

MARIA CLÁUDIA ALHEIROS LIRA

EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA PÓS-DESMAME SOBRE  
O CRESCIMENTO SOMÁTICO, O PERFIL BIOQUÍMICO E A  
FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS  
SUBMETIDOS À DIETA HIPOPROTEICA MATERNA

RECIFE

2016

MARIA CLÁUDIA ALHEIROS LIRA

EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA PÓS-DESMAME SOBRE  
O CRESCIMENTO SOMÁTICO, O PERFIL BIOQUÍMICO E A  
FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS  
SUBMETIDOS À DIETA HIPOPROTEICA MATERNA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutora em Nutrição.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carol Virgínia Góis Leandro

**Co-orientador:** Prof. Dr. José Cândido de Souza Ferraz Jr.

RECIFE

2016

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

L768e Lira, Maria Cláudia Alheiros.  
Efeitos da dieta hiperlipídica pós-desmame sobre o crescimento somático, o perfil bioquímico e a função de macrófagos peritoneais de ratos submetidos à dieta hipoproteica materna / Maria Cláudia Alheiros Lira. – 2016.  
82 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Carol Virgínia Góis Leandro.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.  
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Desnutrição proteica. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Crescimento. 4. Consumo de alimentos. 5. Macrófagos I. Leandro, Carol Virgínia Góis (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-176)

**Maria Cláudia Alheiros Lira**

**EFEITOS DA DIETA HIPERLIPÍDICA PÓS-DESMAME SOBRE O  
CRESCIMENTO SOMÁTICO, O PERFIL BIOQUÍMICO E A FUNÇÃO  
DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS SUBMETIDOS À  
DIETA HIPOPROTEICA MATERNA**

Tese aprovada em 04 de março de 2016 pela banca examinadora:

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carol Virgínia Góis Leandro, CAV/UFPE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elizabeth do Nascimento, UFPE

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Thays de Ataíde e Silva, CAV/UFPE

---

Prof. Dr. José Luiz de Brito Alves, UFPB

---

Prof. Dr. João Henrique da Costa Silva, CAV/UFPE

Recife, 2016

*Aos meus pais, Leandra e Eugenio, pelo amor, incentivo e apoio incondicional!*  
*Ao meu marido, Danilo, pelo apoio, amor e companheirismo!*  
*Aos meus irmãos, Duda e João, pelo amor e companheirismo!*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, por estar sempre ao meu lado e me dar força para seguir em frente!*

*À Carol, minha orientadora, pelo apoio, incentivo, paciência e ensinamentos. Obrigada por ter me acolhido tão bem desde o início do mestrado, pela atenção, carinho, ajuda nos momentos de dificuldade e compartilhamento das alegrias a cada conquista. Obrigada pela oportunidade de trabalhar e aprender com você! Admiro muito o seu amor pela pesquisa e o zelo com a formação dos novos pesquisadores!*

*Ao Cândido, meu co-orientador, que desde o início do doutorado me apoiou e ensinou sobre a imunologia e as técnicas dos experimentos! Muito obrigada por toda a sua atenção, carinho, dedicação e paciência!*

*À Sueli, pelo apoio, carinho, amizade e ensinamentos desde o início do doutorado.*

*À Wylla, que participou de várias etapas importantes dos experimentos. Obrigada pelo carinho, atenção e ensinamentos.*

*Aos amigos de doutorado, Antônio, Thays, Adriano, Madge, Mário, Jéssica, Thaysa e Tássia, por estarem sempre dispostos a ajudar, ensinar e por tornarem o dia a dia mais divertido.*

*Aos meus estagiários, Gabriela, Helyson, Amanda e Camilla. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho. Obrigada pela ajuda e pelo apoio em todos os momentos.*

*À Raquel e Kelli, pelo carinho e ensinamentos.*

*Ao professor Raul, pelo apoio e incentivo.*

*Aos colegas do grupo de pesquisa Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica.*

*À Lúcia, pela ajuda na parte estatística.*

*Ao Sr. França, pela atenção e auxílio no cuidado com os animais!*

*Aos funcionários da Pós-graduação. Obrigada pela atenção e auxílio a longo destes 4 anos.*

## RESUMO

Durante o período perinatal, caracterizado por elevada plasticidade, a carência de proteínas é capaz de induzir adaptações morfológicas e funcionais nos tecidos, visando garantir a sobrevivência do indivíduo no ambiente atual e predito. Contudo, quando o ambiente posterior não é o mesmo para o qual o organismo foi adaptado, eleva-se o risco de aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis. A ingestão excessiva de alimentos ricos em energia, gorduras e carboidratos simples ao longo da vida aumenta o risco de desenvolvimento de excesso de peso e doenças metabólicas e, quando está associada à desnutrição no início da vida, podem ocorrer alterações na trajetória de crescimento, no consumo alimentar, em parâmetros bioquímicos e na função imune. Este estudo objetivou avaliar os efeitos de uma dieta hiperlipídica pós-desmame sobre o crescimento somático, o consumo alimentar, parâmetros bioquímicos e a função de macrófagos peritoneais de ratos submetidos a uma dieta hipoproteica perinatal. Foram utilizados 52 ratos machos *Wistar* cujas mães receberam dieta normoproteica ou hipoproteica durante a gestação e lactação. Do desmame aos 60 dias, os filhotes receberam dieta padrão ou dieta hiperlipídica. Formaram-se 4 grupos experimentais (n=10-14/ cada): Controle (C, ratos que receberam dieta normoproteica na gestação e lactação e padrão pós-desmame), Desnutrido (LP, ratos que receberam dieta hipoproteica na gestação e lactação e padrão pós-desmame), Hiperlipídico (HF, ratos que receberam dieta normoproteica na gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame) e Desnutrido-Hiperlipídico (LP-HF, ratos que receberam dieta hipoproteica na gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame). Avaliou-se o crescimento somático [peso corporal (PC), comprimento da cauda, comprimento naso-anal] ao longo da vida e o consumo alimentar (ingestão alimentar relativa, ingestão energética relativa e coeficiente de eficácia alimentar) de 30 a 36 dias e de 54 a 60 dias de vida. Aos 60 dias, os ratos foram sacrificados e realizou-se coleta de sangue para avaliação sérica de triglicerídeo, colesterol, glicose e leptina, retirada de órgãos e do tecido adiposo epididimal e retroperitoneal para avaliação do peso relativo e de macrófagos peritoneais para avaliação de fagocitose e produção de óxido nítrico (NO) *in vitro*. Filhotes LP tiveram menor PC, comprimento da cauda e comprimento naso-anal do que filhotes C. Aos 60 dias, filhotes LP-HF não diferiram quando comparados aos C, exceto pelo reduzido comprimento naso-anal. De 57 a 60 dias, filhotes LP-HF apresentaram menor ingestão alimentar e energética relativa comparados aos LP, mas o coeficiente de eficácia alimentar foi maior comparado aos LP e C. Filhotes HF e LP-HF apresentaram maior peso relativo da gordura epididimal e retroperitoneal do que filhotes C e LP. Quanto aos parâmetros bioquímicos, filhotes LP apresentaram menor colesterol total do que os C, porém filhotes LP-HF tiveram maior colesterol total do que os LP. Fagocitose e produção de NO aumentaram nos filhotes LP. Diante de um desafio imunológico, a produção de NO por macrófagos aumentou quando comparada ao estado basal, exceto no grupo LP. Estes resultados sugerem que a dieta hiperlipídica pode modular os efeitos da desnutrição perinatal, elevando o risco de doenças metabólicas.

**Palavras-chave:** Desnutrição proteica. Dieta hiperlipídica. Crescimento. Consumo de alimentos. Macrófagos.

## ABSTRACT

The perinatal period is characterized by high plasticity and the lack of protein is able to induce morphological and functional adaptations in the tissues in order to ensure the survival of the individual in the current and predicted environment. However, when the latter environment is not the same to which the organism has adapted to, it increases the risk of developing chronic diseases. Excessive consumption of foods with high levels of energy, fat, simple carbohydrates and low dietary fiber increases the risk of developing overweight and metabolic diseases. When associated with malnutrition early in life, there might be changes on the trajectory of growth, food intake, biochemical parameters and immune function. This study aimed to evaluate the effects of post-weaning high fat diet on somatic growth, food intake, biochemical parameters and peritoneal macrophages function in rats submitted to maternal low protein diet. Fifty-two Wistar rats whose mothers received normal protein or low protein diet during pregnancy and lactation were used. From weaning to 60 days old, pups received a standard diet or a high fat diet. They formed 4 experimental groups (n = 10-14 / each): control (C, rats fed with normal protein diet during pregnancy and lactation and post-weaning standard chow), Low protein (LP, rats fed with low protein diet during pregnancy and lactation and post-weaning standard chow), High fat (HF, rats fed with normal protein diet during pregnancy and lactation and post-weaning high fat diet) and Low protein-High fat (LP-HF, rats fed with low protein diet during pregnancy and lactation, and post-weaning high fat diet). It was evaluated the somatic growth [body weight (BW), tail length, body length] life time and food intake (relative food intake, relative energy intake, and feed conversion) from 30 to 36 days old and from 54 from 60 days old. At 60 days, pups were sacrificed and blood collection was performed to assess the serum profile of lipids, glucose and leptin. Organs and retroperitoneal and epididymal adipose tissues were collected and weighted to evaluate the relative weight. Peritoneal macrophages of rats were collected to evaluate phagocytosis and nitric oxide (NO) production *in vitro*. LP pups had a lower BW, tail length and body length than C pups. At 60 days old, LP-HF pups did not differ when compared to C pups, except by the reduced body length. From 57 to 60, LP-HF pups presented lower relative food intake and relative energy intake compared to LP pups, but feed conversion was higher than C and LP. HF and LP-HF pups had higher relative weight of epididymal and retroperitoneal fat than C and LP pups. Regarding the biochemical profile, LP pups had lower total cholesterol than C, but LP-HF pups had higher total cholesterol than the LP. Phagocytosis and NO production increased in LP pups. Dealing with an immune challenge, NO production by macrophages increased when compared to baseline, except in the LP group. These results suggest that a high fat diet is capable of modulate the effects of perinatal malnutrition, increasing the risk of metabolic diseases.

**Keywords:** Protein malnutrition. High fat diet. Growth. Food intake. Macrophages.

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO ORIGINAL 1:

- Fig. 1** Body weight and percentage of body weight gain of pups during lactation and from weaning to 60 days.....68
- Fig. 2** Body weight gain and food intake of pups during two different periods of evaluation.....69

### ARTIGO ORIGINAL 2:

- Figure 1** Phagocytosis rate of zymosan by peritoneal macrophages.....78
- Figure 2** Release of nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) by cultured peritoneal macrophages in baseline and stimulated state.....78

## LISTA DE TABELAS

### TESE:

|                                                                                                                                                |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1</b> - Composição da dietas experimentais normoproteica e hipoproteica consumidas pelas ratas durante a gestação e a lactação ..... | 37 |
| <b>Tabela 2</b> - Composição química das dietas experimentais padrão e hiperlipídica consumidas pelos filhotes.....                            | 38 |
| <b>Tabela 3</b> - Composição de ácidos graxos da dieta hiperlipídica.....                                                                      | 39 |

### ARTIGO ORIGINAL 1:

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1</b> Table of chemical composition of high fat diet and standard chow used in experiments.....                   | 65 |
| <b>Table 2</b> Fatty acids composition of high fat diet.....                                                               | 65 |
| <b>Table 3</b> Effects of maternal low-protein diet on nutritional parameters of dams and pups until lactation.....        | 66 |
| <b>Table 4</b> Somatic growth measurements, organs weight, biochemical and hormonal parameters of pups at 60 days old..... | 67 |

## SUMÁRIO

|                                                                                     |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 APRESENTAÇÃO .....</b>                                                         | <b>12</b> |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA – Artigo de revisão .....</b>                            | <b>16</b> |
| <b>3 HIPÓTESE.....</b>                                                              | <b>32</b> |
| <b>4 OBJETIVOS .....</b>                                                            | <b>34</b> |
| <b>5 MÉTODOS.....</b>                                                               | <b>36</b> |
| <b>5.1 Animais.....</b>                                                             | <b>36</b> |
| <b>5.2 Dietas experimentais .....</b>                                               | <b>37</b> |
| 5.2.1 Dietas experimentais das ratas .....                                          | 37        |
| 5.2.1 Dietas experimentais dos filhotes.....                                        | 38        |
| <b>5.3 Avaliações nas ratas .....</b>                                               | <b>39</b> |
| 5.3.1 Mensuração do consumo alimentar .....                                         | 39        |
| 5.3.2 Evolução ponderal .....                                                       | 40        |
| 5.3.3 Desempenho da gestação .....                                                  | 40        |
| <b>5.4 Avaliações nos filhotes.....</b>                                             | <b>40</b> |
| 5.4.1 Evolução ponderal .....                                                       | 40        |
| 5.4.2 Avaliação do crescimento somático .....                                       | 41        |
| 5.4.3 Mensuração do consumo alimentar.....                                          | 41        |
| 5.4.4 Eutanásia e coleta dos tecidos .....                                          | 42        |
| 5.4.5 Quantificação dos níveis séricos de glicose, colesterol e triglicerídeos..... | 42        |
| 5.4.6 Avaliação de leptina .....                                                    | 42        |
| 5.4.7 Isolamento de macrófagos peritoneais residentes .....                         | 42        |
| 5.4.8 Avaliação da função de macrófagos.....                                        | 43        |
| 5.4.8.1 Determinação da fagocitose de zymosan .....                                 | 43        |
| 5.4.8.2 Produção de óxido nítrico.....                                              | 43        |
| <b>5.5 Análise estatística .....</b>                                                | <b>44</b> |
| <b>6 RESULTADOS .....</b>                                                           | <b>46</b> |
| <b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                  | <b>48</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                            | <b>50</b> |
| <b>APÊNDICES .....</b>                                                              | <b>53</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                 | <b>80</b> |

# Apresentação

---

## 1 APRESENTAÇÃO

---

A transição nutricional tem sido observada em vários países de baixo e médio rendimento no mundo, sobretudo naqueles da África, Ásia e América Latina. Este fenômeno está relacionado ao rápido desenvolvimento econômico e à urbanização, que desencadearam mudanças nos padrões alimentares e o sedentarismo (LEAL *et al.*, 2012; BELAHSEN, 2014). A transição nutricional se caracteriza pela redução na prevalência de desnutrição e pelo aumento na prevalência de excesso de peso. Em algumas situações, esses dois quadros de má-nutrição ocorrem em diferentes indivíduos que habitam na mesma casa ou, ainda, no mesmo indivíduo, em diferentes momentos da vida (DOAK *et al.*, 2005; LEAL *et al.*, 2012).

No Brasil, embora a desnutrição não seja mais considerada um problema de saúde pública, ainda atinge alguns grupos populacionais mais vulneráveis, como crianças em idade pré-escolar e menores de 1 ano. A Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF 2008-2009), encontrou um déficit de altura entre pré-escolares de 6%, aumentando para 8,9% em crianças menores de 1 ano (IBGE, 2010). O excesso de peso, por outro lado, vem alcançando níveis alarmantes, atingindo 33,5% das crianças de 5 a 9 anos e 20,5% dos adolescentes (IBGE, 2010).

A deficiência nutricional durante o início da vida é capaz de modificar a morfologia e a funcionalidade dos sistemas orgânicos, repercutindo na saúde. A gestação e a lactação são períodos caracterizados por elevada plasticidade, devido aos processos de hiperplasia e diferenciação celular. Nestes períodos, a carência de proteínas é capaz de induzir adaptações morfológicas e funcionais nos tecidos, visando garantir a sobrevivência no ambiente atual (GLUCKMAN, HANSON e BEEDLE, 2007; BAROUKI *et al.*, 2012). Estudos experimentais demonstraram que a exposição à desnutrição proteica materna induz menor peso corporal e medidas de crescimento somático (QASEM *et al.*, 2012; FIDALGO *et al.*, 2013), hiperfagia (DU, 2000; LOPES DE SOUZA *et al.*, 2008) e maior adipogênese (GUAN *et al.*, 2005). Outros estudos demonstraram que o pobre crescimento fetal e a desnutrição materna estão associados ao comprometimento do desenvolvimento dos órgãos e marcadores da função imune, causando imunodeficiência (HOSEA, RECTOR e TAYLOR, 2004; BADR *et al.*, 2011; MORAIS *et al.*, 2014). Após serem submetidos à uma recuperação nutricional, estes animais apresentam maior risco de desenvolver doenças

crônicas não transmissíveis, como obesidade, hipertensão arterial e diabetes (WARNER e OZANNE, 2010).

Quando o ambiente pós-natal não é o mesmo para o qual o organismo adaptou-se, eleva-se o risco de aparecimento de doenças. Desta forma, caso a dieta pós-natal seja rica em energia e lipídios, as adaptações que eram favoráveis podem tornar-se desfavoráveis à saúde (GLUCKMAN, HANSON e BEEDLE, 2007). O excesso de adiposidade leva à disfunção dos adipócitos, acarretando expressão desregulada das adipocinas e favorecendo a gênese de distúrbios ligados à obesidade através de respostas imunometabólicas alteradas (OUCHI *et al.*, 2011). Um desequilíbrio na produção de adipocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias secretadas pelo tecido adiposo, representado por um aumento nas adipocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina 6 (IL-6) e resistina, e por uma redução nas adipocinas anti-inflamatórias adiponectina e *secreted frizzled-related protein 5* (SFRP5), está relacionado ao desenvolvimento de um estado inflamatório crônico de baixa intensidade observado na obesidade e de desordens metabólicas (OUCHI *et al.*, 2011). O excesso de tecido adiposo pode aumentar a infiltração de macrófagos e a inflamação local, alterando a resposta imune frente à infecção (HEILBRONN e CAMPBELL, 2008).

A incompatibilidade entre o ambiente materno privado de nutrientes durante a gestação e a lactação e o ambiente posterior com alta disponibilidade de alimentos ricos em lipídios e energia expõe o organismo ao risco de consequências adversas, como obesidade e desordens metabólicas (GLUCKMAN, HANSON e BEEDLE, 2007). Como resultado, sociedades em rápida transição nutricional e econômica são particularmente vulneráveis. Estudos experimentais a respeito dos efeitos de uma dieta hiperlipídica pós-natal sobre o crescimento, consumo alimentar, parâmetros bioquímicos e função de macrófagos de ratos submetidos à restrição proteica perinatal são escassos. Devido à importância deste tema, este estudo objetivou avaliar os efeitos do consumo de uma dieta hiperlipídica pós-desmame sobre o crescimento somático, o consumo alimentar, parâmetros bioquímicos e a função de macrófagos peritoneais de ratos submetidos a uma dieta hipoproteica perinatal.

