



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
ESCOLA DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS, NUTRIÇÃO E SAÚDE**

**GABRIELA DOS SANTOS PEREZ**

**CONSUMO DE DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE PERÍODO PERINATAL E  
PÓS DESMAME: EFEITOS SOBRE PARÂMETROS HEPÁTICOS E DO  
METABOLISMO LIPÍDICO EM RATOS JOVENS.**

**SALVADOR  
2014**

**GABRIELA DOS SANTOS PEREZ**

**CONSUMO DE DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE PERÍODO PERINATAL E  
PÓS DESMAME: EFEITOS SOBRE PARÂMETROS HEPÁTICOS E DO  
METABOLISMO LIPÍDICO EM RATOS JOVENS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Jairza Barreto Medeiros**

**SALVADOR  
2014**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de Saúde, SIBI  
- UFBA.

S237 Perez, Gabriela dos Santos

Consumo de dieta hiperlipídica durante período perinatal e pós desmame:efeitos sobre parâmetros hepáticos e do metabolismo lipídico em ratos jovens, 2014.

52 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Jairza Maria Barreto Medeiros.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia.  
Escola de Nutrição, 2014.

1. Gestação. 2. Lactação. 3. Nutrição. 4. Fígado. 5. Ratos. I. Medeiros, Jairza Maria Barreto. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 616.8

## TERMO DE APROVAÇÃO

**GABRIELA DOS SANTOS PEREZ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos, Nutrição e Saúde da Escola de Nutrição, da Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Alimentos, Nutrição e Saúde.

**CONSUMO DE DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE PERÍODO PERINATAL E PÓS  
DESMAME: EFEITOS SOBRE PARÂMETROS HEPÁTICOS E DO  
METABOLISMO LIPÍDICO EM RATOS JOVENS**

### BANCA EXAMINADORA:



---

**Profa. Dra. Jairza Maria Barreto Medeiros**  
Doutora Nutrição pela Universidade Federal de Pernambuco  
Professora da Universidade Federal da Bahia



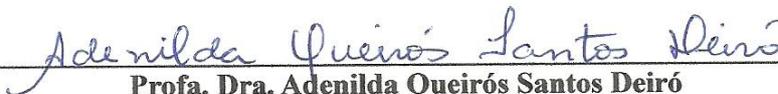
---

**Profa. Dra. Gyselle Crystina Baccan**  
Doutora em Bioquímica pela Universidade de São Paulo  
Professora da Universidade Federal da Bahia



---

**Prof. Dr. Raul Manhães de Castro**  
Doutor em Ciências da Vida pela Université de Paris VI  
Professor da Universidade Federal de Pernambuco.



---

**Profa. Dra. Adenilda Queirós Santos Deiró**  
Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia  
Professor da Universidade Federal da Bahia

Salvador – Bahia, 11 de abril de 2014

Dedicatória

*A minha família, a quem dedico  
todas as minhas vitórias. À eles  
que tem todo o meu amor e  
gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradecer simplesmente torna-se pequeno diante de tamanha gratidão que tenho por todos. À Força maior, Deus, que sempre nos mantém firme e esperançosos de dias melhores. Que nos fortalece e nos ilumina a cada dia sem nada em troca.

À minha família, o bem mais precioso, que apoia o progresso. Que entende as ausências. Que se orgulha enfatizando isso para todos.

A meu pai que mesmo partindo cedo para outro plano, cumpriu o seu legado perpetuando educação, amor e sabedoria aos seus filhos. Obrigada meu herói!

A meu noivo, pelo apoio constante, amor e compreensão em todos os momentos.

À professora Jairza que incentiva meu crescimento desde momentos precoces da graduação. Obrigada pelo exemplo de profissional e pela amizade.

Às estagiárias e mais que tudo, amigas: Lucimeire, Gabriele, Késsia, Bartira, Djane, Ana Paula e Cibele, pelo empenho constante dando sempre o melhor de si no desenvolvimento da pesquisa.

Aos funcionários da ENUFBA, Sr. Vivaldo, Sr. Luis, os porteiros e em especial ao Sr. José Carlos por toda paciência, disposição e amizade, dentre todos os outros que nos auxiliam diariamente nas atividades.

Aos colegas de Mestrado por dividirem todas as dificuldades e conquista nessa trajetória.

À minhas amigas Sheila, Pat Nunes, Elisa, Dalila, Nanda, Pat Brito, Iana, Livia, pelos momentos de descontração, desabafo e companheirismo.

Aos professores pelos ensinamentos e por serem modelos de profissionais, sempre servindo de inspiração.

À amiga Gardênia, por ter ajudado a concluir o trabalho e ter incentivado no desenvolvimento do projeto.

Enfim, a todos que participaram de qualquer maneira. Meus sinceros agradecimentos!

## RESUMO

Nas últimas décadas, estudos tem evidenciado que doenças como obesidade e suas disfunções metabólicas, têm suas origens desde o período de vida intrauterino e primeiros anos de vida. A dieta utilizada durante esses períodos críticos de desenvolvimento, exerce importante papel regulador da saúde dos descendentes. Assim, o presente estudo teve como objetivo Investigar as consequências do consumo perinatal materno de dieta hiperlipídica associado ao hábito alimentar no pós desmame sobre parâmetros hepáticos e do metabolismo lipídico em ratos jovens Fêmeas de ratos Wistar foram alimentadas com dieta hiperlipídica (H) ou dieta controle (C) durante a gestação e lactação. Os descendentes foram divididos em quatro grupos: Controle Controle (CC, n=11) descendentes de ratas alimentadas com dieta controle e alimentados com a mesma dieta no pós desmame; Controle Hiperlipídico (CH, n=10) descendentes de ratas alimentadas com dieta controle e alimentados com dieta hiperlipídica no pós desmame; Hiperlipídico Hiperlipídico (HH, n=10) prole de ratas alimentadas com dieta hiperlipídica no período perinatal e pós desmame; Hiperlipídico Controle (HC, n=9) descendentes de ratas alimentadas com dieta hiperlipídica no período perinatal e dieta controle no pós desmame. Os animais dos grupos HC e HH apresentaram maior ganho de peso no 21º(p≤0,05) dia igualando com os demais grupos no pós desmame. Não houve diferença na média de consumo alimentar entre os grupos, porém os animais HC, HH e CH apresentaram maior peso relativo do tecido adiposo (p≤0,005). Formação de esteatose hepática foi observada nos ratos CH e HH assim como hipercolesterolemia nos dois grupos (p≤0,05). As enzimas hepáticas ALT e GGT foram maiores no grupo HH assim como o LDL no grupo CH quando comparados ao controle. Podemos concluir com esse estudo que dieta obesogênica utilizada em períodos críticos de desenvolvimento, pode contribuir para a formação de obesidade visceral, esteatose hepática e hipercolesterolemia em ratos adultos jovens, mesmo sem modificações no consumo alimentar e ganho ponderal, sendo exacerbada em animais descendentes de ratas que consumiram a dieta na gestação e lactação e que mantiveram o consumo até a vida adulta.

**Palavras chave: dieta hierlipídica, gestação, lactação, fígado, ratos jovens.**

## ABSTRACT

In recent decades, studies have shown that diseases such as obesity and its metabolic disorders, have their origins from the period of intrauterine life and early life. The diet used during these critical periods of development plays an important regulatory role of the health of offspring. Thus, the present study aimed to investigate the effects of perinatal maternal consumption of high-fat diet, associated with post weaning feeding habits, in parameters and on liver lipid metabolism in young rats. Female Wistar rats were fed with high fat diet (H) or control diet (C) during pregnancy and lactation. The descendants were divided into four groups: Control Control (CC, n=11) offspring of rats fed the control diet and fed the same diet post weaning; Hyperlipidic Control (HC, n=10) offspring of rats fed a control diet and fed the high-fat diet after weaning; Hyperlipidic hyperlipidic (HH, n=10) offspring of rats fed with high fat diet during the perinatal period and after weaning; Hyperlipidic control (HC, n=9) offspring of rats fed a high fat diet during the perinatal period and the control diet after weaning. HC and HH animals had greater weight gain in the 21<sup>o</sup> ( $p \leq 0.05$ ) equaling day with the other groups in the post weaning. There was no difference in mean food consumption between groups, but the HC, HH and CH animals showed higher relative weight of adipose tissue ( $p \leq 0.005$ ). Formation of hepatic steatosis was observed in CH and HH rats, as well as hypercholesterolemia in both groups ( $p \leq 0.05$ ). Liver enzymes ALT and GGT were higher in the HH group, as well as LDL in the CH group compared to control. We can conclude with this study that high fat used during critical periods of development, may contribute to the formation of visceral obesity, hepatic steatosis, and hypercholesterolemia in young adult rats, even without changes in food intake and weight gain in young animals being exacerbated in rats fed diet during gestation and lactation and that consumption remained until adulthood.

**Key word: high fat diet, pregnancy, lactation, liver, young rats.**

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1</b> – Divisão dos grupos experimentais maternos.	18
<b>FIGURA 2</b> - Dietas alimentares oferecidas aos respectivos grupos experimentais	20
<b>FIGURA 3</b> - Divisão dos subgrupos experimentais após o desmame.	21
<b>FIGURA 4A</b> - Percentual do ganho de peso do 1° ao 21° de ratos jovens descendentes	26
<b>FIGURA 4B</b> - Percentual do ganho de peso (21° - 28°; 28° - 45°; 45° - 60°) de ratos jovens descendentes	26
<b>FIGURA 5</b> - Média do consumo alimentar de ratos jovens descendentes	27
<b>FIGURA 6</b> - Peso relativo do tecido adiposo visceral de ratos jovens descendentes	28
<b>FIGURA 7</b> - Aparência dos fígados de ratos com massa corporal semelhante	28
<b>FIGURA 8</b> - Peso relativo do fígado de ratos com massa corporal semelhante	29
<b>FIGURA 9</b> - Análise da histologia hepática de ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle (CC) ou uma dieta hiperlipídica (HC) durante a gestação e lactação e que mantiveram (HH) ou não (HC) o consumo da dieta no pós desmame. Hematoxilina e Eosina (400x).	30

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - Composição centesimal das dietas utilizadas no experimento	19
<b>TABELA 2</b> – Composição de ácidos graxos da dieta padrão e dieta hiperlipídica.	19
<b>TABELA 3</b> – Percentual de presença de esteatose macrovesicular e microvesicular e percentual de comprometimento do órgão com esteatose, em ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle ou uma dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação e que mantiveram ou não o consumo da dieta no pós desmame.	30
<b>TABELA 4</b> – Parâmetros bioquímicos de ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle ou hiperlipídica durante a gestação e lactação e que mantiveram ou não o consumo da dieta no pós desmame.	31

