

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E COMPORTAMENTO

ROBERTA GIORGI SILVEIRA

EFEITOS DO CONSUMO MATERNO DE DIETA RICA EM GORDURA
DURANTE A PRECONCEPÇÃO, A PREENHEZ E A LACTAÇÃO
NO DESENVOLVIMENTO DA PROLE

Pelotas

2018

ROBERTA GIORGI SILVEIRA

**EFEITOS DO CONSUMO MATERNO DE DIETA RICA EM GORDURA DURANTE
A PRECONCEPÇÃO, A PREENHEZ E A LACTAÇÃO
NO DESENVOLVIMENTO DA PROLE**

Disertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde e Comportamento da
Universidade Católica de Pelotas.

Orientadora: Dr.^a Fernanda Nedel

Pelotas

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S587e Silveira, Roberta Giorgi
**Efeitos do consumo materno de dieta rica em gordura durante a
preconcepção, a prenhez e a lactação no desenvolvimento da prole.** /
Roberta Giorgi Silveira. – Pelotas: UCPEL, 2018.
120 f.
Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Pelotas, Mestrado em
Saúde e Comportamento, Pelotas, BR-RS, 2018. Orientadora: Fernanda
Nedel.

1. comportamento alimentar materno. 2. dieta rica em gordura. 3.
Desenvolvimento somático. 4. maturação física. 5. reflexo ontogenético I.
Nedel, Fernanda, or. II. Título.

CDD 613

RESUMO

Introdução: O padrão de comportamento alimentar baseado em uma dieta ocidental costumeiramente praticado contemporaneamente reforça a ideia de consumo de alimentos pobres em valor nutricional e com elevada concentração de carboidratos e gorduras. Inúmeros doenças crônicas estão associadas à uma dieta rica em gordura, como diabetes, hipertensão e depressão. Assim como o restante da sociedade as mulheres em idade fértil, gestantes e lactantes vêm apresentando comportamento alimentar responsivo a mídia e a facilidade de obtenção de comidas gordurosas. Estudos em animais têm comprovado que existe associação entre dieta materna rica em gordura e alterações em diversos parâmetros relacionados ao crescimento embrionário, fetal e no estágio pós-natal, sendo necessárias pesquisas adicionais que aprofundem os conhecimentos obtidos até o momento. **Objetivo:** O intuito do presente estudo foi investigar as modificações ao desenvolvimento somático, físico e sensorio-motor da prole de ratos expostos à dieta materna rica em gordura nos períodos preconcepcional, gestacional e de lactação; bem como a influência da dieta na composição corporal materna e nos níveis de glicemia. **Métodos:** Seis fêmeas Wistar (37 dias de idade) foram divididas em grupo controle (CD, n = 3, dieta Nuvilab CR-1, 3,4 kcal / g, gordura 4g%) e dieta rica em gordura (HFD, n = 3, 6,1 kcal / g, gordura 50g%) e mantidas com as respectivas dietas até o desmame (dia 21 pós-natal). A fonte de gordura principalmente utilizada foi banha de porco. As mães foram avaliadas em medidas físicas (peso corporal, comprimento corporal e índice de Lee) e parâmetros bioquímicos de glicose. Os machos das proles (n = 31) foram analisados segundo parâmetros corporais (peso corporal, comprimento e índice de Lee) e de crescimento somático (comprimento mediolateral e ântero-posterior do crânio), maturação das características físicas (desdobramento do pavilhão externo de ambas as orelhas, abertura do canal auditivo, erupção dos incisivos e abertura dos olhos) e reflexo ontogenético (reflexo de endireitamento e geotaxia negativa). **Resultados:** As fêmeas expostas à dieta rica em gordura apresentaram menor peso corporal (from 52 to 122 days old, $p < 0,05$) e menor consumo de ração (from 108 to 122 days old, $p < 0.001$) e seus filhotes exibiram menor peso corporal (from 5 to 21 days old, $p < 0.01$), comprimento naso-anal (14 and 21 days old, $p < 0.01$) e craniocaudal (from 5 to 21 days old, $p < 0.01$), menores eixos mediolateral (from 5 to 21 days old, $p < 0.05$) e anteroposterior (from 5 to 21 days old, $p < 0.05$) da cabeça, maior índice de Lee (21 days old, $p \leq 0.01$) e atraso no reflexo geotaxia negativa ($p < 0.03$) e maturação das características físicas ($p < 0.05$). **Conclusão:** A exposição materna a uma dieta rica em gordura durante os períodos de preconcepção, prenhez e lactação não implica em incremento do peso corporal, no entanto, ainda assim, ocorrem alterações nos parâmetros físicos de peso, comprimento e índice de massa corporais, comprometimento do crescimento somático, atraso no aparecimento de características físicas e prejuízo ao reflexo ontogenético.