Esta tese resultou em 2 artigos originais, que foram submetidos a revistas científicas para apreciação e subsequente publicação. O primeiro artigo original intitula-se **“High fat diet potentiates the effects of a perinatal low-protein diet on somatic growth and visceral fat accumulation in rats”**. Este artigo foi submetido ao *European Journal of Nutrition* (Qualis A2, fator de impacto 3,467) (ANEXO A) e discorre sobre os efeitos do consumo de uma dieta hiperlipídica sobre o crescimento somático, o consumo alimentar,

parâmetros bioquímicos e o acúmulo de gordura em ratos submetidos à restrição proteica materna. O segundo artigo original intitula-se “**High-fat diet does not change peritoneal macrophage functions of young rats submitted to maternal low-protein diet**”. Este artigo foi submetido à revista *Lipids* (Qualis B1, fator de impacto 1,854) (ANEXO B), na forma de *short communication*, e traz informações sobre o consumo de uma dieta hiperlipídica pós-desmame e a função de macrófagos peritoneais de ratos submetidos a uma dieta hipoproteica perinatal. A revisão da literatura está na forma de artigo de revisão, pois este será submetido à Revista de Nutrição.

## Revisão da literatura

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA – ARTIGO DE REVISÃO

---

Título: Papel da desnutrição e hipernutrição na plasticidade fenotípica

Title: Role of malnutrition and overnutrition in phenotypic plasticity

Título abreviado: Nutrição e plasticidade fenotípica

Short title: Nutrition and phenotypic plasticity

### Introdução

Países em desenvolvimento, sobretudo aqueles localizados na África, Ásia e América Latina, têm apresentado uma transição nutricional, acompanhada pela transição epidemiológica e demográfica relacionada ao desenvolvimento econômico e à urbanização <sup>(1)</sup>. Este fenômeno se caracteriza por uma redução na prevalência de desnutrição e um aumento na incidência de excesso de peso, ocasionando uma “*dual burden*” para os serviços de saúde <sup>(1, 2)</sup>. Em alguns casos, estes dois quadros ocorrem em diferentes indivíduos que residem na mesma casa ou, ainda, no mesmo indivíduo, em diferentes momentos da vida <sup>(2-4)</sup>. Nos países em desenvolvimento, devido às disparidades sociais e econômicas, a má-nutrição continua a afetar muitas crianças <sup>(2)</sup>. Enquanto o desenvolvimento tecnológico contribuiu para a melhoria nos serviços de saúde, a industrialização, a urbanização e a globalização contribuíram para um estilo de vida não saudável, caracterizado por hábitos alimentares inadequados e sedentarismo <sup>(1, 2)</sup>. Em termos de saúde, isto foi acompanhado por uma substituição na prevalência das doenças infectocontagiosas pelas doenças crônicas não transmissíveis como principal causa de morte <sup>(1)</sup>.

Nos últimos anos, tem-se observado uma redução nos casos de desnutrição, embora ela ainda acometa uma parcela significativa da população. Lactentes e crianças na fase pré-escolar são os grupos populacionais mais acometidos pela doença, devido à elevada vulnerabilidade a fatores ambientais ocorrida nestas fases. Dentre os indicadores do estado nutricional, o índice altura-para-idade é o que melhor reflete as consequências da desnutrição crônica pregressa (ocorrida nos primeiros meses ou anos de vida), sendo bastante usado em estudos populacionais <sup>(5)</sup>. No período de 1990 a 2010, a baixa estatura para a idade em crianças menores de 5 anos diminuiu de 44,4% para 29,2% <sup>(6)</sup>. Contudo, em 2010, ainda havia cerca de 171 milhões de crianças menores de 5 anos com baixa estatura para a idade, principalmente nos países em desenvolvimento <sup>(6)</sup>. No Brasil,

embora a desnutrição não seja mais considerada um problema de saúde pública, a Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 (POF 2008-2009) encontrou um déficit de altura entre pré-escolares de 6%, que aumentou para 8,9% em crianças menores de 1 ano <sup>(5)</sup>.

Ao mesmo tempo em que tem havido uma redução na prevalência de desnutrição, tem-se observado um aumento alarmante na incidência de excesso de peso. Nos países em desenvolvimento, o excesso de peso em crianças e adolescentes aumentou de 8,3% em 1980 para 13,2% em 2013 <sup>(2)</sup>. No Brasil, dados da POF 2008-2009 indicaram que 33,5% das crianças de 5 a 9 anos apresentaram excesso de peso, quando avaliadas pelo indicador Índice de Massa Corporal (IMC)-para-idade. Em adolescentes e adultos, o excesso de peso atingiu 20,5% e 49% da população, respectivamente <sup>(5)</sup>. Este excesso de peso observado se deve, em parte, à modificação do padrão alimentar da população e ao sedentarismo característico das sociedades ocidentais.

Evidências epidemiológicas e experimentais têm demonstrado os efeitos de dietas desequilibradas no início da vida e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida tardia <sup>(7-10)</sup>. Estudos prévios mostraram que a deficiência nutricional durante a gestação e/ou lactação está fortemente associada ao desenvolvimento de obesidade, diabetes mellitus tipo 2, dislipidemia, hipertensão e doenças cardiovasculares <sup>(7-9, 11, 12)</sup>. Por outro lado, o consumo precoce de alimentos industrializados, densamente energéticos e ricos em gorduras e carboidratos refinados contribuiu para o crescente excesso de peso infantil e o desenvolvimento de doenças metabólicas na infância e adolescência <sup>(13)</sup>. Quando a desnutrição perinatal é sucedida por uma alimentação rica em energia e gordura, como acontece em indivíduos de países submetidos ao rápido desenvolvimento econômico e à transição nutricional, estes são mais suscetíveis ao acúmulo de gordura e ao desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis <sup>(14, 15)</sup>. O aumentado risco de doenças crônicas relacionado à desnutrição crônica pregressa e à hipernutrição posterior pode ser explicado à luz da plasticidade fenotípica.

### **Plasticidade fenotípica e nutrição**

O período perinatal, que compreende a gestação e a lactação, é marcado pela ocorrência de processos de hiperplasia, hipertrofia e diferenciação celular, que originam os tecidos e promovem a organogênese <sup>(16)</sup>. Devido à acelerada velocidade com que estes processos fundamentais ocorrem, este período é de elevada plasticidade sendo, portanto, vulnerável a estímulos ambientais <sup>(16)</sup>. O aporte inadequado de nutrientes, substâncias químicas, drogas, álcool, infecções e outros estressores são exemplos de estímulos ambientais que induzem plasticidade no organismo nas fases críticas do desenvolvimento

<sup>(16)</sup>. O mecanismo subjacente inclui mudanças epigenéticas, tais como metilação do DNA, modificação covalente de histonas e expressão de RNA não-codificante <sup>(16)</sup>. Desta forma, o ambiente e os genes têm um papel determinista na produção e evolução do fenótipo e sobre o desenvolvimento <sup>(17)</sup>. A capacidade de um único genótipo induzir fenótipos alternativos em função de estímulos ambientais é denominada plasticidade fenotípica <sup>(17)</sup>. Esta representa a produção por um único genótipo de uma diversidade de respostas adaptativas, seja na forma, fisiologia e/ou comportamento de um organismo, permitindo-o adaptar-se às mudanças ambientais para manter ou melhorar a capacidade reprodutiva <sup>(17)</sup>.

A plasticidade fenotípica ocorre principalmente durante os períodos correspondentes às janelas de desenvolvimento, gestação e lactação <sup>(18)</sup>. Isto acontece porque o crescimento inicial se dá especialmente por meio do processo de hiperplasia, no qual ocorre um aumento no número de células que propicia a formação da estrutura e da função de órgãos em longo prazo <sup>(18)</sup>. Desta forma, fatores ambientais agindo durante este período podem gerar efeitos em longo prazo sobre componentes vitais do fenótipo de órgãos, enquanto fatores agindo posteriormente durante o desenvolvimento afetam apenas o componente hipertrófico do crescimento e, portanto, afetam mais o tamanho do que a estrutura <sup>(18)</sup>. Outra razão para o período restrito de maior plasticidade pode ser a dificuldade de reverter processos desenvolvimentistas já estabelecidos ou os custos que a modificação das características do organismo adulto gera para a sobrevivência ou o sucesso reprodutivo <sup>(19)</sup>.

O fenômeno biológico da plasticidade fenotípica tem sido observado em muitas plantas e animais <sup>(19)</sup>. Verificou-se que eles são capazes de desenvolver-se de diversas formas, adquirindo características que são adaptadas aos ambientes em que provavelmente viverão. Frequentemente, estas características são induzidas no início da vida ou são definidas por sinais aos quais seus pais ou avós foram expostos <sup>(19)</sup>. Entretanto, quando organismos em desenvolvimento se adaptam ao ambiente atual e este se modifica quando está mais velho, o risco de incompatibilidade fenotípica é maior e pode ter um custo em termos de sobrevivência e sucesso reprodutivo <sup>(19)</sup>.

A nutrição é um dos fatores ambientais mais importantes na indução de plasticidade fenotípica. O organismo em desenvolvimento é capaz de receber sinais provenientes do ambiente externo, por meio da mãe, via placenta ou amamentação, e produzir ajustes integrados na sua fisiologia e/ou morfologia, de forma a se adaptar ao meio predito <sup>(15, 19)</sup>. O organismo em desenvolvimento pode responder à desnutrição, hipernutrição ou disfunção placentária por meio da modificação de sua trajetória de crescimento e desenvolvimento <sup>(15, 19)</sup>. Se a nutrição durante este período é deficiente em nutrientes, podem ocorrer alterações morfofuncionais nos tecidos, na expectativa de

pobres condições pós-natais <sup>(15)</sup>. Por exemplo, tamanho pequeno e metabolismo mais lento podem favorecer a sobrevivência, enquanto tamanho maior e metabolismo mais rápido são vantajosos para o sucesso reprodutivo quando os recursos alimentares são mais abundantes <sup>(19)</sup>. Entretanto, se o ambiente pós-natal não corresponder àquele predito, os ajustes fisiológicos que seriam benéficos podem se tornar prejudiciais à saúde do indivíduo <sup>(15)</sup>. Assim, se houver alta disponibilidade de alimentos ricos em calorias e gorduras e baixo gasto energético no ambiente pós-natal, há maior risco de desenvolvimento de doenças <sup>(15)</sup>.

### **Efeitos da desnutrição durante o desenvolvimento**

A desnutrição tem sido observada em vários países de baixo e médio rendimento no mundo, sobretudo naqueles da África e da Ásia <sup>(1)</sup>. Fatores socioeconômicos e ambientais contribuem para a prevalência de desnutrição, sobretudo no início da vida, pois os indivíduos em desenvolvimento são mais vulneráveis a estímulos ambientais. Se as condições nutricionais durante o desenvolvimento são desfavoráveis, o indivíduo pode ser capaz de lidar com as adversidades ambientais mediante processos adaptativos que são benéficos naquele período, mas têm um custo para seu futuro sucesso reprodutivo <sup>(19)</sup>. O fenótipo maduro se torna diferente daquele expresso em condições ideais e não será tão bem adaptado para a vida adulta quanto poderia ser <sup>(19)</sup>. Na primeira metade do século XX, surgiram evidências a respeito da associação entre os eventos ocorridos no início da vida e o aparecimento de doenças crônicas na vida tardia, a exemplo de obesidade, diabetes, hipertensão arterial e doenças cardiovasculares <sup>(8, 20)</sup>. O peso ao nascer é considerado um indicador do crescimento fetal e maturação e pode refletir um agravo relacionado ao desenvolvimento de doenças futuras <sup>(21)</sup>. Os nascimentos ocorridos em Hertfordshire (Reino Unido) a partir de 1911 foram assistidos, e o peso ao nascer foi registrado, permitindo a realização de diversos estudos retrospectivos a partir desta informação. Estudo realizado por Hales et al. (1991) encontrou que homens que nasceram na década de 1920 com baixo peso e mantiveram o peso reduzido no primeiro ano de vida apresentaram intolerância à glicose e diabetes tipo II aos 64 anos, independente da sua massa corporal nesta idade <sup>(11)</sup>. Outro estudo realizado com dados do mesmo local observou que dentre 5654 homens, aqueles que apresentaram menor peso ao nascer tiveram maior taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares quando adultos <sup>(7)</sup>. Embora o peso ao nascer seja um importante indicador do estado nutricional do recém-nascido, os efeitos da deficiência nutricional no início da vida podem ser vistos em indivíduos nascidos com baixo peso ou não. Adaptações fetais a um ambiente intrauterino prejudicado podem manter a sobrevivência no início da vida, mas ter efeitos deletérios na

vida tardia <sup>(22)</sup>.

A desnutrição no início da vida tem sido estudada a partir de vários modelos experimentais propostos na literatura, que permitem melhor entendimento dos mecanismos subjacentes. Entre os mais utilizados, encontram-se as restrições alimentares em quantidade e qualidade de nutrientes <sup>(23)</sup>. Estes se caracterizam pelo uso de dieta hipocalórica <sup>(24)</sup>, hipoproteica <sup>(9, 10, 25)</sup>, ou ambas. O modelo de desnutrição energética mais prevalente na literatura consiste na restrição alimentar quantitativa, ou seja, na diminuição percentual da quantidade de alimento fornecido ao grupo desnutrido em relação à quantidade consumida pelo grupo controle *ad libitum*. Esta diminuição varia em torno de 30 a 50% da quantidade consumida pelos animais controles na maioria dos estudos <sup>(26, 27)</sup>. Outro modelo de desnutrição energética consiste na redução de calorias não pela restrição quantitativa de alimentos, mas pelo acréscimo de fibras alimentares à dieta e redução proporcional de macronutrientes, o que reduz o impacto da restrição alimentar sobre os ritmos circadianos <sup>(28)</sup>. O modelo de desnutrição proteica reproduz a privação alimentar vivenciada por populações de países em desenvolvimento, nos quais o acesso à proteína é limitado devido às precárias condições socioeconômicas. Dentre os modelos de desnutrição proteica, o mais bem estabelecido na literatura consiste na redução do fornecimento de proteína para 8% das calorias totais (caseína 8%), enquanto o grupo controle recebe 17% das calorias provenientes deste macronutriente (caseína 17%) <sup>(9, 25)</sup>. Em ambos os modelos, a intervenção dietética pode ser realizada durante a gestação, a lactação ou nos dois períodos. Em seguida, os filhotes recebem uma dieta comercial padrão para roedores. As consequências da desnutrição são dependentes do período em que ocorre e da intensidade do agravo, uma vez que alguns processos fisiológicos são específicos de cada período <sup>(10)</sup>.

Desnutrição materna durante a gestação e a lactação está associada a um permanente retardo de crescimento na prole, expresso como um menor peso e medidas de crescimento corporal, associados a uma redução no tamanho de órgãos, como coração, fígado e músculos gastrocnêmicos e sóleo <sup>(9, 10, 29)</sup>. O menor tamanho corporal e menores órgãos e tecidos reduzem as necessidades energéticas e aumentam a chance de sobrevivência num ambiente pós-natal de escassez nutricional <sup>(10)</sup>. Esta redução no crescimento está relacionada com alterações hormonais, como redução na concentração do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e menor expressão do RNA mensageiro do hormônio de crescimento <sup>(30)</sup>. Outro estudo encontrou que filhotes de mães submetidas à desnutrição perinatal apresentaram intolerância à glicose e hiperglicemia de jejum aos 150 dias <sup>(9)</sup>. Durante o início da vida, a capacidade de a insulina promover a entrada da glicose nas células pode estar comprometida em filhotes submetidos a um fornecimento inadequado desta, como um mecanismo adaptativo para garantir o seu

suprimento para o cérebro <sup>(19)</sup>. Entretanto, a resistência à insulina persistente na vida adulta pode levar ao desenvolvimento de diabetes tipo 2, sobretudo se a desnutrição perinatal é seguida de excesso nutricional <sup>(19)</sup>.

Animais submetidos à desnutrição na vida perinatal apresentam menor proporção de massa muscular e maior proporção de tecido adiposo comparados aos controles. Observou-se que a redução da massa muscular em animais submetidos à restrição proteica pode estar relacionada à diminuição na sinalização da proteína mTOR, que regula a síntese proteica em células musculares de mamíferos <sup>(31)</sup>. Isto prejudica a proliferação de fibras musculares, que ocorre apenas na vida fetal, e afeta a capacidade metabólica do músculo <sup>(31, 32)</sup>. Em ratos, o desenvolvimento do tecido adiposo ocorre especialmente no período perinatal, com maior diferenciação na terceira semana de gestação e durante a lactação <sup>(33, 34)</sup>. O aumento na massa gorda em animais submetidos à restrição proteica perinatal pode estar associado ao alterado padrão de transcrição de genes relacionados ao tecido adiposo. Estes animais apresentam um aumento no padrão de expressão de genes relacionados à proliferação de pré-adipócitos, diferenciação dos mesmos em adipócitos maduros e à lipogênese <sup>(35)</sup>. Quando submetidos à dieta hiperlipídica, aumenta a suscetibilidade ao acúmulo de gordura visceral e o risco de resistência à insulina.

Dois componentes do fenótipo metabólico podem ajudar a explicar os efeitos da desnutrição perinatal sobre o estado de saúde-doença na vida tardia. O primeiro deles seria a capacidade metabólica, que se refere à habilidade do corpo para manter a homeostase, a partir de alguns tecidos-chave, como o pâncreas, fígado, coração e rins <sup>(36)</sup>. O segundo seria a carga metabólica, que se refere à carga homeostática imposta sobre a capacidade metabólica. O aumento hipertrófico desproporcional de alguns tecidos corporais durante o crescimento de filhotes submetidos à restrição nutricional materna, como maior aumento de tecido adiposo e menor aumento de tecido muscular, pode impor maior carga metabólica devido aos produtos endócrinos secretados pelo tecido adiposo <sup>(36)</sup>. Esta carga metabólica pode ser exacerbada pela inatividade física e dieta desbalanceada <sup>(36)</sup>. Portanto, verifica-se que as adaptações a um ambiente escasso no início da vida trazem vantagens para o organismo em desenvolvimento, mas podem ter um custo tardio devido à elevada carga metabólica, sobretudo se o ambiente posterior for abundante em calorias e nutrientes.

