradas com Hematoxilina por 30 a 40 segundos, lavadas em água corrente e água destilada para a retirada do excesso de corante e coradas com Eosina por 10 segundos. As lâminas foram então desidratadas por uma bateria crescente de etanol: 70%, 90%, 95%, absoluto I, II e III (5 min cada), banhadas em Xilol (2 vezes - 2 minutos) e montadas com bálsamo do Canadá.

5.8 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DO TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo marrom e o branco das mães foram analisados em microscópio de luz associado a um sistema de captura de imagens NIKON- Zeiss. A área dos adipócitos foi medida com auxílio do programa NIS-Elements, onde foram fotografados cinco campos aleatórios, de um corte de tecido adiposo branco ou marrom, de cada animal, no aumento de 40x. Em cada campo fotografado, foram medidos 15 adipócitos aleatoriamente e coletados os valores das suas áreas em micrômetros quadrados (µm²). Para esta análise foram utilizadas todas as mães HP e

Controle (n=5), além de 14 filhotes, sendo 4 machos e 3 fêmeas, de cada um dos grupos analisados.

5.9 ANÁLISE MORFOMÉTRICA RENAL

As lâminas histológicas dos rins das mães, filhotes e fetos, foram analisadas e fotografadas no mesmo microscópio óptico com sistema de captura de imagens descrito no item anterior. O número total de glomérulos renais foi quantificado no aumento de 10x, para cada animal. Para a contagem do número de células glomerulares e as medidas das áreas foram usados 15 néfrons selecionados aleatoriamente, no aumento de 40x. Foram medidas as áreas (em μm^2) dos corpúsculos renais (néfrons), cápsula de Bowman e glomérulos (Figura 3). Para esta análise foram utilizadas todas as mães do grupo Controle e HP (n=5), 14 filhotes de 32 dpn, sendo n= 4 machos e n=3 fêmeas, para cada grupo de tratamento (Controle e HP), e 8 fetos de 19º ddg, Controle 19 (n=4) e HP 19 (n=4).

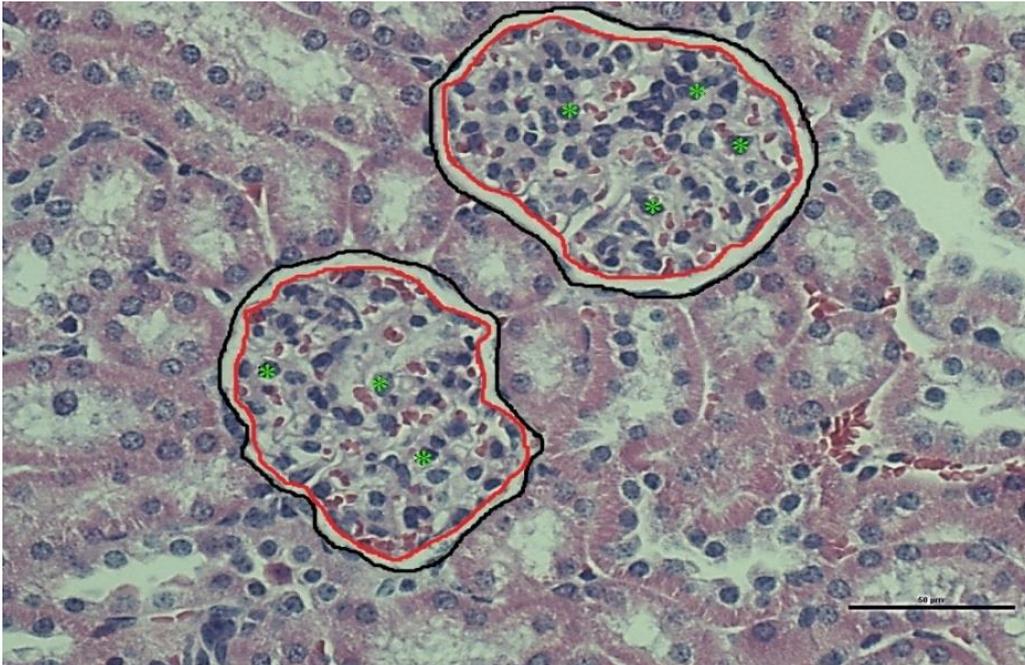


Figura 3– Metodologia utilizada para as análises morfométricas renais.

Fonte: Da autora

Nota: Marcações em preto: medida da área do corpúsculo glomerular ou renal; Marcações em vermelho: medida da área do glomérulo; (*) algumas células glomerulares. Para a mensuração da área da Cápsula de Bowman (área branca entre as duas marcações), foi subtraída a área do glomérulo do corpúsculo renal. Coloração: Hematoxilina e Eosina (40x).

5.10 ANÁLISE MORFOMÉTRICA DA PLACENTA

As placentas das mães do grupo Controle 19 e HP 19 foram analisadas morfológica e morfometricamente. As análises morfométricas foram executadas, como descrito anteriormente para os demais tecidos, através do sistema de captura de imagens acoplado ao microscópio óptico, com o auxílio do Programa Nis Elements e do Programa Am Scope MU1000 – Still and Live Image Microscop Digital Camera (Editing and Measuring Software). Para esta análise foram utilizadas 4 placentas do grupo Controle 19, sendo uma de cada fêmea prenhe e 5 placentas do grupo HP 19. As placentas foram fotografadas panoramicamente, no aumento de 4x e, a partir das imagens obtidas, foram medidos os seguintes parâmetros: área total, espessura, comprimento, número de ilhas de espongiotrofoblasto e área de labirinto e espongiotrofoblasto,

como explicitado na Figura 4. É importante ressaltar que as placentas foram incluídas divididas ao meio em seu maior eixo, visto que os cortes das placentas foram obtidos de forma semi-seriada e dispostos em lâminas numeradas, onde os cortes selecionados para as análises morfológicas foram sempre os coletados na lâmina cinco, sendo medidos os 3 cortes da lâmina e realizada uma média dos valores obtidos.

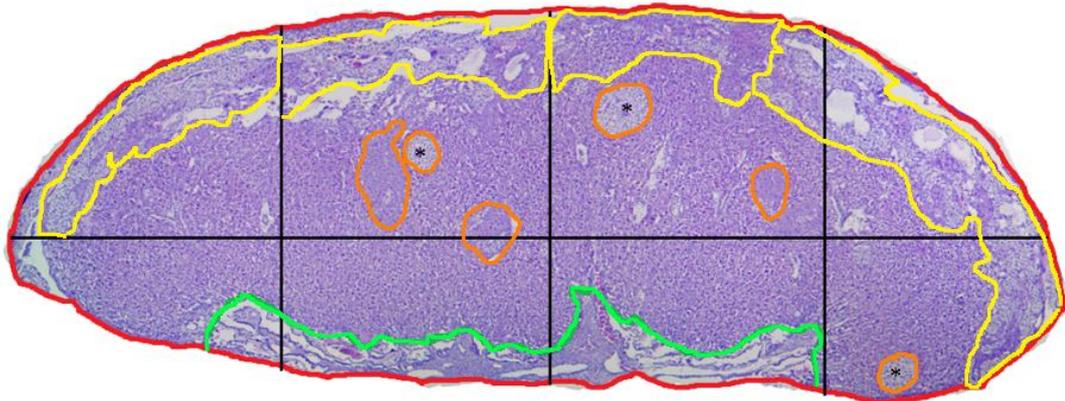


Figura 4 – Morfometria placentária

Fonte: Da autora

Nota: Análise da área total (em vermelho), comprimento, espessura central, lateral direita e lateral esquerda (em preto), medida da área de espongiotrofoblasto (em amarelo), medida da área do prato coriônico (em verde), medida, quantificação e diferenciação das ilhas de espongiotrofoblasto (em laranja). Ilhas de espongiotrofoblasto compostas por células de glicogênio (*). As ilhas circundadas em laranja e não marcadas com o asterisco são ilhas de espongiotrofoblastos compostas por células produtoras de hormônios. A medida da área de labirintotrofoblasto foi feita através da subtração das áreas das ilhas de espongiotrofoblasto, da área total de espongiotrofoblasto e do prato coriônico da área total da placenta.

5.11 ANÁLISE BIOQUÍMICA

5.11.1 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi analisada através da mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em comparação à massa proteica do material biológico analisado (fígado e rim materno e de filhotes e placenta).

As amostras previamente coletadas como descrito anteriormente, foram descongeladas à temperatura ambiente e maceradas, com o fito de obter uma solução homogênea dos tecidos. Após a maceração, as amostras foram centrifugadas a 2000 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4° C. Após centrifugação, o líquido sobrenadante foi separado do sólido depositado no fundo de cada tubo, onde somente o sobrenadante foi utilizado. De cada tubo centrifugado foi aliqotado 400 µL do sobrenadante para análise de TBARS e reservados 20 µL para quantificação da massa proteica. Todas as análises foram executadas em triplicata.

5.11.1.1 Mensuração da concentração das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e mensuração da massa proteica.

A mensuração da concentração de TBARS foi executada baseada na técnica já descrita anteriormente por Janero (1990). Para isso, em cada um dos tubos destinados à reação de TBARS foram acrescentadas as substâncias abaixo na mesma sequência descrita:

- a) 1000 µL de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0,8 %;
- b) 1000 µl de tampão ácido acético (pH 3,4);
- c) 400 µL de Duodecil Sulfato de Sódio (SDS) 8,1% (m/v; água destilada);
- d) 400 µL de homogeneizado tecidual;
- e) 200 µL de água destilada.

Após homogeneizados em vórtex, os tubos foram incubados por 2 horas em estufa a 95° C e resfriados por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm, sendo o branco padronizado por uma solução contendo as mesmas substâncias e quantidades dos grupos avaliados, porém na ausência do homogeneizado tecidual.

Para o cálculo da concentração das TBARS foi utilizada a seguinte fórmula:

$$C (\mu\text{M}) = 0,153 \times A_{532}$$

Onde, **0,153** corresponde à constante de multiplicação estabelecida pelo $\epsilon_{532\text{nm}} = 153 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e **A532** corresponde ao valor de absorvância da amostra a 532 nm.

Para quantificação da massa proteica das amostras, utilizou-se uma técnica descrita por Smith e colaboradores (1985), realizada através do kit Pierce TM BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, n. 23225).

Inicialmente foi realizada uma curva de calibração das soluções utilizadas durante o método e apenas valores $R^2 \geq 0,98$ foram utilizados na quantificação da massa proteica. Para curva de calibração foi utilizada uma solução de soro fetal bovino (BSA) nas concentrações de 0, 25, 125, 250, 500, 750, 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$ diluída em Tampão Tris-HCl pH 7,4. As dosagens foram realizadas em triplicatas e mensuradas a 562 nm. Foi realizada média aritmética de cada triplicata para plotagem do gráfico (massa de BSA ($\mu\text{g/mL}$) X Abs562nm), obtenção de R^2 e equação da reta de regressão linear.

Para mensuração da massa proteica foi preparada a solução do Pierce TM BCA Protein Assay Kit na proporção 50:1 (reagente “A”: reagente “B”) como descrito pelo fabricante. As amostras foram distribuídas em microplaca sempre em triplicata, adicionando em cada poço 15 μL de tampão Tris-HCl pH 7,2, 20 μL de amostra e 200 μL de solução AB. A placa foi homogeneizada por 2 minutos e incubada por 30 minutos à temperatura de 37° C. A leitura foi realizada a 562 nm em espectrofotômetro. A massa proteica do analito foi então calculada através da equação da reta de regressão linear obtida anteriormente e a concentração de TBARS foi calculada para 1 μg de massa proteica.

Tanto a quantificação da massa proteica quando as análises de TBARS foram realizadas para as mães alimentadas com dieta HP e controle (n=5 para cada grupo) e para 14 filhotes, sendo n=4 para machos, em ambos os grupos, e n=3 para filhotes fêmeas, também nos dois grupos estudados.

5.12 ANÁLISE DA PROLE

Ao 1º dia pós-nascimento (dpn) a prole foi contada, padronizada em seis filhotes - sendo prioritariamente três fêmeas e três machos. Após observação dos filhotes em busca de alterações morfológicas visíveis a normalização da prole foi realizada considerado apenas como critério

de seleção a visualização de leite no estômago dos animais pela mancha branca existente no abdômen. De acordo com Chorilli e colaboradores (2007), tal aspecto deve ser considerado se houver necessidade de seleção de animais, pois, animais que mamam demonstram maior habilidade para sobreviver.

As análises de desenvolvimento físico e neurológico foram realizadas no decorrer do primeiro mês de vida dos neonatos, até que todos os parâmetros fossem avaliados.

5.12.1 Testes de desenvolvimento físico

Para os testes de desenvolvimento físico foram utilizados seis filhotes por prole (três machos e três fêmeas). Os filhotes foram numerados e marcados diariamente com caneta permanente, de forma padronizada, para possibilitar o reconhecimento de cada um durante o período de experimento (Figura 5).

Todas as observações físicas dos filhotes foram realizadas no mesmo horário do dia (entre 16 e 17 horas), até o 32º dpn. A presença ou ausência dos parâmetros observados foram relacionados à idade do animal, sendo cada parâmetro avaliado até todos os filhotes apresentarem resposta para o mesmo (Figura 6).

A metodologia utilizada para realização destes testes foi baseada no trabalho de Castro e colaboradores (2000), no entanto, tais autores utilizavam ratos como modelo de pesquisa, dessa forma, os aparatos e análises foram adaptados para testes em camundongos. Os testes de desenvolvimento físico executados neste trabalho foram:

- a) Análise do descolamento de orelha;
- b) Aparecimento de pelo;
- c) Abertura do olho;
- d) Rompimento do dente incisivo superior e inferior;
- e) Descida dos testículos;
- f) Abertura da vagina.

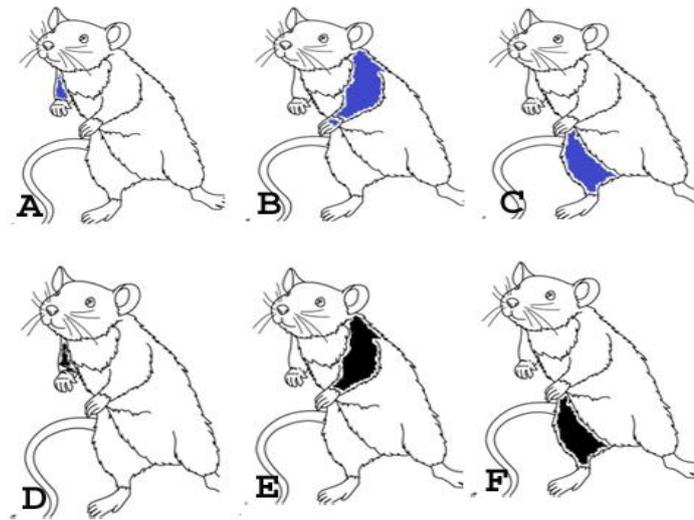


Figura 5 - Marcação padronizada dos filhotes para os testes de desenvolvimento físico e de reflexos neurológicos.

Fonte: Da autora

Nota: **A, B, C:** Padronização feita em fêmeas (azul), sendo respectivamente, Fêmea 1, Fêmea 2 e Fêmea 3; **D, E, F:** Padronização de marcação para machos (preto), Macho 1, Macho 2 e Macho 3, respectivamente.

O ganho de peso dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida também foi monitorado, sendo que os filhotes foram pesados de dois em dois dias, a partir do 2º dpn. Além desses parâmetros, o crescimento naso/caudal, naso/anal e anus/genital foram aferidos (Figura 6 H-J), também respeitando dois dias entre as medidas, utilizando-se um paquímetro digital (MARBEG) de 200 mm de extensão.



Figura 6 - Parâmetros físicos analisados neste trabalho.

Fonte: da autora

Nota: **A.** Animal no dia do nascimento. Observar os olhos fechados, orelhas coladas à cabeça e ausência de pelos. **B.** Descolamento de orelha. **C.** Aparecimento de pelos. **D.** Rompimento dos incisivos. **E.** Abertura de olhos. **F.** Descida dos testículos. **G.** Abertura de vagina. **H.** Medida da distância ano/genital. **I.** Posicionamento do animal para marcação no papel para futura medida naso/caudal e naso/anal com paquímetro digital MARBEG, explicitado em **J.**

5.12.2 Testes de reflexos neurológicos

Para os testes de desenvolvimento de reflexos também foram utilizados três filhotes do sexo masculino e três do sexo feminino de cada prole. Os testes de desenvolvimento neurológico, foram realizados nas mesmas condições citadas acima para os testes de desenvolvimento físico. Os parâmetros para os testes de desenvolvimento neurológico foram baseados e adaptados dos trabalhos de Castro (2006) e Davydov e colaboradores (2015), sendo realizados como descritos a seguir:

- a) Reflexo de endireitamento: o filhote foi colocado deitado em uma superfície plana em decúbito dorsal. Observa-se se em 30 segundos totais se o animal consegue retornar ao decúbito ventral, com as quatro patas apoiadas na superfície (Figura 7 A-C);
- b) Geotaxia negativa: O animal foi colocado em uma rampa de superfície antiderrapante com um ângulo de 30° de inclinação, com a cabeça voltada para a parte mais baixa. Observou-se o filhote por 60 segundos para verificar se ele conseguia virar-se 180°, de forma a estar com a cabeça voltada para a parte mais alta da rampa (Figura 7 D-F);
- c) Sobressalto auditivo: O filhote foi exposto a um som alto e estridente e observou-se se ele percebeu o som, causando um sobressalto no animal. O sobressalto indica início da atividade auditiva do indivíduo.

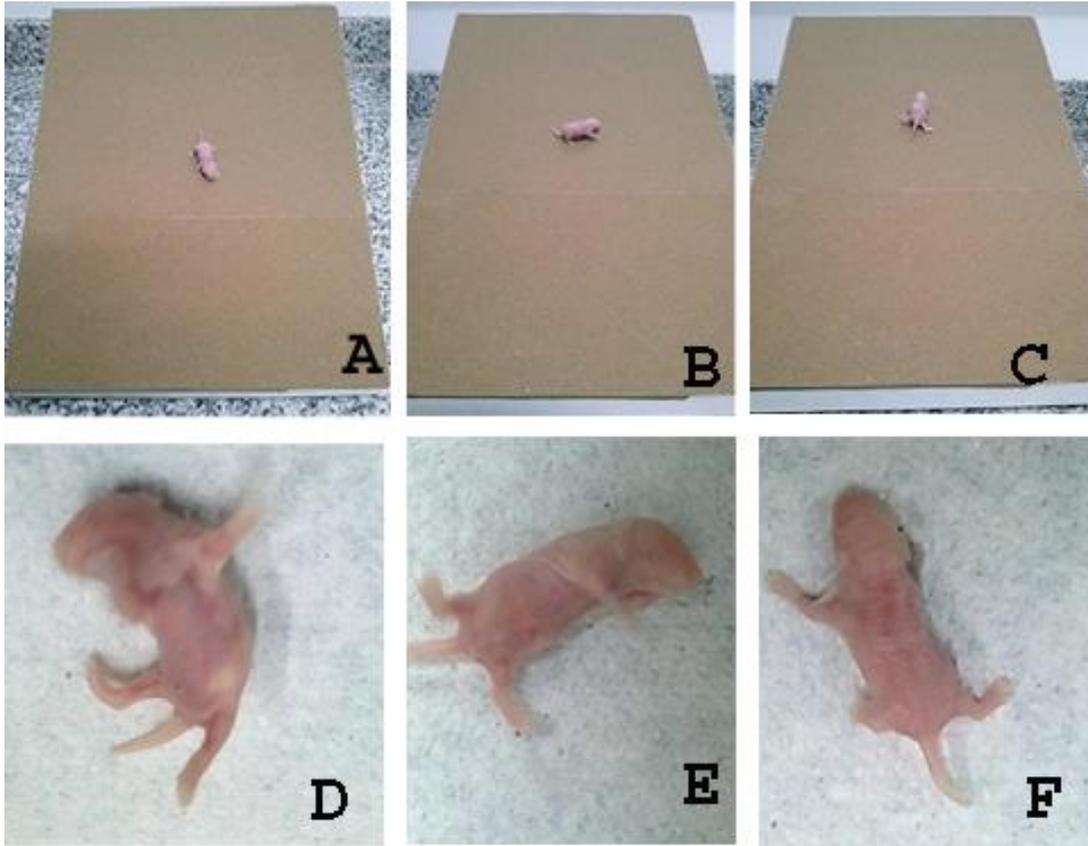


Figura 7- Testes de reflexo da prole

Fonte: Da autora

Nota: **A, B, C.** Filhote executando teste de geotaxia negativa, iniciando com a cabeça voltada para parte baixa da rampa e, finalizando depois de uma volta de 180°, com a cabeça para a parte alta da rampa, sendo assim positivo para o teste. **D, E, F:** Animal desempenhando o teste de reflexo de endireitamento, sendo colocado em decúbito dorsal, com habilidade para se endireitar em decúbito ventral, no tempo estipulado para o teste, sendo assim positivo para o parâmetro analisado.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico Graph Pad Prism 6. Todos os parâmetros deste trabalho foram analisados primeiramente quanto a normalidade dos seus valores, sendo utilizado Shapiro-Wilk normality-test. Quando comprovada normalidade, os valores seguiam para testes específicos para a distribuição normal, e o contrário também foi feito.

Em relação às análises de ingestão alimentar materna, ganho de peso e os crescimentos (naso/anal, naso/caudal e anus/genital) da prole, foi utilizado Análise de Variância Two-way (ANOVA Two-way), visto haver dois fatores atuando na variável resposta (sendo eles dieta e tempo), seguido do Pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni.