Palavras-chave: comportamento alimentar materno, dieta rica em gordura, desenvolvimento somático, maturação física, reflexo ontogenético.

ABSTRACT

Introduction: The pattern of eating behavior based on a Western Diet usually practiced contemporaneously reinforces the idea of consumption of foods that are poor in nutritional value and with a high concentration of carbohydrates and fats. Numerous chronic diseases are associated with a high-fat diet, such as diabetes, hypertension and depression. Like the rest of society, women of childbearing, pregnant and lactating age have been presenting media responsive behavior and the ease of obtaining fatty foods. Animal studies have shown that there is an association between a high fat maternal diet and changes in several parameters related to embryonic, fetal and postnatal growth, and further research is needed to deepen the knowledge obtained so far. **Objective:** The aim of the present study was to investigate changes in the somatic development, physical and sensory-motor effects in the progeny of rats exposed to high-fat diet in the preconception, pregnancy and lactation periods, as well as the influence of diet on maternal body composition and blood glucose levels. **Methods:** Six Wistar females (37 days old) were divided into control group (CD, n = 3, Nuvilab CR-1 diet, 3.4 kcal / g, fat 4g%) and high fat diet (HFD, n = 3, 6.1 kcal / g, fat 50g%) and maintained with the respective diets until weaning (postnatal day 21). The source of fat mainly used was lard. Mothers were evaluated in physical measures (body weight, body length and Lee index) and biochemical parameters of glucose. The males of the offspring (n = 31) were analyzed according to body parameters (body weight, length and Lee index), somatic growth (mediolateral and anteroposterior cranial length), physical characteristics of maturation (unfolding of the external pavilion of both ears, opening of the auditory canal, eruption of the incisors and opening of the eyes) and reflex ontogeny (righting reflex and negative geotaxis). **Results:** Dams exposed to the high-fat diet had lower body weight (from 52 to 122 days old, $p < 0,05$) and less amount of food intake (from 108 to 122 days old, $p < 0.001$). HFD pups had lower body weight (from 5 to 21 days old, $p < 0.01$), naso-anal (14 and 21 days old, $p < 0.01$) and craniocaudal length (from 5 to 21 days old, $p < 0.01$), smaller mediolateral (from 5 to 21 days old, $p < 0.05$) and anteroposterior (from 5 to 21 days old, $p < 0.05$) axis of the head, higher Lee index (21 days old, $p \leq 0.01$), delay in negative geotaxis reflex ($p < 0.03$) and maturation of physical features ($p < 0.05$). **Conclusion:** Maternal exposure to a high-fat diet during preconception, pregnancy and lactation do not implicate in body weight increment, but even so in offspring cause changes in body composition, impair somatic growth, delay in appearance of physical features and prejudice to the reflex ontogeny.