### **Obesidade induzida por dieta hiperlipídica**

O aumento alarmante do excesso de peso visto nas sociedades ocidentais se deve principalmente à modificação do padrão alimentar da população. Alimentos naturais tradicionais de cada região têm sido progressivamente substituídos por alimentos

industrializados, com diversas consequências à saúde. Na população brasileira, alimentos como frutas, hortaliças, cereais integrais e leguminosas têm sido substituídos por alimentos industrializados densamente energéticos, com maior quantidade de lipídios (sobretudo saturados e trans) e carboidratos refinados <sup>(37)</sup>. Este padrão alimentar constitui uma dieta hipercalórica e hiperlipídica, conhecida como dieta ocidentalizada <sup>(38)</sup>. Alimentos industrializados em geral apresentam alta palatabilidade, favorecendo seu consumo e o consequente ganho de peso <sup>(39)</sup>. Além disso, a elevada oferta e o baixo custo de alguns alimentos industrializados contribuem para o aumentado consumo e a epidemia de obesidade <sup>(39)</sup>. O consumo de dieta hipercalórica e hiperlipídica, em muitos casos, origina-se na infância e/ou adolescência, refletindo as consequências de alterações biológicas e/ou do estilo de vida ocidental <sup>(3)</sup>. A ingestão habitual deste tipo de dieta aumenta a adiposidade corporal e predispõe ao desenvolvimento de doenças metabólicas <sup>(37)</sup>.

Dietas ricas em gorduras ou hiperlipídicas são capazes de induzir obesidade tanto em humanos quanto em animais <sup>(40)</sup>. Experimentalmente, diversos modelos de dieta hiperlipídica têm sido usados para induzir obesidade em roedores. Eles permitem investigar os efeitos do consumo de dietas hiperlipídicas sobre o ganho de peso, o acúmulo de gordura e o metabolismo. Um dos modelos de dieta hiperlipídica mais utilizado consiste em adicionar uma determinada fonte de gordura à dieta <sup>(41)</sup>, principalmente banha de porco <sup>(42-44)</sup>. Outro modelo consiste em misturar alimentos ricos em gordura com a dieta comercial padrão <sup>(45, 46)</sup>. Em geral, dietas hiperlipídicas fornecem uma ingestão energética a partir das gorduras que varia de 30 a 78% das calorias totais <sup>(40)</sup>. Esse aumento na ingestão energética proveniente das gorduras favorece o desenvolvimento da obesidade e doenças metabólicas relacionadas <sup>(40)</sup>.

Estudos experimentais têm investigado os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica na vida perinatal ou ao longo da vida sobre diversos sistemas fisiológicos <sup>(42, 45-47)</sup>. Animais submetidos à dieta hiperlipídica materna durante a gestação e a lactação apresentaram elevado peso corporal e aumento no consumo alimentar e níveis de colesterol total, glicose e triglicerídeos aos 100 dias de vida <sup>(46)</sup>. Estudo realizado com ratos submetidos à dieta hiperlipídica do desmame aos 80 dias encontrou aumento de peso corporal, aumento no conteúdo lipídico total da carcaça e no peso do tecido adiposo retroperitoneal e epididimal. Além disso, foi observado aumento de triglicerídeos e leptina sérica, mas não foram observadas alterações nos níveis séricos de glicose, colesterol e insulina <sup>(47)</sup>. Estadella *et al.* (2011) encontraram que animais submetidos à dieta hiperlipídica dos 30 aos 60 dias apresentaram aumento no conteúdo relativo de lipídios da carcaça e nos níveis séricos de glicose, insulina e leptina <sup>(45)</sup>.

Os adipócitos do tecido adiposo branco são responsáveis pela reserva de energia em longo prazo, através do armazenamento de gordura na forma de triglicerídeos.

Além disso, atuam como células endócrinas, uma vez que produzem adipocinas, hormônios e peptídeos relacionados à regulação do apetite <sup>(34, 48)</sup>. O excesso de adiposidade decorrente do consumo de dieta hiperlipídica leva à disfunção dos adipócitos, acarretando expressão desregulada das adipocinas. Dentre as adipocinas, destacam-se a leptina e a adiponectina <sup>(48)</sup>. A leptina regula o comportamento alimentar e a homeostase energética através do sistema nervoso central e tem papel pró-inflamatório quando em excesso no organismo. A adiponectina, por sua vez, atua sobre o metabolismo, melhorando a sensibilidade à insulina e protegendo contra distúrbios metabólicos ligados à obesidade, além de ter papel anti-inflamatório <sup>(48)</sup>. Além da leptina, os adipócitos de indivíduos obesos secretam o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6), adipocinas que induzem a resposta inflamatória <sup>(48)</sup>. A expressão desregulada das adipocinas favorece a patogênese de distúrbios ligados à obesidade por meio de respostas imunológicas alteradas <sup>(48)</sup>.

### **Modulação nutricional do sistema imune**

A formação do sistema imunológico inicia-se a partir das primeiras semanas de vida pré-natal, enquanto a competência imunológica é adquirida gradualmente após o nascimento, tanto em humanos quanto em animais <sup>(49)</sup>. Perturbações no sistema imune em desenvolvimento originadas pela inadequação nutricional, seja pela deficiência ou excesso de nutrientes, podem ter efeitos importantes ao longo da vida <sup>(50)</sup>. Evidências epidemiológicas têm demonstrado uma maior susceptibilidade à infecção e uma maior gravidade da doença em indivíduos desnutridos <sup>(50, 51)</sup>. A desnutrição na infância predispõe o organismo à infecção, enquanto a infecção aumenta o gasto energético e o requerimento de nutrientes para propiciar a defesa para combatê-la, gerando um ciclo que prejudica a saúde <sup>(52)</sup>. Está bem estabelecido que o estado nutricional pode determinar a resposta dos leucócitos <sup>(53)</sup> e que a desnutrição ocorrida nos períodos vulneráveis da vida, como na gestação e na lactação, pode gerar consequências para o organismo, como imunodeficiência <sup>(54)</sup>.

Desnutrição durante a vida gestacional e neonatal induz prejuízos como redução da função linfocitária, redução da migração de leucócitos para os locais de infecção e diminuição da produção de citocinas <sup>(55-57)</sup>. Badr *et al.* (2011) encontraram que crianças desnutridas no período perinatal apresentaram alterada produção de citocinas e mudanças na imunidade celular. Na presença de infecção, apesar do estímulo do excesso de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina (IL) -1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , não houve resposta apropriada de linfócitos T do sangue periférico, explicada por uma aumentada disfunção ou apoptose destas células <sup>(51)</sup>.

Macrófagos são células de extrema importância no controle e na resolução dos processos infecciosos. Dentre suas funções, destacam-se a fagocitose e destruição de microrganismos, apresentação de antígenos para linfócitos T, remoção de células apoptóticas, resolução de processos inflamatórios, angiogênese e reparo e remodelamento tissular <sup>(58)</sup>. Muitas funções destas células estão comprometidas em animais desnutridos. Ferreira-e-Silva *et al.* (2009) encontraram que macrófagos alveolares de ratos desnutridos durante a lactação apresentaram menor cinética de liberação de óxido nítrico do que macrófagos de animais bem nutridos <sup>(59)</sup>. Estudo realizado por Costa *et al.* (2012), encontrou que macrófagos alveolares de ratos submetidos a desnutrição neonatal mostraram menor produção de IFN- $\gamma$  e IL-12 após estímulo *in vitro* com lipopolissacarídeo (LPS) e *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, indicando que a desnutrição proteica pode ocasionar uma inabilidade para combater infecções <sup>(60)</sup>. Macrófagos peritoneais de ratos desnutridos na lactação apresentaram menor capacidade de espalhamento e fagocitose de *Candida albicans* do que aqueles de animais bem nutridos *in vitro* <sup>(61)</sup>. Estas evidências sugerem que a desnutrição perinatal, mesmo após um período de aumento da ingestão de nutrientes, pode comprometer o mecanismo imunitário de um organismo adulto.

Assim como a desnutrição é capaz de alterar a resposta imunológica, a hipernutrição e o aumento de tecido adiposo podem ocasionar modificação na função imune, através de processos inflamatórios. Um número crescente de evidências indica que a obesidade causa um estado inflamatório crônico de baixa intensidade, que contribui para o desenvolvimento de disfunção metabólica sistêmica <sup>(48, 62, 63)</sup> e doenças crônicas, como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e hipertensão arterial <sup>(48, 62, 64, 65)</sup>. Tipicamente, a inflamação resulta da interação coordenada de citocinas pró- e anti-inflamatórias em virtude da presença de um agente infeccioso. Contudo, outros fatores podem desencadear uma inflamação, como uma ingestão elevada de calorias e lipídios <sup>(66)</sup>. Estudos têm indicado que ácidos graxos livres circulantes podem diretamente desencadear respostas inflamatórias através da ativação de receptores semelhantes ao toll (TLR)- 4 e do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) <sup>(66, 67)</sup>, mostrando a influência da hipernutrição sobre a modulação dos mecanismos imunológicos.

O consumo exagerado e prolongado de dieta hiperlipídica promove a hipertrofia e disfunção dos adipócitos. Os adipócitos disfuncionais mediam a resposta inflamatória através da secreção de adipocinas, citocinas e quimiocinas que aumentam o recrutamento de células imunológicas para o tecido adiposo, principalmente macrófagos <sup>(42)</sup>. Macrófagos ativados são a principal fonte de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, propagando o estado inflamatório que influencia a sensibilidade à insulina nas células alvo e pode acarretar resistência insulínica <sup>(42)</sup>. Quando os macrófagos encontram estímulos

inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e LPS ocorre a liberação de NF- $\kappa$ B, que transloca-se para o núcleo e promove a transcrição de genes alvo, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e óxido nítrico sintase induzível <sup>(68)</sup>. Desta forma, a expansão dos adipócitos e da população de células imunes residentes constituem o principal microambiente no qual citocinas pró-inflamatórias são produzidas e liberadas no organismo <sup>(67)</sup>.

O tecido adiposo de indivíduos obesos e de modelos animais de obesidade é infiltrado por grande quantidade de macrófagos, de forma proporcional à adiposidade <sup>(48)</sup>. Em camundongos obesos, os macrófagos ativados produzem citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6 <sup>(69)</sup>. Outro estudo encontrou que camundongos submetidos a 16 semanas de dieta hiperlipídica apresentaram maior expressão de RNAm de TNF- $\alpha$ , IL-6, molécula de adesão intercelular- 1 (ICAM-1), TLR-4, proteína quimiotática para monócitos- 1 (MCP-1) e quimiocina F4/80, refletindo a presença marcadores inflamatórios e de monócitos e macrófagos no tecido adiposo epididimal <sup>(67)</sup>. Portanto, verifica-se que tanto a desnutrição quanto a hipernutrição são capazes de modular a resposta imune, podendo acarretar alterações nas respostas frente à desafios imunológicos.

## Conclusão

Verifica-se que estímulos nutricionais são capazes de alterar o crescimento e o funcionamento do tecido adiposo, do sistema endócrino e do sistema imune, acarretando processos inflamatórios e comprometendo o metabolismo normal. A incompatibilidade entre o ambiente fetal restrito em nutrientes e o ambiente pós-natal moderno, rico em alimentos de elevada densidade energética e lipídios, juntamente com o baixo gasto energético, pode ampliar o risco de obesidade e desordens metabólicas <sup>(70)</sup>. Estudos experimentais investigando os efeitos da desnutrição materna seguida de hipernutrição na prole são escassos e poderiam auxiliar o entendimento das alterações morfológicas e fisiológicas subjacentes à plasticidade fenotípica. Esses estudos poderiam ajudar a elucidar as consequências desses dois quadros de má-nutrição coexistindo em crianças vivendo em sociedades submetidas à rápida transição nutricional e econômica. Isto poderia contribuir para o desenvolvimento de programas de saúde visando à educação nutricional e à assistência à saúde, sobretudo no início da vida, período em que as crianças estão mais vulneráveis aos efeitos da nutrição inadequada.

## Referências

1. Belahsen R. Nutrition transition and food sustainability. Proc Nutr Soc. 2014;73(3):385-8.

2. Tzioumis E, Adair LS. Childhood dual burden of under- and overnutrition in low- and middle-income countries: a critical review. *Food Nutr Bull.* 2014;35(2):230-43.
3. Leal VSL, P. I. C.; Menezes, R. C. E.; Oliveira, J. S.; Costa, E. C.; Andrade, S. L. S. Malnutrition and excess weight in children and adolescents: a review of Brazilian studies. *Rev Paul Pediatr.* 2012;30(3):415-22.
4. Doak CM, Adair LS, Bentley M, Monteiro C, Popkin BM. The dual burden household and the nutrition transition paradox. *Int J Obes (Lond).* 2005;29(1):129-36.
5. IBGE. PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_encaa/default.shtm.2010](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/default.shtm.2010) [
6. de Onis M, Blossner M, Borghi E. Prevalence and trends of stunting among pre-school children, 1990-2020. *Public Health Nutr.* 2012;15(1):142-8.
7. Barker DJ, Osmond C. Diet and coronary heart disease in England and Wales during and after the second world war. *J Epidemiol Community Health.* 1986;40(1):37-44.
8. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet.* 1998;351(9097):173-7.
9. Fidalgo M, Falcao-Tebas F, Bento-Santos A, de Oliveira E, Nogueira-Neto JF, de Moura EG, et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. *Br J Nutr.* 2013;109(3):449-56.
10. Qasem RJ, Yablonski E, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'Mello A P. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. *Physiol Behav.* 2012;105(5):1182-93.
11. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 1991;303(6809):1019-22.
12. Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav.* 2009;96(3):481-92.
13. Bradlee ML, Singer MR, Qureshi MM, Moore LL. Food group intake and central obesity among children and adolescents in the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *Public Health Nutr.* 2010;13(6):797-805.
14. Amuna P, Zotor FB. Epidemiological and nutrition transition in developing countries: impact on human health and development. *Proc Nutr Soc.* 2008;67(1):82-90.
15. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol.* 2007;19(1):1-19.

16. Barouki R, Gluckman PD, Grandjean P, Hanson M, Heindel JJ. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. *Environ Health*. 2012;11:42.
17. West-Eberhard MJ. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. 1989;20:249-78.
18. Wells JC. Adaptive variability in the duration of critical windows of plasticity: Implications for the programming of obesity. *Evol Med Public Health*. 2014;2014(1):109-21.
19. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature*. 2004;430(6998):419-21.
20. Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993;341(8850):938-41.
21. Barker D. Fetal origins of cardiovascular and lung disease. New York 2001.
22. Lewis RP, K.; Godfrey, K. . The role of the placenta in the developmental origins of health and disease—Implications for practice. *Reviews in Gynaecological and Perinatal Practice* . 2006;6:70-9.
23. Dumortier O, Blondeau B, Duvillie B, Reusens B, Breant B, Remacle C. Different mechanisms operating during different critical time-windows reduce rat fetal beta cell mass due to a maternal low-protein or low-energy diet. *Diabetologia*. 2007;50(12):2495-503.
24. Mackay H, Khazall R, Patterson ZR, Wellman M, Abizaid A. Rats perinatally exposed to food restriction and high-fat diet show differences in adipose tissue gene expression under chronic caloric restriction. *Adipocyte*. 2013;2(4):237-45.
25. Aragão RSG, O.; Perez-Garcia, G.; Toscano, A. E.; Gois Leandro, C.; Manhães-de-Castro, R.; Bolaños-Jimenez, F. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. *Acta Physiologica*. 2014;210:70–83.
26. Levay EA, Paolini AG, Govic A, Hazi A, Penman J, Kent S. HPA and sympathoadrenal activity of adult rats perinatally exposed to maternal mild calorie restriction. *Behav Brain Res*. 2010;208(1):202-8.
27. Palou M, Torrens JM, Priego T, Sanchez J, Palou A, Pico C. Moderate caloric restriction in lactating rats programs their offspring for a better response to HF diet feeding in a sex-dependent manner. *J Nutr Biochem*. 2011;22(6):574-84.
28. Alheiros-Lira MC, Araujo LL, Trindade NG, da Silva EM, Cavalcante TC, de Santana Muniz G, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-energy diet ad libitum during gestation and/or lactation on physiological parameters of mothers and male offspring. *Eur J Nutr*. 2015;54(5):793-802.
29. Moita L, Lustosa MF, Silva AT, Pires-de-Melo IH, de Melo RJ, de Castro RM, et al. Moderate physical training attenuates the effects of perinatal undernutrition on the

morphometry of the splenic lymphoid follicles in endotoxemic adult rats. *Neuroimmunomodulation*. 2011;18(2):103-10.

30. de Moura EG, Lisboa PC, Custodio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K, Passos MC. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2007;18(2):134-9.

31. Zhu MJ, Ford SP, Nathanielsz PW, Du M. Effect of maternal nutrient restriction in sheep on the development of fetal skeletal muscle. *Biol Reprod*. 2004;71(6):1968-73.

32. Du M, Yan X, Tong JF, Zhao J, Zhu MJ. Maternal obesity, inflammation, and fetal skeletal muscle development. *Biol Reprod*. 2010;82(1):4-12.

33. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: from stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:715-36.

34. Lukaszewski MA, Eberle D, Vieau D, Breton C. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(10):E1195-207.

35. Guan H, Arany E, van Beek JP, Chamson-Reig A, Thyssen S, Hill DJ, et al. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(4):E663-73.

36. Wells JC. Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. *Am J Hum Biol*. 2010;22(1):1-17.

37. Barreto SMP, A. R. O.; Sichieri, R.; Monteiro, C. A.; Batista Filho, M.; Schmidt, M. I.; Lotufo, P.; Assis, A. M.; Guimarães, V.; Recine, E. G. I.; Victora, C. G.; Coitinho, D.; Passos, V. M. A. Analysis of the global strategy on diet, physical activity and health of the World Health Organization. *Epidemiol Serv Saúde*. 2005;14(1):41-68.

38. Francis H, Stevenson R. The longer-term impacts of Western diet on human cognition and the brain. *Appetite*. 2013;63:119-28.

39. Popkin BMA, L. S.; Wen Ng, S. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. *Nutr Rev*. 2012;70(1): 3–21.

40. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):270-99.

41. Woods SC, Seeley RJ, Rushing PA, D'Alessio D, Tso P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. *J Nutr*. 2003;133(4):1081-7.

42. van der Heijden RA, Sheedfar F, Morrison MC, Hommelberg PP, Kor D, Kloosterhuis NJ, et al. High-fat diet induced obesity primes inflammation in adipose tissue prior to liver in C57BL/6j mice. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(4):256-68.

43. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, et al. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver

and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* (Silver Spring). 2011;19(6):1109-17.

44. Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. 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*. 2009;102(4):514-9.

45. Estadella D, Oyama LM, Bueno AA, Habitante CA, Souza GI, Ribeiro EB, et al. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. *Lipids Health Dis*. 2011;10:168.