## **LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS**

**DHGNA** – Doença hepática gordurosa não alcoólica

**IBGE** – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

**IASO** – International Association for the Study of Obesity

**IMC** – Índice de Massa Corporal

**ALT** – Enzimas Alanina Transaminase

**AST** – Aspartato Transaminase

**GGT** – Gama Glutamil Transpeptidase

**HDL** – High Density Lipoproteins

**LDL** – Low Density Lipoproteins

**VLDL** – Very Low Density Lipoprotein

**SFA** – Ácido graxo saturado

**MUFA** – Ácido graxo monoinsaturado

**PUFA** – Ácido graxo poliinsaturado

**TFA** – Ácido graxo trans

**ND** – Não detectado

**C** – Grupo controle

**H** – Grupo hiperlipídico

**CC** – Grupo Controle Controle

**CH** – Grupo Controle Hiperlipídico

**HH** – Grupo Hiperlipídico Hiperlipídico

**HC** – Grupo Hiperlipídico Controle

**GPC** – Ganho de peso corporal

**HE** – Hematoxilina-eosina

**COBEA** – Colégio Brasileiro para Experimentação Animal

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
	2.1 Objetivo Geral .....	15
	2.2 Objetivos Específicos .....	15
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESE .....</b>	<b>16</b>
<b>4.</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>17</b>
	4.1 Manipulação dietética Materna .....	17
	4.2 Avaliação dos efeitos pós desmame.....	21
	4.3 Avaliação do Peso Corporal.....	22
	4.4 Avaliação do Consumo Alimentar .....	22
	4.5 Análise dos Exames Bioquímicos .....	22
	4.6 Avaliação Ponderal do Tecido adiposo Visceral e do Fígado	23
	4.7 Estudo dos Aspectos Histológicos.....	23
	4.8 Análise Estatística.....	23
	5.0 Aspectos Éticos .....	24
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>38</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>39</b>

---

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade e suas comorbidades associadas atingem proporções pandêmicas no mundo ocidental neste novo milênio. O mais recente levantamento realizado pelo Ministério da Saúde aponta que o excesso de peso e a obesidade aumentaram nos últimos seis anos no Brasil. De acordo com o estudo, a proporção de pessoas acima do peso no país avançou de 42,7%, em 2006, para 48,5%, em 2011. No mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11,4% para 15,8% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

Múltiplos órgãos e sistemas são afetados em decorrência da obesidade e suas complicações metabólicas. Entre as suas diversas repercussões, destaca-se, a doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), resultado do acúmulo de gordura no fígado apresentando associação à resistência à insulina e ao acúmulo de gordura visceral. (FESTI, 2004) Seu espectro de apresentação varia desde uma simples infiltração hepática de gordura (esteatose), passando pelo estabelecimento de um processo inflamatório (esteato-hepatite) até a fibrose hepática (SATHYA, 2002).

Nas últimas décadas, estudos tem evidenciado que doenças como obesidade e suas disfunções metabólicas, têm suas origens desde o período de vida intrauterino, momento em que o feto em desenvolvimento, responde às condições do ambiente as quais é submetido, durante um período crítico de proliferação celular, diferenciação, e maturação, produzindo alterações estruturais e funcionais nas células, tecidos e sistemas orgânicos. Estas alterações podem, por sua vez, originar em curto ou longo prazo, consequências para a saúde e tornar o organismo mais susceptível às doenças (BARKER *et al.*, 1993; WELLS, 2007; LUCAS,

1991). Tal processo decorrente de adaptações precoces que estimulam ou alteram permanentemente a fisiologia e metabolismo do organismo passou a ser denominado de *programação metabólica*. (LUCAS, 1998; LANGLEY-EVANS, 2006) ou mais recentemente de *plasticidade ontogenética*, devido a sua característica mais probabilística do que determinista. (GLUCKMAN, 2005).

Um grande número de estudos já realizados em humanos e animais sobre a programação fetal da obesidade e disfunção metabólica tem focado sobre o papel crítico da nutrição materna antes ou durante o período perinatal (gestação e lactação) produzindo importantes descobertas a respeito. (FAGUNDES et al., 2007; BARRETO-MEDEIROS et al., 2004; LIMA et al., 2011; HOLNESS et al., 2000; WATKINS, SINCLAIR, 2014 ; DURRAN et al., 2014). Estes estudos tratam na sua maioria, de modelos experimentais de dieta materna com deficiência de nutrientes durante os períodos críticos de desenvolvimento. (BYRNE et al., 1997; FRANCO et al., 2002; OZAKI et al., 2001) No entanto, neste novo milênio, mudanças no estilo de vida são observadas.

No Brasil, dados dos estudos sobre a disponibilidade domiciliar de alimentos nas áreas metropolitanas do país, desde a década de 70 até 2009 demonstram tais alterações na dieta destacando o aumento do consumo de alimentos industrializados como, pães, embutidos, biscoitos, refrigerantes e refeições prontas, assim como a ingestão reduzida de arroz, feijão, frutas e hortaliças. (IBGE, 2010a) Assim, observa-se uma ampla difusão e consumo de alimentos hipercalóricos contribuindo para um aumento na prevalência de doenças crônicas não transmissíveis, em especial a obesidade, seja em crianças, adolescentes ou adultos.

Participando do processo de transição nutricional, há também um aumento no consumo de alimentos ricos em gordura (hiperlipídicos) por parte das mulheres em idade reprodutiva (IASO, 2013), colaborando para manutenção de uma inadequação alimentar durante um período crítico de desenvolvimento: a gestação e a lactação.

Um levantamento mundial realizado pela *International Association for the Study of Obesity* (IASO, 2013), aponta para a crescente prevalência de mulheres com sobrepeso (definido como Índice de Massa Corporal (IMC)  $>25 - 29,9\text{kg/m}^2$ ) e a obesidade (IMC  $>30\text{kg/m}^2$ ) em diferentes partes do mundo, destacando-se os Estados Unidos com 35,8% das mulheres em idade reprodutiva (20-39 anos) com obesidade no ano de 2010. No Brasil, segundo pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010b), 48% das mulheres com idade superior a 20 anos, encontram-se com excesso de peso enquanto 16,9% cursam com obesidade

A elevada ingestão dietética de gordura, principalmente produzida a partir de ácidos graxos saturados, desempenha um importante papel no desenvolvimento da DHGNA (AHMED *et al.*, 2009). A esterificação a triglicerídeos é proporcional à disponibilidade de ácidos graxos que, associada a uma redução na capacidade de utilização, contribui para maior acúmulo hepático (ANSTEE, GOLDIN 2006; AHMED *et al.*, 2009).

Em decorrência do aumento do consumo de alimentos hiperlipídicos durante a gestação e lactação, há agora um crescente interesse na influência desta dieta materna sobre seus descendentes, seja na infância ou na vida adulta. (GILLMAN *et al.*, 2008) Novas evidências já sugerem que uma alimentação materna inadequada no período perinatal, pode influenciar seus filhotes na tendência ao desenvolvimento de obesidade por alterar a regulação do apetite e a composição corporal na vida adulta (GILLMAN *et al.*, 2008).

Em ratos, o modelo de obesidade materna induzido pelo consumo de dieta rica em gordura e açúcares tem demonstrando alterações no metabolismo dos descendentes como: aumento no peso corporal, tecido adiposo (OLIVEIRA, 2011; BAYOL, 2008; BENKALFAT, 2011), disfunção miocárdica (TURDI, 2013), resistência à insulina (TAYLOR *et al.*, 2007), preferência alimentar por alimentos hipercalóricos (BAYOL, 2007), resistência a leptina

(MORRISAND, 2009) além do surgimento da doença hepática não alcoólica (BOUANANE et al, 2010; BRUCE et al, 2009; BAYOL, 2010).

Apesar destas evidências, dezenas de relatórios têm abordado esta questão em modelos humanos e animais ao longo dos anos, mas não houve consistência dos resultados ou conclusões. Essas discrepâncias nos resultados podem ser decorrentes da vasta gama metodológica empregada: com uso de espécies diferentes, grande variação nas dietas utilizadas, priorizando nutrientes específicos ou diversificando os tempos de manipulação dietética; variação no consumo alimentar; tipo de gordura utilizada (animal ou vegetal); número de filhotes na ninhada bem como das idades analisadas.

Neste trabalho, foi utilizada uma dieta materna que mimetizasse a alimentação obesogênica atual, desbalanceada nutricionalmente, sendo rica em gordura e calorias, priorizando os períodos críticos de desenvolvimento: gestação, lactação e pós desmame sobre ratos adultos jovens de diferentes ninhadas.

Na prática clínica, esse trabalho contribuirá para se compreender quais as consequências fisiopatológicas de uma alimentação inadequada no início da vida e a sua manutenção no pós desmame. Assunto de extrema importância que hoje ultrapassa os limites da área clínica e se constitui em um caso de saúde pública. Até que ponto distúrbios fisiopatológicos podem estar associados a alterações oriundas da alimentação inadequada durante o período de formação fetal e os primeiros anos de vida?

## 2. OBJETIVOS

---

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as consequências do consumo perinatal materno de dieta hiperlipídica associado ao hábito alimentar no pós desmame sobre parâmetros hepáticos e do metabolismo lipídico em ratos jovens.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos da dieta hiperlipídica durante o período perinatal associado ao hábito alimentar no pós desmame em ratos jovens sobre:

- Evolução ponderal;
- Consumo alimentar.
- Adiposidade visceral;
- Características histológicas do fígado;
- Parâmetros hepáticos: Enzimas Alanina Transaminase (ALT), Aspartato Transaminase (AST) e Gama Glutamil Transpeptidase (GGT);
- Parâmetros do metabolismo lipídico: Triglicerídeos, colesterol total e frações HDL, LDL, VLDL;

### **3. HIPOTÉSES**

---

Ratos jovens descendentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante período perinatal e que mantiveram o hábito alimentar materno após o desmame apresentam alterações em parâmetros hepáticos e no metabolismo dos lipídeos.