Para todo o restante das análises aqui apresentadas, onde apenas um fator (Dieta) afetava a variável resposta, foi utilizado teste t não pareado, para dados com comportamento paramétrico e teste de comparação Mann-Whitney, para valores que não se adequavam ao padrão normal. Para todos os testes e parâmetros, os dados foram considerados estatísticos quando $p \leq 0,05$ e os valores são apresentados no padrão de média \pm desvio padrão da média (SEM).

6 RESULTADOS

Os resultados obtidos nos experimentos detalhados no item anterior estão descritos abaixo.

6.1 ANÁLISES DA INGESTÃO E GANHO DE PESO DAS FÊMEAS PRENHES

Este trabalho evidenciou que os hábitos alimentares referente ao consumo da ração e o ganho de peso das fêmeas prenhes foi alterado entre a dieta HP e o Controle. De maneira a quantificar tais alterações, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) Two-Way, seguidos de pós-teste Bonferroni confeccionado um gráfico comparativo referente ao consumo diário alimentar das fêmeas HP e das fêmeas Controle. Observou-se um menor consumo da dieta HP, uma vez que o fator dieta ($F_{1, 152} = 228.6$; $p < 0,0001$) e o fator tempo ($F_{18, 152} = 4.829$; $p < 0,0001$) influenciaram significativamente a ingestão alimentar das fêmeas HP a partir do 4º dia de gestação (ddg) (Figura 8A).

De maneira a confirmar que esta redução da ingestão diária de ração HP corresponde ainda a um maior consumo proteico, foi calculada a quantidade de proteína ingerida pelas fêmeas (Figura 9B). É importante ressaltar que, quando analisados os dois gráficos de ingestão juntos, mesmo o grupo HP tendo ingerido menor quantidade de ração, a ingestão proteica ainda foi maior quando comparada com a ingestão proteica do grupo Controle, confirmando assim, a capacidade excessiva de proteína da dieta ofertada (Figura 8A-B). A partir dos gráficos, nota-se também que as fêmeas prenhes tendem a aumentar a ingestão de ração com o passar do tempo, visto que ambos os grupos demonstram um aumento de ingestão conforme a progressão da prenhez.

Independente do padrão alimentar, devido a prenhez, esperava-se que as fêmeas dos dois grupos ganhariam massa ao longo do tempo, porém, de acordo com a mesma análise estatística descrita acima (ANOVA/Bonferroni), os resultados demonstram que o tempo ($F_{17, 144} = 97.92$; $p < 0,0001$), a dieta ($F_{1, 144} = 46.60$; $p < 0,0001$) e a interação entre os dois fatores ($F_{17, 144} = 1.954$; $p < 0,01$) foram significativos para fêmeas HP. Apesar do ganho de peso das fêmeas HP mostrar-se levemente menor desde o 9º ddg, somente a partir do 16º ddg os valores mostram-se alterados estatisticamente em relação ao controle, padrão este que foi mantido até

o final da prenhez (Figura 8C). Dessa forma, os resultados aqui apresentados evidenciaram que as fêmeas alimentadas com a dieta HP possuem um ganho de peso significativamente menor ao final da gestação.

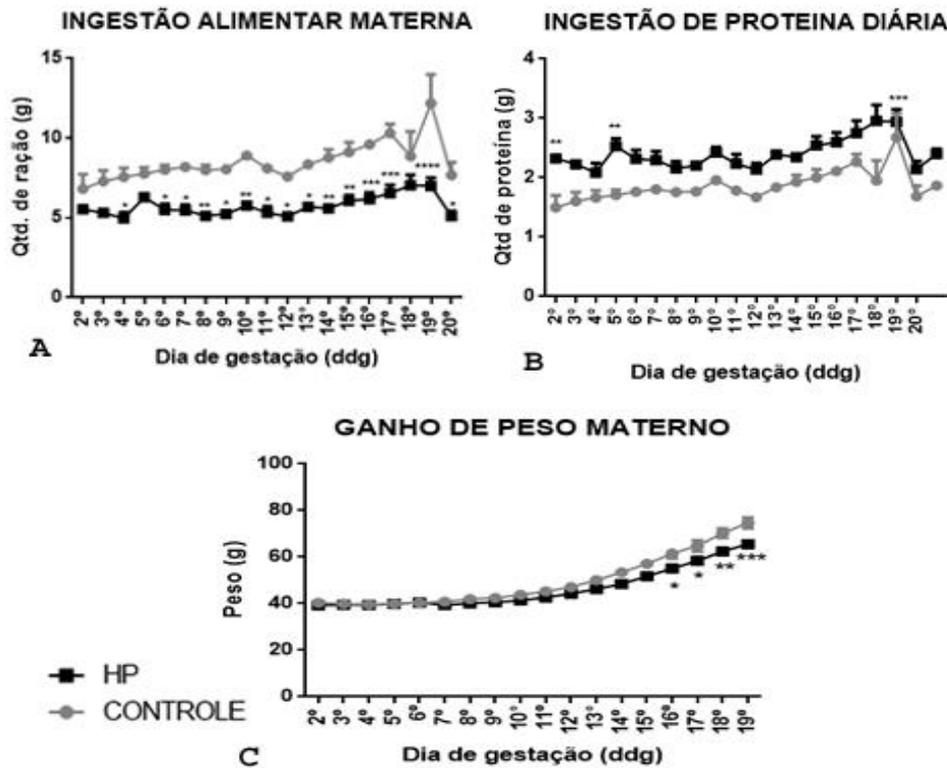


Figura 8- Gráfico da análise de ingestão alimentar, proteica e ganho de peso maternos durante o período de prenhez

Fonte: Da autora

Nota: Análise da quantidade média em gramas (g) de ração (A) e proteína (B) consumida pelas fêmeas prenhes do 2° ao 20° ddg. Em (C), análise do ganho de peso das fêmeas prenhes dos dois grupos. HP: grupo tratado com ração hiperproteica. * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Two-way ANOVA e pós-teste Bonferroni (média \pm SEM).

6.2 ANÁLISE DA QUANTIDADE E PESO DE FILHOTES

Neste trabalho, fêmeas controle e HP não apresentaram diferença na quantidade de filhotes nem no peso dos descendentes ao nascer (Figura 9). Além disso, após observação macroscópica dos filhotes nascidos, não houve alterações morfológicas evidentes sendo que os neonatos de ambos os grupos, nasceram saudáveis, com coloração rosada e movimentação aparentemente normal.

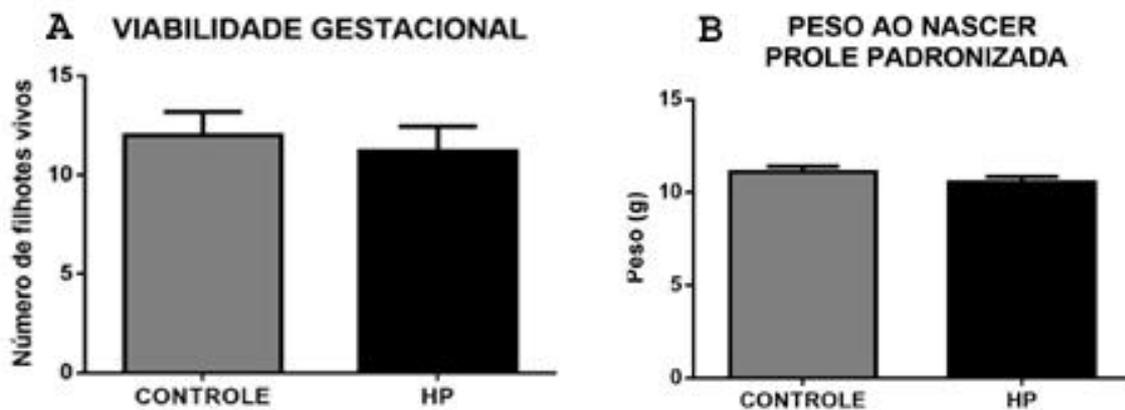


Figura 9- Análise da quantidade média e peso médio de prole no 1º dpn

Fonte: Da autora

Nota: A. Quantidade média de filhotes nascidos vivos por prole; B. Peso em gramas (g) da prole ao nascer, após padronização no número de filhotes (6 filhotes). Teste Mann Whitney $p < 0,05$; média \pm SEM.

6.3 TESTES DE DESENVOLVIMENTO FÍSICO E DE REFLEXO NEUROLÓGICO

Os resultados de desenvolvimento físico e de reflexo neurológico de filhotes de camundongos fêmeas tratadas com dieta controle e HP estão descritos nos itens abaixo.

6.3.1 Testes de desenvolvimento físico

De acordo com o protocolo experimental estabelecido neste trabalho, a maioria dos parâmetros físicos avaliados na prole não mostrou sofrer influência direta da dieta HP materna. Porém, abertura dos olhos (AO) aconteceu tardiamente, tanto em filhotes fêmeas quanto em machos comparadas com o controle. Além disso, a abertura da vagina (AV) também apresentou atraso no grupo HP. Os outros parâmetros analisados como descolamento de orelha (DO), aparecimento de pelo (AP), rompimento do incisivo superior (RIS) e inferior (RII) e descida dos testículos (DT) não apresentaram alterações significativas nos testes executados (Figura 10).

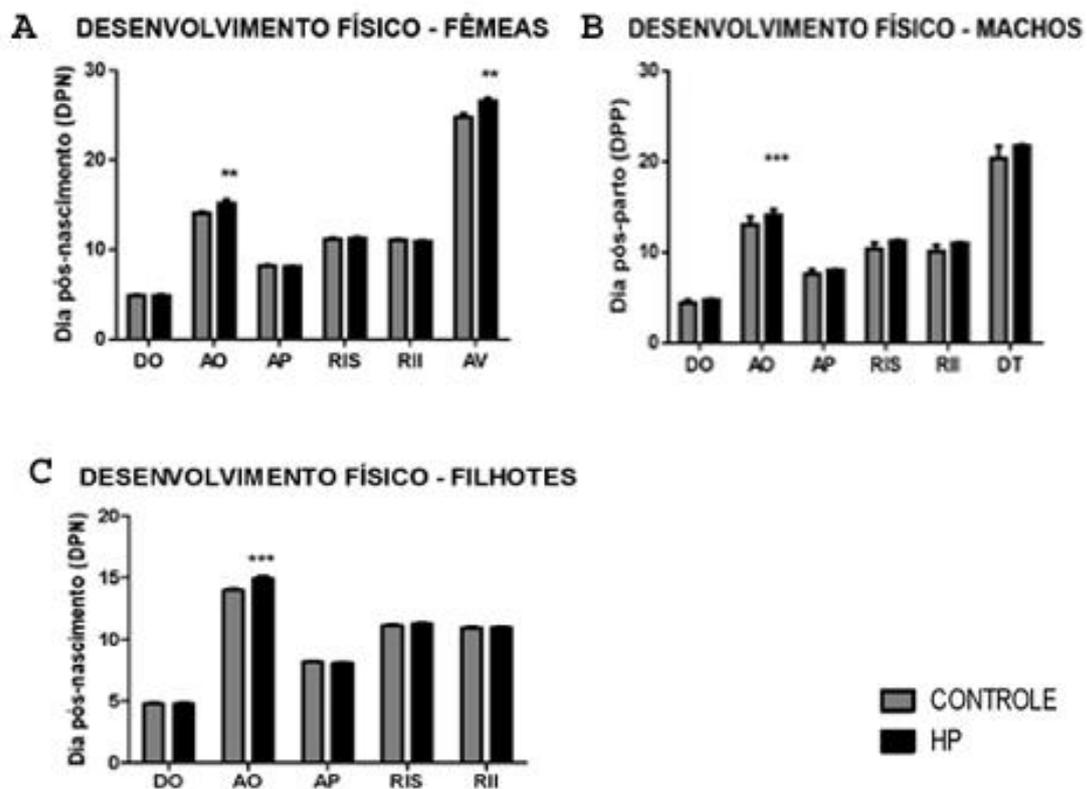


Figura 10 - Análise de desenvolvimento físico de filhotes ao longo do primeiro mês de vida

Fonte: da autora

Nota: **A.** Análise do desenvolvimento físico de filhotes do sexo feminino de mães tratadas com ração controle e HP. **B.** Análise do desenvolvimento físico de filhotes do sexo masculino de mães tratadas com ração controle e HP. **C.** Análise do desenvolvimento físico de filhotes de ambos os sexos de mães tratadas com ração controle e HP. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. **DO:** descolamento de orelha; **AO:** abertura de olho; **AP:** aparecimento de pelo; **RIS:** rompimento de incisivo superior; **RII:** rompimento de incisivo inferior; **AV:** abertura de vagina; **DT:** descida dos testículos. Média \pm SEM.

6.3.2 Testes de desenvolvimento de reflexo neurológico

Os valores provenientes dos testes de desenvolvimento neurológico não mostraram nenhuma alteração nos filhotes HP quando comparados ao controle em nenhum dos parâmetros analisados (Figura 11).

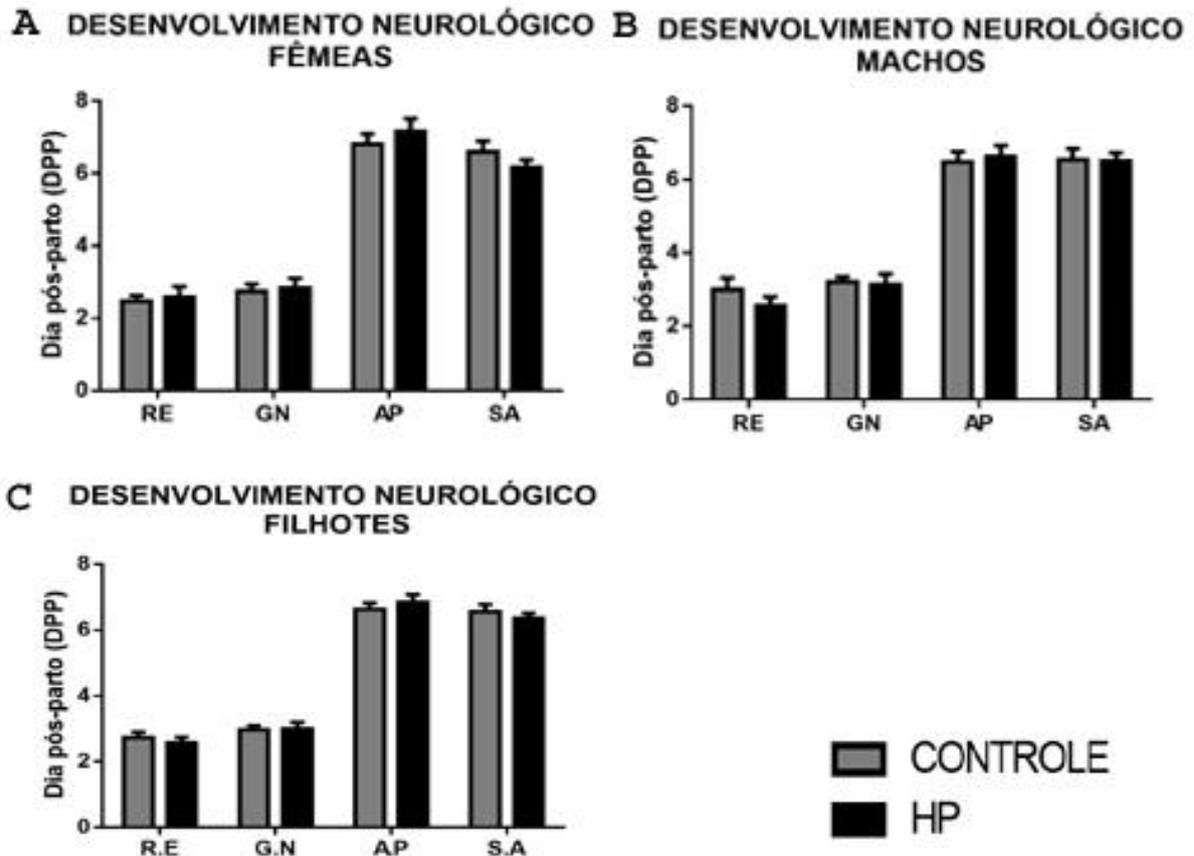


Figura 11 - Análise do desenvolvimento de reflexo neurológico dos filhotes ao longo da infância e adolescência

Fonte: Da autora

Nota: **A.** Análise do desenvolvimento de reflexo neurológico de filhotes do sexo feminino de mães tratadas com ração controle e HP **B.** Análise do desenvolvimento de reflexo neurológico de filhotes do sexo masculino de mães tratadas com ração controle e HP. **C.** Análise do desenvolvimento de reflexo neurológico de filhotes de ambos os sexos de mães tratadas com ração controle e HP. **RE:** reflexo de endireitamento; **GN:** geotaxia negativa; **AP:** agarramento palmar; **SA:** sobressalto auditivo. Teste T não pareado e teste de comparação de média Mann Withney; média \pm SEM.

6.4 ANÁLISE DO GANHO DE PESO DOS FILHOTES

Em relação ao ganho de peso dos filhotes, ao longo do primeiro mês de vida, em fêmeas, o fator dieta ($F 9, 250 = 22.92$; $p < 0,0001$) e o fator tempo ($F 9, 250 = 2278.31$; $p < 0,001$) foram significativos frente ao ganho de peso, porém a interação entre eles não teve influência sobre tal aspecto. Assim, o ganho de peso se mostrou menor a partir do 20º dpn, sendo significativo apenas no 26º dpn. (Figura 12A). As análises de filhotes machos não revelaram nenhuma alteração (Figuras 12B).

Foram realizadas também análises do ganho de peso total ao longo do primeiro mês de vida e nenhuma modificação significativa foi observada, independente do sexo do filhote (Figuras 12E-F).

6.5 ANÁLISE DO CRESCIMENTO DA PROLE

As análises de crescimento naso/caudal, naso/anal e anus/genital encontram-se descritas abaixo.

6.5.1 Crescimento naso/caudal

Os dados de crescimento naso/caudal de filhotes fêmeas não mostraram nenhuma diferença significativa entre os grupos HP e Controle. Entretanto, no sexo masculino, o fator dieta ($F 1, 290 = 29.80$; $p < 0,0001$) e o fator tempo ($F 9, 290 = 3483$; $p < 0,0001$) apresentaram influência sobre o crescimento dos filhotes, sem interação entre eles. O crescimento naso/caudal de filhotes machos mostrou-se significativamente menor nos 11º e 14º dpn. Quando analisados os valores sem considerar o sexo dos filhotes, também o fator tempo ($F 9, 559 = 6612$, $p < 0,0001$) e o fator dieta ($F 1, 559 = 68.51$, $p < 0,0001$) influenciaram nos resultados, gerando um menor crescimento nos dias 5, 11, 14, 20 e 23 em animais do grupo HP (Figura 13A-C)

6.5.2 Crescimento naso/anal

Em relação ao crescimento naso/anal dos filhotes durante o primeiro mês de vida, as análises dos dados não mostraram alterações de crescimento entre os grupos. (Figura 13 D-F).

6.5.3 Crescimento anus/genital

Os valores referentes à análise de crescimento anus/genital não apresentaram significância estatística quando comparados com o grupo controle. Porém, é importante ressaltar que no crescimento anus/genital de filhotes fêmeas demonstrou uma influência significativa do fator tempo ($F_{9, 250} = 684.9$; $p < 0,0001$) e dieta ($F_{1, 250} = 4.405$; $p \leq 0,05$) sobre tal aspecto quando feito o teste de variância ANOVA Two-Way, entretanto, ao fazer o pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni, este não detectou nenhum valor estatisticamente significativo (Figura 13 G-I).