46. Oliveira TW, Leandro CG, de Jesus Deiro TC, dos Santos Perez G, da Franca Silva D, Druzian JI, et al. A perinatal palatable high-fat diet increases food intake and promotes hypercholesterolemia in adult rats. *Lipids*. 2011;46(11):1071-4.

47. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition*. 2004;20(2):218-24.

48. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):85-97.

49. Spencer SJ, Martin S, Mouihate A, Pittman QJ. Early-life immune challenge: defining a critical window for effects on adult responses to immune challenge. *Neuropsychopharmacology*. 2006;31(9):1910-8.

50. Palmer AC. Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *Adv Nutr*. 2011;2(5):377-95.

51. Badr G, Sayed D, Alhazza IM, Elsayh KI, Ahmed EA, Alwasel SH. T lymphocytes from malnourished infants are short-lived and dysfunctional cells. *Immunobiology*. 2011;216(3):309-15.

52. Schaible UE, Kaufmann SH. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLoS Med*. 2007;4(5):e115.

53. Hosea HJ, Rector ES, Taylor CG. Dietary repletion can replenish reduced T cell subset numbers and lymphoid organ weight in zinc-deficient and energy-restricted rats. *Br J Nutr*. 2004;91(5):741-7.

54. Schuler SLG, J.; Cecílio, W. A. C.; Azevedo, M. L. V.; Olandoski, M.; Noronha, L. Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat dams. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 2008;32(2):184-9.

55. Hassanein NM, Talaat RM, Bassiouny K, Hamed MR. Influence of protein malnutrition on induction and treatment of inflammation in mice. *Egypt J Immunol*. 2006;13(2):49-60.

56. Landgraf MAT, R. C. A.; Borelli, P.; Zorn, T. M. T.; Nigro, D.; Carvalho, M. H. C.; Fortes, Z. B. . Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. *Nutrition*. 2007;23:145-56.

57. Cortes-Barberena E, Gonzalez-Marquez H, Gomez-Olivares JL, Ortiz-Muniz R. Effects of moderate and severe malnutrition in rats on splenic T lymphocyte subsets and activation assessed by flow cytometry. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(3):585-92.
58. Cassado AA. Heterogeneidade dos macrófagos peritoneais. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2011.
59. Silva WTF, Galvao BA, Ferraz-Pereira KN, de-Castro CB, Manhaes-de-Castro R. Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats. *Neuroimmunomodulation*. 2009;16(4):219-27.
60. da Costa TBdM, N. G.; de Almeida, T. M.; Severo, M. S.; Castro, C. M. M. B. Desnutrição neonatal e produção de IFN-gama, IL-12 e IL-10 por macrófagos/linfócitos: estudo da infecção celular, in vitro, por *Staphylococcus aureus* meticilina sensível e meticilina resistente. *Rev Nutr*. 2012;25(5):607-19.
61. Prestes-Carneiro LE, Laraya RD, Silva PR, Moliterno RA, Felipe I, Mathias PC. Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2006;52(6):414-20.
62. Hotamisligil GS. Inflammation and metabolic disorders. *Nature*. 2006;444(7121):860-7.
63. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006;116(7):1793-801.
64. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(2):98-107.
65. Rocha VZ, Folco EJ. Inflammatory concepts of obesity. *Int J Inflam*. 2011;2011:529061.
66. Hemalatha R. Diet Induced Inflammation and Potential Consequences on Fetal Development. *J Nutr Disorders Ther* 2013;3(125).
67. Kawanishi N, Yano H, Yokogawa Y, Suzuki K. Exercise training inhibits inflammation in adipose tissue via both suppression of macrophage infiltration and acceleration of phenotypic switching from M1 to M2 macrophages in high-fat-diet-induced obese mice. *Exerc Immunol Rev*. 2010;16:105-18.
68. Borges MC, Vinolo MA, Nakajima K, de Castro IA, Bastos DH, Borelli P, et al. The effect of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on metabolic and inflammatory parameters in high-fat diet-fed Wistar rats. *Int J Food Sci Nutr*. 2013;64(5):561-9.
69. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(1):23-35.
70. Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011;106(1):272-80.

**Hipótese**

---

### **3 HIPÓTESE**

---

O consumo de uma dieta hiperlipídica pós-desmame eleva o crescimento somático, altera o consumo alimentar e o perfil bioquímico e aumenta a função fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos submetidos a uma dieta hipoproteica materna.

## Objetivos

---

## 4 OBJETIVOS

---

### 4.1 Objetivo geral:

Avaliar os efeitos do consumo de uma dieta hiperlipídica pós-desmame sobre o crescimento somático, o consumo alimentar, o perfil bioquímico e a função de macrófagos peritoneais de ratos submetidos a uma dieta hipoproteica materna.

### 4.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a evolução ponderal e o consumo alimentar das mães durante a gestação e a lactação
- Avaliar o crescimento somático dos filhotes durante a lactação e do desmame aos 60 dias
- Mensurar o consumo alimentar dos filhotes após o desmame e ao final do experimento
- Mensurar o peso relativo de órgãos
- Analisar os níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e glicose
- Avaliar a concentração sérica de leptina
- Investigar a taxa de fagocitose de macrófagos peritoneais diante de um desafio imunológico
- Avaliar a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais diante de um desafio imunológico

## Métodos

---

## 5 MÉTODOS

---

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da UFPE (protocolo número 23076.052139/2012-01) e somente foi iniciado após aprovação (ANEXO C).

### 5.1 Animais

Foram utilizadas 16 ratas albinas primíparas da linhagem *Wistar*, com peso corporal compreendido entre 220 e 280g, provenientes da colônia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação com temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , ciclo invertido de 12/12 horas (luz 18:00h às 6:00h) e alojados em gaiolas de polipropileno com livre acesso à água e ração. Duas ratas foram acasaladas com cada macho. Detectada a gestação, as ratas foram divididas em dois grupos de acordo com a dieta recebida: Controle (C, ratas que receberam dieta normoproteica durante a gestação e a lactação,  $n = 8$ ) e Desnutrido (LP, ratas que receberam dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação,  $n = 8$ ). Durante a lactação, as ratas continuaram recebendo dieta experimental e a ninhada foi ajustada para 8 filhotes. Ao desmame (21 dias) somente os filhotes machos permaneceram no experimento. Do desmame até os 60 dias, os ratos ( $n=52$ ) receberam dieta hipercalórica e hiperlipídica ou dieta padrão Nuvilab, formando os grupos: Controle (C, ratos que receberam dieta normoproteica durante a gestação e a lactação e padrão para roedores pós-desmame), Desnutrido (LP, ratos que receberam dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação e padrão para roedores pós-desmame), Hiperlipídico (HF, ratos que receberam dieta normoproteica durante a gestação e a lactação e hiperlipídica pós-desmame) e Desnutrido-Hiperlipídico (LP-HF, ratos que receberam dieta hipoproteica durante a gestação e a lactação e hiperlipídica pós-desmame).

## 5.2 Dietas experimentais

### 5.2.1 Dietas experimentais das ratas

Água e ração foram oferecidos *ad libitum* durante todo o experimento. A dieta normoproteica oferecida às ratas do grupo controle durante a gestação e a lactação consistiu na dieta do Instituto Americano de Nutrição específica para roedores em fase de crescimento (AIN-93G). A dieta normoproteica é nutricionalmente equilibrada em relação à composição e distribuição de macronutrientes (normocalórica, normoproteica, normolipídica e normoglicídica) e à composição de micronutrientes. Esta dieta apresenta 17% das calorías provenientes de proteínas (caseína a 17%) (REEVES, 1997). A dieta hipoproteica, por sua vez, foi desenvolvida baseada na normoproteica, com apenas 8% das calorías provenientes de proteínas (caseína a 8%). Os filhotes receberam estas dietas experimentais indiretamente durante a gestação e a lactação, via alimentação materna. A Tabela 1 apresenta os ingredientes das dietas normoproteica e hipoproteica e a contribuição de cada macronutriente em relação ao valor energético total da dieta (VET).

**Tabela 1** - Composição da dietas experimentais normoproteica e hipoproteica consumidas pelas ratas durante a gestação e a lactação

| <b>Ingredientes</b>     | <b>Normoproteica*<br/>(g/Kg)</b> | <b>Hipoproteica<br/>(g/Kg)</b> |
|-------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| Amido de milho          | 397,5                            | 503,4                          |
| Amido dextrinizado      | 132                              | 132                            |
| Caseína                 | 200                              | 94,1                           |
| Sacarose                | 100                              | 100                            |
| Óleo de soja (mL)       | 77                               | 77                             |
| Celulose                | 50                               | 50                             |
| Mix mineral             | 35                               | 35                             |
| Mix vitamínico          | 10                               | 10                             |
| Metionina               | 3                                | 3                              |
| Colina                  | 2,5                              | 2,5                            |
| Terc-butil-hidroquinona | 0,014                            | 0,014                          |
| Energia total (cal/g)   | 3,6                              | 3,6                            |
| Proteína (% VET)        | 17                               | 8                              |
| Carboidrato (% VET)     | 65                               | 74                             |
| Lipídio (%VET)          | 18                               | 18                             |

\* **Fonte:** Adaptado de Reeves (1997)

### 5.2.2 Dietas experimentais dos filhotes

A dieta padrão (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrientes S/A, Brasil), oferecida aos ratos após o desmame, consistiu numa ração comercial desenvolvida para ratos de laboratório à base de carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix mineral e vitamínico e aminoácidos (Tabela 2).

A dieta hipercalórica e hiperlipídica usada foi a previamente padronizada por Estadella *et al.* (2004), constituída de uma mistura de ingredientes: ração padrão, amendoim cru, chocolate ao leite e biscoito tipo maisena na proporção de 3:2:2:1. Foram mantidas as marcas dos ingredientes para a confecção das dietas. Estes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de péletes (Tabela 2). A composição de ácidos graxos da dieta hiperlipídica encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 2** - Composição química das dietas experimentais padrão e hiperlipídica consumidas pelos filhotes após o desmame

| <b>Composição química</b>               | <b>Ração padrão*</b> | <b>Dieta hiperlipídica</b> |
|-----------------------------------------|----------------------|----------------------------|
| Proteína (N x 6,25) (g/100g)            | 22,51                | 19,02                      |
| Carboidrato (g/100g)                    | 56,3                 | 46,33                      |
| Lipídios (g/100g)                       | 5,12                 | 23,84                      |
| Umidade e substâncias voláteis (g/100g) | 9,26                 | 2,81                       |
| Cinzas (g/100g)                         | 6,81                 | 8,00                       |
| Energia total (cal/g)                   | 3,61                 | 4,75                       |
| Proteína (% VET)                        | 24,92                | 15,98                      |
| Carboidrato (%VET)                      | 62,33                | 38,94                      |
| Lipídios (%VET)                         | 12,75                | 45,08                      |

\*Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes S/A, Brasil)

**Tabela 3** - Composição de ácidos graxos da dieta hiperlipídica

| <b>Ácidos graxos<br/>(g/100g)</b> |              |
|-----------------------------------|--------------|
| <b>Saturados</b>                  | <b>6.97</b>  |
| C 8:0                             | 0.02         |
| C 10:0                            | 0.02         |
| C 12:0                            | 0.23         |
| C 14:0                            | 0.15         |
| C 16:0                            | 3.52         |
| C 17:0                            | 0.03         |
| C 18:0                            | 2.12         |
| C 20:0                            | 0.24         |
| C 22:0                            | 0.40         |
| C 24:0                            | 0.24         |
| <b>Monoinsaturados</b>            | <b>11.76</b> |
| C 16:1n7                          | 0.03         |
| C 17:1                            | 0.02         |
| C 18:1n9                          | 11.49        |
| C 20:1n11                         | 0.21         |
| C 22:1                            | 0.02         |
| <b>Poliinsaturados</b>            | <b>4.32</b>  |
| C 18:2n6                          | 4.22         |
| C 18:3n3 $\alpha$                 | 0.10         |
| C 18:2n6/ C 18:3n3 $\alpha$       | 42.20        |
| <b>Trans</b>                      | N.D. < 0.01  |
| N.D. = não detectável             |              |

### 5.3 Avaliações nas ratas

#### 5.3.1 Mensuração do consumo alimentar

O consumo alimentar das ratas (gestação e a lactação) foi registrado diariamente, com auxílio de balança eletrônica digital (Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g, menor divisão 0,001g). Quantificou-se a ração ofertada diariamente às 8h00min e a sobra após 24h, subtraindo-se os valores para obter a quantidade ingerida (FALCAO-TEBAS *et al.*, 2012). Desta forma, foi possível mensurar a ingestão de ração durante a gestação e a lactação. O consumo alimentar apresentado na lactação incluiu o consumo da mãe e dos filhotes a partir do 14º dia, quando estes últimos abriram os olhos e começaram a ingerir a ração materna.

O Coeficiente de eficácia alimentar foi calculado ao final de cada período (gestação e lactação), obedecendo à seguinte equação: Coeficiente de eficácia alimentar =

$(PF - PI)/TA$  onde, PF (peso corporal do animal ao final do período - em gramas); PI (peso corporal do animal no início do período - em gramas); TA (quantidade total de alimento ingerido durante o período - em gramas) (CAVALCANTE, 2013). O cálculo do coeficiente de eficácia alimentar incluiu o consumo alimentar da mãe e dos filhotes a partir do 14º dia da lactação.

### 5.3.2 Evolução ponderal

A mensuração do peso corporal das ratas foi realizada semanalmente (no 1º, 7º, 14º e 21º dia de gestação e lactação) para avaliar a variação de peso durante a gestação e a lactação. O horário estabelecido para esta avaliação foi entre 08h00min e 9h00min. Foi utilizada uma balança eletrônica digital, marca Marte XL 500, classe II, capacidade máxima 500g (menor divisão 0,001g). A variação de peso foi avaliada em termos absoluto [(peso final (g) – peso inicial (g))] e relativo [Percentual de ganho de peso = (peso do dia (g) x 100/ peso do 1º dia (g)) - 100] (FIDALGO *et al.*, 2013).

### 5.3.3 Desempenho da gestação

Para avaliação do desempenho da gestação, 24h após o nascimento dos filhotes, quantificou-se o número de filhotes nascidos vivos, o peso da ninhada (g) e o peso de cada neonato (g), considerado peso ao nascer ou peso no primeiro dia.

## 5.4 Avaliações nos filhotes

### 5.4.1 Evolução ponderal

A mensuração ponderal dos filhotes ocorreu nos dias 1, 7, 14, 21, 30, 40, 50 e 60, com auxílio de balança eletrônica digital marca Marte XL 500. O horário estabelecido para esta avaliação foi entre 09h00min e 10h00min.

O percentual de ganho de peso foi avaliado nas idades de 1 a 21 dias (lactação) e 21 a 60 dias (pós-desmame) a partir da seguinte fórmula: Percentual de ganho de peso = [(peso do dia (g) x 100/ peso do 1º dia (g))-100 (FIDALGO *et al.*, 2013).

#### 5.4.2 Avaliação do crescimento somático

O crescimento somático dos filhotes foi avaliado durante a lactação e após o desmame. O comprimento da cauda (distância da ponta da cauda à base da cauda, cm) e o comprimento naso-anal (distância do nariz ao ânus, cm) foram mensurados nas idades de 1, 7, 14, 21 e 60 dias, com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm (Starrett®, Série 799, São Paulo, Brasil). Aos 21 e 60 dias, foi aferida a Circunferência Abdominal (imediatamente antes da pata traseira, cm), a Circunferência Torácica (imediatamente atrás da pata dianteira) e a Razão Abdome-Tórax [RAT = Circunferência abdominal (cm) / Circunferência torácica (cm)]. Calculou-se ainda o Índice de Massa Corporal [peso corporal (g)/ comprimento naso-anal (cm)<sup>2</sup>] (NOVELLI *et al.*, 2007).

#### 5.4.3 Mensuração do consumo alimentar

O consumo alimentar dos filhotes foi aferido diariamente de 30 a 36 dias e 54 a 60 dias, para avaliação do consumo de dieta hiperlipídica início da oferta e ao final do experimento, respectivamente. Nestes períodos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais de polipropileno, onde foi quantificada a ração ofertada diariamente às 9h00min e a sobra após 24h, subtraindo-se os valores para obter a quantidade ingerida. Os primeiros 3 dias foram considerados de adaptação ao tamanho reduzido da gaiola e ao isolamento social, sendo analisados apenas os 3 últimos dias. Mediu-se também o peso corporal dos animais para avaliação do ganho de peso em função da quantidade de ração e calorias ingeridas. O coeficiente de eficácia alimentar foi calculado conforme descrito para as ratas e o Coeficiente de ganho de peso por consumo calórico foi calculado a partir da seguinte equação: Coeficiente de ganho de peso por consumo calórico =  $\frac{PF - PI}{VCT} \times 100$  onde, PF (peso corporal do animal ao final do período - em gramas); PI (peso corporal do animal no início do período - em gramas); VCT (valor calórico total da dieta consumida no período - em calorias). Utilizou-se uma balança eletrônica digital marca Marte XL 500 para pesagem da ração e dos animais (CAVALCANTE, 2013).

#### 5.4.4 Eutanásia e coleta dos tecidos

Aos 60 dias de vida, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado em tubos não-heparinizados. O sangue coagulado foi centrifugado (10 min, 2700 rpm, 4°C) para obtenção de soro, que foi congelado em tubos individuais a -80°C, para posterior análise bioquímica e hormonal. Foram retirados também macrófagos peritoneais para os ensaios de fagocitose *in vitro* e de liberação de óxido nítrico no sobrenadante de cultura de células. Posteriormente, o coração, o fígado, o baço e o tecido adiposo retroperitoneal e epididimal foram retirados e pesados, para cálculo do peso relativo (peso do tecido/ peso corporal total x 100).

#### 5.4.5 Quantificação dos níveis séricos de glicose, colesterol e triglicerídeos

Foram avaliados os níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicerídeos através de ensaio colorimétrico de ponto final, utilizando o Kit de Glicose PAP Liquiform, o Kit de Colesterol Liquiform e o Kit de Triglicérides Liquiform, respectivamente (Labtest, Lago Santa, Minas Gerais, Brasil). A fração VLDL-colesterol foi determinada mediante a utilização da equação de FRIEDWALD (1972):  $\text{VLDL-colesterol (mg/dL)} = \text{triglicerídeos} / 5$  (FRIEDEWALD, LEVY e FREDRICKSON, 1972).