## 4. METODOLOGIA

---

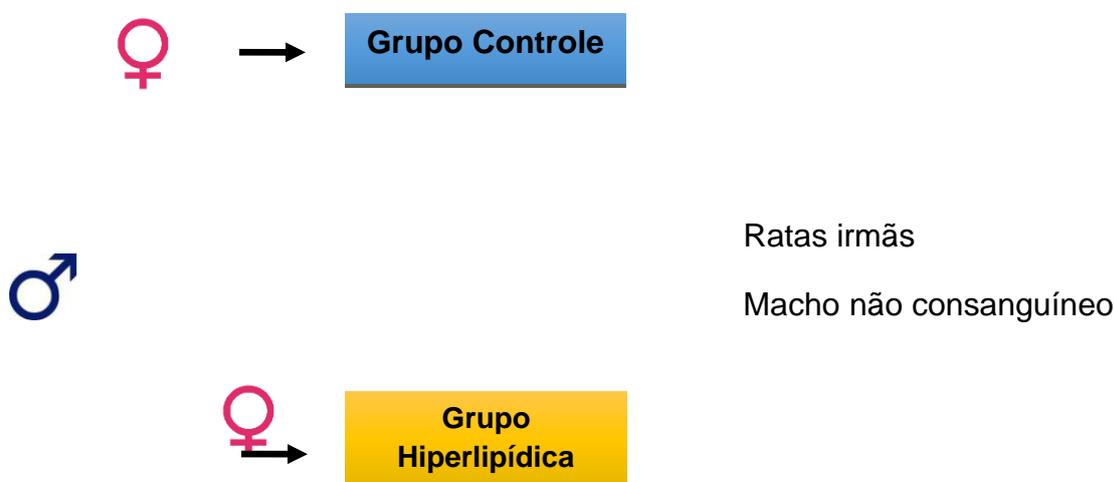
Estudo do tipo experimental realizado em ratos (*Rattus norvegicus*), variedade *albinus*, da linhagem *Wistar*. Foi dividido em duas fases: a primeira caracterizada pela manipulação materna, onde ratas adultas no primeiro dia de gestação foram submetidas à dieta hiperlipídica (dieta teste) durante o período perinatal. Na segunda fase do experimento foram investigados efeitos pós desmame, do 21<sup>o</sup> até 60 dias (rato adulto jovem (SENGUPTA, 2013)) de vida, em descendentes das ratas expostas a dieta hiperlipídica ou padrão no período perinatal que mantiveram ou não o consumo da dieta teste.

Todos os animais foram mantidos no laboratório de experimentação animal sob as mesmas condições, temperatura de  $23 \pm 2$  ° C e ciclo claro/escuro de 12 horas (claro das 6h às 18h; escuro das 18h às 6h).

### 4.1 MANIPULAÇÃO DIETÉTICA MATERNA

Foram utilizadas 8 fêmeas primíparas de ratos *Wistar* com 90 a 100 dias de vida, provenientes do Laboratório de Nutrição Experimental da Escola de Nutrição da Universidade Federal da Bahia (UFBA), da União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME) e da Escola de Medicina Veterinária UFBA que apresentavam peso corporal mínimo de 220g e máximo de 280g. Estas foram colocadas nas caixas utilizadas pelos machos a serem acasalados por dois dias, para que o cheiro do animal induzisse a ovulação. No terceiro dia às 17h, o macho foi adicionado à caixa para iniciar o acasalamento durante toda a noite. Às 7:30h da manhã seguinte, foi realizado o teste do esfregaço vaginal, para constatação da presença de espermatozoides. Caso resultado obtido fosse positivo o primeiro dia da gestação seria estabelecido, caso contrário, os animais se manteriam no acasalamento e o teste seria repetido na manhã seguinte no mesmo horário.

Para cada um macho, foi utilizada duas fêmeas irmãs: uma do grupo Controle (C) e outra do grupo Hiperlipídica (H) como ilustra a figura 1, como forma de submeter os dois grupos de tratamento à mesma origem genética, evitando assim possíveis vieses nos resultados. Mais três duplas de ratas irmãs oriundas de laboratórios distintos, foram utilizadas. No total, foram utilizados quatro machos não consanguíneos, quatro fêmeas do grupo C sem parentesco e 4 fêmeas do grupo H sem parentesco originando oito ninhadas: quatro do grupo controle e quatro do grupo teste. Tal divisão dos grupos por ninhada segue a recomendação de Holson (1992) para experimentos no qual há uma manipulação durante o período de gestação e lactação, preconizando que as fêmeas e/ou a ninhada inteira formam um grupo de tratamento e não somente descendente da ninhada. Logo o “n” será a quantidade total de fêmeas tratadas ou de ninhadas avaliadas por grupo.



**Figura 1:** Divisão dos grupos experimentais materno.

Após a constatação da gestação, as ratas foram isoladas em caixas individuais e divididas em dois grupos, segundo a manipulação nutricional. Um grupo recebeu a dieta padrão (ração) comercial para ratos (Nuvilab<sup>®</sup> CR1), com composição descrita na Tabela 1 e 2, formando assim o grupo C.

O segundo grupo recebeu a dieta hiperlipídica, previamente analisada por Oliveira *et al*, 2011. A dieta é constituída de uma mistura de alimentos hipercalóricos contendo ração comercial (Nuvilab<sup>®</sup>), amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito do tipo maria na proporção de 3:2:2:1. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de péletes. A composição centesimal e o perfil de ácidos graxos das dietas encontram-se nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1:** Composição centesimal das dietas utilizadas no experimento.

Nutrientes	Dieta(g/100g)	
	DC	DH
<b>Carboidrato</b>	57	46
<b>Proteína</b>	22	17
<b>Lipídio</b>	4	23
<b>Cinzas</b>	9	4
<b>Umidade</b>	8	10
<b>Energia (kcal/g)</b>	3,5	4,5

DC: dieta controle; DH: dieta hiperlipídica. Fonte: Oliveira *et al* (2011).

**Tabela 2:** Composição de ácidos graxos da dieta padrão e dieta hiperlipídica.

Ácidos graxos	Ácidos graxos totais %	
	DC	DH
<b>Total SFAs</b>	19,17	41,71
<b>Total MUFAs cis</b>	26,24	35,32
<b>Total PUFAs cis</b>	53,4	21,95
<b>Total TFAs</b>	1,18	0,41
<b>PUFA: SFA</b>	2,78	0,53

DC: dieta controle; DH: dieta hiperlipídica; SFA: ácido graxo saturado; MUFA: ácido graxo monoinsaturado; PUFA: ácido graxo poliinsaturado; TFA: ácido graxo trans; ND: não detectado. Fonte: Oliveira *et al* (2011)





Dieta Controle

Dieta Hiperlipídica

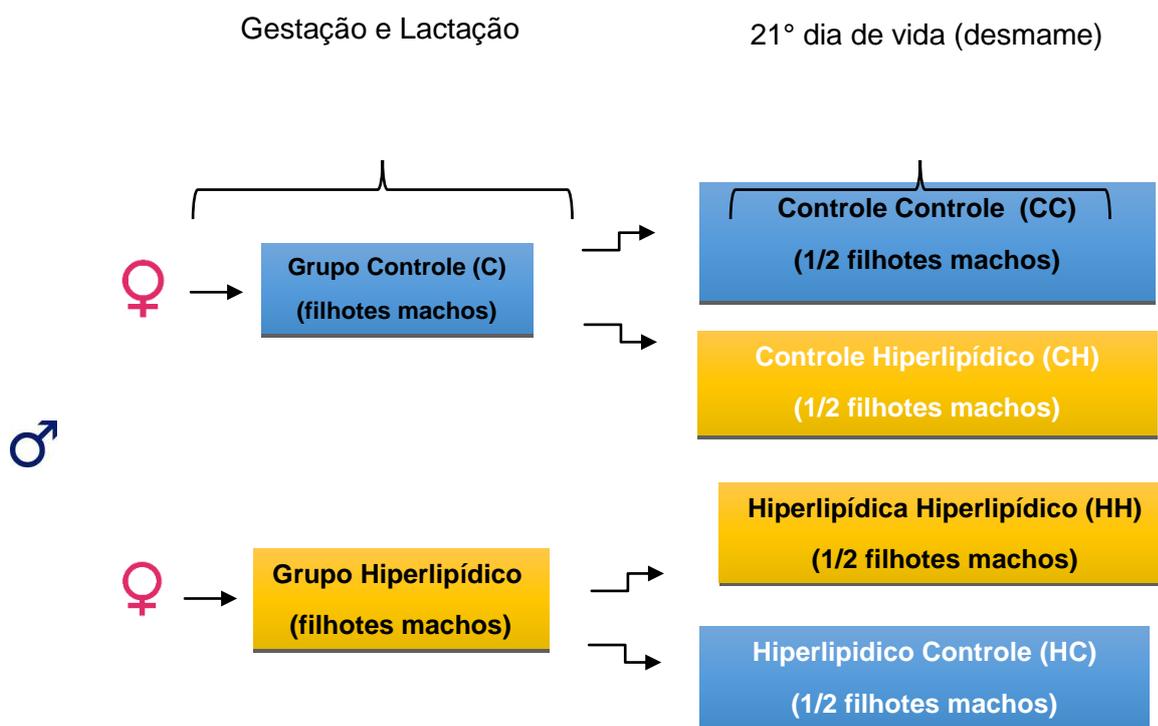
**Figura 2:** Dietas alimentares oferecidas aos respectivos grupos experimentais.

As dietas foram oferecidas às ratas durante todo o período de gestação e lactação. Durante esse período foi analisado o ganho ponderal e o consumo alimentar materno (para acompanhamento da gestação), o peso ao nascer e número de filhotes por ninhada que foi padronizada para 8 filhotes por lactante. Ratas que apresentaram ninhadas inferiores a 10 filhotes e superior a 15 não participaram do experimento.

#### **4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PÓS-DESMAME EM RATOS DESCENDENTE 21**

A segunda fase foi caracterizada pelo estudo dos efeitos pós-desmame (do 21º até 60º dia de vida) em descendentes machos de ratas expostas a dieta hiperlipídica ou controle durante o período perinatal. Cada ninhada proveniente das ratas do grupo C e H da primeira etapa do experimento tiveram seus filhotes divididos em subgrupos como ilustra a figura 2. Dos oito ratos descendentes de cada gestante do grupo C, metade do número de filhotes machos originaram o Grupo Controle Controle (CC, n=11), formado por descendentes de ratas do grupo C e alimentadas com dieta controle até 60 dias, e a outra metade formou o Grupo Controle Hiperlipídico (CH, n=10), formado por descendentes de ratas do grupo C e alimentadas com dieta hiperlipídica a partir do 21º dia de vida (desmame). A mesma subdivisão procedeu-se no grupo H: Grupo Hiperlipídico Hiperlipídico (HH, n=10), composto por descendentes de ratas do grupo H e alimentados com dieta hiperlipídica até 60

dias de vida e o Grupo Hiperlipídico Controle (HC, n=9), composto por descendentes de ratas do grupo H e alimentados com dieta controle até 60 dias. Este mesmo desenho se reproduziu mais três vezes, totalizando quatro ninhadas do grupo C (originando filhotes do grupo CC e CH) e quatro ninhadas do grupo H (originando filhotes do grupo HH e HC).