Keywords: maternal eating behavior, high-fat diet, somatic development, physical maturation, reflex ontogeny.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Células-tronco neuronais em cérebros adultos de mamíferos.....	37
Figura 2 – Quiescência e ativação da célula-tronco neuronal adulta.....	39
Figura 3 – Processo de diferenciação das células-tronco neuronais embrionárias e adultas e reguladores.....	41
Figura 4 – Desenho experimental do projeto de pesquisa.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identificação dos estudos encontrados a respeito do tipo de animal, percentual de gordura da dieta, início e término da alimentação experimental, idade das fêmeas ao acasalamento, tempo de vida da prole na avaliação e sexo da prole avaliado.....	70
Tabela 2 – Origem e comparação entre os percentuais de macronutrientes das dietas utilizadas nos estudos encontrados.....	71
Tabela 3 – Comparação dos tipos de avaliações realizadas nos artigos encontrados.....	72
Tabela 4 – Apresentação dos resultados obtidos nos artigos encontrados.....	74
Tabela 5 - Caracterização dos mRNAs e do microRNA que serão alvo de análise de expressão no hipocampo das proles submetidas a dieta rica em gordura <i>versus</i> proles expostas à dieta controle.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -MSH	Hormônio alfa estimulador de melanócito
BrdU	<i>5-Bromo-2'-Deoxyuridine</i>
E4	<i>Embryonic day 4</i>
E17	<i>Embryonic day 17</i>
E18	<i>Embryonic day 18</i>
E19	<i>Embryonic day 19</i>
E21	<i>Embryonic day 21</i>
E23	<i>Embryonic day 23</i>
DG	<i>Dentate gyrus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
HES	<i>Hair enhancer of Slipt</i>
HES1	<i>HeS family BHLH transcription factor 1 protein</i>
<i>HES1</i>	<i>HeS family BHLH transcription factor 1 gene</i>
HES5	<i>HeS family BHLH transcription factor 5 protein</i>
<i>HES5</i>	<i>HeS family BHLH transcription factor 5 gene</i>
MASH1	<i>Mammalian achaete scute homolog-1 protein</i>
<i>MASH1</i>	<i>Mammalian achaete scute homolog-1 protein</i>
miRNA	<i>microRNA</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MSI1	<i>Musashi1 protein</i>
MSI2	<i>Musashi2 protein</i>
NRC	<i>National Research Council</i>
NSC	<i>Neural Stem Cell</i>

NUMB1	<i>Numb homolog 1</i>
NUMB4	<i>Numb homolog 4</i>
NYP	<i>Neuropeptide Y</i>
P10	<i>Postnatal day 10</i>
P18	<i>Postnatal day 18</i>
P21	<i>Postnatal day 21</i>
P60	<i>Postnatal day 60</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Shh-Gli	<i>Sonic Hedgehog–Patched–Gli Pathway</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SGZ	<i>Subgranular zone</i>
SVZ	<i>Subventricular zone</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1 IDENTIFICAÇÃO.....	01
2 PROJETO DE PESQUISA	02
2.1 Introdução.....	02
2.2 Objetivos.....	04
2.3 Hipóteses.....	06
2.4 Estratégias de busca.....	07
2.5 Revisão de literatura.....	09
2.5.1 A evolução do comportamento alimentar humano.....	09
2.5.2 O comportamento alimentar na sociedade contemporânea.....	14
2.5.3 O comportamento alimentar materno durante a gestação.....	23
2.5.4 O desenvolvimento neurológico fetal.....	29
2.5.5 Neurogênese no hipocampo do cérebro adulto e depressão.....	36
2.5.6 A influência do comportamento alimentar materno no desenvolvimento neurológico e na manifestação do comportamento depressivo na prole.....	43
2.6 Metodologia.....	55
2.6.1 Animais e dieta.....	55
2.6.2 Mensurações físicas e consumo da dieta.....	57
2.6.3 Maturação de características físicas da prole.....	58
2.6.4 Coleta e análise do material biológico.....	59
2.6.5 Testes de reflexo.....	62
2.6.6 Testes comportamentais.....	62
2.6.7 Análises estatísticas.....	66
2.6.7 Aspectos éticos	66
2.7 Cronograma	68
2.8 Orçamento	69
Anexos	70
Anexo I: Tabelas	70
AnexoII: Especificações técnicas da dieta controle.....	77
2.9 Referências	79
3 ARTIGO.....	92
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	110

1. IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Efeitos do consumo materno de dieta rica em gordura durante a concepção, a gravidez e a lactação no desenvolvimento da prole

1.2 Designação da titulação pretendida: Título de mestre

1.3 Orientador: Fernanda Nedel

1.4 Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

1.5 Curso: Mestrado em Saúde e Comportamento

1.6 Linha de pesquisa: Avaliação Biológica em Estudos Pré-Clínicos

1.7 Data: 10 de dezembro de 2018

2. PROJETO DE PESQUISA

2.1 INTRODUÇÃO

Desde o surgimento dos primeiros hominídeos o processo evolutivo implicou na necessidade de adaptação nutricional, principalmente em função das mudanças climáticas que variaram os alimentos à disposição. A prática de uma dieta rica em gorduras, atualmente determinante do comportamento alimentar humano, passou inicialmente a gerar aumento do peso corporal, depois obesidade e, por fim, está associada a uma infinidade de enfermidades crônicas contemporâneas (Gran e Leonard, 1989; Popkin, 2006).