#### 5.4.6 Avaliação de leptina

A avaliação da concentração sérica de leptina (Leptin Rat ELISA - KRC2281-Biosource) foi realizada por meio de *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), segundo as orientações do fabricante. O ELISA se baseia em reações antígeno-anticorpo e enzimáticas, que resultarão, ao final de várias etapas, na produção de uma substância colorida. A densidade ótica da reação enzimática colorimétrica foi determinada em espectrofotômetro (TP-reader, Thermoplate, São Paulo, Brasil) para determinação da curva padrão e quantificação de leptina.

#### 5.4.7 Isolamento de macrófagos peritoneais residentes

Macrófagos peritoneais foram obtidos através de lavado peritoneal com *phosphate buffered saline* (PBS). Após injeção intraperitoneal de 20 ml de PBS e coleta do lavado,

adicionou-se 15 ml de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% para manter um meio nutritivo para as células e permitir sua sobrevivência. Posteriormente, a suspensão celular foi centrifugada (300g, 4° C, 10 min) para isolamento e coleta dos macrófagos. Quando necessário, os eritrócitos foram lisados em 5 mL de solução de hemólise durante 4 minutos. Adicionou-se 2 ml de RPMI 1640 com SFB. Depois, retirou-se uma alíquota de 50 µL de cada suspensão para realização da contagem de células viáveis. Esta foi feita com adição de *Trypan Blue* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) à suspensão celular e contagem numa câmara de Neubauer, sob um microscópio óptico. O volume da suspensão necessário para ter  $1 \times 10^6$  células foi identificado para posterior uso nos ensaios de fagocitose e liberação de óxido nítrico (NO).

#### 5.4.8 Avaliação da função de macrófagos

##### 5.4.8.1 Determinação da fagocitose de zymosan

Uma amostra contendo  $1 \times 10^6$  macrófagos foi incubada em banho-maria por 40 minutos a 37° C em 1 ml de RPMI 1640 com partículas opsonizadas de zymosan (zymosan A de *Saccharomyces cerevisiae* – Sigma Z-4250; Sigma, St. Louis, Mo., USA). As partículas ( $1 \times 10^7$ ) foram opsonizadas por incubação em banho-maria na presença de soro de rato controle por 30 minutos a 37° C. Após incubação com zymosan, os macrófagos foram corados com Kit Panótico Rápido (Laborclin Produtos para laboratórios LTDA, Pinhais, PR, Brasil) para contagem de fagocitose em microscópio óptico. A capacidade fagocítica foi definida como o número de macrófagos que internalizou 3 ou mais partículas de zymosan. Foram analisadas 100 células de cada lâmina e os resultados foram demonstrados como percentual de macrófagos fagocíticos.

##### 5.4.8.2 Produção de óxido nítrico

O óxido nítrico é um produto resultante da atividade fagocítica antimicrobiana de macrófagos ativados. No entanto, devido à curta duração de sua meia-vida (alguns segundos), utiliza-se medidas indiretas de quantificação. Produtos finais oxidativos estáveis são usados para mensuração do óxido nítrico, dentre eles o nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ) e o nitrato ( $\text{NO}^{3-}$ ).

Suspensão celular de macrófagos ( $1 \times 10^6$  células) em meio RPMI 1640 com SFB

10%, em um volume final de 1 mL, foi pipetada numa placa de cultura de 24 poços e incubada a 37° C numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 1 h, células não aderentes foram removidas por lavagem com meio de cultura e células aderentes remanescentes foram usadas para o ensaio de liberação de NO. As células remanescentes foram incubadas por 24 horas na ausência ou presença de Lipopolissacarídeo (LPS, *Lipopolysaccharides* de *Escherichia coli* 055:B5 - Sigma L2880; Sigma, St. Louis, Mo., USA) (controle positivo – 1 ng/mL/poço) e Interferon gama (IFN-  $\gamma$ , Interferon- $\gamma$  de rato recombinante, expresso em *Escherichia coli* – Sigma L3275; Sigma, St. Louis, Mo., USA) (controle positivo - 5 ng/mL/poço). Para quantificação de nitrito, 100  $\mu$ L de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e 0,1% a-naftil etilenodiamina em água destilada, misturados na proporção de 1:1) foi adicionado para 100  $\mu$ L de sobrenadante de cultura de células numa placa de 96 poços. A curva padrão foi determinada por diferentes concentrações de nitrito de sódio (0-35  $\mu$ M) e a absorbância das amostras foi mensurada em um espectrofotômetro (TP-reader, Thermoplate, São Paulo, Brasil) a 550 nm. Os resultados foram expressos como produção de nitrito ( $\mu$ M).

## 5.5 Análise estatística

Para a análise das ratas e dos filhotes durante a gestação e a lactação, utilizou-se o teste t de *Student*. Após o desmame, usou-se ANOVA *one-way* seguido do teste de Bonferroni. Os valores estão expressos em média e erro padrão da média (EPM). O nível de significância foi mantido em 5% ( $p < 0,05$ ) em todos os casos. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA; versão 6.0 para MAC).

## Resultados

---

## 6 RESULTADOS

---

Artigo original 1 – Intitulado “**High fat diet potentiates the effects of a perinatal low-protein diet on somatic growth and visceral fat accumulation in rats**”, este artigo foi submetido ao periódico *European Journal of Nutrition* e encontra-se de acordo com as normas aos autores (APÊNDICE A).

Artigo original 2 – Intitulado “**High-fat diet does not change peritoneal macrophage functions of young rats submitted to maternal low-protein diet**”, este artigo foi submetido ao periódico *Lipids* e encontra-se de acordo com as normas aos autores (APÊNDICE B).

## Considerações finais

---

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Animais que consumiram dieta hiperlipídica após uma restrição proteica materna durante a gestação e a lactação apresentaram alterações fenotípicas indicativas de plasticidade durante o desenvolvimento. O consumo de dieta hiperlipídica por animais submetidos à restrição proteica perinatal ocasionou uma recuperação no crescimento somático, no nível de LDL-colesterol, aumento no coeficiente de eficácia alimentar e no acúmulo de gordura visceral em relação aos animais desnutridos. Isto demonstra que a dieta hiperlipídica é capaz de potencializar os efeitos da dieta hipoproteica em animais previamente desnutridos, aumentando o risco de doenças crônicas. Por outro lado, a dieta hiperlipídica não foi capaz de alterar a função fagocítica e a produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais de ratos previamente desnutridos. Ratos submetidos à restrição proteica perinatal apresentaram aumentada fagocitose e produção de óxido nítrico, sugerindo que a restrição proteica materna pode ter ocasionado uma elevação nas citocinas pró-inflamatórias. O aumento do acúmulo de tecido adiposo poderia elevar a produção de adipocinas inflamatórias, contudo a concentração sérica de leptina não diferiu entre os grupos, sugerindo que talvez ainda não esteja ocorrendo uma inflamação exacerbada no tecido adiposo. Outros estudos com o mesmo desenho experimental, avaliando as citocinas e adipocinas pró- e anti-inflamatórias, poderiam ajudar a compreender os mecanismos subjacentes à modulação do sistema imune pela nutrição.

## Referências

---

## Referências

- BADR, G. et al. T lymphocytes from malnourished infants are short-lived and dysfunctional cells. **Immunobiology**, v. 216, n. 3, p. 309-315, Mar 2011.
- BAROUKI, R. et al. Developmental origins of non-communicable disease: implications for research and public health. **Environ Health**, v. 11, p. 42, 2012.
- BELAHSEN, R. Nutrition transition and food sustainability. **Proc Nutr Soc**, v. 73, n. 3, p. 385-388, Aug 2014.
- CAVALCANTE, T. C. et al. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. **Lipids**, v. 48, p. 1157–1168, 2013.
- DOAK, C. M. et al. The dual burden household and the nutrition transition paradox. **Int J Obes (Lond)**, v. 29, n. 1, p. 129-136, Jan 2005.
- DU, F.; HIGGINBOTHAM, D. A.; WHITE, B. D. Food Intake, Energy Balance and Serum Leptin Concentrations in Rats Fed Low-Protein Diets. **J. Nutr.**, v. 130, n. 3, p. 514-521, 2000.
- FALCAO-TEBAS, F. et al. Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. **Br J Nutr**, v. 107, n. 3, p. 372-377, Feb 2012.
- FIDALGO, M. et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. **Br J Nutr**, v. 109, n. 3, p. 449-456, Feb 14 2013.
- FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, v. 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BEEDLE, A. S. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **Am J Hum Biol**, v. 19, n. 1, p. 1-19, Jan-Feb 2007.
- GUAN, H. et al. Adipose tissue gene expression profiling reveals distinct molecular pathways that define visceral adiposity in offspring of maternal protein-restricted rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 288, n. 4, p. E663-673, Apr 2005.
- HEILBRONN, L. K.; CAMPBELL, L. V. Adipose tissue macrophages, low grade inflammation and insulin resistance in human obesity. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 12, p. 1225-1230, 2008.
- HOSEA, H. J.; RECTOR, E. S.; TAYLOR, C. G. Dietary repletion can replenish reduced T cell subset numbers and lymphoid organ weight in zinc-deficient and energy-restricted rats. **Br J Nutr**, v. 91, n. 5, p. 741-747, May 2004.

IBGE. PESQUISA DE ORÇAMENTOS FAMILIARES 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil. . [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_encaa/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/default.shtm), 2010. Acesso em: 12 de out.

LEAL, V. S.; LIRA, P. I. C.; MENEZES, R. C. E.; OLIVEIRA, J. S.; COSTA, E. C.; ANDRADE, S. L. L. S. Malnutrition and excess weight in children and adolescents: a review of Brazilian studies. **Rev. Paul. Pediatr.**, v. 30, n. 3, p. 415-422, 2012.

LOPES DE SOUZA, S. et al. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. **Eur J Neurosci**, v. 27, n. 6, p. 1400-1408, Mar 2008.

MORAIS, N. G.; COSTA, T. B.; SEVERO, M. S.; CASTRO, C. M. . Long-term effects of neonatal malnutrition on microbicide response, production of cytokines, and survival of macrophages infected by *Staphylococcus aureus* sensitive/resistant to methicillin. **Rev. Nutr.** , v. 27, n. 5, p. 557-568, 2014.

NOVELLI, E. L. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Lab Anim**, v. 41, n. 1, p. 111-119, Jan 2007.

OUCHI, N. et al. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 2, p. 85-97, Feb 2011.

QASEM, R. J. et al. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. **Physiol Behav**, v. 105, n. 5, p. 1182-1193, Mar 2012.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet **Journal of Nutrition**, v. 127 n. 5 Suppl p. 838S-841S, 1997.

WARNER, M. J.; OZANNE, S. E. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. **Biochem J**, v. 427, n. 3, p. 333-347, May 1 2010.

## Apêndices

---

## APÊNDICE A - Artigo original 1

**Title:** High fat diet potentiates the effects of a perinatal low-protein diet on somatic growth and visceral fat accumulation in rats

**Short-title:** High fat diet potentiates the programming of fat accumulation

### Introduction

Nutritional transition has been observed in middle-income countries, mainly in Latin America, Africa, Middle East, and Asia (1, 2). This phenomenon is linked to increased economic development and urbanization and occurs mainly due to changes in food consumption patterns and physical inactivity (1). While the problems of hunger and undernutrition still affect a significant number of individuals, there is an increase of overnutrition and overweight, causing a dual burden to the healthy public policy (1, 2). In 2010, 171 million of children under 5 years old were stunted worldwide (3). On the other hand, 43 million children of the same age were overweight or obese with 93 million under risk of overweight (2, 4). In developing countries, the prevalence of overweight and obesity in children and adolescents increased from 8.3% in 1980 to 13.2% in 2013 (2). This dual burden of under- and overnutrition can occur in the community, in the same house and even in the same individual at different periods of lifespan (2, 5).

Deficient early nutrition causes reduction on growth, augmented efficiency of fat storage and lower lean mass that is associated with a higher risk to develop chronic disease during adult life (2). Further, the high consumption of a Western diet by low-income population, characterized mainly by industrialized foods rich in fats, refined carbohydrates, added sugars and calories, contributed to the increase of body weight gain and fat accumulation (2, 6). It seems that the association of under- and overnutrition maximizes the risk of metabolic disorders such as obesity, diabetes type II, dyslipidemia, hypertension and cardiovascular disease and it can be understood in the context of the phenotype plasticity (7). Phenotypic plasticity is the ability of a single genotype to induce alternative phenotypes in function of environmental stimuli (8). These physiological adjustments are beneficial at a short-term during development, but at long-term, it can be associated to the early appearance of metabolic diseases (7, 9).

Experimental models have been developed to understand the physiological and morphological impacts of these nutritional environmental changes on phenotypic plasticity (10-12). For example, rats submitted to maternal protein restriction (8% casein) during gestation and lactation and fed a high fat diet (41% fat) post-weaning, presented higher percentage of visceral fat and reduced insulin sensitivity when compared to their pairs (10). Rats submitted to undernutrition during lactation (increase of litter size) followed by high fat diet (32% fat) post weaning presented elevated relative weight of epididymal and retroperitoneal fat and higher plasmatic leptin, insulin and adiponectin than control (12). Maternal food restriction (70% of the control diet) followed by a high fat diet (23% of fat) induced changes in the expression of genes involved in the adipogenesis of pups (11). However, less is known about the effects of a high fat diet during the development and growth of offspring submitted to a protein restriction. Moreover, there are no data concerning to the effects of a high fat diet on food intake, body composition and metabolic profile of rats whose mothers received low protein diet during gestation and lactation.

The present study tested the hypothesis that high-fat diet potentiates the effects of a perinatal low-protein diet on growth-restriction and fat accumulation of offspring during development. Thus, the main goal of this study was to evaluate the effects of a high-fat diet post-weaning on somatic growth, food consumption, fat accumulation and biochemical profile of offspring submitted to a maternal protein restriction.

## **Material and methods**

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Biological Sciences Center (protocol No. 23076.052139/2012-01), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil, and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (13).

### ***Animals and diets***

Virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) and males of the same strain were obtained from the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco. The female rats weighted 220-280g and were 90-120 days old when they mated. The day on which spermatozoa were present in a vaginal smear was designated as the day of conception (day 0 of pregnancy). Pregnant rats were then transferred to individual cages and they were maintained at room temperature of  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$

with a controlled light-dark cycle (dark 06.00–18.00 hours). Pregnant rats were randomly divided in two groups (n=8/each): control (C, fed a normal protein diet with 17% casein during gestation and lactation) and low-protein diet (LP, fed a low-protein diet with 8% casein during gestation and lactation) (AIN-93G) (14). Water and experimental diets were given *ad libitum*. After delivery, offspring were maintained as litters of eight pups (C and LP). At weaning (21 d old), male offspring received commercial standard rodent chow Nuvilab® (CR1 Nuvital Nutrientes S/A, Brazil) or a high fat (HF) diet (Table 1). Then, four groups of male offspring rats (n=11/each) were formed as follow: Control (C, animals fed normal protein diet during gestation and lactation and standard chow post weaning), Low Protein (LP, animals fed low protein diet during gestation and lactation and standard chow post weaning), High Fat (HF, animals fed normal protein diet during gestation and lactation and high fat diet post weaning) and Low Protein-High Fat (LP-HF, animals fed low protein diet during gestation and lactation and high fat diet post weaning). The HF diet consisted of commercial standard chow plus peanuts, milk chocolate, and sweet biscuit in the proportion of 3:2:2:1 (15). The fatty acids composition of HF diet is shown in Table 2. The pups were fed experimental diets until the 60<sup>th</sup> day of life, when they were killed by decapitation.

### ***Mother's body weight and food intake***

The mother's body weight was recorded on day 1, 7, 14, 21 during gestation and lactation. Percentage of body weight gain (% BWG) was calculated as follow:  $[\text{final body weight (g)} \times 100 / \text{initial body weight (g)}] - 100$  (16). Daily food intake was determined by the difference between the amount of food (weight in grams) provided at 09 a.m. and the amount of food (weight in grams) that remained 24 h later (17). Body weight was recorded using a Marte Scale (XL-500, II class) with 0.001g accuracy. The energy intake was calculated by multiplying the amount of food intake during gestation and lactation by the energetic value of both low-protein diet and normal protein diet. Feed Conversion (FC) was calculated as:  $\text{FC} = \text{final body weight} - \text{initial body weight} / \text{total amount of food intake}$  (18).

### ***Offspring's Assessment***

#### ***Somatic growth***

The manipulations were made 24h after birth. All assessments were made between 08.00 and 10.00 hours. Somatic growth was assessed in terms of body weight, tail length, and body length

measurements. During lactation, body weight, tail length, and body length were measured at days 1, 7, 14, and 21 after birth. Percentage of body weight gain was calculated as described above for dams. Body weight of the pups was recorded throughout the experiment with a Marte scale with 0.001g precision. Body length (distance from nose to anus, cm) and tail length (distance from tail tip to tail base, cm) were measured with a digital caliper (Starrett®, Series 799, São Paulo, Brazil) with a 0.01 mm precision (19). At 21 d old, abdominal circumference (immediately anterior to the forefoot, cm); thoracic circumference (immediately behind the foreleg, cm), abdomen-chest ratio (ACR): abdominal circumference (cm) / thoracic circumference (cm), and body mass index (BMI) [body weight (g) / body length (cm)<sup>2</sup>] were all evaluated (20).

Offspring body weight was assessed at 30, 40, 50 and 60 d old. At 60 of age, the percentage of body weight gain, BMI, abdominal circumference, thoracic circumference, and ACR were calculated (20).

#### *Measurement of food intake*

Between days 30 and 36 and days 54 and 60 after birth, pups were housed individually for 7 days. The first three days were designed for adaptation to the cage. Next, animal's daily food consumption was determined by the difference between the amount of food (grams) provided at the onset of the dark cycle and the amount of food (grams) remaining 24 h later (17). Body and food weight were recorded by a Marte Scale (XL-500, II class) with 0.001g accuracy. The energy intake was calculated by multiplying the amount of food intake by the energetic value of both standard chow and high fat diet. On the day 33 until 36 and 57 until 60, it was calculated the % BWG, relative food intake (g/ 100 g of body weight), relative energy intake (cal/ 100 g of body weight), FC and energy efficiency (EE). EE was calculated: final body weight – initial body weight/ total amount of calorie (18).

#### *Biochemical and hormonal assessment*

After fasting (12 h), rats were killed by decapitation, blood samples were collected and centrifuged at 3500 rpm for 10 min to obtain the serum, which was stored at -80 °C for future analysis. Serum glucose, total cholesterol and triglyceride (TG) levels were measured with commercially available kits (Labtest, Minas Gerais, Brazil) using a spectrophotometer Genesys 10s UV-vis (Thermo Scientific™, Amarillo, TX), following the manufacturer instructions. The equation of Friedewald was

used to calculate the levels of very low-density-lipoprotein cholesterol (VLDL-c) (21). All analyses were performed in duplicate. Leptin was analyzed by an enzyme-linked immunosorbent assay using a commercially available kit (Leptin Rat ELISA, Biosource, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) according to the manufacturer's instruction.