**Figura 3:** Divisão dos subgrupos experimentais após o desmame.

22

Do 1º ao 21º dia de vida, em dias alternados, foi avaliado o peso corporal dos filhotes. Ao desmamar, o peso foi aferido uma semana pós desmame, e ao 60º dia de vida. Nos últimos 15 dias do experimento, os animais foram mantidos em gaiolas individualizadas para análise do consumo alimentar em dias alternados. Ao completar 60 dias, os ratos foram anestesiados para coleta do sangue e análise dos parâmetros hepáticos (ALT, AST e GGT), triglicerídeos, colesterol total e suas frações. Ao final da coleta sanguínea, os animais foram sacrificados através da punção cardíaca para retirada e pesagem do tecido adiposo visceral (mesentérico e epididimal) e o fígado. As avaliações serão descritas nas próximas seções.

### **4.3 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL**

O peso corporal dos animais foi registrado através de balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000, com capacidade de 4kg e sensibilidade de 0,001g. Posteriormente foram calculados os parâmetros:

*Ganho de peso corporal*

O ganho de peso corporal (GPC) foi calculado através da seguinte fórmula:

Onde: % GPC =  $(P_x / P_1) * 100$

% GPC = ganho de peso corporal em percentual

$P_x$  = Peso de cada dia subsequente

$P_1$  = Peso ao nascer

### **4.4 AVALIAÇÃO DO CONSUMO ALIMENTAR**

Dos 45 aos 60 dias de vida, em dias alternados, foi oferecida uma quota padronizada de ração (70g) sendo pesado posteriormente a sobra alimentar para estimar o consumo alimentar no período de 24h.

### **4.5 ANÁLISE DOS EXAMES BIOQUÍMICOS**

23

Os animais foram anestesiados (0,5mL de Xilazina, 2,0mL Ketamina em soro fisiológico, volume final 10ml; 0,1 ml anésteico/10g de peso do animal) para a realização da técnica. O sangue foi coletado após a verificação da completa sedação do animal, sendo posteriormente centrifugado a 200rpm/10 minutos para a separação das frações do plasma. As determinações de colesterol total, HDL, LDL, VLDL, triglicerídeos, ALT, AST e G-GT foram realizadas em laboratório veterinário especializado.

### **4.6 AVALIAÇÃO PONDERAL DO TECIDO ADIPOSEO VISCERAL E FÍGADO**

Ao final da coleta sanguínea, os animais foram sacrificados através da punção cardíaca. Com uma incisão ao longo do abdômen, o tecido adiposo visceral e o fígado foram retirados e mergulhados em solução salina para lavagem e posterior pesagem em balança eletrônica digital – Marte, modelo S-4000, com capacidade de 4kg e sensibilidade de 0,001g.

#### **4.7 ESTUDOS DOS ASPECTOS HISTOLÓGICOS**

Após a coleta do sangue através da punção cardíaca, o fígado foi removido e pesado em balança semi-analítica posteriormente à imersão em solução salina. O órgão foi conservado em solução de formol a 10% para posterior preparação das laminas histológicas na Faculdade de Odontologia da UFBA.

Os lobos do fígado foram seccionados transversalmente e embebidos em solução tamponada de formol. As amostras seccionadas foram coradas com hematoxilina-eosina (HE). O exame microscópico foi realizado por um patologista independente, sem conhecimento do protocolo experimental, que avaliou a arquitetura hepática e observou a presença de gordura e inflamação se houvesse. O resultado histológico foi classificado quanto à presença de microesteatose e macroesteatose. Em caso de confirmação desta última, foi estabelecido o percentual de comprometimento do órgão através da visualização histológica. (KLEINER *et al.*, 2005)

#### **4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

24

Para comparação dos diferentes grupos foi empregado o software *GraphPadPrism* version 6.04 for Windows utilizando a análise de variância (ANOVA) para os dados paramétricos. Quando a ANOVA indicou a diferença significativa, foi utilizado o teste de Tukey para identificar as diferenças entre os grupos. A significância estatística foi considerada, admitindo-se um nível crítico de 5%, em todos os casos. Para análise dos dados descritivos foi empregado o software SPSS 2.0.

#### **4.9. ASPECTOS ÉTICOS**

Todas as atividades foram realizadas de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal – COBEA e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care Use of Laboratory Animals.

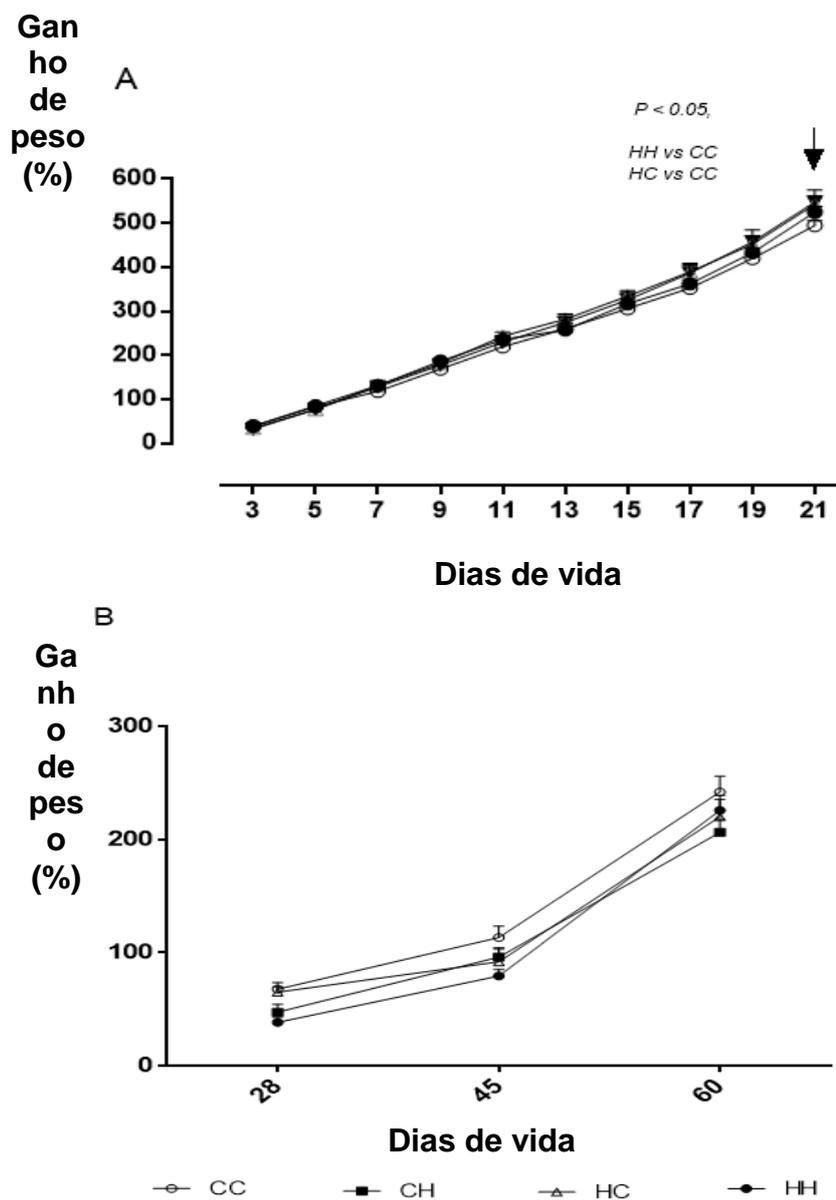
Este projeto faz parte de um projeto mais amplo aprovado pelo Comitê de Ética da faculdade de Odontologia da UFBA, segundo protocolo nº 02/13 com o título: “Pode o consumo materno de dieta hiperlipídica palatável no período perinatal programar alterações endócrinas, inflamatórias e a preferência alimentar em diferentes fases da vida?”

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

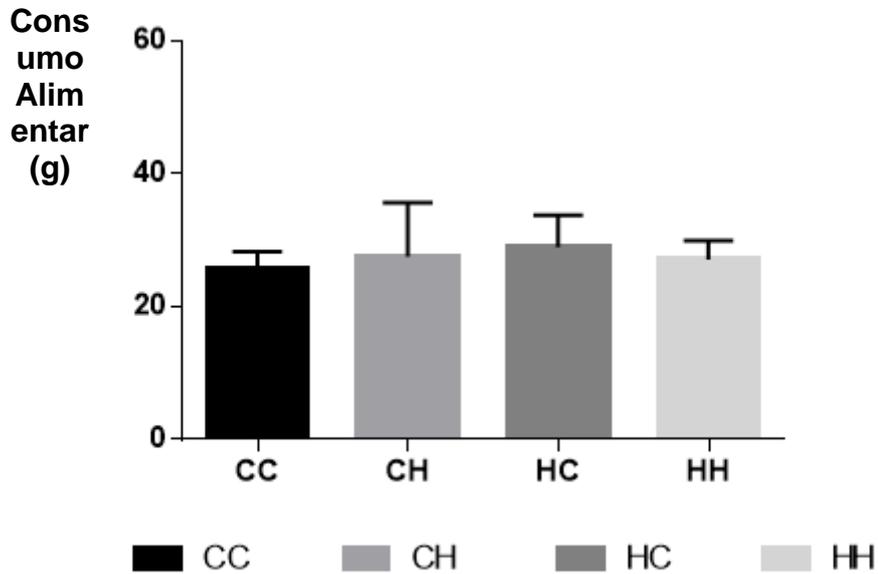
**Ganho de Peso**

O percentual do ganho de peso dos animais descendentes de ratas do grupo C e H, foi similar entre os grupos desde o nascimento, apresentando uma diferença no 21º para os animais do grupo HH e HC. (Figura 4A) Após a lactação, houve um decréscimo no ganho ponderal desses animais não mantendo diferença no percentual do ganho de peso entre todos os grupos no período pós desmame até completar 60 dias. (Figura 4B)