Além dos distúrbios metabólicos relacionados ao sobrepeso/obesidade, o aumento das doenças neurodegenerativas vislumbrado nos dias atuais suscitou à influência desta consequência do descontrole alimentar sobre o sistema nervoso central (SNC) (Mazon, et al., 2017). Os problemas decorrentes da troca do padrão alimentar saudável observado até meados do século passado por um elevado consumo de alimentos poucos nutritivos fazem parte do cotidiano de adultos e crianças, impactando ainda mais à saúde geral da população.

Afora a possibilidade de o consumo de alimentos gordurosos afetar o ser humano em idade adulta, passou-se a questionar quais as consequências de tal exposição a indivíduos ainda em formação e, por este motivo, houve o início das pesquisas com animais a respeito do tema. Os primeiros estudos se dedicaram a buscar compreender como comportamento alimentar da mãe, sobretudo no período gravídico, poderia afetar o desenvolvimento embrionário e fetal de modo a estabelecer determinações sobre o centro controlador da fome localizado no hipotálamo (Chang, et al., 2008; Gupta, et al., 2009), tornando o SNC de embriões e fetos expostos à dieta materna rica em gorduras alvo de constantes investigações.

Ao focar em questões relacionadas ao sobrepeso, obesidade e diabetes infantil descobriu-se que as implicações neurológicas do abuso materno no consumo de alimentos com elevado teor de gordura vão muito além de disfunções metabólicas. As pesquisas realizadas até então observaram as seguintes modificações dos componentes do SNC no feto: aumento do número de neurônios responsivo a peptídeos orexígenos, acúmulo de lipídios peroxidados no hipocampo com prejuízo ao desenvolvimento das células-tronco neuronais, diminuição da neurogênese, alterações da expressão genética hipocampal e também desregulação das vias de sinalização controladoras da neurogênese (Tozuka, Wada e Wada, 2009; Mendes-da-Silva, et al., 2015).

Ademais, ainda foi relatado que no pós-natal houve redução da capacidade de aprendizagem espacial e dificuldade de memorização e na vida adulta verificou-se redução da atividade locomotora e manifestação de comportamento depressivo. Os achados são promissores para futuras pesquisas relacionadas a consequências negativas do comportamento alimentar materno nas funções cognitivas e neurológicas de seus descendentes, podendo ocasionar anormalidades tanto psiquiátricas quanto neurodegenerativas (Giriko, et al., 2013, Lin, et al., 2015).

Assim, o presente estudo tem como objetivo principal ampliar as informações já obtidas sobre o tema consoante a realização de estudo experimental animal com submissão de fêmeas de ratos albinos Wistar *Rattus norvegicus* ao consumo de dieta rica em gorduras durante o pré-concepção, a gestação e o aleitamento com verificação de parâmetros físicos, bioquímicos e biológicos da mãe e de seus descendentes e análise dos comportamentos cognitivo depressivo da prole na vida adulta.

2. 2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo geral

Avaliar, em modelo animal, as consequências do consumo materno de uma dieta rica em gorduras nas fases de pré-concepção, gestação e lactação nos desenvolvimentos físico e neurológico da prole e a ocorrência de comportamento depressivo no início da idade adulta.

2.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as mensurações físicas da mãe (peso corporal, comprimento, índice de Lee, acúmulo de tecido adiposo nas regiões retroperitoneal e gonadal) e consumo diário da dieta provocadas pelo consumo de uma dieta rica em gordura desde antes da concepção até a lactação da prole.
- Avaliar as alterações físicas na prole (peso corporal, comprimento, índice de Lee, acúmulo de tecido adiposo nas regiões retroperitoneal e gonadal, peso encefálico e o comprimento da cabeça dos eixos mediolateral e anteroposterior) e consumo diário da dieta, provocadas pelo consumo de uma dieta rica em gordura das mães desde antes da concepção até a lactação.
- Avaliar a maturação de características físicas da prole (desdobramento do pavilhão auditivo externos de ambas as orelhas para a posição totalmente ereta, abertura do conduto auditivo, erupção dos incisivos e abertura dos olhos) provocadas pelo consumo de uma dieta rica em gordura da mãe desde antes da concepção até a lactação.
- Identificar alterações nos níveis séricos de glicose, insulina, leptina, colesterol total e frações e triglicerídeos no sangue periférico da mãe e da prole provocadas pelo consumo de uma dieta rica em gordura da mãe desde antes da concepção até a lactação.