#### *Weight of organs*

After blood collection, the abdominal cavity was exposed and liver, heart, spleen, epididymal and retroperitoneal fat pads were removed and weighted using a scale (Marte XL 500, Class II, capacity 500 g with 0.001 g precision) to calculate absolute weight (g) and relative weight (g/ 100 g of body weight).

#### **Statistical Analyses**

During gestation and lactation, the differences between control and low-protein diet were analyzed by Student's T Test. For the analysis of the differences among groups (C, LP, HF and LP-HF), it was used one-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M. Significance was set at  $P < 0.05$ . Data analysis was performed using the statistical program Graphpad Prism 6<sup>®</sup> (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

#### **Results**

During gestation, there were no differences between LP and C dams in terms of body weight, food and energy intake (Table 3). At delivery, the number and birth weight of pups did not change between groups. Throughout lactation, LP dams showed a reduced final body weight and feed conversion (FC) as well as a progressive loss of body weight, both absolute and relative (range of weight). LP pups presented reduced tail length (at 14 d old) and body length (at 14 and 21 d old). BMI, abdominal and thoracic circumferences were reduced in LP pups (Table 3).

Pups from LP mothers showed lower body weight during lactation (Figure 1A) and %BWG (- 45,22%) than C pups (Figure 1B). After weaning, groups were divided according to the consumption of high fat diet. LP and LP-HF pups remained lighter than C until the 60 days of age (Figure 1A). However, between 21 and 60 days old, LP and LP-HF showed a higher %BWG than C (+40,93% and +50,43%, respectively) and LP-HF presented a higher %BWG than HF (+74,83%) (Figure 1B).

From the 33<sup>th</sup> to the 36<sup>th</sup> day of life, animals were evaluated in terms of food intake. LP-HF displayed a lower relative food intake when compared to LP, but energy intake and FC were higher than C and LP pups (Figure 2). From the 57<sup>th</sup> to 60<sup>th</sup> day of life, LP exhibited a higher relative food intake and relative energy intake than C, but FC and EE were similar (Figure 2). On the other hand, during this period, LP-HF pups showed a lower relative food and energy intake compared to LP, but FC was higher than C and LP pups (Figure 2).

At 60 d old, LP pups showed reduced BMI, tail length and body length (Table 4). LP-HF pups did not change when compared to C, except for body length (Table 4). HF and LP-HF pups showed increased weight of retroperitoneal and epididymal fat depots compared to C and LP pups, but serum concentrations of leptin did not differ between groups (Table 4). There were no differences in the biochemical parameters among groups, except for LP pups which presented reduced total cholesterolemia while LP-HF pups exhibited higher levels (Table 4).

## Discussion

Many studies have demonstrated that malnutrition occurring during the early life development induces physiological and homeostatic set points in the organism as a strategy for survival (7, 16, 22, 23). These changes are well characterized in terms of growth trajectory, alterations of food intake and metabolic disorders (16, 22, 24-26). According to previous studies, our results demonstrated that pups submitted to maternal protein restriction during gestation and lactation show both reduced body weight and somatic growth, increased food intake and biochemical alterations. However, when caloric and palatable foods were provided to these animals, the effects on fat accumulation, food intake and lipid profile were heightened, as seen in previous studies (7, 9, 10). In fact, our results demonstrated that the intake of high fat diet post weaning increased body weight, BMI, retroperitoneal and epididymal fat pads and total cholesterol in LP pups. Therefore, it suggests that although the organisms try to adapt to these different environments, the metabolic load generated by the low lean mass and high fat mass is higher than the metabolic capacity acquired during fetal life, increasing the risk of diseases (27, 28). The effects of programming on the susceptibility to visceral fat accumulation and the increase on the risk of metabolic disorders were elevated in pups from protein-restricted dams during gestation and lactation.

During gestation, LP dams showed no change in body weight gain, food and energy intake,

birth weight and litter number. Previous studies have found that mother's body weight gain and pup's birth weight were reduced, but the number of pups was maintained (22, 29, 30). At the end of lactation, it was observed that prolonged consumption of a low protein diet resulted in lower body weight and FC in LP dams, despite of a similar food intake. The reduction of maternal body weight during lactation and the repercussion on offspring growth are in accordance with previous studies (31). This deficit in offspring's growth patterns can be associated with hormonal alterations, such as reduced insulin-like growth factor concentration (IGF-1) and growth hormone (GH) mRNA expression (32).

At weaning, protein restricted pups were submitted to a HF diet. At 60 d old, LP pups presented lower body weight, BMI and body length than C. The consumption of high fat diet amplified these effects when compared to LP. One previous study verified that rats submitted to perinatal protein restriction (8% protein) followed by HF diet (41% of total calories from fat, 42% carbohydrates and 17% protein) post weaning did not present higher body weight at the same age, but showed higher percentage of body weight gain than C and HF groups (10). LP-HF pups exhibited lower relative food intake than LP, while the relative energy intake and FC were higher than C and LP pups. These results can be attributed to the hypercaloric nature of HF diet (4.75 cal/g vs 3.61 cal/g) (33). Diets containing 30% or more of energy derived from fat induce obesity in rodents as a result of increased energy intake and efficiency of energy storage (34, 35).

There was a reduction in food intake, thus, these results can be attributed to a high energy density of high fat diet (35). Other important factor that contributes to HF diet-induced obesity is the higher energy efficiency of fat. The oxidation of protein and carbohydrate sets spontaneously according to the proportion of these nutrients on diet, increasing with the overfeeding (36). On the other hand, it does not occur with lipids, as fat overfeeding had small effects on oxidation and total energy expenditure (34). Diet-induced thermogenesis (DIT) is also important to energetic balance regulation and may influence the energy expenditure and the accumulation of fat in HF animals (35). In a mixed diet, DIT may represent an energy expenditure of 10% to 15% of the their caloric content (36). However, when evaluated separately, protein, carbohydrate and lipid present an energy expenditure generated by DIT of 20% to 30%, 5% to 10%, and 0% to 3% of total calories ingested, respectively (36). These mechanisms could explain the metabolic effects of HF diet on fat accumulation in HF animals.

In the present study, LP-HF and LP pups presented elevated relative energy intake, which

contributed to the high percentage of body weight gain from 21 to 60 d old, although somatic growth remained low. The complex control of food intake and energy metabolism in mammals depends on the ability of the hypothalamus to integrate multiple signals, indicating the nutritional state and the energy level of the organism (37). This would produce appropriate responses in terms of food intake, energy expenditure, and metabolic activity, maintaining homeostasis (37). LP diet consumption results in reduced activation of the satiety centers, reverberating in a higher food intake (33, 38). This may be associated with increased hypothalamic gene expression of orexigenic neuropeptides such as neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP) in LP pups (33, 39). These neuropeptides are decreased in offspring fed HF diet (33), as an adaptive mechanism to reduce the body weight gain (33, 40). Mice submitted to prolonged consumption of HF diet after protein restriction showed reduced hypothalamic gene expression of NPY and AgRP compared to LP pups, but there was no difference in gene expression of anorexigenic neuropeptides cocaine- and amphetamine-regulated transcript (CART) and pro-opiomelanocortin (POMC) (33). This suggests that perinatal protein restriction can lead to differential adaptive responses to HF diet in feeding behavior (33). Neuropeptides that regulates feeding behavior may have an important role on the food consumption to meet the requirements of energy and nutrients according to the composition of diet.

Leptin is an important hormone produced by the adipose tissue that acts as a satiety signal for the central nervous system through the leptin receptor (Ob-Rb). This results in a reduced appetite and higher energy expenditure (12). In rats, prolonged consumption of high fat diet increases adipose tissue quantity and leptin levels (15, 41), while protein restriction decreases leptin concentration in offspring (16, 22). In the present study, leptin serum concentration did not differ among groups, even though LP-HF pups presented a high percentage of retroperitoneal and epididymal fat compared to C and LP pups. A previous study has found that animals submitted to maternal protein restriction exhibited a reduction in serum leptin concentrations compared to C, and the consumption of HF diet was not able to increase the leptin concentration in these animals (10). Likewise, the biochemical profile did not change, except for a reduction in total cholesterol in LP pups followed by an increase in response to HF diet. A previous study found that mice submitted to protein restriction diet presented no alterations in cholesterol and glucose, but higher levels of these biochemical parameters when they were submitted to a high fat diet (33).

## Conclusions

In this study, rats submitted to a maternal low protein diet during gestation and lactation were challenged with a HF diet post weaning to evaluate the effects of fat overconsumption on parameters of growth, food intake and metabolism. We observed that HF diet intake boosted body weight, somatic growth, feed conversion and visceral fat accumulation in rats previously submitted to protein restriction. It demonstrates also that both perinatal and post-natal nutrition are important to the healthy and suitable development of rats. However, the dual burden in the same organism can potentiate the risk of metabolic disease. More studies with the same design and prolonged exposure to a high fat diet are necessary to investigate the underlying mechanism that could be mediating these alterations. The results would be helpful to suggest mechanisms for intervention including balanced diets to promote a suitable growth and development for children that were undernourished during perinatal life.

## Acknowledgments

This research was supported by the Foundation to Support Science and Research in Pernambuco State - Brazil (FACEPE), CAPES and the National Council for Research - Brazil (CNPq).

The authors declare that there are no conflicts of interest

## References

1. Belahsen R. Nutrition transition and food sustainability. *Proc Nutr Soc.* 2014;73(3):385-8.
2. Tzioumis E, Adair LS. Childhood dual burden of under- and overnutrition in low- and middle-income countries: a critical review. *Food Nutr Bull.* 2014;35(2):230-43.
3. de Onis M, Blossner M, Borghi E. Prevalence and trends of stunting among pre-school children, 1990-2020. *Public Health Nutr.* 2012;15(1):142-8.
4. de Onis M, Blossner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(5):1257-64.
5. Doak CM, Adair LS, Bentley M, Monteiro C, Popkin BM. The dual burden household and the nutrition transition paradox. *Int J Obes (Lond).* 2005;29(1):129-36.
6. Popkin BMA, L. S.; Wen Ng, S. NOW AND THEN: The Global Nutrition Transition: The Pandemic of Obesity in Developing Countries. *Nutr Rev.* 2012;70(1): 3–21.
7. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol.* 2007;19(1):1-19.

8. West-Eberhard MJ. Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 2005;304(6):610-8.
9. Bateson P, Barker D, Clutton-Brock T, Deb D, D'Udine B, Foley RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature.* 2004;430(6998):419-21.
10. Gosby AK, Maloney CA, Caterson ID. Elevated insulin sensitivity in low-protein offspring rats is prevented by a high-fat diet and is associated with visceral fat. *Obesity (Silver Spring).* 2010;18(8):1593-600.
11. Lukaszewski MA, Mayeur S, Fajardy I, Delahaye F, Dutriez-Casteloot I, Montel V, et al. Maternal prenatal undernutrition programs adipose tissue gene expression in adult male rat offspring under high-fat diet. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2011;301(3):E548-59.
12. Prior LJ, Velkoska E, Watts R, Cameron-Smith D, Morris MJ. Undernutrition during suckling in rats elevates plasma adiponectin and its receptor in skeletal muscle regardless of diet composition: a protective effect? *Int J Obes (Lond).* 2008;32(10):1585-94.
13. Bayne K. Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. *Physiologist.* 1996;39(4):199, 208-11.
14. Reeves PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.* 1997;127(5 Suppl):838S-41S.
15. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition.* 2004;20(2):218-24.
16. Fidalgo M, Falcao-Tebas F, Bento-Santos A, de Oliveira E, Nogueira-Neto JF, de Moura EG, et al. Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal moderate-low physical training. *Br J Nutr.* 2013;109(3):449-56.
17. Lopes de Souza S, Orozco-Solis R, Grit I, Manhaes de Castro R, Bolanos-Jimenez F. Perinatal protein restriction reduces the inhibitory action of serotonin on food intake. *Eur J Neurosci.* 2008;27(6):1400-8.
18. Cavalcante TCFS, J. M. L.; Silva, A. A. M.; Muniz, G. S.; Luz, L. M.; Lopes de Souza, S.; Manhães de Castro, R.; Ferraz, K. M.; Nascimento, E. Effects of a Westernized Diet on the Reflexes and Physical Maturation of Male Rat Offspring During the Perinatal Period. *Lipids.* 2013;48:1157–68.
19. Silva HJM, Marinho, S. M. O. C.; Silva, A. E. T. M.; Albuquerque, C. G.; Moraes, S. R. A.; Manhães de Castro, R. Protocol of Mensuration to Avaliation of Indicators of Somatic Development of Wistar Rats. *Int J Morphol.* 2005;23(3):227-30.
20. Novelli EL, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41(1):111-9.
21. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972;18(6):499-502.
22. Qasem RJ, Yablonski E, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'Mello A P. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. *Physiol Behav.* 2012;105(5):1182-93.
23. Leandro CG, da Silva Ribeiro W, Dos Santos JA, Bento-Santos A, Lima-Coelho CH, Falcao-Tebas F, et al. Moderate physical training attenuates muscle-specific effects on fibre type composition in adult rats submitted to a perinatal maternal low-protein diet. *European journal of nutrition.* 2012;51(7):807-15.

24. Moita L, Lustosa MF, Silva AT, Pires-de-Melo IH, de Melo RJ, de Castro RM, et al. Moderate physical training attenuates the effects of perinatal undernutrition on the morphometry of the splenic lymphoid follicles in endotoxemic adult rats. *Neuroimmunomodulation*. 2010;18(2):103-10.
25. Ravelli AC, van der Meulen JH, Michels RP, Osmond C, Barker DJ, Hales CN, et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *Lancet*. 1998;351(9097):173-7.
26. Sandboge S, Moltchanova E, Blomstedt PA, Salonen MK, Kajantie E, Osmond C, et al. Birth-weight and resting metabolic rate in adulthood - sex-specific differences. *Annals of medicine*. 2012;44(3):296-303.
27. Wells JC. Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. *Am J Hum Biol*. 2010;22(1):1-17.
28. Alheiros-Lira MC, Araujo LL, Trindade NG, da Silva EM, Cavalcante TC, de Santana Muniz G, et al. Short- and long-term effects of a maternal low-energy diet ad libitum during gestation and/or lactation on physiological parameters of mothers and male offspring. *Eur J Nutr*. 2015;54(5):793-802.
29. Falcao-Tebas F, Bento-Santos A, Fidalgo MA, de Almeida MB, dos Santos JA, Lopes de Souza S, et al. Maternal low-protein diet-induced delayed reflex ontogeny is attenuated by moderate physical training during gestation in rats. *Br J Nutr*. 2012;107(3):372-7.
30. Aragão RSGn-Q, O.; Perez-Garcia, G.; Toscano, A. E.; Gois Leandro, C.; Manhães-de-Castro, R.; Bolaños-Jimenez, F. Differential developmental programming by early protein restriction of rat skeletal muscle according to its fibre-type composition. *Acta Physiologica*. 2014;210:70-83.
31. Moretto VL, Ballen MO, Goncalves TS, Kawashita NH, Stoppiglia LF, Veloso RV, et al. Low-Protein Diet during Lactation and Maternal Metabolism in Rats. *ISRN obstetrics and gynecology*. 2011;2011:876502.
32. de Moura EG, Lisboa PC, Custodio CM, Nunes MT, de Picoli Souza K, Passos MC. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2007;18(2):134-9.
33. Camargo RL, Batista TM, Ribeiro RA, Branco RC, Da Silva PM, Izumi C, et al. Taurine supplementation preserves hypothalamic leptin action in normal and protein-restricted mice fed on a high-fat diet. *Amino Acids*. 2015;47(11):2419-35.
34. Hill JO, Melanson EL, Wyatt HT. Dietary fat intake and regulation of energy balance: implications for obesity. *J Nutr*. 2000;130(2S Suppl):284S-8S.
35. Hariri N, Thibault L. High-fat diet-induced obesity in animal models. *Nutr Res Rev*. 2010;23(2):270-99.
36. Hermsdorff HH, Volp AC, Bressan J. [Macronutrient profile affects diet-induced thermogenesis and energy intake]. *Arch Latinoam Nutr*. 2007;57(1):33-42.
37. Magni P, Dozio E, Ruscica M, Celotti F, Masini MA, Prato P, et al. Feeding behavior in mammals including humans. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1163:221-32.
38. Du FH, D. A.; White, B. D. Food Intake, Energy Balance and Serum Leptin Concentrations in Rats Fed Low-Protein Diets. *J Nutr*. 2000;130(3):514-21.
39. Orozco-Solis R, Lopes de Souza S, Barbosa Matos RJ, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, et al. Perinatal undernutrition-induced obesity is independent of the developmental programming of feeding. *Physiology & behavior*. 2009;96(3):481-92.
40. Levin BE, Dunn-Meynell AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002;283(4):R941-8.

41. Estadella D, Oyama LM, Bueno AA, Habitante CA, Souza GI, Ribeiro EB, et al. A palatable hyperlipidic diet causes obesity and affects brain glucose metabolism in rats. *Lipids Health Dis.* 2011;10:168.