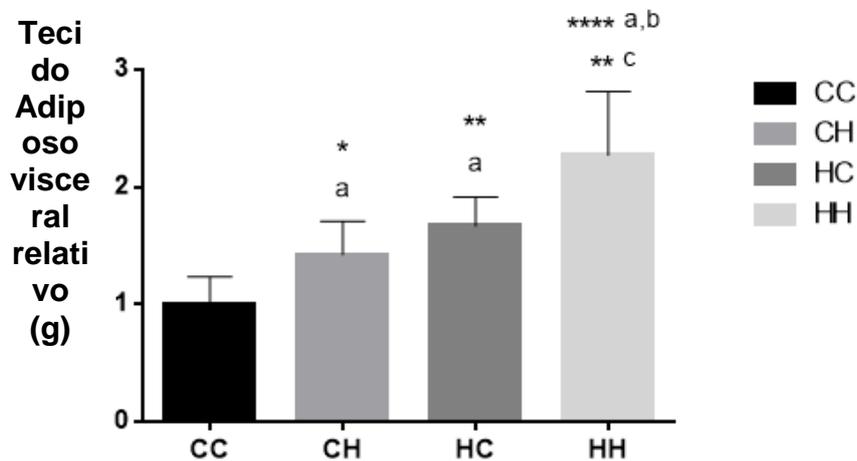
**Figura 4:** Percentual do ganho de peso do 1º ao 21º dia de vida de ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle ou dieta hiperlipídica durante o período perinatal (A). Percentual do ganho de peso (21º - 28º; 28º - 45º; 28º - 60º) de ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle ou dieta hiperlipídica durante o período perinatal e que mantiveram ou não o consumo no pós desmame (B). Os valores são apresentados como Média±SEM usando ANOVA Twoway seguido do teste de múltipla comparação Tukey's.

A média do consumo alimentar de todos os animais, foi semelhante no período de investigação (45° ao 59° dia) desse estudo, não apresentando diferença estatística. (Figura 5)



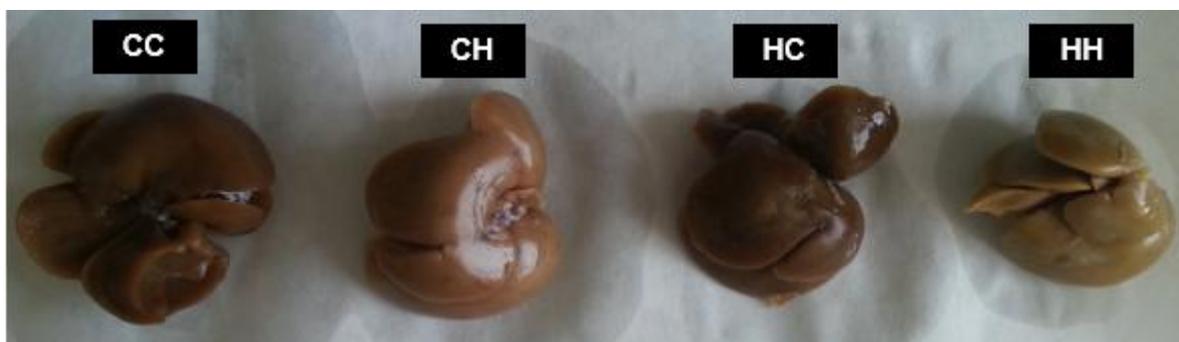
**Figura 5:** Média do consumo alimentar de ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle ou hiperlipídica durante a gestação e lactação e que mantiveram ou não o consumo da dieta no pós desmame. Os valores são apresentados como Média $\pm$ SEM usando ANOVA Oneway seguido do teste de múltipla comparação Tukey's.

O tecido adiposo visceral relativo foi expressivamente maior (Figura 6) nos ratos descendentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica bem como nos descendentes que mantiveram o consumo desta dieta até 60 dias quando comparados ao grupo controle. 28



**Figura 6:** Peso relativo do tecido adiposo visceral de ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle ou hiperlipídica durante a gestação e lactação e que mantiveram ou não o consumo da dieta no pós desmame. Os valores são apresentados como Média±SEM usando ANOVA Oneway seguido do teste de múltipla comparação Tukey's. Nível de significância adotado \* $p<0,05$ , \*\* $p\leq 0,005$ , \*\*\*\* $p<0,0001$ , sendo “a”: quando comparado ao CC, “b” com CH e “c” com HC

A aparência dos fígados dos ratos que receberam dieta hiperlipídica no pós desmame até os 60 dias apresenta-se com coloração mais pálida que o fígado dos ratos controle, sendo mais fortemente descorada nos ratos do grupo HH. (Figura 7)

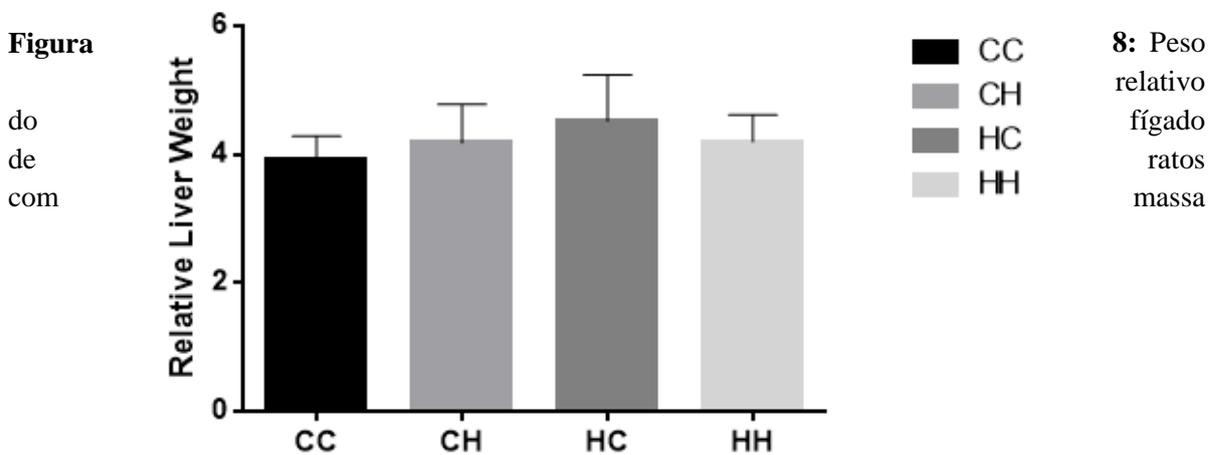


**Figura 7:** Aparência dos fígados de ratos com massa corporal semelhante, descendentes de ratas alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação e que mantiveram ou não o consumo até 60 dias de vida.

29

O consumo da dieta hiperlipídica não promoveu mudanças no peso relativo do fígado (Figura 8). No entanto, animais alimentados com dieta hiperlipídica no pós-desmame até completar 60 dias de vida (Figura 9) apresentaram presença de esteatose macrovesicular (90%, caracterizada pela presença de grande vacúolo de gordura que empurra o núcleo para a periferia) e microvesicular (50%, numerosos pequenos vacúolos citoplasmáticos que provocam indentações no núcleo centralmente localizado). Desses 90%, a maioria dos animais (60%) encontravam-se com grau de comprometimento hepático  $\leq$  a 10%, a qual é considerada normal, de acordo com Neuschwander-Tetri (2003) enquanto 30% apresentava grau de difusão entre 30 e 50% como verificado na tabela 3.

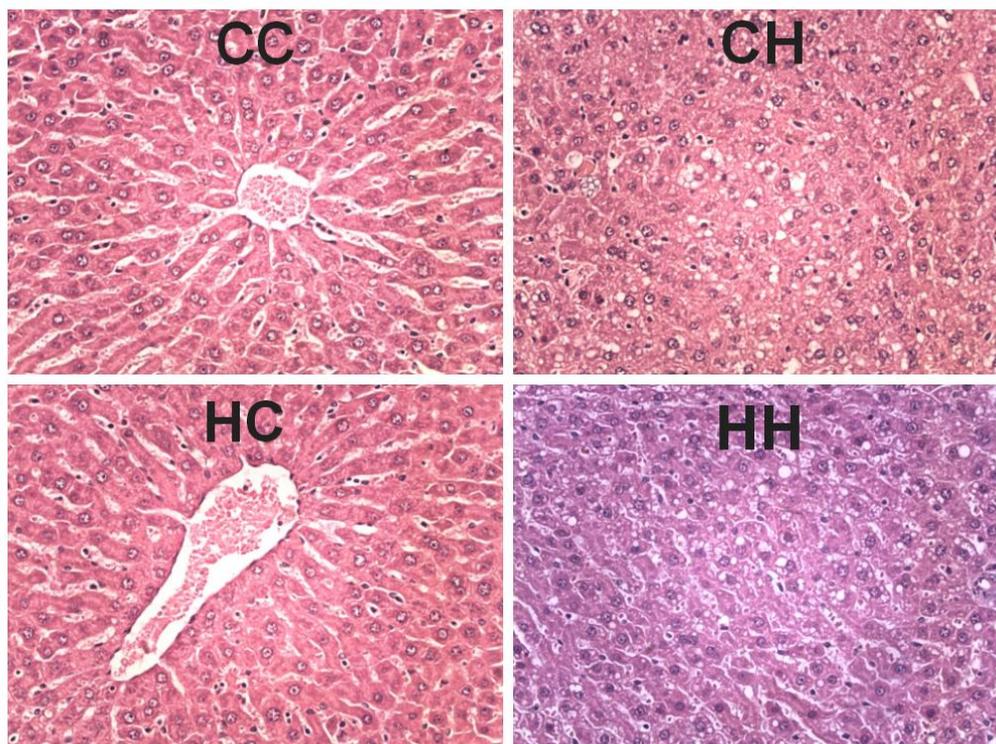
**Peso  
relati  
vo do  
fígad  
o (g)**



corporal semelhante descendentes de ratas alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação e que mantiveram ou não o consumo até 60 dias de vida. Valores apresentados em Média  $\pm$  SEM usando ANOVA 1way seguido do teste de múltipla comparação Tukey's.