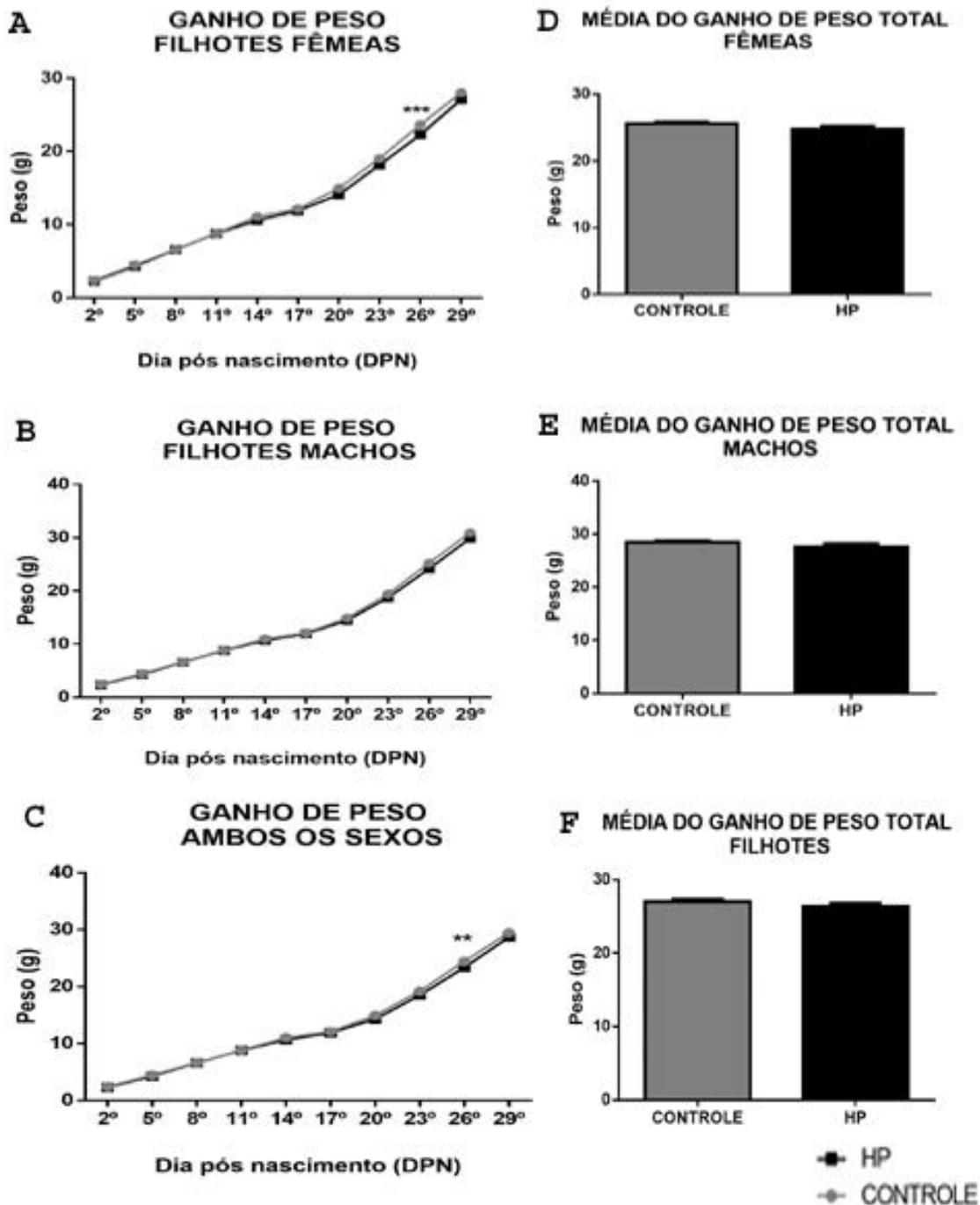


Figura 12 - Ganho de peso dos filhotes ao longo do primeiro mês de vida

Fonte: Da autora

Nota: **A.** Análise do ganho de peso de filhotes fêmeas ao longo do primeiro mês de vida; **B.** Análise do ganho de peso de filhotes machos ao longo do primeiro mês de vida; **C.** Análise do ganho de peso de filhotes de ambos os sexos ao longo do primeiro mês de vida. **D, E, F.** Média do ganho de peso total ao longo do primeiro mês de vida dos filhotes fêmeas, machos e de ambos os sexos, respectivamente. ANOVA Two-Way e Bonferroni e Teste T não pareado; média \pm SEM; ** $p \leq 0,01$, *** $p < 0,001$.

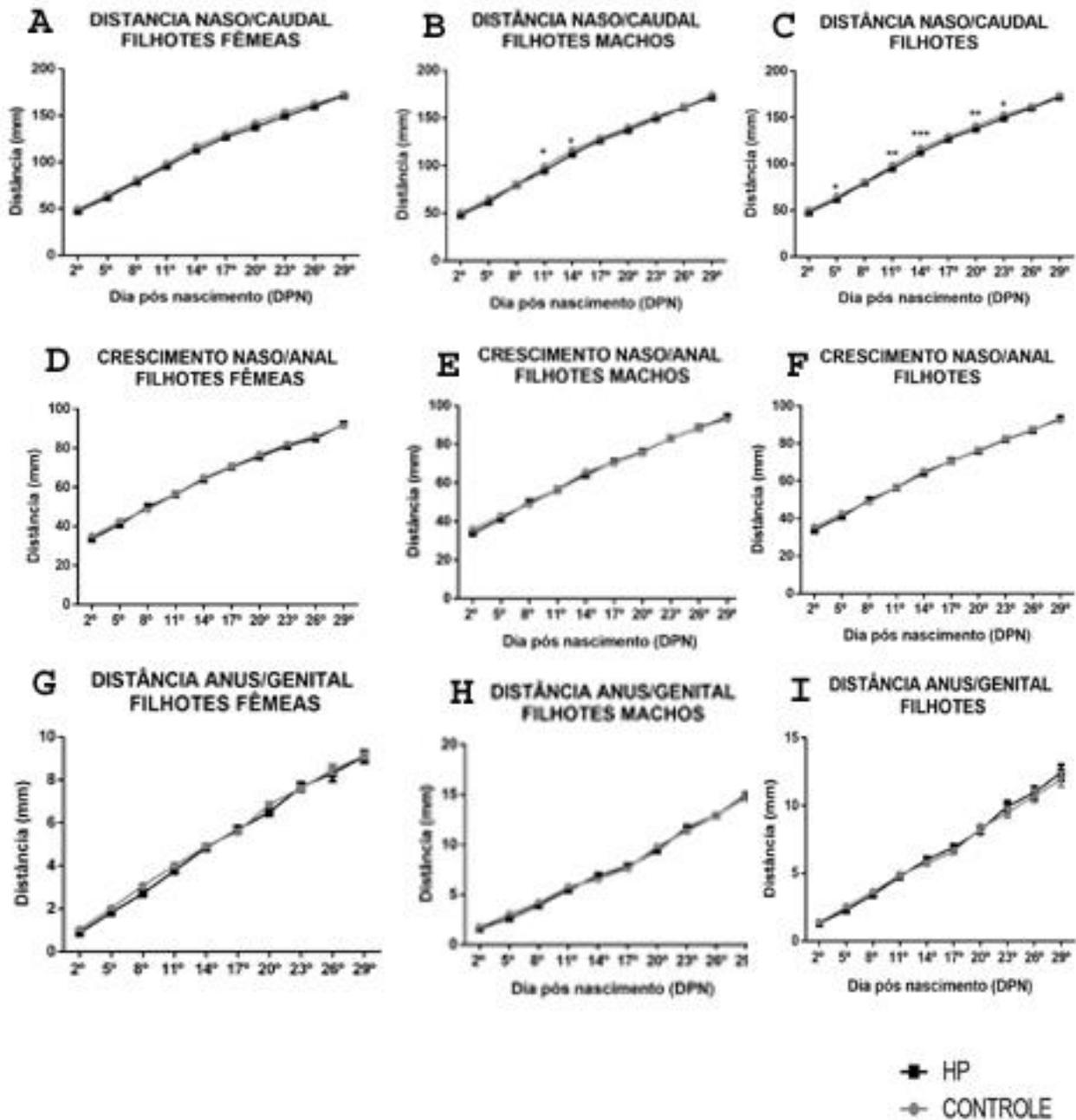


Figura 13- Crescimentos naso/caudal, naso/anal e anus/genital de filhotes de mães submetidas à dieta controle e HP

Fonte: Da autora

Nota: **A, B e C:** Crescimento naso/caudal de filhotes fêmeas, machos e de ambos os sexos, respectivamente, ao longo do primeiro mês pós-nascimento; **D, E e F.** Crescimento naso/anal de filhotes fêmeas, machos e de ambos os sexos ao longo do primeiro mês pós-nascimento; **G, H e I.** Crescimento anus/genital de filhotes fêmeas, machos e de ambos os sexos, respectivamente, longo do primeiro mês pós-nascimento; ANOVA Two-Way seguido de Bonferroni ; * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$; média \pm SEM.

6.6 ANÁLISE DO PESO DOS ÓRGÃOS

Abaixo estão descritos os resultados provenientes da metodologia do peso de rins, tecido adiposo branco e marrom de mães do grupo controle e HP.

6.6.1 Análise do peso dos órgãos maternos e proporção rim/tíbia

No momento da eutanásia o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM) maternos foram coletados e pesados, não apresentando qualquer diferença significativa entre os grupos experimentais (Figura 14A).

Além dos tecidos adiposos, o rim direito também foi coletado e pesado, assim como a tíbia direita, que foi medida (em milímetros), objetivando padronizar o peso dos rins com o porte físico do camundongo, sendo que os dados estatísticos também não demonstraram alterações significativas entre os grupos (Figura 14B).

Nos grupos Controle 19 e HP 19, dos quais foram coletadas as placentas, foi detectada uma diminuição no peso daquelas provenientes de mães alimentadas com a dieta hiperproteica (Figura 14C).

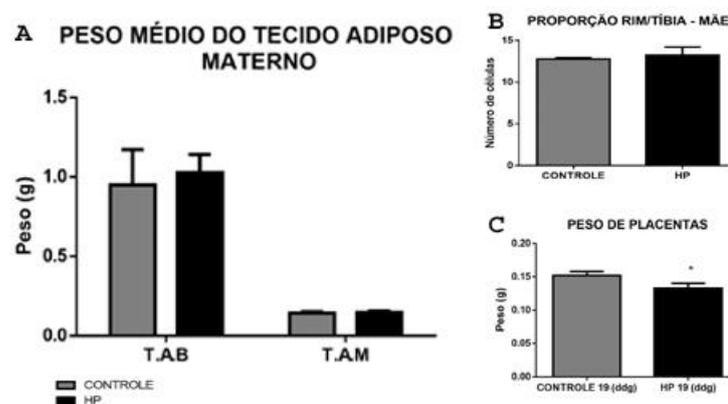


Figura 14 - Análise do peso de órgãos maternos

Fonte: Da autora

Nota: A. Peso médio de Tecido adiposo branco e marrom de mães alimentadas com dietas diferenciadas; B. Proporção rim/tíbia e, C. Peso médio das placentas de camundongos grávidos sacrificados no 19º ddg. Teste Mann Withney (utilizado em A e B) e Teste t não pareado (em C). * $p \leq 0,05$, média \pm SEM

6.6.2 Análise do peso dos órgãos dos filhotes e proporção rim/tíbia

Com relação aos filhotes, os pesos de TAB não apresentaram diferença estatística entre os valores encontrados para os filhotes HP e Controle. Porém, o peso médio do TAM, quando não considerado sexo, indicou uma diminuição em filhotes descendentes de mães alimentadas com ração HP (Figura 15).

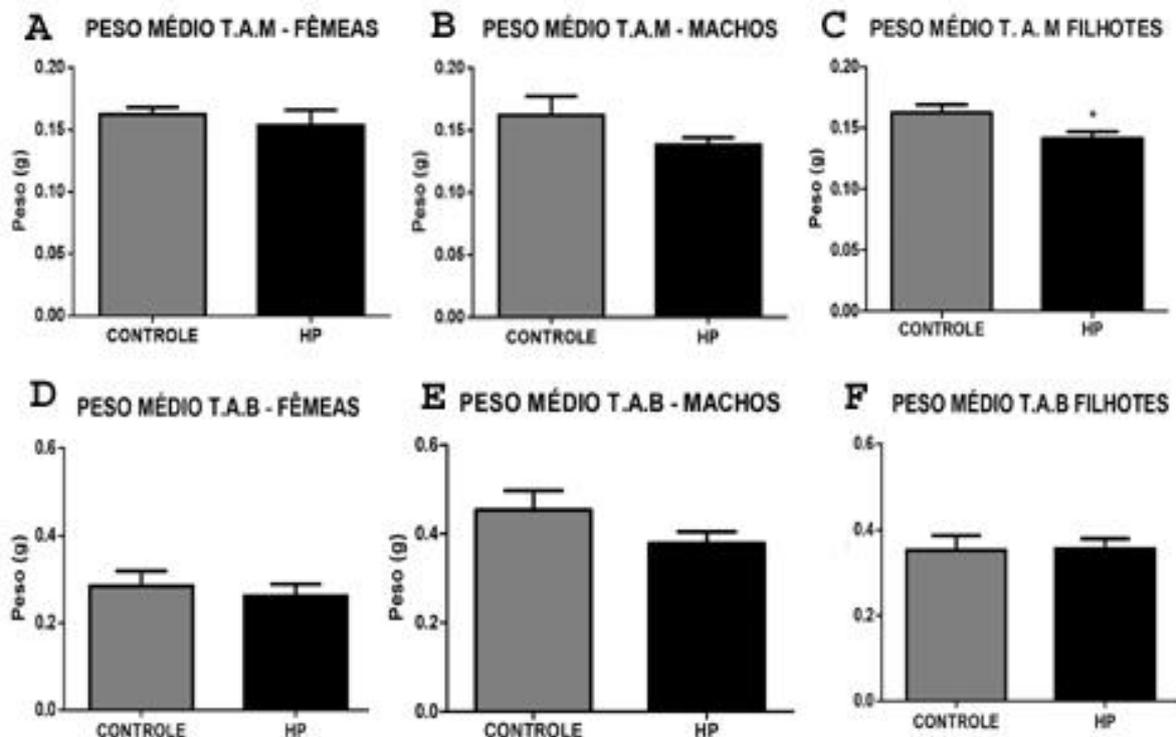


Figura 15- Peso médio de tecido adiposo branco e marrom de filhotes com 32 dia pós-nascimento

Fonte: Da autora

Nota: . **T.A.M:** Tecido adiposo marrom; **T.A.B:** tecido adiposo branco. Teste Mann Whitney; * $p \leq 0,05$; média \pm SEM. **A; B; C:** Peso médio de tecido adiposo marrom em filhotes do sexo feminino, masculino e em ambos os sexos, respectivamente. **D; E; F:** Peso médio de tecido adiposo branco em filhotes do sexo feminino, masculina e em ambos os sexos, respectivamente.

As análises da proporção rim/tíbia, no entanto, explicitaram uma diminuição da proporção em filhotes do sexo feminino e, contrariamente, um aumento da mesma proporção em filhotes do sexo masculino. Ao ser avaliado os dois sexos em conjunto, não foi observada diferença significativa (Figura 16).

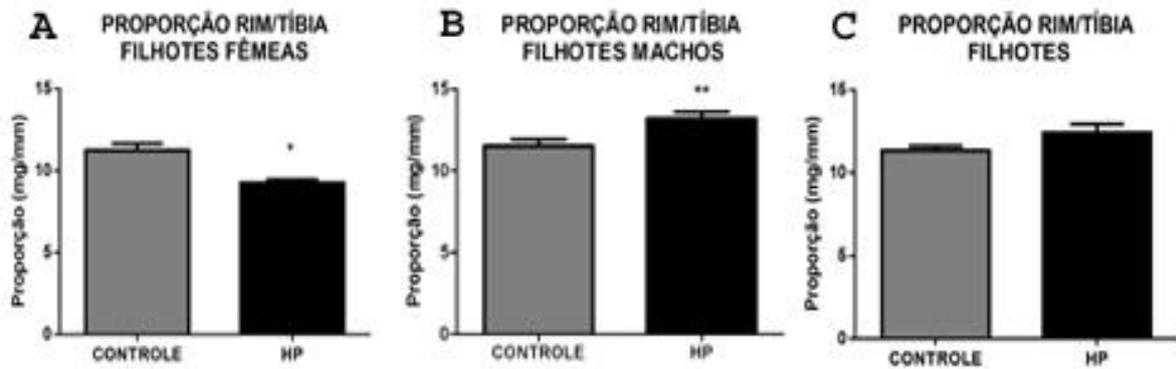


Figura 16 - Análise da proporção rim/tíbia de filhotes com 32 dias pós-nascimento

Fonte: Da autora

Nota: . **A; B; C:** Proporção rim/tíbia de filhotes fêmeas, machos e de ambos os sexos, respectivamente. Teste Mann Withney para as análises de macho e fêmea e teste T não pareado para a análise de ambos os sexos; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, dados apresentados em média \pm SEM.

Os rins retirados dos fetos aos 19 ddg, após pesagem, não apresentaram diferenças estatísticas entre os dois grupos analisados (Figura 17).

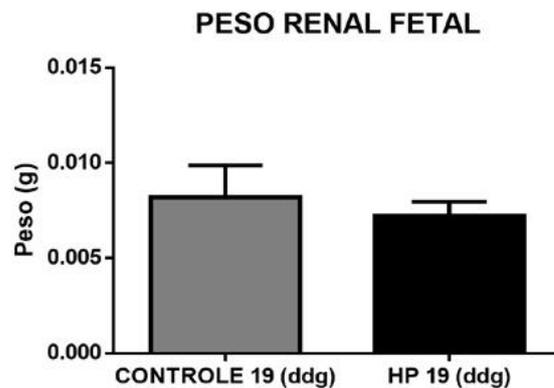


Figura 17 – Análise do peso renal dos fetos de 19 dias.

Fonte: Da autora

6.7 ANÁLISE HISTOLÓGICA E MORFOMÉTRICA DE ÓRGÃOS MATERNO

A seguir serão apresentados os resultados de morfologia e morfometria de TAB, TAM e rins maternos.

6.7.1 Morfologia e morfometria de tecido adiposo

Nas análises morfológicas aqui desenvolvidas, somente o TAB apresentou alteração evidente, sendo que os adipócitos brancos das fêmeas HP aparentavam ter menor tamanho, o que foi confirmado com as análises morfométricas desenvolvidas posteriormente (Figura 18A). Porém, com exceção da alteração do tamanho dos adipócitos do TAB, os dois tecidos adiposos coletados, tanto no grupo Controle como no HP não mostraram outras alterações. O TAB apresentava-se constituído por células poliédricas, grandes, contendo núcleos periféricos e um espaço intracitoplasmático grande e único central, muito evidente devido a extração da sua reserva lipídica durante o processamento histológico realizado, sendo por esta característica conhecido também como tecido adiposo unilocular (Figura 18B-C). O TAM inter-escapular, coletado das mães, apresentava-se também condizente com o descrito na literatura, contendo células menores, poligonais, mais intensamente coradas, com núcleos mais arredondados, ainda periférico e uma grande quantidade de espaços citoplasmáticos que continham gotículas lipídicas extraídas durante o processamento histológico de rotina (Figura 18D-E).

6.7.2 Histologia e morfometria renal materna

Na análise morfológica do tecido renal materno, foi observado um menor número de glomérulos nos animais HP (Figura 19C-D), e esta redução foi confirmada através da análise morfométrica (Figura 19A). As demais estruturas renais avaliadas não apresentaram alterações de acordo com a descrição morfológica renal conhecida. Logo após ser coletado e seccionado longitudinalmente eram observadas a cápsula renal, a zona cortical e a medular. Cada corpúsculo renal apresentou cerca de 200 µm de diâmetro, sendo constituído por um enovelado de capilares (glomérulo), envolvidos pela Cápsula de Bowman. É importante salientar que o número de glomérulos renais é muito variável. Os glomérulos são envoltos pelos numerosos

túbulos proximais, aqueles que apresentam células altas e bem coradas, e pelos túbulos contorcidos distais, que são constituídos por células baixas e coradas mais fracamente.

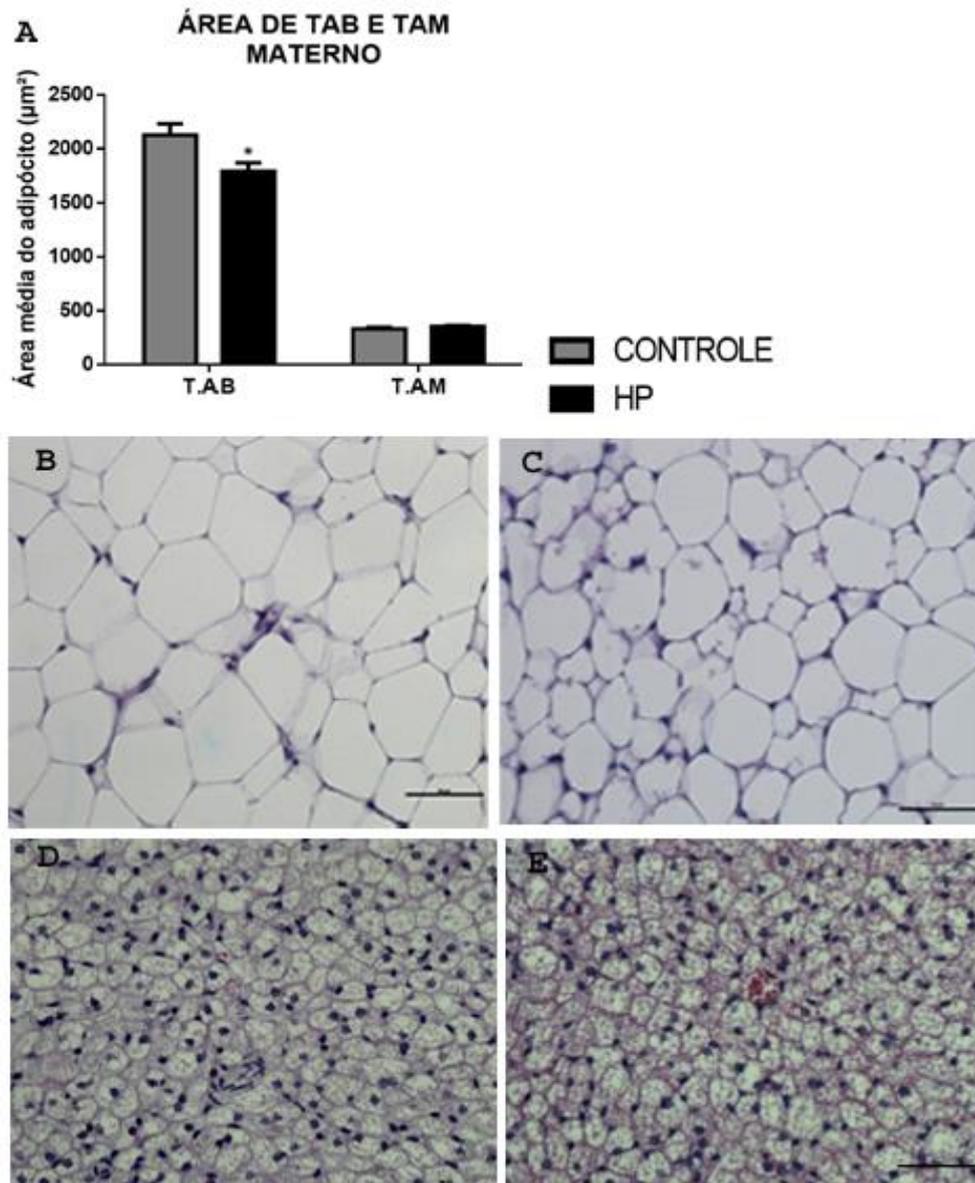


Figura 18 - Análise da área média de adipócitos brancos e marrons

Fonte: Da autora

Nota: A. **T.A.B:** Tecido adiposo branco; **T.A.M:** tecido adiposo marrom. **B;** **C.** Lâmina histológica de tecido adiposo branco de mães controle e HP, respectivamente. Observar a diminuição visível na área dos adipócitos brancos do grupo HP. Coloração H.E, 40x. **D; E.** Lâmina histológica de tecido adiposo marrom de mães alimentadas a dieta Controle e HP, respectivamente. Coloração H.E, 40x.