**Table 1** Table of chemical composition of high fat diet and standard chow used in experiments

| Chemical composition                      | Standard chow * | High fat diet |
|-------------------------------------------|-----------------|---------------|
| Protein (N x 6,25) (g/100g)               | 22,51           | 19,02         |
| Carbohydrate (g/100g)                     | 56,30           | 46,33         |
| Lipids (g/100g)                           | 5,12            | 23,84         |
| Humidity and volatile substances (g/100g) | 9,26            | 2,81          |
| Ashes (g/100g)                            | 6,81            | 8,00          |
| Total energy (cal/g)                      | 3,61            | 4,75          |
| Protein (% TEV)                           | 24,92           | 15,98         |
| Carbohydrate (% TEV)                      | 62,33           | 38,94         |
| Lipid (% TEV)                             | 12,75           | 45,08         |

\* Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrients S/A, Brazil)

**Table 2** Fatty acids composition of high fat diet

| <b>Fatty acids (g/100g)</b> |              |
|-----------------------------|--------------|
| <b>Saturated</b>            | <b>6.97</b>  |
| C 8:0                       | 0.02         |
| C 10:0                      | 0.02         |
| C 12:0                      | 0.23         |
| C 14:0                      | 0.15         |
| C 16:0                      | 3.52         |
| C 17:0                      | 0.03         |
| C 18:0                      | 2.12         |
| C 20:0                      | 0.24         |
| C 22:0                      | 0.40         |
| C 24:0                      | 0.24         |
| <b>Monounsaturated</b>      | <b>11.76</b> |
| C 16:1n7                    | 0.03         |
| C 17:1                      | 0.02         |
| C 18:1n9                    | 11.49        |
| C 20:1n11                   | 0.21         |
| C 22:1                      | 0.02         |
| <b>Polyunsaturated</b>      | <b>4.32</b>  |
| C 18:2n6                    | 4.22         |
| C 18:3n3 $\alpha$           | 0.10         |
| C 18:2n6/ C 18:3n3 $\alpha$ | 42.20        |
| <b>Trans</b>                | N.D. < 0.01  |

N.D. = non detectable

**Table 3.** Effects of maternal low-protein diet on nutritional parameters of dams and pups until lactation

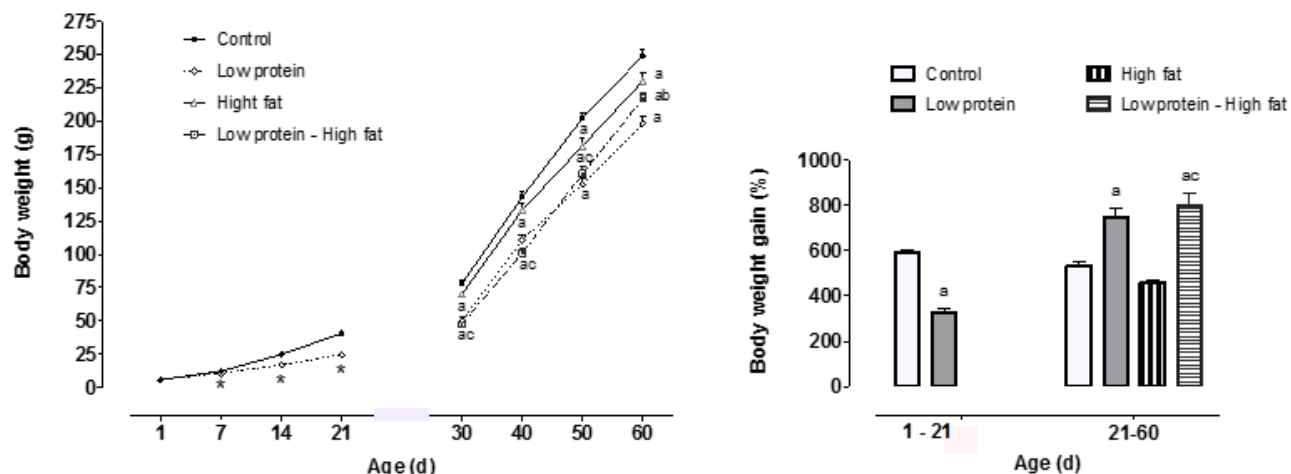
|                              | Age (d) | Groups    |         |         |        |            |         |         |        | p           |
|------------------------------|---------|-----------|---------|---------|--------|------------|---------|---------|--------|-------------|
|                              |         | C (n = 8) |         |         |        | LP (n = 8) |         |         |        |             |
|                              |         | Mean      | Min     | Max     | SEM    | Mean       | Min     | Max     | SEM    |             |
| <b>Gestation</b>             |         |           |         |         |        |            |         |         |        |             |
| Initial body weight (g)      |         | 236,00    | 200,00  | 282,00  | 9,75   | 237,11     | 217,00  | 250,00  | 4,54   | 0,92        |
| Final body weight (g)        |         | 323,69    | 277,00  | 369,00  | 12,42  | 329,06     | 301,00  | 359,00  | 8,86   | 0,73        |
| Range of weight (g)          |         | 87,69     | 69,00   | 121,00  | 6,59   | 91,94      | 65,00   | 112,00  | 6,32   | 0,65        |
| Range of weight (%)          |         | 37,45     | 26,04   | 49,59   | 2,87   | 38,76      | 26,00   | 45,48   | 2,46   | 0,72        |
| Food intake (g)              |         | 411,16    | 353,23  | 462,22  | 16,59  | 398,92     | 319,35  | 479,38  | 21,73  | 0,68        |
| Energy intake (kcal)         |         | 1480      | 1271,63 | 1663,99 | 59,72  | 1436       | 1149,66 | 1725,77 | 78,22  | 0,68        |
| FC                           |         | 0,21      | 0,16    | 0,28    | 0,02   | 0,23       | 0,17    | 0,27    | 0,01   | 0,35        |
| Birth weight (g)             |         | 5,94      | 5,16    | 7,08    | 0,10   | 5,88       | 5,08    | 6,62    | 0,08   | 0,64        |
| Number of pups               |         | 8,50      | 6,00    | 11,00   | 0,73   | 10,00      | 9,00    | 12,00   | 0,42   | 0,10        |
| <b>Lactation</b>             |         |           |         |         |        |            |         |         |        |             |
| Initial body weight (g)      |         | 273,17    | 222,00  | 312,00  | 13,19  | 258,85     | 239,00  | 282,00  | 6,28   | 0,31        |
| Final body weight (g)        |         | 264,90    | 217,00  | 301,00  | 11,24  | 218,45     | 170,00  | 253,00  | 9,47   | <b>0,01</b> |
| Range of weight (g)          |         | -8,27     | -23,00  | 2,40    | 3,83   | -40,40     | -69,00  | -4,40   | 7,64   | <b>0,01</b> |
| Range of weight (%)          |         | -2,86     | -7,74   | 0,90    | 1,29   | -15,64     | -28,87  | -1,77   | 3,04   | <b>0,00</b> |
| Food intake (g)              |         | 650,11    | 491,74  | 764,39  | 30,01  | 554,55     | 426,48  | 730,49  | 38,80  | 0,07        |
| Energy intake (kcal)         |         | 2340,40   | 1770,26 | 2751,80 | 108,05 | 1996,38    | 1535,33 | 2629,76 | 139,67 | 0,07        |
| FC                           |         | -0,01     | -0,03   | 0,00    | 0,01   | -0,08      | -0,14   | -0,01   | 0,02   | <b>0,02</b> |
| <b>Pups</b>                  |         |           |         |         |        |            |         |         |        |             |
| Tail length (cm)             | 1       | 1,65      | 1,50    | 2,00    | 0,02   | 1,64       | 1,50    | 1,80    | 0,01   | 0,65        |
|                              | 7       | 2,72      | 2,00    | 3,50    | 0,07   | 2,65       | 2,30    | 3,00    | 0,04   | 0,39        |
|                              | 14      | 4,28      | 3,50    | 5,00    | 0,08   | 3,63       | 3,00    | 4,10    | 0,06   | <b>0,00</b> |
|                              | 21      | 5,87      | 4,90    | 6,90    | 0,10   | 5,26       | 3,80    | 5,50    | 0,59   | 0,28        |
| Body length (cm)             | 1       | 5,18      | 4,80    | 5,70    | 0,05   | 5,14       | 4,90    | 5,30    | 0,02   | 0,45        |
|                              | 7       | 6,72      | 6,00    | 7,40    | 0,08   | 6,57       | 6,00    | 7,00    | 0,04   | 0,10        |
|                              | 14      | 8,86      | 7,30    | 9,90    | 0,12   | 7,84       | 6,80    | 8,90    | 0,10   | <b>0,00</b> |
|                              | 21      | 11,36     | 9,30    | 12,80   | 0,14   | 9,57       | 7,90    | 11,30   | 0,19   | <b>0,00</b> |
| BMI                          | 21      | 0,32      | 0,25    | 0,44    | 0,01   | 0,27       | 0,23    | 0,34    | 0,01   | <b>0,00</b> |
| Abdominal circumference (cm) | 21      | 7,09      | 6,00    | 8,50    | 0,22   | 6,32       | 5,20    | 7,00    | 0,13   | <b>0,00</b> |
| Thoracic circumference (cm)  | 21      | 7,35      | 6,50    | 8,60    | 0,16   | 6,45       | 5,80    | 7,30    | 0,11   | <b>0,00</b> |
| ACR                          | 21      | 0,97      | 0,81    | 1,12    | 0,03   | 0,98       | 0,74    | 1,17    | 0,03   | 0,82        |

During gestation and lactation, the dams and pups were fed either a normal or low-protein diet. C= normal protein diet in gestation and lactation; LP= low protein diet in gestation and lactation. Statistical analyses using T Test. Data expressed in mean  $\pm$  SEM. N = 8 dams for each group; n = 26 pups for each group. FC= Feed conversion (g wt gain/ g food); BMI = Body mass index; ACR = Abdomen-chest ratio

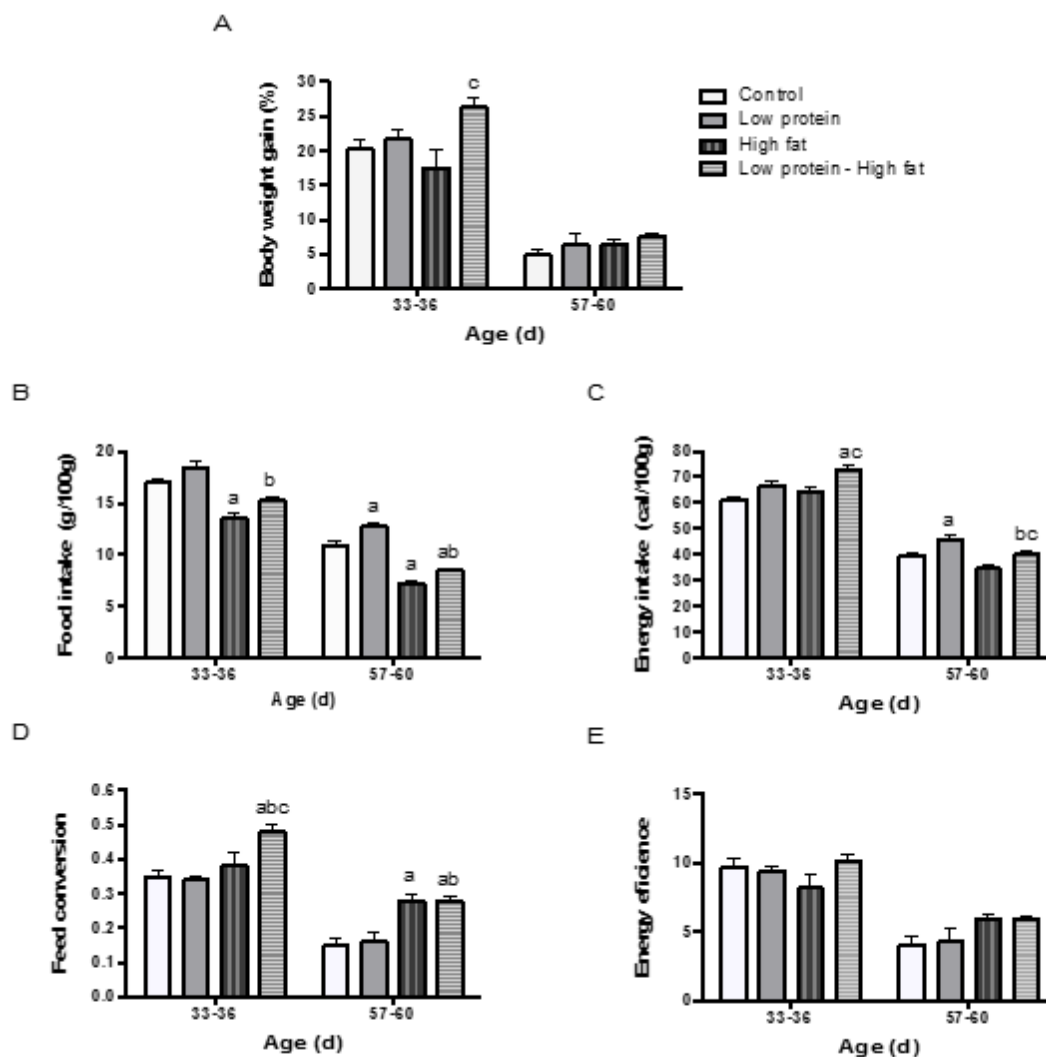
**Table 4.** Somatic growth measurements, organs weight, biochemical and hormonal parameters of pups at 60 days old

|                                            | Groups |      |                    |      |                   |      |                     |      |      |
|--------------------------------------------|--------|------|--------------------|------|-------------------|------|---------------------|------|------|
|                                            | C      |      | LP                 |      | HF                |      | LP-HF               |      | p    |
|                                            | Mean   | SEM  | Mean               | SEM  | Mean              | SEM  | Mean                | SEM  |      |
| <b>Somatic growth</b>                      |        |      |                    |      |                   |      |                     |      |      |
| BMI                                        | 0,52   | 0,01 | 0,48 <sup>a</sup>  | 0,01 | 0,49              | 0,01 | 0,52 <sup>b</sup>   | 0,01 | 0,00 |
| Tail length (cm)                           | 15,63  | 0,31 | 14,26 <sup>a</sup> | 0,23 | 16,68             | 0,25 | 15,32 <sup>c</sup>  | 0,31 | 0,00 |
| Body length (cm)                           | 21,8   | 0,22 | 20,35 <sup>a</sup> | 0,16 | 21,55             | 0,25 | 20,22 <sup>ac</sup> | 0,31 | 0,00 |
| Abdomen-chest ratio (cm)                   | 1,06   | 0,02 | 1,03               | 0,02 | 1,03              | 0,01 | 1,04                | 0,01 | 0,54 |
| <b>Organs weight</b>                       |        |      |                    |      |                   |      |                     |      |      |
| Liver (g/100g)                             | 3,45   | 0,07 | 3,57               | 0,06 | 3,46              | 0,08 | 3,57                | 0,06 | 0,41 |
| Retroperitoneal fat (g/100g)               | 0,96   | 0,08 | 0,93               | 0,07 | 1,63 <sup>a</sup> | 0,07 | 1,55 <sup>ab</sup>  | 0,07 | 0,00 |
| Epididymal fat (g/100g)                    | 0,97   | 0,10 | 1,05               | 0,06 | 1,34 <sup>a</sup> | 0,05 | 1,61 <sup>ab</sup>  | 0,09 | 0,00 |
| Heart (g/100g)                             | 0,42   | 0,01 | 0,44               | 0,01 | 0,43              | 0,01 | 0,46                | 0,02 | 0,18 |
| Spleen (g/100g)                            | 0,20   | 0,01 | 0,26               | 0,02 | 0,27              | 0,02 | 0,32 <sup>a</sup>   | 0,03 | 0,00 |
| <b>Biochemical and hormonal parameters</b> |        |      |                    |      |                   |      |                     |      |      |
| Glucose (mg/dL)                            | 97,93  | 1,51 | 93,62              | 2,61 | 97,30             | 2,28 | 92,16               | 2,61 | 0,20 |
| Triglycerides (mg/dL)                      | 35,07  | 2,07 | 39,15              | 1,97 | 39,01             | 1,93 | 40,23               | 1,81 | 0,25 |
| Total cholesterol (mg/dL)                  | 65,36  | 3,71 | 51,26 <sup>a</sup> | 1,40 | 69,39             | 3,69 | 69,27 <sup>b</sup>  | 2,24 | 0,00 |
| VLDL-c (mg/dL)                             | 7,01   | 0,41 | 7,83               | 0,39 | 7,80              | 0,39 | 8,05                | 0,36 | 0,24 |
| Leptin (ng/ml)                             | 1,62   | 0,35 | 0,94               | 0,09 | 1,63              | 0,34 | 1,70                | 0,45 | 0,53 |

C = Control group (pups of mothers that received normal protein diet during gestation and lactation and standard chow after weaning); LP = Low protein group (pups of mothers that received low protein diet during gestation and lactation and standard chow after weaning); HF = High fat group (pups of mothers that received normal protein diet during gestation and lactation and high fat diet after weaning); LP-HF = Low protein-high fat group (pups of mothers that received low protein diet during gestation and lactation and high fat diet after weaning). BMI = Body mass index. Data expressed in mean  $\pm$  SEM. a  $p < 0.05$  vs C; b  $p < 0.05$  vs LP; c  $p < 0.05$  vs HF using One-way Anova followed by Bonferroni's post hoc test.



**Fig. 1** Body weight and percentage of body weight gain of pups during lactation and from weaning to 60 days. A - Body weight of pups. B – Percentage of body weight gain of pups. Data expressed in mean  $\pm$  SEM. a  $p < 0.05$  vs C; b  $p < 0.05$  vs LP; c  $p < 0.05$  vs HF using One-way Anova followed by Bonferroni's post hoc test.



**Fig. 2** Body weight gain and food intake of pups during two different periods of evaluation. A – Percentage of body weight gain; B – Relative food intake; C – Relative energy intake; D – Feed conversion (g wt gain/ g food); E – Energy efficiency [(g wt gain/ cal ingested) x 100]. Data expressed in mean  $\pm$  SEM. a  $p < 0.05$  vs C; b  $p < 0.05$  vs LP; c  $p < 0.05$  vs HF using One-way Anova followed by Bonferroni's post hoc test.

## APÊNDICE B - Artigo original 2

**Title of paper:** High-fat diet does not change peritoneal macrophage functions of young rats submitted to maternal low-protein diet

**Running-title:** High fat diet and macrophage functions

### Introduction

In epidemiological, experimental and clinical studies, it has been shown that undernutrition, immunosuppression and infectious diseases exist simultaneously. Particularly, malnutrition during pregnancy and lactation may compromise both adaptive and innate immunity in pups during growth and adulthood. Maternal protein restriction reduced number of T lymphocytes and antibody responses to vaccination [1-3]. Neonatal undernutrition (multideficient diet with 7% of protein) induced a reduced nitric oxide release by alveolar macrophage *in vitro* of adult rats [4]. Likewise, previous studies have shown that maternal low-protein diet is related to impaired spreading, phagocytosis and microbicide functions of macrophages facing an immune challenge [5, 6].

The consequences of maternal undernutrition can be potentiated by the consumption of a high fat diet. Indeed, continuous intake of high fat diet can promote hypertrophy and dysfunction of adipocytes. It may induce infiltration of pro-inflammatory macrophages in adipose tissue, enhancing the production of pro-inflammatory cytokines in this tissue [7]. It may contribute to the appearance of chronic low-grade inflammation observed in obese individuals [7]. Phagocytosis consist in a process of recognition and ingestion of particle that results in the activation of the respiratory burst and production of reactive oxygen and nitrogen species with important cytolytic properties [8]. Production of

nitric oxide (NO) is also an effector function of activated macrophages to kill pathogens [4]. There are no studies evaluating the effects of a perinatal low protein diet and a post weaning high-fat diet on the innate immune response of rats.