- Identificar alterações nos níveis de BDNF e corticosterona no hipocampo da prole, provocados pelo consumo de uma dieta rica em gordura da mãe desde antes da concepção até a lactação da mãe.
- Identificar as alterações hipocampais referentes à expressão dos mRNA e produção das proteínas de Notch1, Hes1 e Hes5 e à expressão do microRNA-9 nas proles das fêmeas submetidas à dieta rica em gordura em relação ao grupo controle.
- Identificar como a exposição à dieta materna rica em gordura durante a preconcepção, a gestação e a lactação pode estar vinculada ao aparecimento de comportamento depressivo e déficits cognitivos na idade adulta da prole por influência da desregulação das vias de sinalização que controlam a neurogênese dos estágios pós-natais.

2.3 HIPÓTESES

- Será observado aumento de peso, da quantidade de tecido adiposo gonadal e retroperitoneal, do índice de Lee e do consumo alimentar pelas mães expostas a dieta rica em gordura.
- Será observado nas proles expostas à dieta rica em gordura aumento de peso, do índice de Lee, da quantidade de tecido adiposo gonadal e retroperitoneal e do consumo alimentar, e redução do comprimento corporal, do peso encefálico e das medidas dos eixos mediolateral e anteroposterior da cabeça das proles.
- Será observado atraso nas características físicas de desdobramento do pavilhão auditivo externos de ambas as orelhas para a posição totalmente ereta, abertura do conduto auditivo, erupção dos incisivos e abertura dos olhos das proles expostas à dieta rica em gordura.
- Será observado nos animais do grupo submetido à dieta rica em gordura elevação dos parâmetros bioquímicos séricos de glicose, insulina, leptina colesterol total e frações e triglicerídeos tanto nas mães quanto na prole.
- Será observada redução dos níveis da neurotrofina BDNF e aumento dos níveis de corticosterona no hipocampo das proles expostas a dieta rica em gordura.
- Serão encontrados níveis aumentados na expressão dos mRNA e da produção das proteínas Nocth1, Hes1 e Hes5 e redução da expressão do microRNA-9 no hipocampo das proles correspondentes à dieta materna rica em gordura.
- Será notado que nas proles do grupo exposto à dieta rica em gordura ao efetuar-se os testes comportamentais exacerbação do comportamento depressivo e déficit cognitivo em comparação com o grupo controle.

2.4 ESTRATÉGIAS DE BUSCA

A revisão de literatura foi realizada entre os meses de março a maio de 2017, principalmente na base de dados Pubmed, utilizando como filtro a busca por estudos experimentais com animais independente do ano de publicação e da linguagem em que foi escrita. Os termos MeSH utilizados estão listados abaixo, bem como a quantidade de publicações encontradas para cada conjunto de descritores:

- ⇒ ("mothers"[MeSH Terms] OR "mothers"[All Fields] OR "maternal"[All Fields]) AND ("diet, high-fat"[MeSH Terms] OR ("diet"[All Fields] AND "high-fat"[All Fields]) OR "high-fat diet"[All Fields] OR ("high"[All Fields] AND "fat"[All Fields] AND "diet"[All Fields]) OR "high fat diet"[All Fields]) = 1.450 publicações
- ⇒ (("maternal behaviour"[All Fields] OR "maternal behavior"[MeSH Terms] OR ("maternal"[All Fields] AND "behavior"[All Fields]) OR "maternal behavior"[All Fields]) AND offspring[All Fields]) AND ("diet, high-fat"[MeSH Terms] OR ("diet"[All Fields] AND "high-fat"[All Fields]) OR "high-fat diet"[All Fields] OR ("high"[All Fields] AND "fat"[All Fields] AND "diet"[All Fields]) OR "high fat diet"[All Fields]) = 94 publicações
- ⇒ (((("mothers"[MeSH Terms] OR "mothers"[All Fields] OR "maternal"[All Fields]) AND ("diet"[MeSH Terms] OR "diet"[All Fields])) AND ("neurogenesis"[MeSH Terms] OR "neurogenesis"[All Fields])) AND offspring[All Fields] = 42 publicações
- ⇒ (("diet, high-fat"[MeSH Terms] OR ("diet"[All Fields] AND "high-fat"[All Fields]) OR "high-fat diet"[All Fields] OR ("high"[All Fields] AND "fat"[All Fields] AND "diet"[All Fields]) OR "high fat diet"[All Fields]) AND offspring[All Fields]) AND ("neural stem cells"[MeSH Terms] OR ("neural"[All Fields] AND "stem"[All Fields]