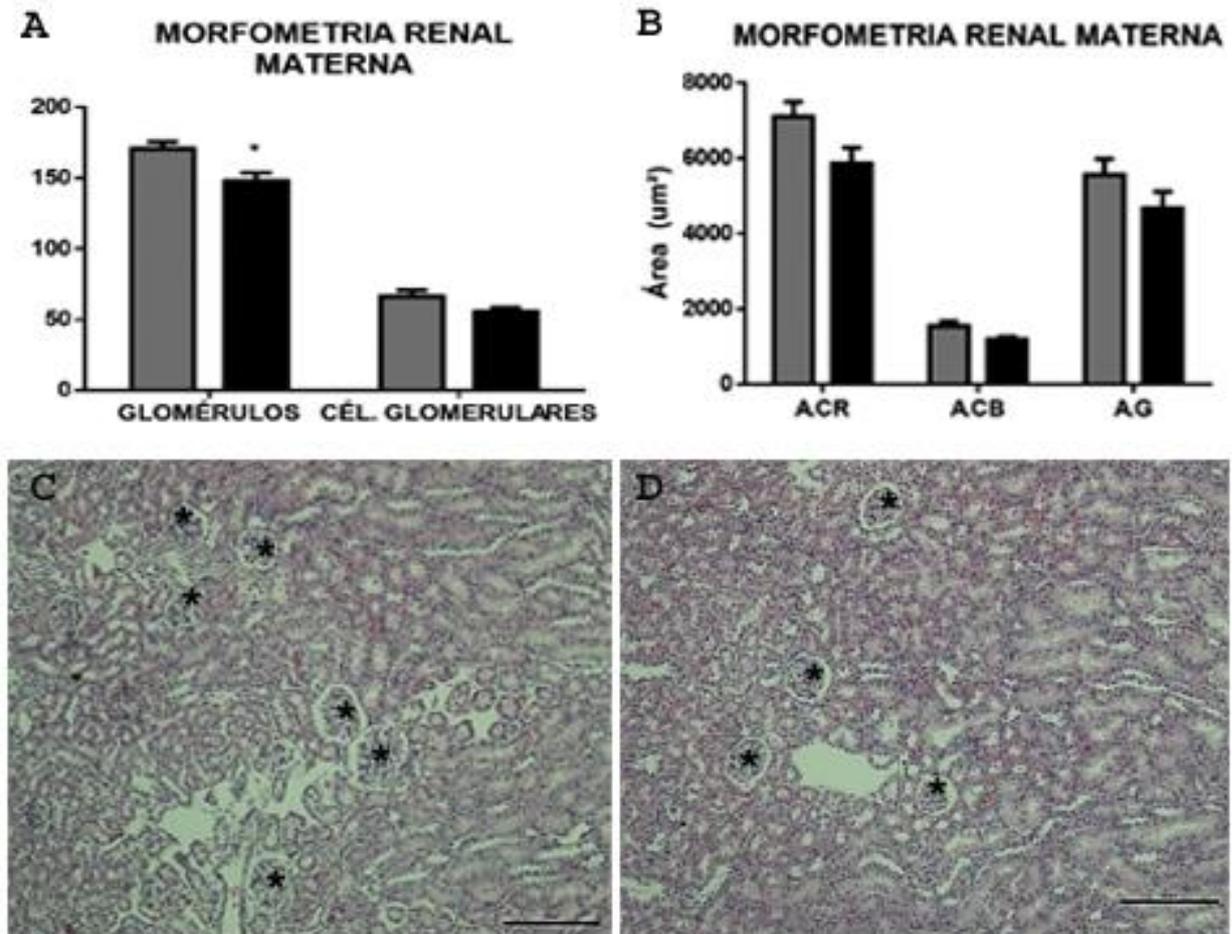


Figura 19- Morfometria renal de mães

Fonte: Da autora

Nota: **A:** Contagem do número de glomérulos e células glomerulares de mães alimentadas com ração Controle e HP. **B:** Medida da áreas renais maternas de ambos os padrões alimentares. **CB:** Cápsula de Bowman, **CR:** corpúsculo renal; **G:** glomérulo; **A.CR:** Área do corpúsculo renal; **A.CB:** Área da Cápsula de Bowman; **A.G:** Área do glomérulo. **C; D:** Corte histológico renal de mães alimentadas com alimentação controle e HP, respectivamente. Observar a quantidade diminuída de glomérulos (*) no animal HP. Aumento 10x, Coloração Hematoxilina e Eosina. * $p \leq 0,05$, média \pm SEM.

6.8 MORFOMETRIA DE ÓRGÃOS DOS FILHOTES

6.8.1 Tecido adiposo

A análise histológica do TAB da prole apresentou morfologia similar ao materno (ver item 6.7.1). No entanto, morfometricamente, observou-se diferença de tamanho nos adipócitos

brancos de maneira significativa apenas em filhotes machos provenientes de mães alimentadas com a dieta HP (Figura 20B). Quando considerados ambos os sexos, o aumento detectado em machos também foi observado (Figura 20C).

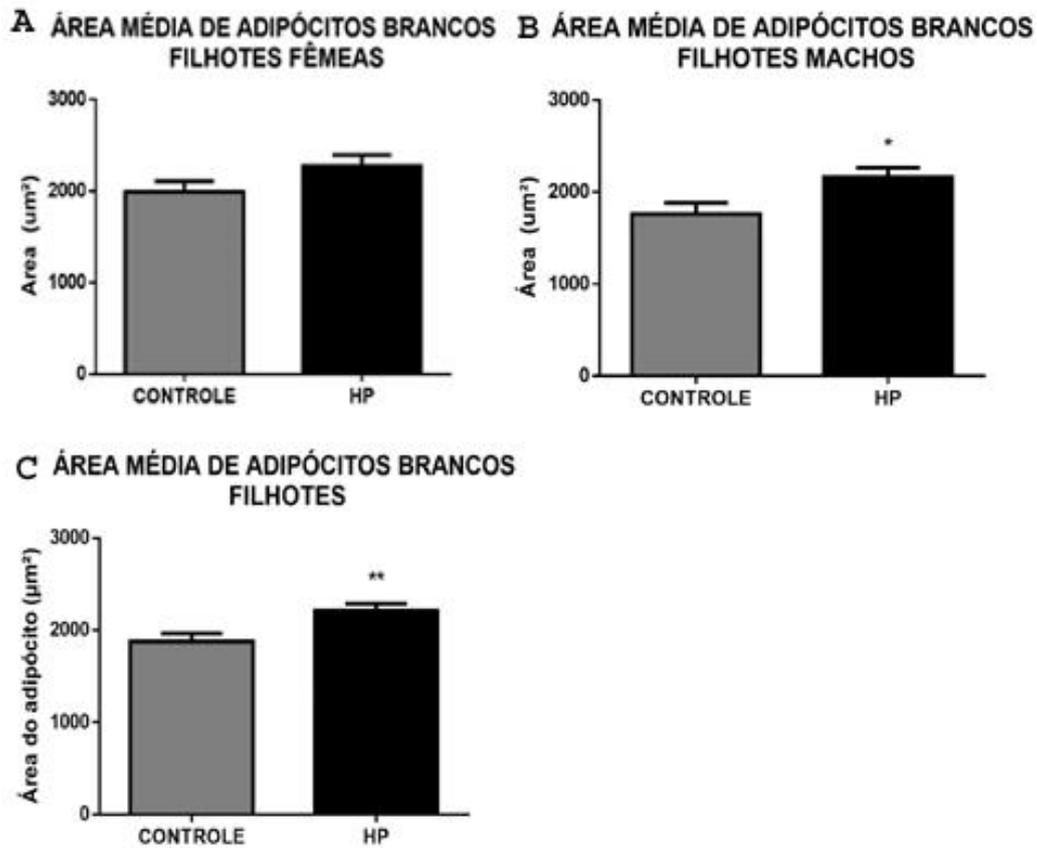


Figura 20 - Morfometria de tecido adiposo branco de filhotes

Fonte: Da autora

Nota: **A; B; C.** Área média de adipócitos brancos de filhotes fêmeas, machos e de ambos os sexos, respectivamente. Teste Mann Withney e Teste t não pareado, * $p \leq 0,05$; ** $p < 0,01$, média \pm SEM.

Morfológicamente, o TAM também foi condizente ao observado para mãe, porém, morfometricamente, foi verificada uma redução da área média dos adipócitos marrons nos filhotes machos de mães HP (Figura 21 A-B). O mesmo foi observado quando foi avaliado o mesmo parâmetro no total de filhotes, desconsiderando o sexo (Figura 21 C).

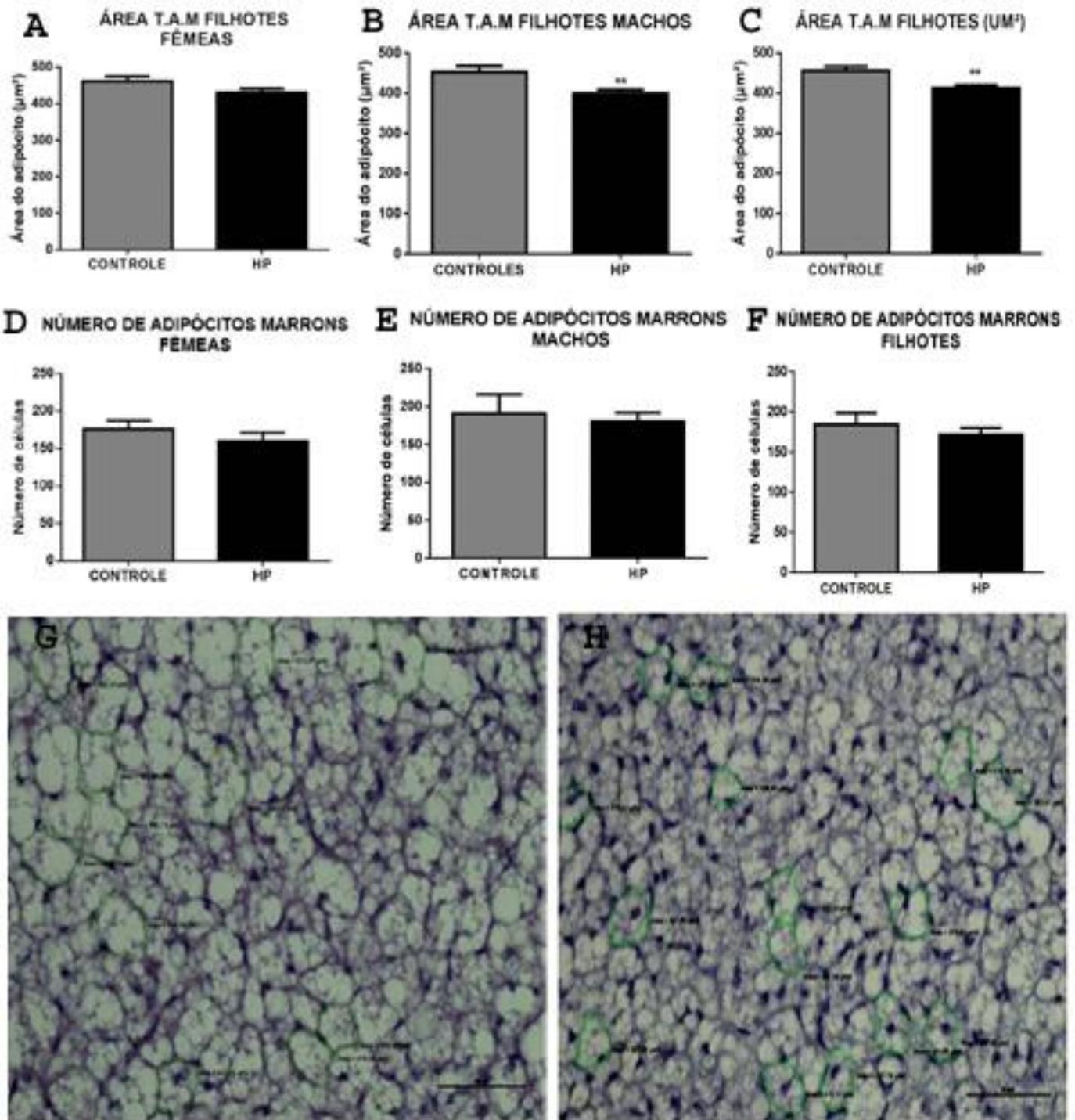


Figura 21 - Morfometria de TAM de filhotes

Fonte: Da autora

Nota: **A; B; C** Área média de adipócitos de TAM em filhotes fêmeas, machos e de ambos os sexos, respectivamente. **D; E; F** número médio de adipócitos marrons encontrados em filhotes fêmeas, machos e de ambos os sexos, respectivamente. **G; H.** Lâminas histológicas de TAM de machos controle e HP, respectivamente. Observar a área dos adipócitos. Coloração: H.E, 40x. Teste t não pareado e Teste Mann Whitney. ** $p < 0,01$; dados apresentados em média \pm SEM.

6.8.2 Morfometria renal de filhote de 32 dias pós-nascimento

A descrição morfológica renal de filhotes também foi semelhante à descrição materna (item 6.7.2), mas diferente do ocorrido rim materno, as análises morfométricas renais dos filhotes não apontaram nenhuma diferença significativa em nenhum dos padrões analisados entre os grupos experimentais (Figura 22).

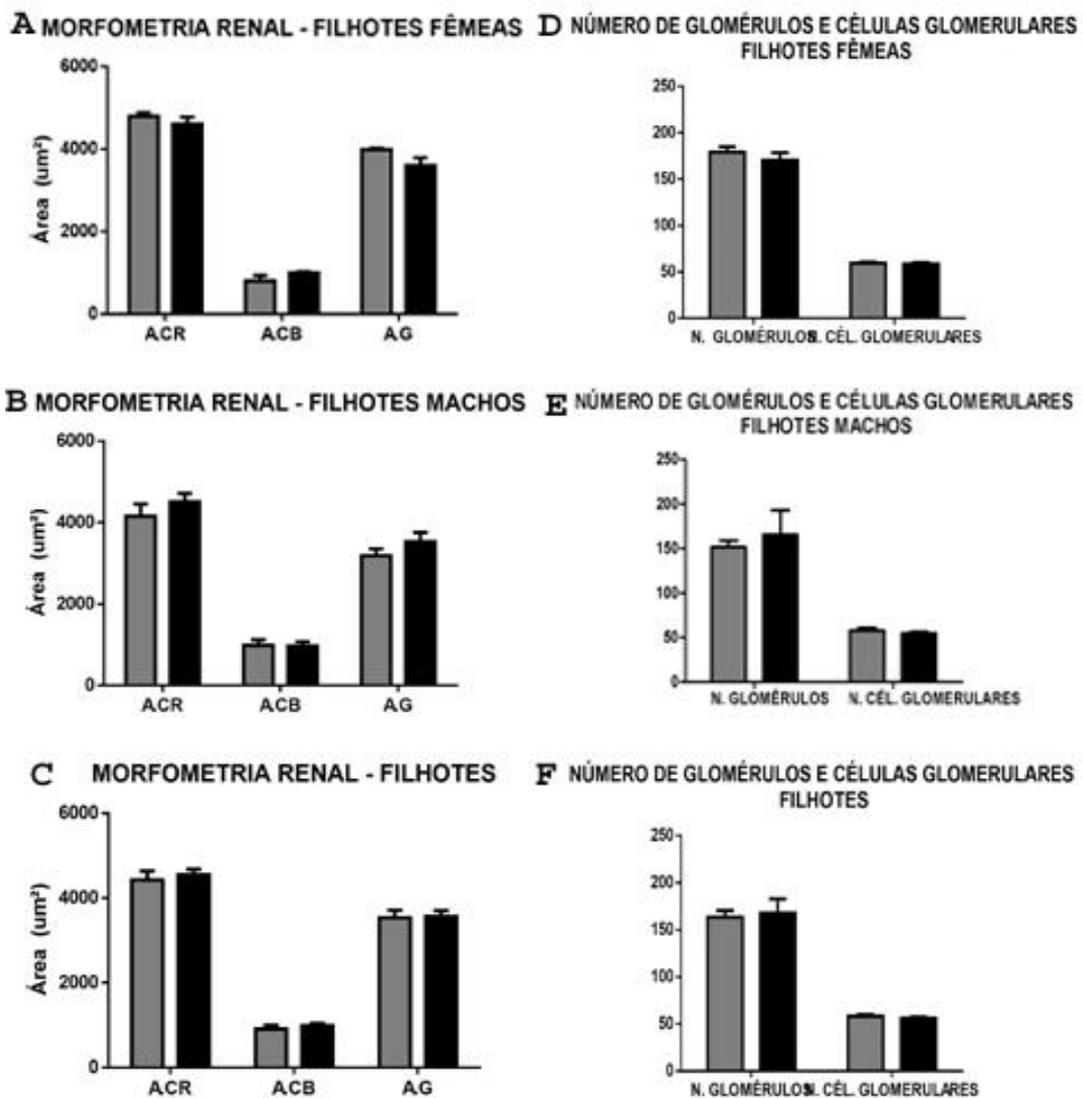


Figura 22 - Morfometria renal de filhotes com 32 dias pós-nascimento.

Fonte: Da autora

Nota: **A; B; C:** Morfometria renal de filhotes fêmeas, machos e ambos os sexos, respectivamente. **D; E; F:** Análise do número glomerular e número de células glomerulares em fêmeas, machos e ambos os sexos, respectivamente. **A.CR:** Área do corpúsculo renal; **A.CB:** área da Cápsula de Bowman; **A.G:** área glomerular.

6.8.3 Morfologia e morfometria renal de fetos

Macroscopicamente, os fetos apresentavam-se rosados sem diferenças anatômicas perceptíveis quando dissecados. Além disso, o rim também não demonstrava alterações macroscópicas. Os parâmetros avaliados nos rins fetais não diferiram entre os grupos de tratamento (Figura 23).

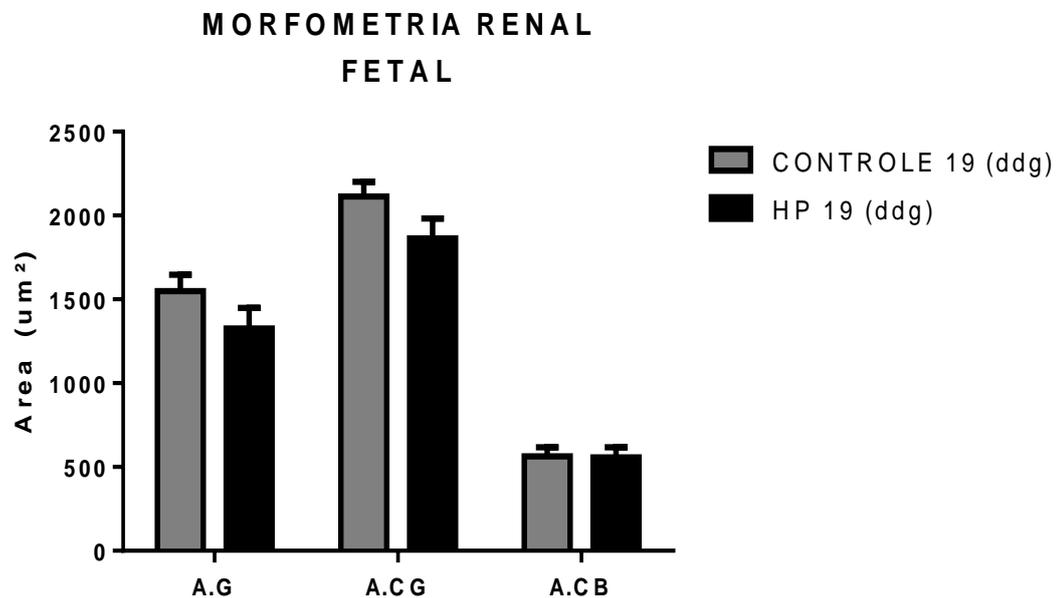


Figura 23 - Morfometria renal fetal

Fonte: Da autora

Nota: **A.G:** Área do glomerular; **A.CG:** Área do corpúsculo glomerular; **A.CB:** Área da Cápsula de Bowman. Teste Mann Withney, média \pm SEM.