30

Para os filhotes HC, descendentes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica, observou-se uma preservação na estrutura do fígado com ausência de modificações no parênquima hepático em 100% dos animais analisado (Tabela 3). Entretanto, pode-se notar que as adaptações hepáticas resultantes da adoção de uma dieta hiperlipídica ao longo da vida pós-natal, pode ser agravada pela utilização da mesma dieta no período perinatal, promovendo o surgimento de esteatose macro e microvesicular em 100% dos descendentes. Desses, 55,5% apresentaram esteatose < a 10%, enquanto 44,44% dos animais estavam com 30% e 80% de comprometimento hepático.



**Figura 9:** Análise da histologia hepática de ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle (CC) ou uma dieta hiperlipídica (HC) durante a gestação e lactação e que mantiveram (HH) ou não (HC) o consumo da dieta no pós desmame. Hematoxilina e Eosina (400x).

**Tabela 3:** Percentual de presença de esteatose macrovesicular e microvesicular e percentual de comprometimento do órgão com esteatose, em ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle ou uma dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação e que mantiveram ou não o consumo da dieta no pós desmame. Valores apresentados em frequência de distribuição. (Frequencies – SPSS 2.0)

	CC	CH	HH	HC
<b>Esteatose macrovesicular</b>	0%	90%	100%	0%
<b>Esteatose microvesicular</b>	0%	50%	100%	0%
<b>Grau de difusão</b>				
<b>0%</b>	100%	10%	0%	100%
<b>≤10%</b>	0	60%	55,55%	0
<b>30%</b>	0	10%	22,22%	0
<b>50%</b>	0	20%	0%	0
<b>80%</b>	0	0%	22,22%	0

Nos exames bioquímicos (Tabela 4), observou-se uma elevação no colesterol total e no VLDL dos animais CH quando comparados ao grupo CC. Animais descendentes de mães do grupo hiperlipídico que mantiveram o consumo da dieta no pós desmame (HH) também apresentaram maiores níveis séricos de colesterol total e gama GT quando comparados ao grupo controle, encontrando-se ainda com maiores níveis de ALT em relação ao grupo CH.

**Tabela 4:** Parâmetros bioquímicos de ratos descendentes de mães submetidas a uma dieta controle ou hiperlipídica durante a gestação e lactação e que mantiveram ou não o consumo da dieta no pós desmame.

Parâmetros Bioquímicos	CC	CH	HH	HC
CT	64,18 ± 2,28	<b>83,60***</b> ± 5,30	<b>78,00*</b> ± 2,24	72,78 ± 1,67
HDL	38,14 ± 3,02	39,88 ± 2,24	42,12 ± 1,59	38,21 ± 1,20
LDL	18,40 ± 1,54	27,52 ± 4,71	25,29 ± 3,06	26,44 ± 1,47
VLDL	4,64 ± 0,56	<b>10,80**</b> ± 1,60	7,23 ± 0,82	8,40 ± 1,42
TGL	66,66 ± 2,73	73,31 ± 1,79	67,08 ± 1,80	63,97 ± 3,13
ALT	50,35 ± 2,37	48,84 ± 3,95	<b>62,19*</b> ± 4,66	53,20 ± 2,44
AST	227,53 ± 13,79	225,20 ± 13,88	238,47 ± 7,78	213,72 ± 10,53
GGT	1,0 ± 0,05	1,02 ± 0,05	<b>1,39**</b> ± 0,09	1,18 ± 0,09

Os valores são apresentados em média ± SEM (erro padrão); \*\*p<0,005; \*\*\*p<0,0005 (teste ANOVA Oneway seguido do teste de múltipla comparação Tukey's);

O regime dietético empregado no presente estudo exemplifica a situação nutricional vivenciada pela população mundial, uma vez que há oferta abundante de alimentos hiperlipídicos. É inegável que o consumo de alimentos ricos em gordura, especialmente a saturada torna-se um hábito cada vez mais precoce, perpetuando, inclusive, alterações que

ocorreram durante fases críticas de desenvolvimento como a gestação e lactação (SRINIVASAN et al, 2006; BRION et al, 2010).

O percentual do ganho de peso dos ratos descendentes de mães do grupo controle (C) e do grupo hiperlipídico (H), foi semelhante no período da lactação, apresentando um leve aumento das proles provenientes de mães alimentadas com dieta hiperlipídica a partir do 15º dia, com diferença estatística no 21º dia, assim como visto em diferentes trabalhos (FRANCO et al, 2002; SRINIVASAN et al, 2006; OLIVEIRA et al, 2011).

No entanto, após a inserção das respectivas dietas (controle ou hiperlipídica) como fonte alimentar direta desses filhotes, o percentual de ganho ponderal passou a ser similar em todos os grupos até 60 dias. Khan e colaboradores (2005) em metodologia semelhante, não encontrou diferença no peso dos filhotes machos e fêmeas até completarem 180 dias. Porém, em outro estudo, foi verificada similaridade nos pesos dos animais até completarem 63 dias, havendo elevação ponderal após esse período até o 120º dia de vida nos animais que receberam dieta hiperlipídica (JACKSON et al, 2012).

Diferente dos resultados encontrados nesse trabalho, outros autores encontraram elevação no ganho ponderal no período da lactação ou até a vida adulta (COUVREUR et al, 2011; BAYOL et al, 2010; ASHINO et al, 2012; HOWIE et al, 2009; SRINIVASAN et al, 2006; SAMUELSSON et al, 2008) bem como, redução do peso corporal para os animais machos e fêmeas em contato com a dieta hiperlipídica (FEREZOU-VIALA et al, 2007). 33

As razões para tamanhas divergências nos pesos são incertas. Essas discrepâncias são provavelmente devido a diferenças metodológicas, que vão desde o uso de espécies de roedores diferentes, composição das dietas, períodos da inserção da mesma, tamanho da ninhada e variação no consumo alimentar.

De acordo com Couvreur e colaboradores (2011), ratos da linhagem Wistar tendem a minimizar o grau de obesidade induzida pela dieta materna na prole como sendo uma resposta preditiva adaptativa à dieta obesogênica (ARMITAGE et al, 2004). Já Zambrano e colaboradores (2006) ressaltam que a principal causadora da multiplicidade de resultados é a diferença na composição das dietas, em especial a proteína que no processo de programação fetal é o nutriente modulador no ganho de peso

Embora as dietas que apresentam alto teor de gordura estejam associadas a hiperfagia (BAYOL, 2007) os animais não apresentaram diferença na média do consumo alimentar nos 15 dias analisados. Esses dados corroboram com os de KHAN e colaboradores (2005) que não encontraram diferença na ingestão alimentar desde o pós desmame até os 180 dias. Resultados semelhantes foram observados em outros estudos (CINTRA et al, 2006; ELAHI et al, 2009]. Por outro lado, diferentes pesquisas apontam para uma elevação no consumo alimentar de animais descendentes de ratas que consumiram dieta hiperlipídica e que mantiveram ou não o consumo até a vida adulta (BOUANANE et al, 2010; GREGORIO et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2011).

Os resultados desse artigo comprovam que o peso corporal por si só, não é um bom preditor para obesidade, uma vez que, apesar de não haver diferença entre o ganho de peso de todos os animais, o tecido adiposo visceral foi maior em todos os grupos que consumiram a dieta hiperlipídica, seja somente no período perinatal (HC), pós desmame (CH) ou perinatal e pós desmame (HH).

34

Em estudo realizado por Woods e colaboradores (2003), animais alimentados com dieta hiperlipídica até os 80 dias de vida apresentaram gordura corporal total maior que 50% quando comparado com o grupo controle, no entanto, o incremento no peso corporal foi de apenas 10%, mostrando que esta medida pode subestimar o real grau da obesidade assim como visto neste estudo. Outros trabalhos também encontraram maior quantidade de tecido

adiposo nos animais que consumiram dieta hiperlipídica (BAYOL et al, 2008; JACKSON et al, 2012; HOWIE et al, 2009; ESTADELLA et al, 2011). Foi verificado ainda, em observação à longo prazo, que uma dieta rica em gordura pode aumentar não só o tecido adiposo corporal, como também pode induzir esse incremento através das gerações (MASSIERA et al, 2010).

O tecido adiposo é o principal órgão de armazenamento de energia do organismo humano, sendo responsável por depositar excesso de energia ingerido exercendo uma importante ação na termorregulação, armazenamento e liberação de ácidos graxos. No entanto, já se reconhece o seu papel de órgão multifuncional com expressiva função endócrina, mantendo uma comunicação intensa com os demais órgãos e sistemas orgânicos (HAUNER, 2004).

A alta disponibilidade de gordura presente na dieta utilizada também foi capaz de promover alterações a nível hepático. Observando a aparência do fígado nos diferentes grupos, pode-se constatar uma alteração na coloração deste órgão (Figura 4), onde os animais CH e HH apresentaram-se mais pálidos, em decorrência da infiltração de gordura, sendo agravada essa descoloração nos filhotes HH.

O acúmulo de gordura no fígado é decorrente, principalmente, da elevação dos Ácidos Graxos Livres (AGL) na corrente sanguínea. Esses em excesso, caso não sejam oxidados ou transportados para a circulação em forma de lipoproteínas de baixa densidade, podem ser sintetizados em triacilgliceróis e depositados no fígado, podendo dar início à DHGNA 35 (GOLDBERG, 2006). A grande disponibilidade de gordura nesta dieta, principalmente a saturada, pode ter gerado um aumento de AGL circulantes nestes animais.

De acordo DIEHL (1999), DHGNA é caracterizada principalmente pela presença de macrogotículas de gordura no hepatócito. Na ausência de processos inflamatórios, esse fenômeno é conhecido como esteatose hepática. Trabalhos já publicados, com diferentes

metodologias, documentam que a administração neonatal de dieta hiperlipídica em ratos adultos promove aumento no tamanho do fígado e acúmulo de gotículas de lipídeos no mesmo (BRUCE et al, 2009; OBEN et al, 2010, MEIJER et al, 2010) diferindo dos resultados de Ahmed (2009) que mesmo alimentando os animais com uma dieta rica em gordura por 3 semanas, não observou formação de esteatose hepática nos animais.

A esteatose hepática pode se manifestar de duas formas: microvesicular e, ou macrovesicular. A esteatose microvesicular, presente em 100% dos animais HH e 50% dos CH, é geralmente associada com disfunção hepática grave a qual está relacionada com alterações na via de beta-oxidação dos ácidos graxos livres, enquanto a macrovesicular é resultante de alterações fisiopatológicas crônicas, envolvendo aumento da síntese, oxidação deficiente e redução da secreção hepática de lipídios ocorrendo principalmente na obesidade (MAZZA, 2005).