AND "cells"[All Fields]) OR "neural stem cells"[All Fields] OR ("neural"[All Fields] AND "stem"[All Fields] AND "cell"[All Fields]) OR "neural stem cell"[All Fields]) = 3 publicações

⇒ ("mothers"[MeSH Terms] OR "mothers"[All Fields] OR "maternal"[All Fields]) AND ("eating behaviour"[All Fields] OR "feeding behavior"[MeSH Terms] OR ("feeding"[All Fields] AND "behavior"[All Fields]) OR "feeding behavior"[All Fields] OR ("eating"[All Fields] AND "behavior"[All Fields]) OR "eating behavior"[All Fields]) = 18.865 publicações

2.5 REVISÃO DE LITERATURA

2.5.1 A evolução do comportamento alimentar humano

O gênero ao qual pertence o homem existe há cerca de 2 milhões de anos na Terra e os antepassados hominídeos¹ pré-humanos surgiram a aproximadamente 4 milhões de anos atrás, sendo que ambos momentos da evolução contribuíram diretamente para a composição genética atual em função da resposta às influências da dieta à época. As características da alimentação humana ou hominídea começaram a ser moldadas antes mesmo do aparecimento do ser humano, quando ancestrais presentes no período Pleistoceno precisaram adaptar-se em tempos de emergência no que se refere à exploração de recursos alimentares, com a disposição de alimentos sofrendo ampla variação conforme o período paleontológico, a localização geográfica e as condições sazonais (Eaton e Konner, 1985).

Não há como negar que, consoante a biologia evolutiva, os requisitos nutricionais e as necessidades alimentares dos seres humanos contemporâneos foram estabelecidos em um passado pré-histórico. Durante milênios hominídeos e hominídeos subsistiram consumindo dietas muito variadas de acordo com o clima, a capacidade de caça, os métodos de processamento e a disposição de alimentos (Garn e Leonard, 1989).

Diversos aspectos concernentes ao comportamento alimentar, sobretudo quanto às bases fisiológicas da relação entre o homem e o alimento são comuns a outros mamíferos, sobretudo primatas. No entanto, a alimentação humana é diferenciada pelo fato de o homem apresentar restrições pessoais e psicológicas associadas à disponibilidade e à facilidade de obtenção dos alimentos decorrente de sua evolução, o que pode fazer com que o consumo se

¹ Hominídeos corresponde à família que inclui o homem e formas ancestrais atualmente extintas. A classificação mais moderna inclui nesta família macacos, como, por exemplo, gorilas e chimpanzés (Ferreira, 2004).

torne excessivo e vá além das necessidades fisiológicas quando não há limitações ambientais na oferta (Ulijaszek, 1992; Ulijaszek, 2002).

O comportamento alimentar do ser humano apresenta reflexos do comportamento alimentar de outros primatas, tais como a dieta onívora² (Leonard, 2000), a exemplo da seleção de alimentos altamente desenvolvida a partir do sabor, da visão e do cheiro, sentidos utilizados com intuito de identificar possíveis inadequações. Uma questão bastante relevante e estudada no comportamento alimentar humano é a preferência pelo sabor adocicado, uma vez que ao longo do processo evolutivo a discriminação por este paladar foi otimizada em função das modificações na necessidade de maior aporte energético e para ampliar o número de alimentos potencialmente comestíveis (Ulijaszek, 2002).