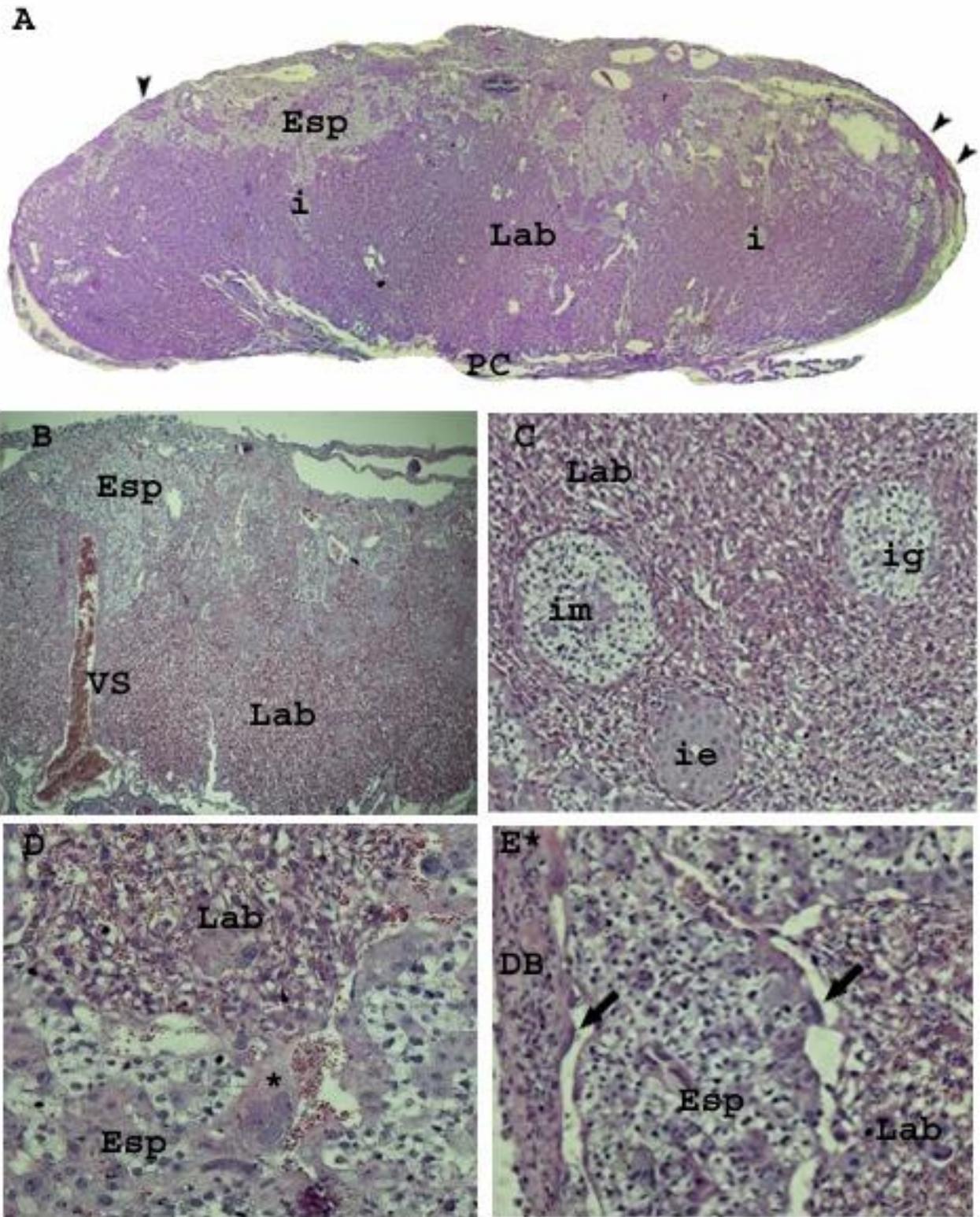
6.8.4 Morfologia e morfometria placentária

Por terem sido dissecadas no momento da coleta as placentas avaliadas praticamente não apresentaram decidua basal, sendo o enfoque dado nas camadas de origem trofoblásticas.

Nos cortes histológicos de ambos os grupos experimentais verificou-se células gigantes parietais circundando a região do espongiotrofoblasto que se apresentava bastante amplo contendo células endócrinas e de glicogênio facilmente diferenciadas pela coloração de HE. A camada do labirintotrofoblasto ocupava a maior área da placenta em meio as suas trabéculas contendo sangue materno e fetal, sendo que podiam ser encontrado um números variável de ilhas celulares provenientes da camada do espongiotrofoblasto (Figura 24 A-B). A ilhas celulares visualizadas na camada do labirinto apresentavam-se de três tipos. O primeiro formado basicamente por células poliédricas, com o contorno citoplasmático definido e núcleo central, apresentando áreas claras devido à extração dos grânulos de glicogênio durante o processamento (ilhas de glicogênio). O segundo tipo composto por células poliédricas, justapostas com citoplasma claro, consideradas como células endócrinas (ilhas endócrinas) e o terceiro tipo, presente em menor quantidade, constituído por ambos os tipos celulares (ilhas mistas) (Figura 24C).

Observando mais detalhadamente a zona juncional pode-se notar um entremeado de células endócrinas e de glicogênio formando a camada do espongiotrofoblasto. Nesta região as Células Trofoblásticas Gigantes (CTGs) parietais e de canal podiam ser facilmente encontradas (Figura 24D-E) fagocitando eritrócitos ou delimitando a luz de canais vasculares para o abastecimento sanguíneo materno. As CTGs parietais localizadas próxima a decídua basal, no geral, apresentavam-se mais fusiformes e com atividade fagocitária normal (Figura 24E). Vale ressaltar que não foram encontradas diferenças morfológicas entre as placentas do grupo Controle-19 e o HP-19.

Quando mensuradas as áreas das camadas placentárias também não foram detectadas alterações morfométricas entre os grupos avaliados. As áreas das camadas placentárias assim como sua espessura total, não apresentaram alterações. (Figura 25 A-B). As ilhas celulares presentes na região do labirintotrofoblasto, quando quantificadas não apresentaram variações significativas entre o número total de ilhas ou de cada um dos subtipos devido ao efeito da dieta HP (Figura 25 C).



Nota: A. Imagem panorâmica da placenta. Observar as Células trofoblásticas Gigantes (**cabeca de seta**), o prato coriônico (**PC**), e as ilhas placentárias (**i**). (aumento de 4x); B. Detalhe das camadas placentárias. Observar as áreas de labirintotrofoblasto (**Lab**) e espongiotrofoblasto (**Esp**) e vaso sanguíneo (**VS**) (Aumento 4x); C. Ilhas placentárias, onde observa-se ilhas mistas (**im**), ilhas endócrinas (**ie**) e ilhas de glicogênio (**ig**) (aumento de 10x); D. Detalhe de Célula Trofoblástica Gigante parietal (*) executando eritrofagocitose (aumento de 20x); E: Detalhe de célula trofoblástica gigante de canal (**setas**) e decídua basal (**DB**) (aumento de 20x). Coloração Hematoxilina e Eosina.

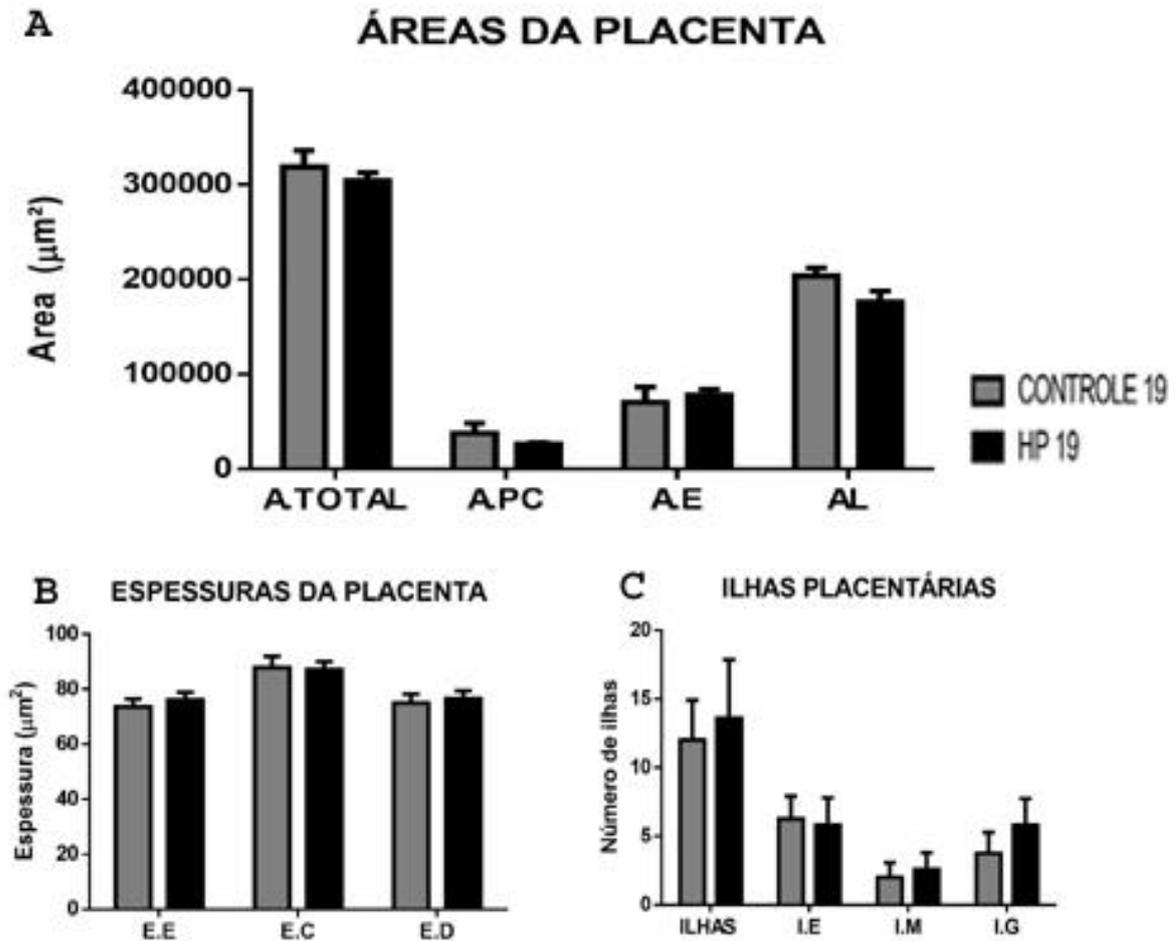


Figura 25 – Morfometria placentária com 19 dias de gestação

Fonte: Da autora

Nota: . **A.** Média das áreas da placenta, onde **A.TOTAL**: área total; **A.PC**: área do prato coriônico; **A.E**: área de espongiotrofoblasto; **A.L**: área de labirintotrofoblasto. **B.** Média da s espessura s esquerda, central e direita da placenta (**E.E**, **E.C**, **E.D**, respectivamente). **C:** Média do número de ilhas presentes na placenta. **ILHAS**: total de ilhas, incluindo todos os subtipos; **I.E**: Ilhas compostas por células endócrinas; **I.M**: Ilhas mista, composta pelos dois tipos celulares; **I.G**: ilhas de armazenamento de glicogênio. Teste Mann Withney, $p \leq 0,05$, média \pm SEM

6.9 QUANTIFICAÇÃO PROTEICA

Os dados resultantes do procedimento de quantificação proteica estão apresentados nos itens a seguir.

6.9.1 Quantificação proteica materna

Os resultados deste experimento indicaram que no rim de mães tratadas com ração HP ocorreu uma diminuição significativa na quantidade de proteína, entretanto não foi encontrada nenhuma alteração na quantidade proteica no fígado materno entre os dois grupos de tratamento (Figura 26).

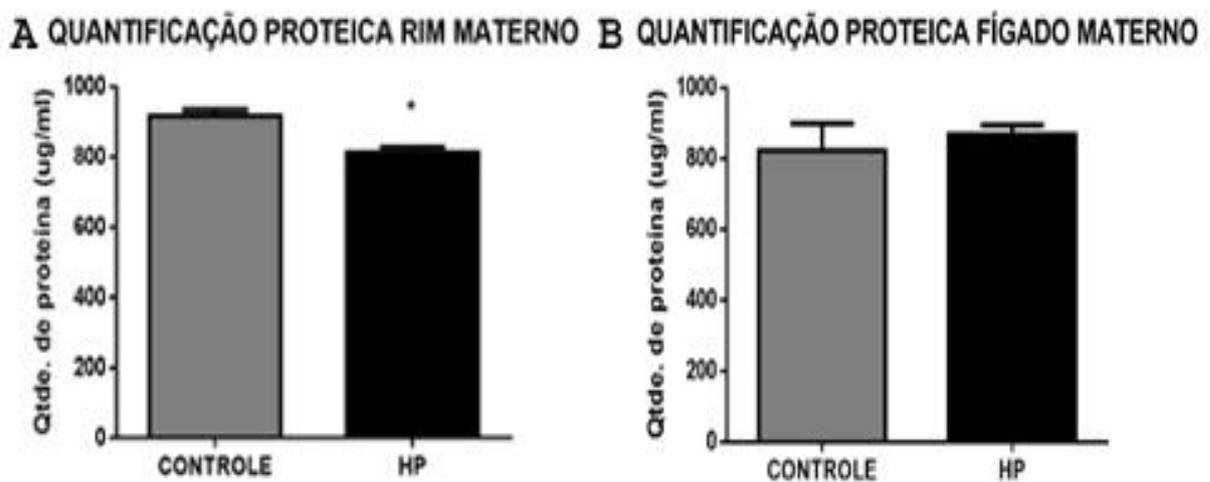


Figura 26- Quantificação proteica em órgãos de mães alimentadas com diferentes dietas

Fonte: Da autora

Nota: A e B:Quantificação proteica em rim e fígado materno, respectivamente. Teste Mann Withney, * $p \leq 0,05$, média \pm SEM.

6.9.2 Quantificação proteica em filhotes

Os resultados referentes à quantificação proteica hepática e renal dos filhotes não mostraram alterações (Figura 27). Não foram encontrados dados acerca da quantificação proteica em filhotes de camundongos descendentes de mães com alterações alimentares, sendo então este dado inédito na literatura.

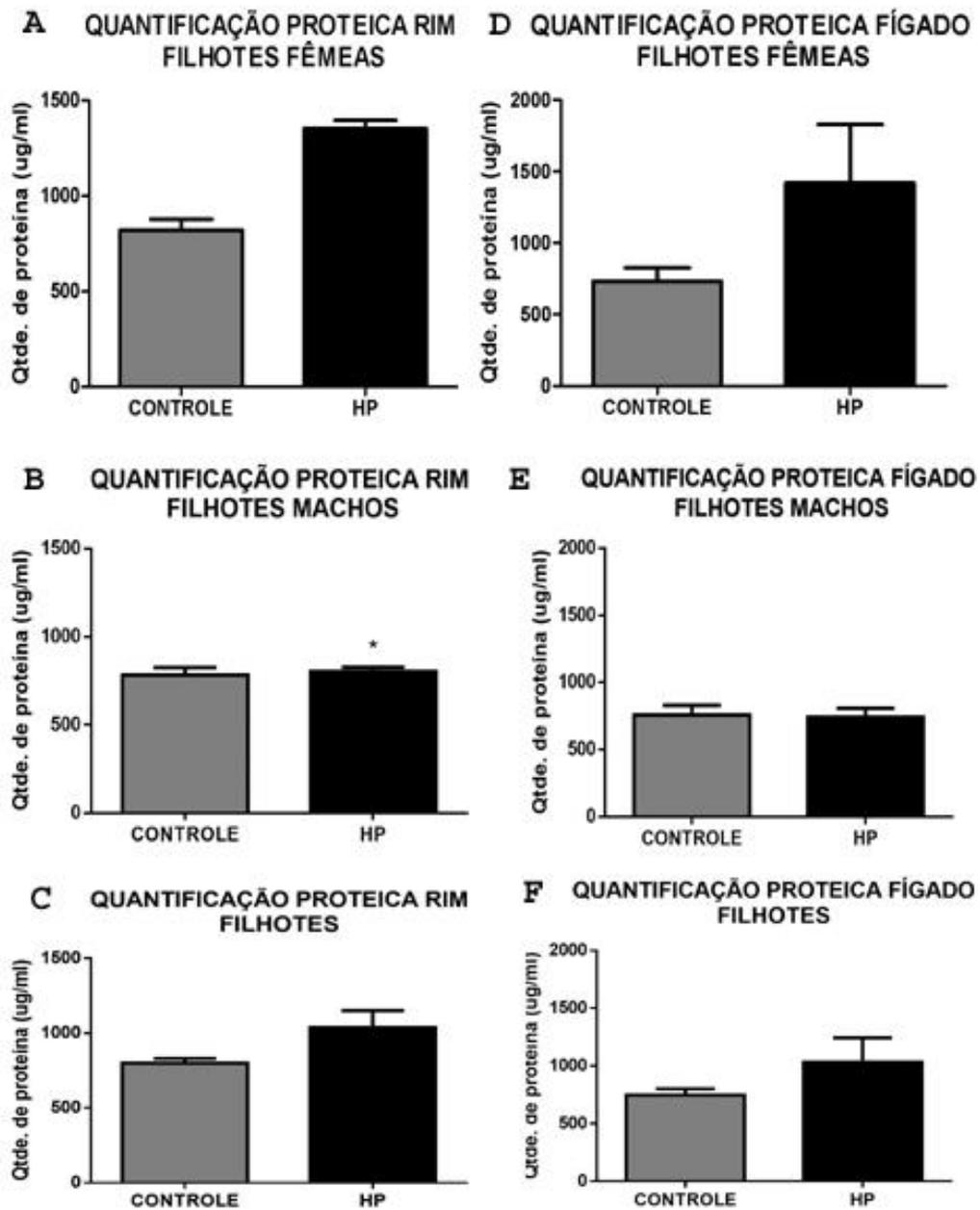


Figura 27- Quantificação proteica em rim e fígado de filhotes com 32 dias pós-nascimento

Fonte: Da autora

Nota: **A; B; C:** Análise da quantificação proteica total em rins de filhotes fêmeas, machos e de ambos ossexos, respectivamente. **D; E; F.** Análise da quantificação proteica de fígado em filhotes fêmeas, machos e ambos os sexos, respectivamente. Teste Mann Withney, $p \leq 0,05$, média \pm SEM.

6.9.3 Quantificação proteica de placentas

Os dois grupos HP-19 e Controle-19 não apresentaram diferenças na quantidade de proteínas totais presentes no tecido placentário (Figura 28).

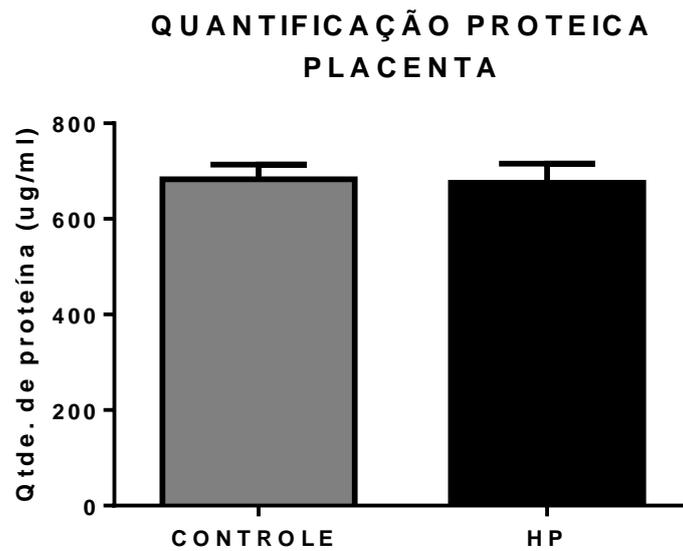


Figura 28 – Quantificação proteica placentária

Fonte: Da autora

6.10 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os dados obtidos com a metodologia de TBARS para a peroxidação lipídica materna e de filhotes estão descritos a seguir.

6.10.1 Peroxidação lipídica materna

Frente às análises de peroxidação lipídica no tecido renal e hepático materno, não houveram alterações estatísticas entre os valores apresentados nos dois grupos (Figura 29).

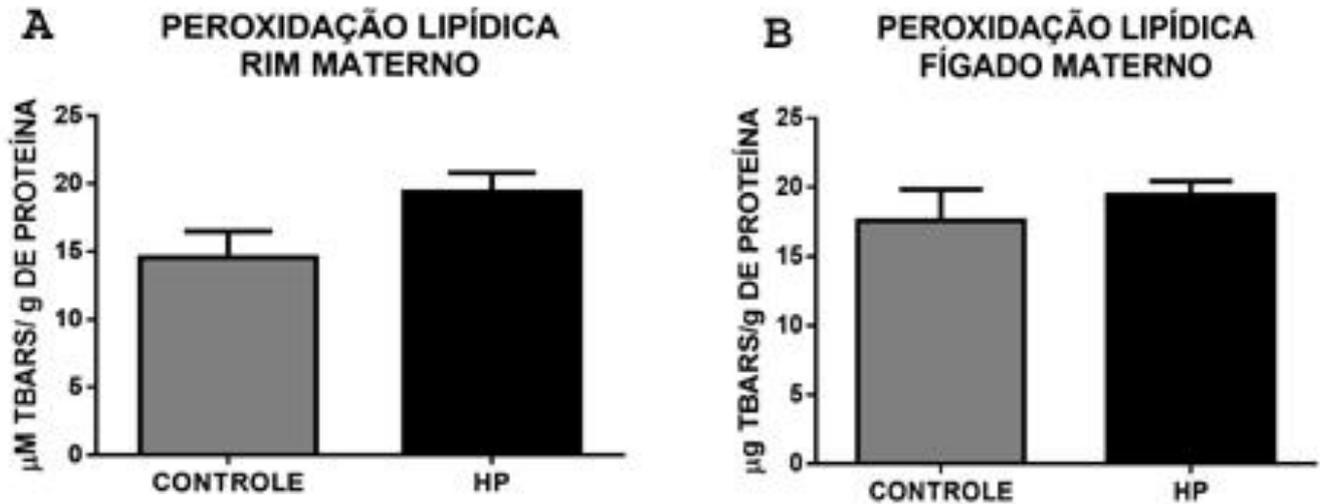


Figura 29 - Análise da peroxidação lipídica em órgãos maternos

Fonte: Da autora

Nota: **A; B:** Análise da peroxidação lipídica em rim e fígado maternos, respectivamente. Teste Mann Withney, $p \leq 0,05$, dados em média \pm SEM.