Assim como foi observada maior concentração de tecido adiposo visceral no grupo HH, a esteatose hepática de ratos alimentados com dieta hiperlipídica no pós desmame, foi agravada pela adoção da mesma dieta no período perinatal. Quando submetidos à uma inadequação alimentar durante períodos críticos de desenvolvimento, o fígado dos ratos sofreu alterações fisiológicas e estruturais agravando o grau de esteatose, sendo confirmada pela aparência mais descorada desse órgão. Em outros estudos com metodologia semelhante, observa-se resultados similares (BOUANANE et al, 2010; GREGORIO et al, 2010; BAYOL, 2010).

36

Tal fato pode estar relacionado à oferta abundante de ácidos graxos saturados, pela placenta ou por meio do leite materno, aumentando a lipogênese hepática e o estresse oxidativo no fígado fetal (BYRNE et al, 2009). Com a manutenção dessa dieta, foi mantida a alta disponibilidade de AGL propiciando o aparecimento da esteatose hepática de forma mais intensa nos animais HH quando comparados aos CH.

A elevação da gordura visceral nesses animais, também pode ter contribuído para a alteração no metabolismo do fígado, formando esteatose hepática nos grupos CH e HH uma vez que o excesso de gordura também aumenta as taxas de lipólise e a captação de ácidos graxos livres por esse órgão. Ela é um órgão metabolicamente ativo (GALIC, 2010) capaz de liberar uma variedade de hormônios e adipocinas, os quais agem de maneira autócrina, parácrina e/ou endócrina regulando áreas responsáveis por atividades comportamentais, metabólicas, cardiovasculares, reprodutivas e imunológicas (MITCHEL et al, 2005; KLEIN et al, 2006).

Apesar da esteatose hepática ser considerada uma condição benigna, um número crescente de estudos tem demonstrado que a DHGNA pode levar a complicações a longo prazo, tais como cirrose hepática e carcinoma hepatocelular assim como aumento da mortalidade relacionada à este órgão (EKSTEDT et al, 2006; HASHIMOTO et al, 2005; HUI et al, 2003; SANYAL et al, 2006). Além disso, a DHGNA é por si só, ou associada a outra patologia hepática, um fator de risco para diabetes e doenças cardiovasculares (SANYAL et al, 2002; VILLANOVA et al, 2006; VOLZKE et al, 2005; STRANGES et al, 2005; HANLEY et al, 2005).

37

Analisando os exames bioquímicos podemos observar que os animais do grupo CH apresentaram maior Colesterol Total e VLDL, enquanto o HH também encontrava-se com o Colesterol Total elevado além da enzima ALT. A elevação na concentração do CT e VLDL é um achado comum em indivíduos com obesidade e consequência principalmente da hiperlipogênese hepática (BIOLETTO et al, 2007). A hipercolesterolemia é referida como um dos principais fatores de riscos independentes para a doença aterosclerótica (CHAMPE, 2000) sendo a principal preditora no aumento dos níveis de lipídeos e lipoproteína plasmática, a gordura saturada, encontrada em grande quantidade na dieta utilizada neste estudo (MARGO, 2006).

Os resultados desse trabalho, demonstram que a utilização da dieta hiperlipídica em períodos de formação fetal pode adaptar o feto a ter uma melhor sobrevivência quando exposto a um ambiente que foi previsto, confirmando a teoria adaptativa preditiva proposta por Gluckman e Hanson (2005), uma vez que, apesar de se encontrarem em pior grau de esteatose hepática, os animais HH apresentaram menor expressividade na diferença do CT quando comparado e com o grupo CC e não apresentaram maiores valores para VLDL, como visto nos animais que consumiram a dieta somente no pós desmame. Outros trabalhos confirmam essa teoria, não encontrando diferença no colesterol total e em outros exames bioquímicos ou verificando valores menores em animais programados com dieta hiperlipídica e que foram expostos a ambiente semelhante (COVREUR et al, 2011; BAYOL, 2010; AHMED et al, 2009).

Em outros artigos, animais alimentados com essa dieta desde o período perinatal, apresentam elevação nos triglicerídeos, CT e suas frações desde o 21º até a vida adulta (BOUANANE et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2011) ou somente no período pós natal (MEIJER et al, 2010; CHECHI et al, 2006).

A esteatose hepática pode estar associada a testes de função hepática anormais com ALT e AST elevadas, que refletem o dano celular e vazamento para a corrente sanguínea (NEUSCHWANDER-TETRI, 2005). Dietas hipercolesterolêmicas, como a utilizada neste estudo, podem promover um aumento no estresse oxidativo no fígado (KAMESH, 2012), resultando em um aumento na atividade dessas enzimas. Foi observado no presente trabalho, uma elevação apenas na ALT dos animais HH. No entanto, já se é bem estabelecido que a doença hepática pode coexistir com sem alteração nos valores das enzimas hepáticas mesmo com a DHGNA em graus mais expressivos (NEUSCHWANDER-TETRI, 2004). 38

Para os animais do mesmo grupo, também verificou-se um maior valor da enzima Gamma - glutamil transferase (GGT). Apesar de ser produzida por tecidos extra-hepáticos, incluindo

os rins, epidídimo, pulmão, dentre outros, a maioria da GGT sérica é derivada a partir do fígado, sendo utilizada como um biomarcador de doença hepática ou biliar quando associada a outras enzimas mais específicas (WHITFIELD, 2001; EMDIN, 2005).

## 6. CONCLUSÕES

---

Os resultados apresentados neste estudo demonstram que a utilização de dieta hiperlipídica durante o período perinatal e pós desmame promove, em ratos jovens:

- Acúmulo de tecido adiposo visceral
- Esteatose hepática
- Hipercolesterolemia
- Alteração no LDL, ALT e GGT

Assim, a exposição a uma dieta rica em lipídeos em janelas críticas de desenvolvimento é capaz de promover alterações hepáticas e no metabolismo dos lipídeos em ratos jovens.

## 7. REFERÊNCIAS

---

AHMED, U., REDGRAVE, et al. Effect of dietary fat to produce non-alcoholic fatty liver in the rat. **J. Gastroenterol. Hepatol**, v.24, n.8, p.1463 – 1471, Aug. 2009.

ANDERSON, J.W; PATTERSON, K. Snack foods: comparing nutrition values of excellent choices and “junk foods.” **J Am Coll Nutr**, v.24, n.3, p.155–156, Jun, 2005.

ANSTEE, Q.M., GOLDIN, R.D. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. **Int. J. Exp. Pathol**, v. 87, n.1, p.1-16, Feb. 2006.

ARMITAGE, J.A. et al. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? **J Physiol**, v.561, n. 2, p. 355–77, Dec. 2004.

ASHINO, N. G. et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. **J Nutr Biochem**, v. 23, n.4, p. 341-8, May. 2012

BARKER, D.J.P. et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **Lancet**, v.341, n. 8850, p. 938-41, April. 1993.

BARRETO-MEDEIROS, J.M. et al. Malnutrition during brain growth spurt alters the effect of fluoxetine on aggressive behavior in adult rats. **Nutr Neurosci**, v.7, n.1, p.49-52, Feb. 2004.

BAYOL, S.A; FARRINGTON, S.J; STICKLAND, N.C. A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for “junk food” and a greater propensity for obesity in rat offspring. **Br. J. Nutr**, v. 98, n.4, p. 843–851, Oct 2007.

BAYOL, S.A; SIMBI, B.H; BERTRAND, J.A; STICKLAND, N.C. Offspring from mothers fed a 'junk food' diet in pregnancy and lactation exhibit exacerbated adiposity that is more pronounced in females. **J Physiol**, v. 586, n. 13, p. 3219-3230, Jul. 2008.

BAYOL, S.A; SIMBI, B.H; FOWKES, R.C; STICKLAND, N.C. A Maternal "Junk Food" Diet in Pregnancy and Lactation Promotes Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rat Offspring. **Endocrinology**, v. 151, n.4, p. 1451-146, Apr. 2010.

BEDOGNI, G. et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the dionysosnutrition and liver study. **Hepatology**, v.42, n. 1, p. 44–52. 2005.

BENKALFAT, N.B. et al. Altered adipose tissue metabolism in offspring of dietary obese rat dams. **Clin Sci (Lond)**, v. 121, n.1, p. 19-28, Jul. 2011.

BIOLETTO, S. et al. Acute hyperinsulinemia and very low density and low density lipoprotein subfractions in obese subjects. **Am J Clin Nutr**, v.71, n.2, p. 443-9, Feb. 2000.

BOUANANE, S. et al. Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. **Metabolism**, v.59, n.12, p. 1701-1709, Dec. 2010.

BRION, M.J. et al. Maternal macronutrient and energy intakes in pregnancy and offspring intake at 10 y: exploring parental comparisons and prenatal effects. **Am J Clin Nutr**, v. 91, n. 3, p. 748-756, Mar. 2010.

BROWNING, J.D. et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1387–95, Dec. 2004.

BRUCE, K.D. et al. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. **Hepatology**, v.50, n.6, Dec. 2009.

BYRNE, C.D. et al. Programming of hepatic insulin-sensitive enzymes in offspring of rat dams fed a protein-restricted diet. **Am J Physiol**, v.272, n.5, p. 1083–1090, May.1997.

CALLAWAY, L.K. et al. The prevalence and impact of overweight and obesity in na Australian obstetric population. **Med J Aust**, v.184, n.2, p. 56–59, Jan. 2006.

CHAMPE, P.C; HARVEY, R.A. **Bioquímica ilustrada**, 2ª edição, Porto Alegre, 2000, p. 211 – 212.

CHECHI, K. et al. Maternal diet rich in saturated fats has deleterious effects on plasma lipids of mice. **Exp Clin Cardiol**, v.11, n.2, p. 129- 35, Jan, 2006.

CINTRA, D.E. et al. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. **Nutrition**, v. 22, n.2, p. 197-205, Feb, 2006.

CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **Am J Clin Nutr**, v.81, n.2, p. 341–354, Feb. 2005.

COUVREUR, O. et al. Unexpected long-term protection of adult offspring born to high-fat fed dams against obesity induced by a sucrose-rich diet. **PLoS One**, v.6, n.3, Mar, 2011.

DIEHL, A.M. Nonalcoholic steatohepatitis. **Semin Liver Dis**, v.19, n.2, p. 221-9, Mar. 1999.

DURRANT, L.M et al. Maternal food restriction modulates cerebrovascular structure and contractility in adult rat offspring: effects of metyrapone. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.306, n. 6, p. 401-10, Mar. 2014.