Thus, this study tested the hypothesis that the consumption of a high fat diet post weaning potentiates the effects of a maternal protein restriction on function of peritoneal macrophages of rats. The main goal of the present study was to evaluate the phagocytosis rate and the production of nitric oxide by peritoneal macrophages of young rats submitted to a maternal low-protein diet followed by a high fat diet.

## Methods

### *Animals and diets*

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee of the Biological Sciences Center (protocol no. 23076.052139/2012-01), Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil, and followed the Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [9]. Pregnant rats were randomly divided in two groups (n=8/each): control (C, fed a normal protein diet with 17% casein during gestation and lactation) and low-protein diet (LP, fed a low-protein diet with 8% casein during gestation and lactation) (AIN-93G) [10]. Water and experimental diets were given *ad libitum*. At delivery, offspring were maintained as litters of eight pups (C and LP). At weaning (21 d old), male offspring remained in the experiment and fed either commercial standard chow for rodents Nuvilab® (CR1 Nuvital Nutrientes S/A, Brazil) or high fat (HF) diet, and four groups (n=11/each) were formed: Control (C, animals fed normal protein diet during gestation and lactation and standard chow post weaning), Low Protein (LP, animals fed low protein diet during gestation and lactation and standard chow post weaning), High Fat (HF, animals fed normal protein diet during gestation and lactation and high fat diet post weaning) and Low Protein -High Fat (LP-HF,

animals fed low protein diet during gestation and lactation and high fat diet post weaning). The HF diet consisted of commercial standard chow plus peanuts, milk chocolate, and sweet biscuit in the proportion of 3:2:2:1 [11]. It contained 4.75 cal/g and 45.08% of total calories from lipids. The fatty acids composition of HF diet consisted of 6.97 g/100g of saturated fatty acids, 11.76 g/100g of monounsaturated fatty acids and 4.32 g/100g of polyunsaturated fatty acids. The ratio of omega-6: omega-3 was 42:1. The pups fed experimental diets until the 60th d of life, when they were killed by decapitation.

#### *Peritoneal Lavage*

After decapitation, male rats received an intraperitoneal injection of 20 mL of phosphate buffered saline. Peritoneal macrophages were harvest in tubes with RPMI 1640 (Vitrocell, Campinas, SP, Brazil) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and then the samples were centrifuged at 300 *g* for 10 min at 4°C to obtain pellet. Cells were suspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS. More than 98% of peritoneal macrophages were viable as indicated by the trypan blue exclusion test.

#### *Phagocytosis assay*

Peritoneal macrophages ( $1 \times 10^6$ ) were incubated for 40 min at 37°C in 1 ml RPMI 1640 with opsonized particles of zymosan (zymosan A of *Saccharomyces cerevisiae* – Sigma Z-4250; Sigma, St. Louis, Mo., USA). The particles ( $1 \times 10^7$ ) were opsonized by incubation in the presence of control rat serum for 40 min at 37°C. The phagocytic capacity was defined as the number of macrophages that internalized 3 or more zymosan particles. The results were then reported as percentage of phagocytic macrophages. At least 100 cells were counted in each coverslip [8].

### *Nitric Oxide (NO) Assay*

Peritoneal macrophages were placed in a culture plate with RPMI 1640 with 10% FCS ( $1 \times 10^6$ /well) and were stimulated with 1 ng/mL/well of lipopolysaccharide (LPS, Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* - Sigma L2880, Sigma, St. Louis, Mo., USA) and 5 ng/mL/well of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (Interferon gamma from rat - Sigma I3275, USA). Cells were incubated for 24 h at 37° C and 5% CO<sub>2</sub> to induce NO production [4]. NO release was measured indirectly using a quantitative colorimetric assay based on the Griess reaction [12]. In the present study, duplicate 100  $\mu$ L aliquots of cell culture supernatants were incubated with 100  $\mu$ L of freshly prepared Griess reagent (1% sulfanilamide in 5% o-phosphoric acid, 0.1% naphthylethylene diamide dihydrochloride) at room temperature for 10 min. The absorbance of the azochromophore was measured at 550 nm (Bel Photonics 1105, Tecnal, Piracicaba, SP, Brazil). The NO concentration was determined using sodium nitrite as a standard (0–35  $\mu$ M). All samples were assayed against a blank comprising RPMI 1640 with 10% FCS incubated for 24 h in the same plates as the samples, but in the absence of cells [4]. All reagents were purchased from Sigma-Aldrich. The results were expressed in micromoles of NO per  $1 \times 10^6$  cells.

### *Statistical analyses*

Results from phagocytosis assay and NO release by peritoneal macrophages were analyzed by one-way ANOVA and Bonferroni's *post hoc* test. In NO assay, Student T test was used to evaluate stimulated vs baseline macrophages. Values are presented as means  $\pm$  S.E.M. Significance was set at  $P < 0.05$ . Data analysis was performed using the statistical program Graphpad Prism 6<sup>®</sup> (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

## Results and discussion

To describe the role of macrophages in impaired host defense under maternal protein malnutrition followed by the consumption of HF diet, we examined the activities of the phagocytosis and NO production in peritoneal resident macrophages. Macrophages from LP pups showed a higher phagocytosis rate than C (Figure 1). In contrast, previous studies had found that macrophage from undernourished animals showed reduced phagocytosis [5, 6]. Different experimental models of diet and the period of time of protein restriction (gestation, lactation or both) can explain the divergence among findings. However, the extent of tissue inflammation that develops as the consequence of an innate immune response is determined in large part by the balance between pro-inflammatory and anti-inflammatory macrophages [13]. Resident tissue macrophages play an important anti-inflammatory role in constructive processes like wound healing and tissue repair, and turn off damaging immune system activation by producing anti-inflammatory cytokines [14, 15]. Our results confirm that the phagocytic function of macrophages is susceptible to maternal protein restriction, and suggest that functional alterations of macrophages (more pro-inflammatory) may be involved in the failure of development of a specific immune response. This imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory response seems to actively promote tumor growth [14].

Animals that consumed a HF diet from weaning until 60<sup>th</sup> day of life, regardless to the maternal protein restriction, showed no effects on phagocytosis rate of peritoneal macrophages. Accordingly, previous study showed that HF diet for 12 weeks did not change systemic markers of inflammation (interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and plasminogen activator inhibitor-1) that can activate the phagocytic activity of macrophages [16]. It was interesting to observe that HF diet blunted the phagocytosis rate of peritoneal macrophages in rats submitted to a maternal LP-diet. We can suggest that HF diet may

modulate the secretion of immunomodulators such as cytokines and hormones that regulate macrophage functions. It is well established that a HF diet can lead to increased levels of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 resulting in increased NF- $\kappa$ B and inhibition of PPAR- $\gamma$  [17]. In addition, leptin has been shown as an important hormone involved in the up-regulation of the inflammatory immune responses [18, 19]. In this study, there was an increase in epididymal and retroperitoneal fat depots without correspondent increase of leptin serum concentration (data not shown).

At baseline, macrophages from LP pups showed an increase in the NO production (Figure 2). Previous studies showed that resident macrophages from the low-protein diet groups release larger amounts of superoxide anion and nitric oxide [6, 20]. The enhanced production of oxygen intermediates by macrophages may augment tissue damage extending the inflammation as a consequence of an up-regulation of an innate immune response [20]. Macrophages are activated by LPS and IFN- $\gamma$ , and secrete high levels of IL-12 and low levels of IL-10 [21]. After LPS+IFN- $\gamma$  -stimulation, all experimental groups showed an increased production of NO when compared with baseline values except macrophages from LP pups (Figure 2). However, there was no difference when groups were compared. Our findings are aligned with previous study that verified that there are no effects on NO production in response to the LPS stimulation in peritoneal macrophages from the HF diet group [16].

In conclusion, macrophages from pups submitted to a protein restriction showed an increased phagocytic activity and NO production at baseline. It can be suggested that maternal protein restriction is associated with functional alterations of pro-inflammatory macrophages. After stimulation with LPS and IFN- $\gamma$ , there is no incremental response of the NO production in macrophages from LP-pups as seen in their pairs. Thus, the consumption of HF diet from weaning until 60<sup>th</sup> days old did not potentiate the effects of perinatal low-

protein diet.

## Acknowledgments

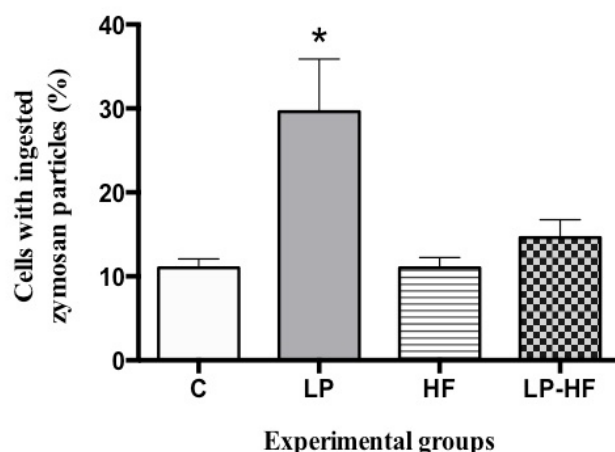
This research was supported by the Foundation to Support Science and Research in Pernambuco State - Brazil (FACEPE), CAPES and the National Council for Research - Brazil (CNPq).

The authors declare that there are no conflicts of interest

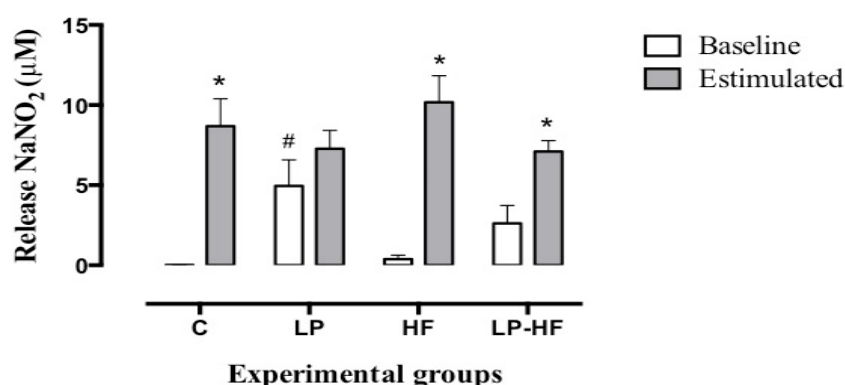
## References

1. Langley-Evans SC, and Carrington LJ (2006) Diet and the developing immune system. *Lupus* 15: 746-752
2. Ortiz R, Cortes L, Cortes E, and Medina H (2009) Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. *Clin Exp Immunol* 155: 96-106
3. Jones KD, Berkley JA, and Warner JO (2010) Perinatal nutrition and immunity to infection. *Pediatr Allergy Immunol* 21: 564-576
4. Ferreira ESWT, Galvao BA, Ferraz-Pereira KN, de-Castro CB, and Manhaes-de-Castro R (2009) Perinatal malnutrition programs sustained alterations in nitric oxide released by activated macrophages in response to fluoxetine in adult rats. *Neuroimmunomodulation* 16: 219-227
5. Morais NGC, T. B.; Severo, M. S.; Castro, C. M. (2014) Long-term effects of neonatal malnutrition on microbicide response, production of cytokines, and survival of macrophages infected by *Staphylococcus aureus* sensitive/resistant to methicillin. *Rev Nutr* 27: 557-568
6. Prestes-Carneiro LE, Laraya RD, Silva PR, Moliterno RA, Felipe I, and Mathias PC (2006) Long-term effect of early protein malnutrition on growth curve, hematological parameters and macrophage function of rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 52: 414-420
7. Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, and Walsh K (2011) Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 11: 85-97
8. Leandro CG, de Lima TM, Alba-Loureiro TC, do Nascimento E, Manhaes de Castro R, de Castro CM, Pithon-Curi TC, and Curi R (2007) Stress-induced downregulation of macrophage phagocytic function is attenuated by exercise training in rats. *Neuroimmunomodulation* 14: 4-7

9. Bayne K (1996) Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals available. American Physiological Society. *Physiologist* 39: 199, 208-111
10. Reeves PG (1997) Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet *Journal of Nutrition* 127 838S-841S
11. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, and Oller Do Nascimento CM (2004) Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 20: 218-224
12. Ding AH, Nathan CF, and Stuehr DJ (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 141: 2407-2412
13. Zigmond E, Samia-Grinberg S, Pasmanik-Chor M, Brazowski E, Shibolet O, Halpern Z, and Varol C (2014) Infiltrating monocyte-derived macrophages and resident kupffer cells display different ontogeny and functions in acute liver injury. *J Immunol* 193: 344-353
14. Muller A, Brandenburg S, Turkowski K, Muller S, and Vajkoczy P (2015) Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells. *Int J Cancer* 137: 278-288
15. Tay SS, Roediger B, Tong PL, Tikoo S, and Weninger W (2014) The Skin-Resident Immune Network. *Curr Dermatol Rep* 3: 13-22
16. Borges MC, Vinolo MA, Crisma AR, Fock RA, Borelli P, Tirapegui J, Curi R, and Rogero MM (2013) High-fat diet blunts activation of the nuclear factor-kappaB signaling pathway in lipopolysaccharide-stimulated peritoneal macrophages of Wistar rats. *Nutrition* 29: 443-449
17. Cortez M, Carmo LS, Rogero MM, Borelli P, and Fock RA (2013) A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-alpha production by increasing NF-kappaB and attenuating PPAR-gamma expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation* 36: 379-386
18. Matarese G, Moschos S, and Mantzoros CS (2005) Leptin in immunology. *J Immunol* 174: 3137-3142
19. Procaccini C, Jirillo E, and Matarese G (2012) Leptin as an immunomodulator. *Mol Aspects Med* 33: 35-45
20. Teshima S, Rokutan K, Takahashi M, Nikawa T, Kido Y, and Kishi K (1995) Alteration of the respiratory burst and phagocytosis of macrophages under protein malnutrition. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 41: 127-137
21. Wan JM, Haw MP, and Blackburn GL (1989) Nutrition, immune function, and inflammation: an overview. *Proc Nutr Soc* 48: 315-335



**Figure 1** Phagocytosis rate of zymosan by peritoneal macrophages. Data were analyzed using one-way Anova followed by Bonferroni's post hoc test. Data expressed in mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  vs C. C = Control group (pups of mothers that received normal protein diet during gestation and lactation and standard chow after weaning); LP = Low protein group (pups of mothers that received low protein diet during gestation and lactation and standard chow after weaning); HF = High fat group (pups of mothers that received normal protein diet during gestation and lactation and high fat diet after weaning); LP-HF = Low protein-high fat group (pups of mothers that received low protein diet during gestation and lactation and high fat diet after weaning).



**Figure 2** Release of nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) by cultured peritoneal macrophages in baseline and stimulated state. Macrophages were stimulated with LPS and  $\text{IFN}\gamma$ . Student T test was used to evaluate stimulated vs baseline macrophage. One-way Anova followed by Bonferroni's post hoc test were used to evaluate all groups in baseline and stimulated states. Data expressed in mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  stimulated vs baseline; #  $p < 0.05$  vs C in baseline.



**ANEXO A - Email de submissão do Artigo Original 1 à revista European Journal of Nutrition**

**Fwd: EJON-D-16-00157 : Submission Confirmation for High fat diet potentiates the effects of a perinatal low-protein diet on somatic growth and visceral fat accumulation in rats**

----- Forwarded message -----

From: **Editorial Office (EJON)** <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>

Date: Wed, Feb 17, 2016 at 4:43 PM

Subject: EJON-D-16-00157 : Submission Confirmation for High fat diet potentiates the effects of a perinatal low-protein diet on somatic growth and visceral fat accumulation in rats

To: Carol Gois Leandro <[carolleandro22@gmail.com](mailto:carolleandro22@gmail.com)>

Dear Dr. Leandro,

Your submission entitled "High fat diet potentiates the effects of a perinatal low-protein diet on somatic growth and visceral fat accumulation in rats" has been received by journal European Journal of Nutrition.

The submission id is: EJON-D-16-00157

Please refer to this number in any future correspondence.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <http://ejon.edmgr.com/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,  
Springer Journals Editorial Office  
European Journal of Nutrition

---

**ANEXO B – Email de submissão do Artigo Original 2 à revista Lipids**

**Fwd: Lipids - Manuscript ID LIPIDS-16-0048**

----- Forwarded message -----

From: <[plandman@aocs.org](mailto:plandman@aocs.org)>

Date: Fri, Feb 19, 2016 at 12:19 AM

Subject: Lipids - Manuscript ID LIPIDS-16-0048

To: [carolleandro22@gmail.com](mailto:carolleandro22@gmail.com)

18-Feb-2016

Dear Dr. Leandro:

Your manuscript entitled "High-fat diet does not change peritoneal macrophage functions of young rats submitted to maternal low-protein diet." has been successfully submitted online and has entered into our peer review process.

Your manuscript ID is LIPIDS-16-0048.

Please use this manuscript ID number in all future correspondence regarding this submission or when calling the office with questions regarding this manuscript. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log on to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/lipids> and edit your user information as appropriate.

You can view the status of your manuscript by checking your Author Center after logging on to <https://mc.manuscriptcentral.com/lipids>.

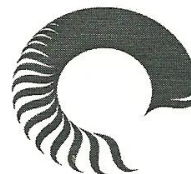
Thank you for submitting your manuscript to Lipids.

Sincerely,  
Lipids Editorial Office

---

## ANEXO C – Parecer do Comitê de Ética

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 04 de setembro de 2014.

Ofício nº 543/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profª. Carol Virginia Góis Leandro**  
Centro Acadêmico de Vitória – UFPE  
Processo nº 23076.052139/2012-01

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **“Efeitos da dieta hipocalórica perinatal e da dieta hipercalórica e hiperlipídica pós-desmame sobre a resposta imunológica de ratos adultos endotoxêmicos”**.

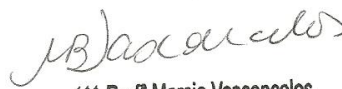
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: biotério departamento de nutrição.  
Animais: ratos wistar; Peso: 250g; sexo: machos e fêmeas;  
idade: 90 dias; nº total de animais: 82 ratos.  
Observação: o processo encontra-se aprovado com solicitação de mais 20 ratas Wistar, com idade de 90-120 dias, para continuidade do projeto, totalizando 102 animais.

Atenciosamente,

  
 **Profª Marcia Vasconcelos**  
Vice-Presidente do CEUA/CCB-UFPE  
SIAPE 2199635

CCB: Integrar para desenvolver