6.10.2 Peroxidação lipídica em filhotes

Assim como os resultados descritos acima para os órgãos maternos, a peroxidação lipídica hepática de filhotes provenientes de prole de mães tratadas também não apresentou nenhuma anormalidade em comparação ao grupo controle, porém, no tecido renal houve uma diminuição deste parâmetro em filhotes HP, em fêmeas e quando desconsiderada a variabilidade (Figura 30 A e C).

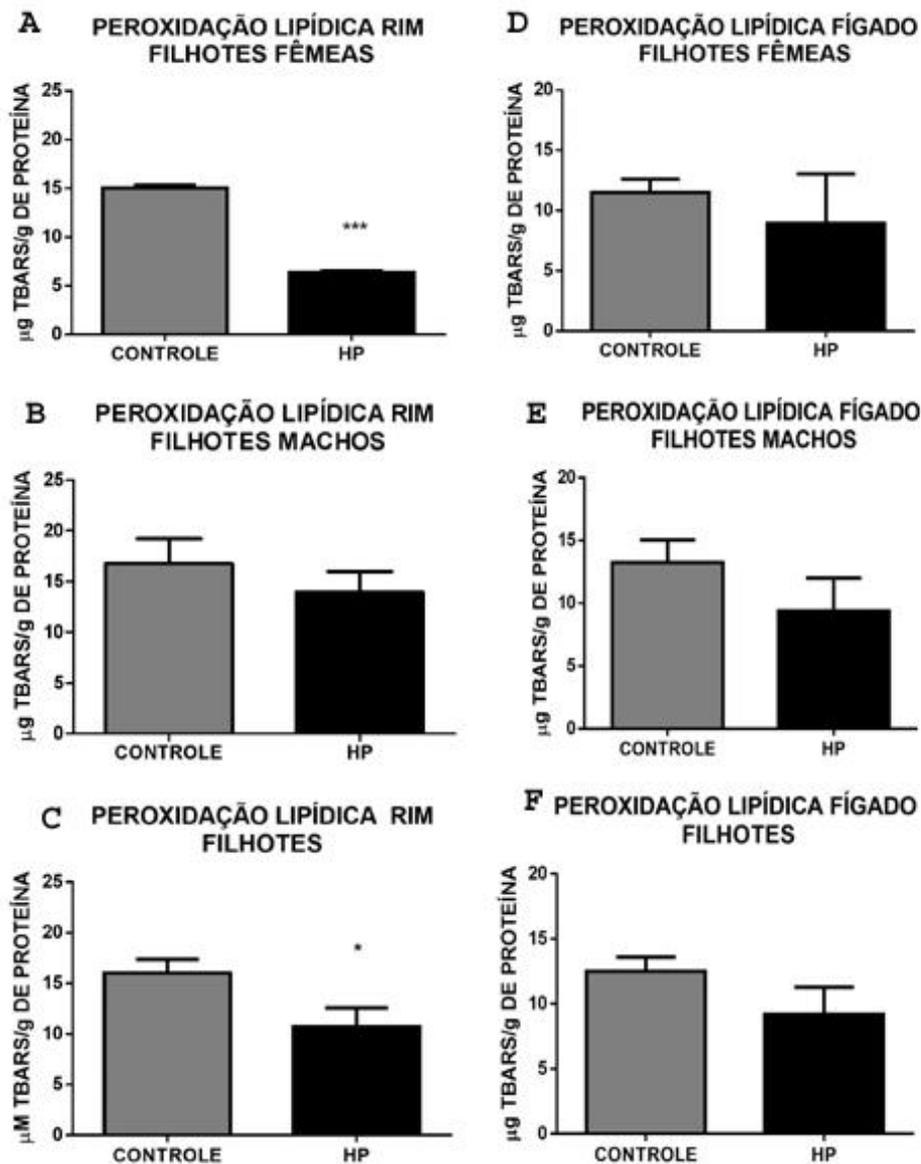


Figura 30 - Análise da peroxidação lipídica renal e hepática de filhotes de 32 dias pós-nascimento

Fonte: Da autora

.Nota: **A; B; C.** Análise da peroxidação lipídica renal em filhotes fêmeas, machos e em ambos os sexos, respectivamente. **D; E ; F:** Análise da peroxidação lipídica hepática em filhotes fêmeas, machos e em filhotes de ambos os sexos, respectivamente. Teste t não pareado e Teste Mann Withney, * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$, dados expressos em média \pm SEM.

6.10.3 Peroxidação lipídica placentária

A análise placentária também demonstrou uma queda no índice de peroxidação lipídica deste órgão (Figura 31).

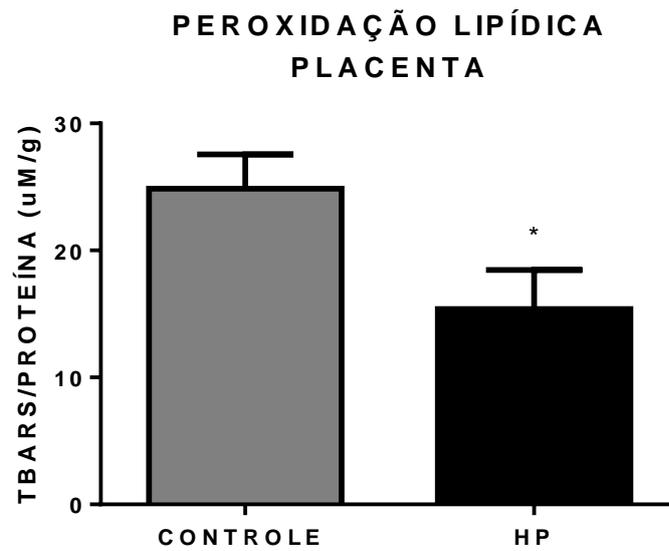


Figura 31 - Análise da peroxidação lipídica placentária

Fonte: Da autora

7 DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento deste estudo foi utilizada uma ração controle constituída de aproximadamente 22% de proteína, o que confere com a dieta padronizada pelo Instituto Americano de Nutrição - American Institute of Nutrition (AIN-93G) considerada ideal para camundongos prenhes, a qual constituída por em média 20% de proteína, 7% de lipídeos e 52% de carboidratos (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993). A ração hiperproteica utilizada nas fêmeas prenhes neste trabalho apresentou um aumento de, aproximadamente, duas vezes o teor de proteína ideal sem alterar os demais macronutrientes da dieta de maneira significativa, o que a torna adequada para os resultados experimentais desejados frente ao efeito do excesso de consumo proteico na gestação de camundongos. Além disso, é importante ressaltar que, mesmo com maior quantidade de proteína e uma pequena diminuição de carboidratos, a dieta utilizada nestes experimentos apresenta densidade calórica muito semelhante, tanto à dieta controle, também utilizada nos experimentos, quanto a dieta base para camundongos gestantes (AIN-93G). Dentro deste contexto, a dieta hiperproteica utilizada pode ser classificada também como isocalórica, permitindo a associação dos resultados encontrados ao aumento proteico, reiterando assim a influência do excesso proteico na gestação e desenvolvimento dos descendentes.

Uma alimentação rica em proteínas mostra-se como uma ferramenta muito importante para o controle de peso através de diversos mecanismos (PESTA; SAMUEL, 2014). Dietas com altas dosagens de proteínas e valores normais de carboidratos exercem uma melhora no metabolismo, aumentando, mesmo na presença do carboidrato, a perda de massa corporal (SOENEN et al., 2012). Esta alteração metabólica pode estar relacionada ao fato das proteínas serem o mais saciante e termogênico de todos os macronutrientes, o que significa que ao ingerir grandes quantidades de proteína, o metabolismo é acelerado e o gasto energético é maior, aumentando assim o consumo de calorias (SOENEN; WESTERTERP-PLANTENGA, 2008). De acordo com a literatura, o mecanismo da saciedade é uma das melhores formas de perder peso, visto que em um tempo maior de saciedade, a necessidade de uma nova ingestão é menor e assim, o gasto calórico sobressai à ingestão, culminando na perda de peso (PESTA; SAMUEL, 2014). Além disso, com a diminuição da frequência na ingestão, os níveis de Glucagon (hormônio relacionado com o jejum) aumentam, e os de insulina diminuem (hormônio relacionado com os momentos de ingestão), direcionando a produção de energia

prioritariamente através da quebra de ácidos graxos (lipólise), diminuindo assim, ainda mais, a massa corporal (PESTA; SAMUEL, 2014).

A eficiência da dieta rica em proteínas, em promover a saciedade, se deve também ao fato das proteínas serem moléculas muito grandes e de difícil digestão, adiando assim o esvaziamento gástrico e, como consequência, gerando uma maior sensação de saciedade (PESTA; SAMUEL, 2014). Segundo Nieuwenhuisen e colaboradores (2009), uma dieta proteica rica em aminoácido Triptofano mostra-se muito saciante, pois o aminoácido em questão é precursor do hormônio Serotonina, relacionado com o bem-estar, que, indiretamente, diminui a necessidade de uma ingestão alimentar contínua. Por fim, a saciedade é um componente-chave para induzir o balanço energético negativo e promover a perda de peso.

Os resultados relacionados à ingestão alimentar e proteica, acompanhados do ganho peso de camundongos prenhes obtidos neste trabalho, complementam a literatura. Estes dados indicam que frente a uma dieta HP a saciedade é aumentada nos animais, ingerindo uma quantidade menor de ração quando comparado com os animais controle, e, conseqüentemente, ao ingerirem menor quantidade de ração, adquirem menos peso ao longo da prenhez. Se faz importante destacar que, ao analisar o gráfico de ingestão de proteína ao longo da prenhez, vê-se que, mesmo ingerindo menor quantidade de ração, o grupo HP ingeriu maior quantidade de proteína durante toda a prenhez. Além disso, a hipótese de que os resultados observados, neste trabalho, sejam decorrentes à uma menor quantidade de ração ingerida pelos animais do grupo HP deve ser desconsiderada. Um quadro de restrição alimentar, não é pertinente, visto que segundo Chorilli e colaboradores (2007), o consumo médio de ração diária por camundongos adultos é de em média 5 gramas e, desta maneira, mesmo ingerindo menor quantidade de alimento que os animais do grupo Controle, as fêmeas gestantes do grupo HP ingeriram valores dentro da normalidade.

Ainda dentro da temática que permeia o ganho de peso e, conseqüentemente, o aumento de estocagem de lipídeo, sabe-se que em humanos e em camundongos o tecido adiposo branco ou unilocular perigonadal não compõe a única reserva de TAB do organismo, sendo encontrado também diferentes reservas, como o TAB subcutâneo e o visceral (OBREGON, 2014). Dessa forma, apesar de o ganho de peso das fêmeas tratadas com dieta HP ter sido significativamente menor ao final da prenhez, o TAB perigonadal avaliado não demonstrou nenhuma redução de peso em relação as mães do grupo controle. Possivelmente, a perda de peso demonstrada neste resultado foi decorrente de perda de TAB de alguma outra reserva corporal. Além disso, a coleta de TAB perigonadal se deu no 32º dpn, sendo que as mães voltaram a ser alimentadas com ração controle desde o 1º dpn, podendo ter ocorrido um novo ganho de peso durante o período

de lactação. Diferenças entre o peso de reserva de tecido adiposo e o peso total do animal já foram descritas anteriormente em um estudo com ratos jovens alimentados também com dieta HP, onde os animais apresentaram menor adiposidade corporal, não sendo detectado efeito no peso total corporal do animal (TIRAPEGUI et al., 2012).

De acordo com os resultados apresentados nesta pesquisa, a morfologia do TAM e do TAB conferem com a descrição histológica de Junqueira e Carneiro (2013), onde o TAB é denominado tecido adiposo unilocular devido a uma única grande área ocupada por lipídeos em sua região citoplasmática e o TAM, conhecido é como tecido adiposo multilocular, em decorrência de diversas gotículas de gordura intracitoplasmáticas. No entanto, apesar de ambos, estruturalmente, manterem moléculas de lipídeos em seu citoplasma, o TAB e o TAM apresentam-se fisiologicamente bastante distintos, pois, o TAB é responsável por armazenar triglicerídeos sobressalentes à produção de energia, advindos da alimentação, e o TAM tem a função contrária de metabolizar essa energia estocada na forma de gordura pelo tecido adiposo branco (CANNON; NEDERGAARD, 2004; MINAMINO; NAGASAWA; OHTSURU; 2008).

Nos dados morfométricos de tecido adiposo ocorreu uma diminuição da área média de adipócitos brancos de mães alimentadas com dieta HP, o que pode estar associado a diminuição de apetite. Segundo Pesta e Samuel (2014), um dos mecanismos mais importantes para a perda de peso corporal é induzir à saciedade, gerando um balanço negativo de calorias, culminando em perda de massa lipídica livre. A ingestão de altas doses de proteína, sendo este macronutriente o mais saciante conhecido, pode então diminuir a necessidade contínua de ingestão alimentar, culminando em um gasto calórico maior do que a ingestão, diminuindo também, dessa forma, o armazenamento de triglicerídeos. Complementando esse fato, sendo também o macronutriente mais termogênico conhecido (PESTA, SAMUEL; 2014), as proteínas podem propiciar o aumento da metabolização de lipídeos, advindos das reservas do TAB, pelo TAM, contribuindo, mais uma vez, para a diminuição da reserva de lipídeos nos adipócitos brancos.

Os efeitos da modificação nutricional ao longo da gestação dependem do tipo da dieta, da sua durabilidade, da intensidade da ingestão alimentar e do período da gestação, sendo que dietas diferenciadas podem ou não resultar em padrões corporais diferentes também na prole (BUCKLEY; JAQUIERY; HARDING, 2005). De acordo com o protocolo experimental estabelecido neste trabalho, a maioria dos parâmetros físicos avaliados nos filhotes não demonstrou sofrer influência direta da dieta materna ao longo da prenhez. Porém, diferentemente dos outros parâmetros, a abertura de vagina em filhotes fêmeas mostrou um atraso significativo

em proles de mães alimentadas com altas dosagens proteicas, assim como a abertura de olhos em filhotes de ambos os sexos.

O balanço energético e as funções metabólicas ideais são necessárias para a regulação da fisiologia reprodutiva. Além disso, durante a gestação, onde há um aumento do requerimento energético, a formação do sistema reprodutor feminino é muito sensível a mudanças nutricionais e ambientais. Neste cenário, a baixa ingestão calórica ou baixa nutrição, poderiam gerar baixas quantidades de leptina, podendo desencadear assim um atraso no desenvolvimento reprodutivo, através de um atraso no início da puberdade (BREWER; BALEN, 2010; KATZ; VOLLENHOVEN, 2000).

A literatura descreve a leptina como um importante hormônio produzido principalmente pelos adipócitos do TAB, que desempenha seu papel como regulador da puberdade e fertilidade, principalmente do sexo feminino (ARCHANCO et al., 2003; MARGETIC et al., 2002). A via principal de atuação da leptina é pelo eixo hipotálâmico-hipofisário-gonadal, mais conhecido como eixo HPG. A ativação da via acontece quando a leptina, produzida pelos adipócitos brancos é reconhecida no hipotálamo, mais especificamente no núcleo arqueado, regulando a liberação de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). O GnRH estimula diretamente a produção e liberação do hormônio luteneizante (LH) e folículo estimulante (FSH). O FSH e o LH são reguladores do ciclo reprodutivo feminino, regulando indiretamente assim os níveis de estrógeno e progesterona liberados. Enfim, a progesterona executa o papel de iniciadora do início da puberdade (PÉREZ-PÉREZ, 2015, TEENA-SEMPERE, 2007). Dentro deste contexto, os resultados aqui apresentados demonstram uma diminuição da área de adipócitos no TAB em mães tratadas com a dieta HP e, concomitante, um atraso na abertura vaginal de filhotes descendentes dessas mães, podendo estar correlacionados a uma diminuição de leptina materna disponível no ambiente uterino no momento do desenvolvimento do sistema reprodutor feminino da prole, culminando, a longo prazo, em um atraso da maturidade sexual desses filhotes na adolescência. No entanto, experimentos visando mensurar uma possível variação nos índices de leptina materna durante a prenhez devem ainda ser avaliados.

Corroborando com esta teoria, a morfometria do TAB dos filhotes fêmeas e machos descendentes de mães HP constatou que a área de adipócitos brancos em filhotes machos aumentou e, em fêmeas, nenhuma alteração foi detectada. Analisando estes dados, é possível supor que, em resposta à diminuição de leptina disponível no desenvolvimento intrauterino, os filhotes machos sofreram uma adaptação e apresentaram uma área maior de adipócitos brancos na adolescência (período em que o tecido foi coletado), produzindo assim maior quantidade de leptina neste momento e, como consequência, não apresentaram retardo no desenvolvimento

sexual como os filhotes do sexo feminino, visto que estas, no mesmo momento da puberdade dos machos, não demonstraram alteração na área dos adipócitos, não apresentando assim uma adaptação frente à falta de leptina intrauterina, culminando em atraso da maturação sexual.

Fortalecendo ainda mais a teoria aqui levantada, Connor e colaboradores (2012), mostraram que a adiposidade de filhotes machos advindos de ratas alimentadas com dieta altamente gordurosa foi maior e seu desenvolvimento reprodutivo mais avançado, concluindo que com uma quantidade energética estocada maior, possivelmente houve um atendimento melhor da demanda e assim, o desenvolvimento reprodutivo foi acelerado, coincidindo com a teoria aqui descrita, em que a maior quantidade de lipídeos estocado no TAB de machos impediu um atraso no desenvolvimento reprodutivo, como ocorreu nas fêmeas. Em suma, seria interessante o desenvolvimento de estudos posteriores que possibilitem estudar mais a fundo a fertilidade destas fêmeas geradas durante o regime de alimentação HP.

Os efeitos de uma dieta de restrição proteica nos filhotes de ratos resultam em diversas mudanças metabólicas, culminando em obesidade na vida adulta, porém, os efeitos de alta dosagem proteica no metabolismo de filhotes ainda não está muito bem elucidado (BRITTANY et al., 2009). Maredsouls e colaboradores (2016) observaram menor adiposidade visceral e subcutânea em filhotes de mães alimentadas com excesso de proteína, não sendo esse efeito sexo-específico, mas tendendo a ser maior em fêmeas. Além disso, Bayol e colaboradores (2005) mostraram que a dieta materna pode influenciar na adiposidade dos filhotes, sendo que uma dieta materna rica em açúcares e gorduras utilizada por ratos gestantes culminou em uma maior adiposidade em filhotes.

A morfometria do tecido adiposo marrom em filhotes fêmeas não foi alterada pela alimentação materna, porém, em machos, a área média de adipócitos marrons foi diminuída em filhotes de mãe HP. O TAM é especializado em dissipação de energia, objetivando manter o balanço energético e manutenção da temperatura corporal, expressando assim, constitutivamente, vários genes termogênicos. Comumente ele é ativado em situações de baixa temperatura e frente a dietas gordurosas. A ativação do TAM então gera um aumento no gasto energético, a partir de triglicerídeos, armazenados no TAB (ARIAS et al., 2015, HARMS; SEALE, 2016). Atualmente, o TAM tem sido relacionado com baixo peso corporal, sendo assim, ele vem sendo estudado e visto como um aspecto em potencial para intervenções terapêuticas contra a obesidade (LEE et al., 2010). Frente a isso, a capacidade que o TAM tem de utilizar os triglicerídeos advindos do TAB para a produção de calor, faz com que as reservas de gordura nos adipócitos brancos diminuam, e assim ocorre a diminuição da hipertrofia dos adipócitos do TAB (KROTT et al., 2016).

Somando-se a estas pesquisas, segundo Forest e colaboradores (2016), alguns nutrientes ou componentes podem induzir ou acelerar a expressão da Proteína desacopladora (Uncoupling protein - UCP-1) em adipócitos marrons, aumentando assim a produção de calor. Os dados deste trabalho mostram um aumento na área média de TAB em filhotes machos HP e concomitante diminuição da área de TAM nos mesmos animais sugerindo, que o processo de termogênese desenvolvido pelo TAM nos machos possa estar comprometido, reduzindo o recrutamento e utilização das reservas de triglicerídeos dos adipócitos brancos para produção energética, culminando em uma maior quantidade de lipídeos neste tecido. Cabe ressaltar ainda, uma possível ação sexo-dependente também neste aspecto, vista influência da alimentação materna somente em filhotes machos e não em fêmeas. Os dados de Yoneshiro e colaboradores (2011) corroboram com os descritos neste trabalho, visto que segundo os estes pesquisadores, a diminuição da ativação de TAM é relacionada com aumento nos índices de obesidade, sugerindo uma ligação entre falha na função de TAM e ganho de peso. Ainda de acordo com Harms e Seale (2013), a diminuição da ativação de TAM é relacionada com o aumento dos índices de doenças crônicas como obesidade e diabetes tipo II.