EKSTEDT, M. et al. Long-term follow-up of patients with NAFLD and elevated liver enzymes. **Hepatology**, v.44, n.4, p. 865–873, Oct. 2006.

ELAHI, M.M, et al. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. **Br J Nutr**, v. 102, n.4, p. 514-519, Aug. 2009.

EMDIN, M; POMPELLA, A; PAOLICCHI, A. Gamma-glutamyltransferase, atherosclerosis, and cardiovascular disease: triggering oxidative stress within the plaque. **Circulation**, v.112, n.14, p. 2078–2080, Oct. 2005.

ESTADELLA, D. et al. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. **Lip Health Dis**, v.10, n.1, p.168. 2011.

FAGUNDES, A.T.S. et al. Maternal low protein diet during lactation programmes the body composition and the glucose homeostasis in the adult rat offspring. **British Journal of Nutrition**, v.98, n.5, p. 922-928, Nov. 2007.

FEREZOU-VIALA, J. et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.293, n.3, p.R1056–R1062, Jun. 2007.

FESTI, D, et al. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. **Obes Rev**, v. 5, n.1, p. 27-42. Feb. 2004.

FRANCO, M.C, et al. Intrauterine undernutrition: expression and activity of the endothelial nitric oxide synthase in male and female adult offspring. **Cardiovasc Res**, v. 56, n.1, p.145–153, Oct. 2002.

GALIC, S; OAKHIL, J.S; STEINBERG, G.R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v. 3126, n. 2, p.129-139, Mar. 2010.

GILLMAN, M.W. et al. Developmental origins of childhood overweight: potential public health impact. **Obesity(SilverSpring)** v.16, n.7, p.1651–1656, Jul. 2008.

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

GOLDBERG, I.J; GINSBERG, H.N. Ins and outs modulating hepatic triglyceride and development of nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v. 130, n. 4, p. 1243-46, Feb. 2006.

GREGORIO, B.M, et al. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. **Am J Obstet Gynecol**, v. 203, n.5, p. 495.e1-495.e8, Nov. 2010.

GUELINCKX, L. et al. Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. **Obes Rev**, v.9, n.2, p. 140-150, Mar, 2008.

GUTHRIE, J.F; LIN, B.H; FRAZAO E. Role of food prepared away from home in the American diet, 1977–78 versus 1994 –96: changes and consequences. **J Nutr Educ Behav**, v.34, n.3, p.140 –150, May. 2002.

HANLEY, A.J, et al. Liver markers and development of the metabolic syndrome: the insulin resistance atherosclerosis study. **Diabetes**, v. 54, n.11, p. 3140–3147, Feb. 2005.

HASHIMOTO, E. et al. The characteristics and natural history of Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatol Res**, v.33, n.2, p. 72-76, Nov.2005.

HAUNER, H. The new concept of adipose tissue function. **Physiol Behav**, v.83, n.4, p.653–658, Dec. 2004.

HOLNESS, M.J. et al. Early life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of type 2 diabetes mellitus. **Biochem J**, v. 349, n.3, p.657–665, Aug. 2000.

HOLSON, R.R.; PEARCE, B. Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. **Neurotoxicol Teratol**, v.14, n.3, p. 221-228, May. 1992.

HOWIE, G. J. et al. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **J Physiol**, v.587, n. 4, p. 905–915, Feb. 2009.

HUI, J.M. et al. Long-term outcomes of cirrhosis in nonalcoholic steatohepatitis compared with hepatitis C. **Hepatology**, v.38, n.2, p. 420–427, Feb. 2003.

IASO - International Society for the Study of Obesity. **Prevalence of overweight and obesity around the globe**. Disponível em:<http://www.iaso.org/resources/obesity-data-portal/resources/tables/>. Acesso em: 29 Out 2013.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009. Aquisição alimentar domiciliar per capita, Brasil e grandes regiões**. Rio de Janeiro; 2010a.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares, 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro; 2010b.

JACKSON, C.M. et al. Exposure to maternal overnutrition and a high-fat diet during early postnatal development increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.302, n.6, p. F774–F783, Mar. 2012.

KAMESH V.; SUMATHI T. Antihypercholesterolemic effect of Bacopa monniera linn. on high cholesterol diet induced hypercholesterolemia in rats. **Asian Pac. J. Trop. Med**, v.5, n.12, p. 949-955, Dec. 2012.

KHAN, I.Y. et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. **Am J Phys**, v.288, p. R127 – R133, Jan. 2005.

KIM, S.Y, et al. Trends in pre-pregnancy obesity in nine states, 1993–2003. **Obesity**, v.15, n. 4, p.986–993, Apr. 2007.

KLEIN, J. et al. Adipose tissue as source and target for novel therapies. **Trends Endocrinol Metab**, v.17, n.1, p. 26-32, Feb. 2006.

KLEINER, D.E. et al. Nonalcoholic Steatohepatitis Clinical Research Network. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v.41, n.6, p. 1313-21, Jun. 2005.

LANGLEY-EVANS, S.C. Developmental programming of health and disease. **Nutri Soc** v.65, n.1, p. 97–105, Feb. 2006.

LIMA, S.N. et al. Early weaning causes undernutrition for a short period and programmes some metabolic syndrome components and leptin resistance in adult rat offspring. **Br J of Nutr**, v.105, n.9, p.1405-1413, May. 2011.

LUCAS, A. Programming by early nutrition: an experimental approach. **J. Nutr.**, v.128, n.2, p.401S-406S, Feb. 1998.

LUCAS, A. Programming by early nutrition in man. In: *The Childhood Environment and Adult Disease*, p. 38–55. **CIBA Foundation Symposium** 156. Wiley, Chichester, U.K. 1991.

MARGO, A; DENK, M.D. Dietary fats, fatty acids, and their effects on lipoproteins. **Curr. Atheroscler. Rep**, v.8, n.6, p. 466-71. 2006.

MASSIERA, F. et al. A Western-like fat diet is sufficient to induce a gradual enhancement in fat mass over generations. **J Lipid Res**, v. 51, n.8, p.2352-2361, Aug. 2010

MAZZA R.P.J.; PEREIRA C.C.A.; WAITZBERG, D.L. **Doenças hepáticas**. In: Cuparri L. (Coord.). *Nutrição Clínica no Adulto*. Barueri, SP: Manole, 2005. cap. 16. p. 313-348.

MEIJER, V.E. et al. Dietary fat intake promotes the development of hepatic steatosis independently from excess caloric consumption in a murine model. **Metabolism**, v. 59, n.8, p. 1092 – 105, Aug. 2010.

MINISTERIO DA SAÚDE. **Quase metade da população brasileira está acima do peso**. 2012. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/noticia/4718/162/quase-metade-da-populacao-brasileira-esta-acima-do-peso.html>>. Acesso em: 20 de maio de 2013.

MITCHEL, M. et al. Adipokines: implications for female fertility and obesity. **Reproduction**, v.130, n.5, p. 583-597, Nov. 2005.

MORRISAND, M.J; CHEN, H. Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. **International Journal of Obesity**, v.33, p. 115–122, 2009

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A; CALDWELL. Nonalcoholic Steatohepatitis: Summary of an AASLD Single Topic Conference. **Hepatology**, v. 37, n. 5, p. 1202 – 19, May. 2003.

NEUSCHWANDER-TETRI. Nonalcoholic steatohepatitis and the metabolic syndrome. **Am J Med Sci**, v. 330, n.6, p.326 – 35, Dec. 2005.

NIELSEN, S.J; SIEGA-RIZ, A.M; POPKIN, B.M. Trends in energy intake in U.S. between 1977 and 1996: similar shifts seen across age groups. **Obes Res**, v.10, n. 5, p. 370 –378, May. 2002.

OBEN, J.A. et al. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. **J Hepatol.** v. 52, n.6, p. 913-920, Jun. 2010.

OLIVEIRA, T.W.S, et al. A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. **Lipids.**, v.46, n.11, p. 5-10, Nov. 2011.

OZAKI, T,N. et al. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. **JPhysiol**, v.530,141–152. 2001.

SAMUELSSON, A.M. et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, v.51, n.2, p. 383–392, Feb. 2008.

SANYAL, A.J. et al. Similarities and differences in outcomes of cirrhosis due to nonalcoholic steatohepatitis and hepatitis C. **Hepatology**, v. 43, n.4, p.682–689, Mar.2006.

SANYAL, A.J. AGA technical review on nonalcoholic fatty liver disease. **Gastroenterology**, v.123, n.5, p.1705–1725, Nov. 2002.

SATHYA, P; MARTIN, S; ALVAREZ, F. Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) in children. **Curr Opin Pediatr**, v.14, n.5, p. 593-600, Oct. 2002.

SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating its age with Human's. **Int J Prev Med**, v.4, n. 6, p. 624-630, Jun. 2013.

SRINIVASAN, M. et al. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.291, n.4, p. E792–9, Oct. 2006.

STRANGES, S. et al. Body fat distribution, liver enzymes, and risk of hypertension: evidence from the Western New York Study. **Hypertension**, v. 46, n. 5, p. 1186–1193, Feb. 2005.

TAYLOR, P.D; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Exp Physiol**, v. 52, n.2, p. 287-298, Mar. 2007.

TURDI, S. et al. Interaction between maternal and postnatal high fat diet leads to a greater risk of myocardial dysfunction in offspring via enhanced lipotoxicity, IRS-1 serinephosphorylation and mitochondrial defects: JMCC, v.55, p.117-129, Feb. 2013.

VILLANOVA, N. et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk profile in nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 42, n.2, p.473–480, Mar. 2005.

VOLZKE, H. et al. Hepatic steatosis is associated with an increased risk of carotid atherosclerosis. **World J Gastroenterol**, v.11, n.12, p. 1848–1853, Dec. 2005.

WATKINS, A.J; SINCLAIR, K.D. Paternal protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 47 Mar. 2014.

WELLS, J. C. K. The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect. **Biological Reviews**, v.82: 143–172. 2007

WHITFIELD, J.B. Gamma-glutamyl transferase. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.38, n. 4, p. 263–3553. 2001.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Joint WHO/FAO expert consultation. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva: WHO/FAO; 2003.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity and overweight**. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 13 de Outubro de 2013.

WOODS, S. C. ET AL. A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats. **J Nutr**, v. 133, n.4, p. 1081 – 7, Apr. 2003.

ZAMBRANO, E. et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **J Physiol**, v.571, p.221–230, Dec. 2006.