Em relação ao atraso na abertura de olhos dos filhotes, Belluscio e colaboradores (2014), demonstraram, também em camundongos, a influência da proteína no desenvolvimento físico de filhotes, sob o efeito de uma dieta hipoproteica, com 9% de proteína. Neste ensaio, em encontro com os dados apresentados neste trabalho, os autores supracitados também encontraram um atraso na abertura de olhos em filhotes (de ambos os sexos) provenientes de mães tratadas com baixo índice proteico, justificando um atraso na maturação ocular. Tais dados descritos enfatizam assim a possibilidade do padrão nutricional materno durante a prenhez alterar aspectos físicos no desenvolvimento de filhotes. No entanto, de que forma a ingestão de proteínas pode atrasar a abertura ocular do filhote ainda precisa ser esclarecido principalmente pelo fato deste parâmetro ser alterado pelo excesso e pela carência deste macronutriente. O atraso no mesmo parâmetro de abertura ocular, ainda ocorre, segundo Giriko e colaboradores (2013), quando uma dieta rica em ácidos graxos é ministrada durante a gestação de ratos, mas estes autores também não encontraram justificativa pertinente para esta alteração.

A partir de uma alteração nutricional, lesões microestruturais, bioquímicas e moleculares podem ser geradas no sistema nervoso central dependendo do tempo e tipo de insulto nutricional. De acordo com a injúria acarretada por dessas alterações, e o local prejudicado, podem ser desencadeadas diversas patologias (MORGANE; MOCKLER; GALLER, 2002). Ainda segundo Morgane e colaboradores (2002), as alterações decorrentes da nutrição desbalanceada mais comuns são alterações histológicas, mudanças na estrutura celular

e modificações no balanço de marcadores celulares. De acordo com alguns autores, todos os macronutrientes exercem influência na formação cerebral, porém as proteínas parecem exercer um papel mais crítico associado ao desenvolvimento das funções neurológicas (MORGANE; MOCKLER; GALLER, 2002). Tais alterações podem gerar então, consequências estruturais e fisiológicas negativas no desenvolvimento cerebral (ALAMY; BENGELLOUN, 2012).

O período pós-natal também é descrito como de grande importância na formação cerebral de ratos e camundongos pois, o desenvolvimento neurológico em ratos ocorre mais tardiamente do que em humanos, onde os primeiros dez dias pós-natal são equivalentes ao 3º trimestre de gestação humana (CLANCY et al., 2007; WORKMAN et al., 2013). Em camundongos, testes de reflexo neonatal podem ser considerados como um índice importante utilizado como indicador de desenvolvimento cerebral (BELLUSCIO et al., 2014). Os testes de reflexo de endireitamento e geotaxia negativa são importantes ferramentas para avaliar a capacidade sensorio-motor refletindo a maturação da função do cerebelo (SECHER et al., 2006), órgão importante frente aos ajustes posturais, modulando os comandos para os neurônios motores e buscando compensar as mudanças de posição do corpo e/ou alterações na carga sobre os músculos, refletindo assim no equilíbrio dos filhotes (BERNE E LEVI, 2009; SECHER et al., 2006).

Impactos ambientais, tais como temperatura extrema, hiper e subnutrição, ou impactos sociais como estresse, durante a fase perinatal, podem interferir no desenvolvimento e na vida da prole alterando características físicas, fisiológicas, assim como comportamentais (ALMOND et al., 2012; LOU et al., 2015). Na espécie humana, estudos evidenciam uma influência negativa da nutrição materna insuficiente e irregular no intelecto e no comportamento dos filhos (BLACK et al., 2013). Em ratos, a restrição proteica pré e pós-natal afetou o desenvolvimento e comportamento de ansiedade em machos (REYES-CASTRO et al., 2012). No entanto, o fato de não haver resultados significativos que alertem para alguma falha no desenvolvimento neural dos filhotes gerados sob altas taxas de proteína pode demonstrar que a carência proteica na gestação pode comprometer o desenvolvimento neurológico, mas o excesso deste macronutriente talvez não gere consequências negativas na formação neurológica dos filhotes.

Seguindo este contexto, grandes proteínas não ultrapassam a placenta em valores significativos, salvo algumas exceções, porém, os aminoácidos constituintes dessas moléculas conseguem fazer a travessia, atingindo os tecidos fetais (MORGANE; MOCKLER; GALLER, 2002). Diversas outras moléculas importantes na formação e execução do sistema nervoso são também constituídas de aminoácidos, como precursores proteicos, enzimas e hormônios

peptídicos, além de que vários aminoácidos atuam como neurotransmissores ou são formadores destes. Fica claro assim a participação dos aminoácidos na formação e funcionamento cerebral, e não apenas como componentes estruturais proteicos (MORGANE; MOCKLER; GALLER, 2002). Assim, na deficiência ou ausência de aminoácidos, pode haver uma necessidade maior do que a oferta, e o sistema nervoso em formação pode sofrer consequências.

O presente trabalho, sugere que a quantidade de proteína aumentada para 42% no total da dieta alimentar das mães, sem que houvesse baixa da oferta de forma significativa dos demais nutrientes, permitiu uma oferta de aminoácidos além do necessário para o desenvolvimento neuropsicomotor da prole. Desta maneira é importante ressaltar que o excesso de aminoácidos ofertados não apresentou influência negativa no funcionamento e/ou desenvolvimento do sistema nervoso dos filhotes de mães HP. Vale ressaltar ainda que este é o primeiro trabalho visando averiguar a influência da dieta HP sobre o desenvolvimento neurológico da prole de camundongos uma vez que nenhum dos parâmetros avaliados nos testes de reflexos neurológicos apresentou variação entre o grupo Controle e o HP.

A avaliação morfológica macroscópica inicial dos filhotes logo após o nascimento também não apresentou anormalidade, pois os filhotes de ambos os grupos nasceram aparentemente saudáveis, com coloração rosada e movimentação normal, não apresentando indícios de mal formações visíveis ou qualquer outro indicativo de teratogênese. Estes animais foram observados no primeiro dia pós-nascimento e a aparência morfológica macroscópica confere com o descrito por Santos (2002) que relata que ao nascimento, os filhotes são desprovidos de pelos, excetuando as vibrissas, corpo avermelhado, olhos fechados, pavilhão auricular também fechado e aderido à cabeça.

Sabe-se que fêmeas de camundongo geram em média 10 a 12 filhotes por ninhada (LAPICHIK; MATTARAIA; KO, 2009; FELICIONI, 2014), o que foi ao encontro com o observado nos resultados anteriormente descritos. As proles apresentavam indivíduos que pesavam em média 1,0 g, independente do sexo, o que confere com trabalhos consultados, sendo que para o primeiro dia de vida é comum os neonatos pesarem de 1 a 1,5g (FELICIONI, 2014; LAPICHIK; MATTARAIA; KO, 2009). O ganho de peso e o tamanho do filhote, neste trabalho, parece não ter sido afetado o que pode estar associado com o fato de que os grupos Controle-19 e HP-19 mantiveram a quantidade de proteína placentária inalterada, assim como todos os aspectos morfológicos e morfométricos avaliados em suas placentas. De acordo com este contexto, aparentemente a dieta HP não acarretou nenhuma alteração que pudesse interferir na quantidade de suprimento nutricional recebido pelo embrião e ou feto. Mesmo as placentas

HP tendo apresentado uma pequena redução de peso, possivelmente o suprimento e a capacidade de trocas metabólicas não foram alterados.

Apesar dos resultados aqui apresentados não indicarem nenhuma influência da dieta HP sobre a quantidade e o peso de filhotes, as consequências da ingestão de proteínas durante a gestação nestes parâmetros ainda são controversas na literatura. Segundo Maslova e colaboradores (2014), a ingestão de proteína animal, principalmente carnes, pode aumentar o peso da prole gerando filhos com sobrepeso, sendo essa alteração mais aparente em filhotes do sexo feminino. A ingestão materna, em ratos submetidos a dieta HP (40%) durante a prenhez, geraram filhotes com massa corporal menor do que mães que ingeriram dieta controle (KUCIA et al., 2010). Em controvérsia, Lou e colaboradores (2015), não observaram diferença estatística no tamanho e peso da ninhada antes do desmame, de mães HP (36%), em um modelo de roedor herbívoro, convergindo com os dados aqui apresentados. De maneira semelhante aos resultados deste trabalho, Zimanyi e seus colegas (2002), não descreveram diferenças no número de filhotes por prole e nem no peso de ratos descendentes de mães tratadas com 52% de proteína. É importante ressaltar que neste último caso, a proteína adicionada a dieta também foi a caseína. Por fim, em um estudo mais atualizado, Maredsous e colaboradores (2016), com uma dieta HP 55%, em ratos também não observaram diferença estatística no peso ao nascer de filhotes.

Segundo Thone-Reineke, e colaboradores (2006), a ingestão de dieta HP (40%) durante a gestação pode culminar no aumento do crescimento da prole feminina no início da puberdade de filhotes de ratos, mesmo não apresentando diferença no peso ao nascimento. Além disso, foi constatada a diminuição de proteínas importantes no leite materno de fêmeas que ingeriram dieta HP na gestação. Consequentemente, proles que ingeriram o leite com déficit proteico mostraram um padrão de peso menor ao longo do primeiro mês de vida (KUCIA et al., 2010).

Entretanto, os dados literários mostram-se muito contrastantes em relação ao peso de filhotes descendentes de mães com alterações alimentares durante o primeiro mês de vida. Lou e colaboradores (2015) além de não observarem alteração de peso e tamanho em proles de roedores no nascimento, também não viram alterações de peso durante a lactação em filhotes provenientes de mães com dieta HP (36%). O mesmo aconteceu no trabalho de Zimanyi e colaboradores (2002) com ratos, onde filhotes de fêmeas tratadas com ração HP 52% durante a gestação e o início da lactação também não apresentaram nenhuma alteração no padrão de ganho de peso quando comparado ao grupo controle.

Em relação aos resultados apresentados nesta dissertação, filhotes fêmeas obtiveram um menor ganho de peso pontual no 26º dpn. Outros trabalhos também já demonstraram que, em resposta a alta exposição proteica (55%), ratos de ambos os sexos, descendentes de mães

tratadas durante a gestação e lactação também ganharam menos peso ao longo deste mesmo período de vida pós-natal. (MAREDSOUS, et al.; 2016). Além disso, Thone-Reineke e colaboradores (2006), observaram que o ganho de peso em filhotes fêmeas de mães HP foi levemente maior no início da puberdade, mostrando também um comportamento sexo-dependente deste parâmetro frente a dietas proteicas.

Desta maneira pode-se afirmar que existe uma correlação direta entre padrões nutricionais maternos durante a gestação com o crescimento e desenvolvimento dos seus descendentes. Em humanos, frente a uma dieta hiperproteica durante a vida inicial observa-se uma tendência a um crescimento acelerado de crianças de ambos os sexos (SOCHA et al., 2011). Além disso, dados de Reyes-Castro e colaboradores (2012) mostraram que houve um crescimento anus/genital maior em filhotes, de ambos os sexos, descendentes de mães com restrição proteica no período pré-natal, ficando claro, desta forma, que existem referências demonstrando que tanto o excesso quanto a carência de proteína interferem potencialmente nestes padrões. Nos resultados descritos no presente trabalho em relação a crescimento naso/caudal de machos convergem com a teoria de que alterações proteicas podem atuar no crescimento dos filhotes de maneira sexo dependente, sendo que a dieta HP (42%), culminou em uma diminuição da taxa de crescimento naso/caudal em machos e quando considerados filhotes de ambos os sexos, no entanto, não alterando as taxas quando analisado o mesmo parâmetro em filhotes fêmeas. Em suma, a diminuição do crescimento decorrente de dieta proteica possivelmente ocorreu pelo fato de que, frente à nutrição desbalanceada oferecida, houve alteração na composição do leite materno, composição esta necessária para o crescimento correto dos filhotes. Segundo Kucia e colaboradores (2011), a composição do leite materno é comprometida frente à dieta HP durante a gestação, lactação e quando utilizada em ambos os momentos. Desta forma, com a possível alteração composicional do leite materno, o crescimento dos filhotes pode vir a ser comprometido.

Alterações dietéticas maternas podem alterar outros sistemas específicos, ultrapassando somente alterações no ganho de peso e tecidos adiposos. Dietas com grande quantia de proteínas parecem estar relacionadas a uma sobrecarga renal materna (MEEK et al., 2013; MARCKMANN et al., 2015), além da própria gestação que por si só já exige uma demanda maior do sistema urinário (QUIAN SHEN, et al., 2011). Dentro deste contexto, os rins maternos, também foram analisados, buscando possíveis alterações decorrentes da alteração alimentar. Cabe ressaltar que a proporção rim/tíbia materna não apresentou nenhuma alteração. O efeito negativo exercido pelo aumento de proteína no rim parece estar relacionado com a necessidade de trabalho exacerbado na filtração glomerular frente ao excesso deste nutriente e

não com a hipertrofia ou hipotrofia do órgão (APARÍCIO et al., 2013). Apesar do tamanho e peso do órgão não estar alterado, a análise morfométrica apontou uma diminuição do número de glomérulos renais, o que associado a diminuição da quantidade de proteína renal em mães HP o que pode caracterizar um quadro de falha na filtração glomerular.

A nefrogênese em humanos é completada em meados das 36 semanas de gestação, porém, isso não ocorre em ratos, onde ela se finaliza somente após o nascimento, por volta do 8º dia pós-natal (HINCHLIFFE et al., 1991; LARSON; APERIA; WILTON, 1980). Sabe-se que ao longo da vida não ocorre produção de mais glomérulos, porém, pode haver perda do número de glomérulos como consequência da idade e de quadros patológicos, comprometendo assim a função renal (GUYTON; HALL, 2006; NYENGAARD; BENDTSEN, 1992).

As fêmeas prenhes deste trabalho, além de gestantes, foram alimentadas com dieta HP sendo que, segundo Bosch e colaboradores (1986), a ingestão de proteína em excesso gera uma taxa exacerbada de filtração renal. Frente a tais informações, o excesso de atividade renal, provocada pelo aumento de proteína durante a prenhez, pode ter culminado em falha deste órgão, diminuindo o número de glomérulos nos rins dos animais expostos ao tratamento hiperproteico. De acordo com Bertram e colaboradores (2001), o tamanho dos glomérulos pode se apresentar aumentado quando o número glomerular é menor, visando manter a área de filtração glomerular de maneira compensatória, porém, este quadro não fica evidente em alguns casos (SKOV et al., 1994), corroborando como descrito no presente trabalho, onde o tamanho do glomérulo, da Cápsula de Bowman e do corpúsculo renal não foram alterados.

Aparício e colaboradores (2013), em convergência com os resultados aqui apresentados, também observaram piora no perfil morfológico renal e urinário de ratos não gestantes tratados com dieta HP 45%. Além disso, está descrito na literatura que a diminuição no número de néfrons gera um aumento da retenção de sódio, causado pela baixa taxa de filtração, o que gera um quadro patológico de hipertensão (BRENNER; GARCIA; ANDERSON, 1988).

Frente às alterações morfométricas observadas, análises de quantidade de proteína e peroxidação lipídica foram realizadas afim de estudar mais profundamente os prejuízos renais maternos causados pela alimentação hiperproteica durante o período gestacional, sendo detectado uma diminuição na quantidade de proteína renal frente a uma peroxidação lipídica inalterada. Sabe-se que o rim é responsável por diversas funções metabólicas no organismo, como função excretória, regulação de líquidos corporais, balanço eletrolítico e balanço ácido-base. Porém, além de todas as funções renais já amplamente conhecidas, sabe-se que os rins também excretam substâncias externas ingeridas e produtos metabólicos (BERNE; LEVI, 2009).

Em condições normais, a formação da urina inicia com o movimento do ultrafiltrado plasmático dos capilares glomerulares para a cápsula de Bowman, movimento este passivo e desprovido de proteínas. Porém, em uma patologia conhecida como síndrome nefrótica, a qual pode ser causada por alterações alimentares crônicas e bruscas, como a empregada neste trabalho, há um aumento da permeabilidade dos capilares glomerulares às proteínas plasmáticas, resultando em uma elevada secreção urinária de proteínas, quadro conhecido como proteinúria (BERNE; LEVY, 2009). De acordo com estes autores, a proteinúria é decorrente da perda da função normal dos podócitos que compõem a chamada barreira de filtração, devido a redução da espessura dos processos podais (BERNE; LEVY, 2009). Bertram e colaboradores (2001) em seus estudos mostraram que a diminuição do número de glomérulos está associada com o aumento das dimensões deste e suas estruturas, objetivando compensar a falta de néfrons funcionais. Porém, os resultados apresentados neste trabalho não mostraram aumento na área da Cápsula de Bowman, na área total do glomérulo e nem na área do néfron. Frente a tais informações, possivelmente a espessura dos podócitos pode ter diminuído em decorrência da hiperfiltração causada pelas altas taxas de proteína ingerida e a não compensação que o aumento da área deveria causar.

Em suma, hipoteticamente, frente a uma alta dosagem alimentar de proteína, a qual resulta em uma carga de trabalho excessiva glomerular, pode ter sido desenvolvido um quadro semelhante ao supracitado em mães alimentadas com dieta HP, culminando assim na maior eliminação proteica renal pela urina, abaixando os níveis de proteína neste órgão.

Além dos rins maternos, foram analisados também os rins dos filhotes jovens aos 32 dpn, descendentes de mães HP, onde, apesar da proporção rim/tíbia apresentar alterações inversamente proporcionais entre os sexos, não foi detectado nenhuma diferença, em nenhum padrão morfológico e/ou morfométrico. Esta ausência de alterações morfométricas também foi observada nos rins retirados de fetos (19º ddg). No entanto, devido ao tamanho muito reduzido e a falta de ossificação adequada, não foi possível a retirada da Tíbia com precisão para confirmar se já ocorriam diferenças de proporção entre os tratamentos.

Como já descrito anteriormente, o uso excessivo de proteína pode causar sobrecarga renal e alterações morfológicas neste órgão. Porém, Zimanyi e colaboradores (2002), em estudo com dieta HP 54% em ratos, não observou aumento de tamanho e nem de peso renal em filhotes de mães alimentadas com a dieta e, o mesmo padrão foi descrito por esses autores quanto a número de glomérulos, volume glomerular e superfície de filtração. Além disso, a pressão sanguínea dos filhotes também não foi alterada, indicando assim que a dieta materna durante a gestação e semanas iniciais da lactação, neste caso, não afetou o desenvolvimento do sistema

urinário dos filhotes. Desta forma os resultados de Zymanyi e colaboradores (2002), conferem com os apresentados neste trabalho, excetuando o tamanho alterado do órgão.

No entanto, o impacto do consumo excessivo de proteína na dieta e sua associação com doenças renais têm sido estudado há muitos anos, mas ainda não há evidências suficientes que comprovem que a alta ingestão proteica possa causar danos renais em indivíduos saudáveis (KNIGHT et al., 2003). Vale salientar ainda que mesmo não sendo encontradas alterações na mensuração de proteína entre os filhotes HP e controle, este é um dado importante pelo seu ineditismo, pois, não foi encontrado nada na literatura acerca da quantificação proteica em filhotes de camundongos descendentes de mães HP.

Estudos prévios demonstraram que o estresse oxidativo perinatal é importante na programação fetal de susceptibilidade a possíveis doenças metabólicas adultas (AL-GULBORY; FOWLER; GARREL, 2010). Mudanças no padrão alimentar materno durante a gestação e lactação pode alterar negativamente o metabolismo da prole, podendo alterar o estresse oxidativo tecidual (KIM; KIM; KNOW, 2016).

Os dados aqui apresentados mostraram que houve uma diminuição significativa da peroxidação lipídica em rins de filhotes fêmeas, e também quando não considerado o fator sexo nos filhotes. Em trabalho recente, Spim e colaboradores (2016) mostraram que, em ratos machos adultos, alimentados com dieta rica em gorduras (60%) houve um aumento na peroxidação lipídica e, em animais tratados com a mesma dieta em associação com *Lentinulaedodes*, que é um cogumelo altamente proteico, a peroxidação lipídica causada pela dieta gordurosa foi compensada, sendo os números então comparáveis aos valores do grupo controle. Neste estudo, os autores atribuem tais efeitos ao possível potencial antioxidante do cogumelo, sem saber, porém, qual substância ou nutriente deste alimento estaria desempenhando tal papel. Reforçando estes resultados, Ashino e seus colegas (2012), teorizam que frente à obesidade materna, há um aumento de citocinas pró-inflamatórias, e estas parecem induzir um estresse oxidativo e inflamação na placenta durante a gestação. Porém, as mães HP neste trabalho apresentaram menor peso e menor área de adipócitos brancos, contrariando assim o quadro descrito acima, podendo então, a quantidade de adiposidade diminuída, baixar os níveis de estresse oxidativo na placenta e assim, influenciar positivamente neste aspecto bioquímico em filhotes descendentes desta gestação.

8 CONCLUSÃO

Em camundongos, a dieta materna hiperpoteica (42%), baseada no aumento de caseína é capaz de alterar o metabolismo materno, diminuindo a necessidade de ingestão alimentar, modulando o tecido adiposo branco, diminuindo do número de glomérulos e a quantidade total de proteína renal.

A dieta hiperproteica ministrada durante a prenhez ainda interfere nos padrões de desenvolvimento da prole, atrasando a abertura dos olhos de filhotes de ambos os sexos e a abertura vaginal das fêmeas mas não foi capaz de alterar os padrões de reflexo da prole.

A suplementação proteica materna, também alterou o metabolismo termogênico em filhotes machos, e a peroxidação lipídica renal de filhotes apesar de não ter influenciado na quantificação proteica e na morfologia placentária.

Sendo assim, conclui-se que a dieta hiperproteica materna pode alterar o organismo materno e a homeostase da gestação e, possivelmente através de programação fetal, influenciar a vida inicial da prole, muitas vezes de forma sexo específica, gerando consequências negativas para o desenvolvimento dos filhotes.

ANEXO**ANEXO 1 – Aceite do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas**

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Protocolo nº 668/2015, sob responsabilidade de Andréa Mollica do Amarante Paffaro, referente ao projeto intitulado "Dieta hiperproteica na gestação de camundongos e seus reflexos morfofuncionais na fêmea prenhe, embriões, fetos, placenta e neonatos" está em conformidade com o disposto na Lei nº 11.794/08 e nas resoluções do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UNIFAL) em 18 de setembro de 2015.

Alfenas, 21 de setembro de 2015.

Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira
Presidente CEUA/UNIFAL

REFERÊNCIAS

ABDEL-HAKEEM, A. K. et al. Mechanisms of impaired nephrogenesis with fetal growth restriction: altered renal transcription and factor expression. **Am J Obstet Gynecol.**, New York, v. 199, n. 3, p. 252e1-252e7, 2008.

AMARANTE, A. M. **EstudoImunocitoquímico das catpsinas D e B emcélulastrofoblásticasgigantes de Camundongos.** 1997, 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 1997.

AMARANTE-PAFFARO, A. M.; et al. Localization of cathepsins D and B at the maternal-fetal interface and the invasiveness of the trophoblast during the post implantation period in the mouse. **Cells Tissues Organs.**, Atlanta, v. 193, p. 417-425, 2011.

ANTUNES, M. V. et al. Estudo pré-analítico e de validação para determinação de malondialdeído em plasma humano por cromatografia líquida de alta eficiência, após derivatização com 2,4-dinitrofenilhidrazina. **Rev. Bras. Ciên. Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 279-287, 2008.

AL-GUBORY, K. H.; FOWLER, P. A.; GARREL, C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **Int J Biochem Cell Biol**,Nedlands, v. 42, n. 10, p. 1634–1650, 2010.

ALMOND,K. et al. The influence of maternal protein nutrition on offspring development and metabolism: the role of glucocorticoids. **Proceedings of the Nutrition Society**, Aberdeen, v. 71, n. 1, p. 198-203, 2012.

ALAMY, M.; BENGELLOUN, W. A. Malnutrition and brain development: An analysis of the effects of inadequate diet during different stages of life in rat. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**,Rome, v. 36, n. 6, p. 1463-80, 2012.

ANDREASYAN, K. et al. Higher maternal dietary protein intake in late pregnancy is associated with a lower infant ponderal index at birth. **Eur J Clin Nutr.**, Londres, ,v. 61, n.4, p. 498-508, 2007.

APARÍCIO, V. A., et al. High-protein diets and renal status in rats. **Nutr Hosp.**, Madrid, v. 28, n. 01, p. 232-237, 2013.

ARCHANCO, M., et al. Leptin expression in the rat ovary depends on estrous cycle. **The journal of histochemistry and cytochemistry**, Bethesda, v.51, n.10, p.1269-77, 2003.

ARIAS, N. et al. MicroRNAs involved in the browning process of adipocytes. **JPhysiolBiochem**, Navarra, v.72, n. 3, p.509-521, 2016.

ASHINO, N.G. et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **J NutrBiochem**, Lexington, v. 23, n. 4, p.341–348, 2012

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa de organismos. **Quim. Nova**. São Paulo, v. 29, n. 1, p.113-123, 2006.

BARTELT, A. et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance. **Nat. Med.**, New York, v.17, n. 2, p. 200–205, 2011.

BAYOL, S.A; SIMB, B.H.; STICKLAND, N.C. A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. **The journal of physiology**, Malden, v. 567, n.3, p. 951-961, 2005.

BELLUSCIO, L. M.; et al. Early protein malnutrition negatively impacts physical growth and neurological reflexes and evokes anxiety and depressive-like behaviors. **Physiology and Behavior**, Zurich, n. 129, p. 237-254, 2014.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. , 6.ed., **Amsterdã**, Elsevier Editora, 2009.

BERTRAM, J. F., et al. Renal glomerular number and size in Australian Aborigines, African Americans and white populations from the same locations: a preliminary report. **Image Anal Stereol**, Ljubljana, v. 20, p.153–156, 2001.

BLACK, R. E., et al. Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **Maternal and Child Nutrition**, Malden, v. 382, n. 9890, p. 427-451, 2013.

BOSH, J. P., et al. A. Renal hemodynamic changes in humans. Response to protein loading in normal and diseased kidneys. **Am J Med.**, Tucson, v. 81,n.5, p. 809-815, 1986.

BRENNER, B. M.; GARCIA, D.L.; ANDERSON, S. Glomeruli and blood pressure – less of one, more the other? **Am J Hypertens**, Montreal, v. 1, n.4 Pt1, p. 335–347, 1988.

BREWER, C.J.; BALEN, C.J. The adverse effects of obesity on conception and implantation. **Reproduction**, Nottingham, v. 140, n.3, p. 347-64, 2010.

BRITTANY, M.V. et al. In utero and postnatal exposure to a high-protein or high-carbohydrate diet leads to differences in adipose tissue mRNA expression and blood metabolites in kittens. **British Journal of Nutrition**, Southampton, v. 102, n.8, p.1136-1144, 2009.

BROW, L. S. **Nutritional requirements during pregnancy**. Jones and Bartlett, Burlington 2010.

BUCKLEY, A. J.; JAQUIERY, A. L.; HARDING, J. E. Nutritional programming of adult disease. **Cell Tissue Res.**, New York, v. 322, n.1, p. 73-79, 2005.

CALVINO-NUNEZ, C.; DOMÍNGUEZ DEL-TORO, E. Clonidine Treatment Delays Postnatal Motor Development and Blocks Short-Term Memory in Young Mice. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n.12, 2014.

CANNON, B.; NEDERGAARD, J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol. Rev.** Boston, v. 84, n.1, p. 277–359, 2004.

CASTRO V. L.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestacion to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**, Würzburg, v. 118, n.1-2, p.93-102, 2000.

CASTRO, V. L. Aspectos da exposição ambiental aos agroquímicos e a avaliação de seus efeitos no desenvolvimento animal. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v.21, n.1-2, p.469-497, 2004.

CASTRO, V. L. Estudo experimental em ratos da interação mãe/filhote expostos a agroquímicos. **Circular técnica- Embrapa**, Brasília, p.1-7, n.1, 2006.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H.R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, Araraquara, v. 28, n.1, p.11-23, 2007

CLANCY, B. et al. Extrapolating brain development from experimental species to humans. **NeuroToxicology**, Little Rock, v. 28, n. 5, p. 931-37, 2007.

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS. Estimativa de N – Como calcular o número de animais experimentais. Universidade de Brasília. Disponível em: <<http://ceuaunb.org/estimativa-de-n/>>. Acesso em 11 nov. 2015.

CONNOR, K. L. et al. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. **The Journal of physiology**. Malden, v. 590, n.9, p. 2167-80, 2012.

DAMASCENO, D. C., et al. **Anomalias congênitas – estudos experimentais**. 1ª ed., Coopmed – editora médica, Belo Horizonte, 2008.

DAVYDOV, D.M. et al. Neurodevelopment and phenotype-modulating functions of S100B protein: A pilot study. **Physiology & Behavior**, Zurich, v.140, n. nulo, p. 188-196, 2015.

DUKAN, P. **Eu não consigo emagrecer: a dieta francesa que conquistou 30 milhões de leitores**. Editora Best Seller, Rio de Janeiro, 2012.

ENDERS, A. C.; WELSH, A. O. Structural interactions of trophoblast and uterus during hemochorial placenta formation. **The Journal of Experimental Zoology**. Malden, v. 266, n. 6, p. 579-587, 1993

ENG, J. Sample Size Estimation: How Many Individuals Should Be Studied? **Radiology**, Boston, v.227, n.2, p. 309-313, 2003.

FELICIONI, F. **Efeitos morfológicos e de lipoperoxidação da restrição alimentar aguda durante a gestação de camundongos**, 2014, 101f. Dissertação de mestrado (Biociências Aplicadas à Saúde) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

FOREST, C., et al. What induces watts in WAT? **Adipocyte**, San Diego, v. 5, n. 2, p.136-152, 2016.

FOWLES, E. R. What's a pregnant woman to eat? A review of current USDA dietary guidelines and MyPyramid. **The Journal of Perinatal Education**. New Jersey, v. 15, n.4, p. 28-33, 2006.

GEORGIADIS, P.; FERGUSON-SMITH, A. C.; BURTON, G. J. Comparative developmental Anatomy of the Murine and Human Definitive Placentae. **Placenta**. Elizabeth Vale, v. 23, n.1, p. 3-19, 2002.

GODFREY, K. M.; BARKER, J. K. Fetal Nutrition and adult disease. **Am J Clin Nutr.**, Rockville, v.71, n.5, p.1344S-13452S,2000.

GIRIKO, C. A., et al. Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet, **Int. J. Devl Neuroscience**, Galveston, v.31, n.8, p.731-739, 2013.

GUELINCKX I. et al. Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. **Obesity Reviews**, Malden, v.9, n.2, p. 140–150. 2008.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 11^a ed. Editora Elsevier, Amsterdã, 2006.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, Sheffield, v, 35, n.5, p. 1047-1049, 2007.

HARMS, M.; SEALE, P. Brown and beige fat: development, function and therapeutic potential. **Nature Medicine**, New York, v. 19, n.10, p.1253-63, 2013.

HIMCHLIFFE, S.A., et al. D. Human intrauterine renal growth expressed in absolute number of glomeruli assessed by the dissector method and Cavalieri principle. **Lab Invest**, Evans, v.64, n.6, p.777–784, 1991.

HUOT, R. et al. Foster litters prevent hypothalamic-pituitary adrenal axis sensitization mediated by neonatal maternal separation. **Psychoneuroendocrinology**, Houston, v. 29, n.2, p. 279-289, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE OPNIÃO PÚBLICA E ESTATÍSTICA – IBOPE/FEDERAÇÃO DAS INDUSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO – FIESP. Pesquisa Nacional sobre o Perfil do Consumo de Alimentos no Brasil. Brasil Foodstrant 2020. Disponível em: <http://www.abic.com.br/media/EST_PESQFoodTrends1.pdf> .Acesso em 05 maio 2015.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidate tissue injury. **Free Radical Biology & Medicine**, Los Angeles, v. 9, n.6, p. 515-540, 1990.

JUNQUEIRA E CARNEIRO. **Histologia Básica**. 12^a Ed., Editora Guanabara, Lisboa, 2013.

KANITZ, E., et al. High and Low Protein: Carbohydrate Dietary Ratios during Gestation Alter Maternal-Fetal Cortisol Regulation in Pigs. **PLoS ONE**. San Francisco, v. 7, n. 12, p. 52748, 2012.

KAPUT, J. Nutrigenomics – 2006 update. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Padova, v. 45, n.3, p.279–287, 2006.

KATZ, M. G.; VOLLENHOVEN, B. The reproductive endocrine consequences of anorexia nervosa. **BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology**, Malden, v. 107, n.6, p. 707-713, 2000.

KIM, J.; KIM, J.; KWON, Y. H. Effects of disturbed liver growth and oxidative stress of high-fat diet-fed dams on cholesterol metabolism in offspring mice. **Nutr Res Pract.**, Korea, v. 10, n. 4, p. 386-392, 2016.

KING, R. H., et al. The response of first-litter sows to dietary protein level during lactation. **J Anim Sci.**, Champaign, v. 71, n.9, p. 2457–2463, 1993.

KNIGHT, E.L., et al. The impact of protein intake on renal function decline in women with normal renal function or mild renal insufficiency. **Ann Intern Med**, Filadélfia, v. 138, n.5, p. 460-467, 2003.

KROTT, L. M., et al. Endocannabinoid regulation in white and brown adipose tissue following thermogenic activation. **Journal of lipid research**, San Diego, v. 57, n.3, p. 464-473, 2016.

KUCIA, M. et al. High-protein diet during gestation and lactation affects mammary gland mRNA abundance, milk composition and pre-weaning litter growth in mice. **Animal**, França, v.5, n.2, p.268-277, 2010.

LAPICHIK, V.B.V.; MATTARAIA, V.G.M; KO, M.K. **Cuidados e manejo de animais de laboratório**, 1^a edição,, Ed. Atheneu, Rio de Janeiro, 2009.

LARSSON, L.; APERIA, A.; WILTON P. Effect of normal development on compensatory renal growth. **Kidney Int.**, New York, v.18, n.1, p.29–35, 1980.

LEE, P, et al. A critical appraisal of the prevalence and metabolic significance of brown adipose tissue in adult humans. **Am J PhysiolEndocrinolMetab**, Quebec, v.299, n. 4, p.601–606, 2010.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p.293-303, 2001.

LOU, M. et al. Maternal dietary protein supplement confers long-term sex-specific beneficial consequences of obesity resistance and glucose tolerance to the offspring in Brandt's voles. **ComparativeBiochemistryandPhysiology**, Ontario, v. 182, p. 38-44, 2015.

LUZ, H.K.M., et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta ScientiaeVeterinariae**, PortoAlegre, v. 39, n.2 , p.1-13, 2011.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Rev. Nutr. Campinas**, Campinas, v.12, n.3, p. 205-212, 1999.

MATHERS, J. C. Early nutrition: impact on epigenetics. **Forum Nutr.**, n.60, p. 42-8, 2007

MASLOVA, E., et al. Maternal protein intake during pregnancy and offspring overweight 20 y later. **Am J ClinNutr.**, Houston, v. 100, n.4, p. 1139-48, 2014.

MARCKMANN, P., et al. High-Protein Diets and Renal Health. **Journal of Renal Nutrition**, New York, v. 25, n.1, p. 1-5, 2015.

MAREDSOULS, C. D., et al. High-Protein Exposure during Gestation or Lactation or after Weaning Has a Period- Specific Signature on Rat Pup Weight, Adiposity, Food Intake, and Glucose Homeostasis up to 6 Weeks of Age. **The Journal of Nutrition**, Houston, v. 146, n.1, p. 21-29, 2016.

MARGETIC, S., et al. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. **Journal of the International Association for the Study of Obesity**, New York, v.6, n.11, p. 1407-33, 2002.

McGRATH, L.T., et al. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. **ClinicaChimica Acta**, Gent., v.235, n.2, p.179-188, 1995.

- MEEK, R. L. et al. Glomerular cell death and inflammation with high-protein diet and diabetes. **Nephrol Dial Transplant**, França, v. 28, n.7, p. 1711–1720, 2013.
- MENALICH, R. et al. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: A histomorphometric study. **Kidney International**, St. Louis, v.58, n.2, p. 770–773, 2000.
- MINAMINO, K.; NAGASAWA, Y.; OHSURU, M. A water-soluble extract from *Grifolafrondosa*, maitake mushroom, decreases lipid droplets in brown adipocyte tissue cells. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.** Tokio, v. 54, n.6, p.497-500, 2008.
- MOORE, S. E. Early-Life nutritional programming of health and disease in the gambia, **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, v. 7, n. 2, p. 123-131, 2016.
- MORGANE, P. J.; MOCKLER D. J., GALLER, J. R. Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, Roma, v. 26, n.4, p. 471-483, 2002.
- NEVES, S. M. P., et al. **Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP**, Ed. Fabíola Rizzo Sanches São Paulo, 2013.
- NIEUWENHUIZEN, A. G. et al. Acute effects of breakfasts containing a-lactalbumin, or gelatin with or without added tryptophan, on hunger, “satiety” hormones and amino acid profiles. **British Journal of Nutrition**, Southampton, v. 101, n.12, p.1859-66, 2009.
- NYENGAARD, J. R.; BENDTSEN, T. F. Glomerular number and size in relation to age, kidney weight, and body surface in normal man. **Anat Rec**, Malden, v. 232, n.2, p.194–201, 1992.
- OBREGON, M.J. Adipose tissue and thyroid hormones. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 5, n.479, p. 479, 2014.
- OLIVEIRA, J. E. D; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**, São Paulo, Sarvier, 1998.
- PARISI, F.; LAORETI, A.; CETIN, I. Multiple micronutrient needs in pregnancy in industrialized countries. **Ann. Nutr. Metab.**, Basel, v. 65, n.1, p.13-21, 2014.

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

PÉREZ-PÉREZ, A., et al. Role of leptin in female reproduction. **Clin Chem Lab Med**, Padova, v. 53, n.1, p. 15-28, 2015.

PESTA, D. H., SAMUEL, V.T. A high-protein diet for reducing body fat: mechanisms and possible caveats. **Nutrition & Metabolism**, China, v. 11, n.1, p.1, 2014.

QUIAN SHEN. et al. Intrauterine growth restriction and postnatal high-protein diet affect the kidneys in adult rats. **Nutrition**, Roma, v. 27, n.3, p. 364-371. 2011.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diet for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the Reformulation of the AIN 76-A Rodent Diet. **Journal of Nutrition**, Houston, v. 123, n. 11, p.1939-1951, 1993.

REMELY, M., et al. Therapeutic perspectives of epigenetically active nutrients. **Br J Pharmacol.**, Malden, v.172, n.11, p.2756–2768, 2015.

REYES-CASTRO, L.A., et al. Pre- and/or postnatal protein restriction developmentally programs affect and risk assessment behaviors in adult male rats, **Behavioural Brain Research**, Düsseldorf, v. 227, n. 2, p. 324-329, 2012.

RIFAS-SHIMAN, S. L. C et al. Changes in dietary intake from the first to the second trimester of pregnancy. **Pediatric Perinatal Epidemiology**, Malden, v. 20, n.1, p. 35-42, 2006.

ROMAN, S.S. Avaliação toxicológicas de compostos orgânicos de telúrio sobre o desenvolvimento pré-natal em camundongos, 2011.118f. Tese (Doutorado – Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

SECHER, T., et al. A neural cell adhesion molecule-derived fibroblast growth factor receptor agonist, the FGL-peptide, promotes early postnatal sensorimotor development and enhances social memory retention. **Neuroscience**, San Juan de Alicante v.141, n.3, p.1289–99, 2006.

SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M. **Modern nutrition in health and disease**. 10^o ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 2006.

SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **J. Pediat.**, Rio de Janeiro, v. 83, n.6, 2007.

SKOV, K., et al. Number and size of renal glomeruli in spontaneously hypertensive rats. **J Hypertens**, Millan, v.12, n. 12, p. 1373–1376, 1994.

SMITH, P. K.; et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid¹. **Analytical Biochemistry**. Bethesda, v. 150, n.1, p. 76-85, 1985.

SOENEN, S. et al. Relatively high-protein or “low-carb” energy-restricted diets for body weight loss and body weight maintenance? **Physiology & Behavior**, Zurich, v. 107, n. 3, p.374-380, 2012.

SOENEN, S.; WESTERTERP-PLATENGA, M. S. Proteins and satiety: implications for weight management. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, Bruxelles, v. 11, n. 6, p. 747-751, 2008.

SOCHA, P.; et al. Milk protein intake, the metabolic-endocrine response, and growth in infancy: data from a randomized clinical trial. **Am. J.Clin. Nutr.**, Houston, v. 94, n.6, p.1776S–84S, 2011.

SPIM, S.R.V.; et al. Effects of *Lentinula edodes* consumption on biochemical, hematologic and oxidative stress parameters in rats receiving high-fat diet, **Eur. J. Nutr.**, p. 1-10, 2016.

STEPHENS, T. V. et al. Protein Requirements of Healthy Pregnant Women during Early and Late Gestation Are Higher than Current Recommendations. **The Journal of Nutrition**, Houston, v. 145, n.1, p.73-78, 2014.

TEENA-SEMPERE, M. Roles of ghrelin and leptin in the control of reproductive function. **Neuroendocrinology**, Edinburgh v. 86, n.3, p. 229-41, 2007.

THONE-REINEKE, S. et al. High-protein nutrition during pregnancy and lactation programs blood pressure, food efficiency, and body weight of the offspring in a sex-dependent manner. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, St. Louis, v. 291, n.4, p.1025-1030, 2006.

TIRAPAGUI, J., et al. Effects of two different levels of dietary protein on body composition and protein nutritional status of growing rats. **Nutrients**, Basel, v. 4, n. 9, p.1328–37, 2012

VIRGILLI, F.; PEROZZI, G. How does nutrigenomics impact human health? **IUBMB Life**, Malden, v.60, n. 5 , p. 341-344, 2008.

VITOLO, M.R. *Nutrição: da gestação ao envelhecimento*. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2008.

WANG, H.; DEY, S. K. Roadmap to embryo implantation clues from mouse models. **Nature**. v. 7, n.3, p. 185-199, 2006.

WORKMAN, A. D. et al. Modeling Transformations of Neurodevelopmental Sequences across Mammalian Species. **The Journal of Neuroscience**, Washington, v. 33, n. 17, p.7368-7383, 2013.

YONESHIRO, T., et al. Age-related decrease in cold-activated brown adipose tissue and accumulation of body fat in healthy humans. **Obesity (Silver Spring)**, Malden, v. 19, n.9, p. 1755-1760, 2011.

ZIMANYI, M. A.; BERTRAM, J. F.; BLACK, M. J. Nephron number and blood pressure in rat offspring with maternal high-protein diet. **Pediatr. Nephrol.**, Tehran, v. 17, n.12, p. 1000-1004, 2002.