As especificações morfológicas da dentição de fósseis de homínídeos revelam padrões hipotéticos de dieta, demonstrando que o *Australopithecus*, o homínídeo mais primitivo e o último ancestral direto do homem antes do surgimento do gênero *Homo*, era essencialmente vegetariano com dieta bastante variada. O *Homo habilis* é o primeiro descendente direto do *Australopithecus* e a sua habilidade em produzir ferramentas de pedra para facilitar a caça (Isaac, 1983), associada ao uso da necrofagia (Blumenschine, 1991), propiciou considerável desenvolvimento na exploração do consumo da carne de outros animais, levando à manutenção da diversidade alimentar e ampliando o domínio humano sobre a natureza (Isaac & Crader, 1981; Ulijaszek, 2002).

Ainda que não se possa estabelecer uma trajetória retilínea na evolução do gênero *Homo*, pode-se dizer que o *H. habilis* evoluiu para o *Homo erectus* por volta de 2 milhões de anos atrás, quando a disponibilidade dos alimentos passou a ser controlada com o aumento do consumo de carne animal e pela possibilidade de cozimento advinda da descoberta do fogo.

² Onívoro é aquele que se alimenta de animais e de vegetais (Ferreira, 2004).

Embora o principal uso inicial do fogo tivesse como intenção a proteção, a partir de então, percebeu-se que poderia ser utilizado para o cozimento dos alimentos, gerando, com isso, efeitos sobre a ecologia, as relações sociais e a nutrição. Os aspectos nutricionais sofreram incremento na complexidade a medida que se estabeleceu maior controle no modo como os alimentos ficariam disponíveis, o que ocorreu tanto pelo aumento no consumo de carne, sem que houvesse substituição das fontes vegetais de energia, quanto pela melhora da biodisponibilidade dos alimentos existentes devido à ingestão na forma cozida (Ulijaszek, 2002).

O aumento do tamanho corporal e dos horários de atividades físicas do *H. erectus* em relação ao *Australopithecus* gerou elevação de 40 a 85% no gasto de energia corporal (Leonard & Robertson, 1997), sendo que o corpo de maior tamanho e o comportamento complexo daquela espécie possibilitaram o estabelecimento de um lar, o avanço do domínio da cadeia alimentar e o aumento da captação e ingestão de energia na dieta, não implicando em perda na qualidade de vida (Milton, 1987).

O próximo hominídeo na escala evolutiva, o *Homo heidelbergensis*, aprimorou a atividade de caça ao praticá-la em grupo e a espécie posterior, o *Homo neandertalensis*, a tornou ainda mais elaborada ao desenvolver a caça cooperativa em virtude de ser um caçador-coletador social. O modelo cooperativista de caça foi mantido pela espécie seguinte, o *Homo sapiens*, o qual passou a apresentar comportamento distinto, porque, além da prática da caça e da coleta sociais, desenvolveu estratégias de forrageamento³ que se mostraram superior às demais espécies de *Homo* (Ulijaszek, 2002).

Afora isso, o *H. sapiens* já nos períodos iniciais ao seu surgimento utilizava linguagem e simbolismo e, ainda, produzia ferramentas de pedra de modo semelhante ao *H. neanderthalensis*, que em diversos aspectos eram mais complexas que as desenvolvidas pelas

³ Forragear se refere ao ato de locomover-se em busca de alimento.

espécies anteriores. O comportamento alimentar modificado, a melhora nas ações de forrageamento e a escolha de alimentos que proporcionam ganho máximo de energia, ao que podemos denominar adaptação nutricional, foram fundamentais no processo de seleção natural que permitiu ao *H. sapiens* ser a única espécie sobrevivente do gênero *Homo* e determinaram diversas condutas fixas, reproduzidas e sustentadas até os dias atuais no que concerne à alimentação (Foley, 1987; Eaton e Konner, 1985; Ulijaszek, 1992).

Em um momento posterior, o *H. sapiens* moderno determinou mudanças ecológicas, promoveu o surgimento da agricultura e desenvolveu sociedades estratificadas em cunho econômico, o que impactou em diversificação das normas culturais e sociais concernentes à alimentação, sobretudo no uso do alimento como um símbolo, o qual pode ser considerado como um traço marcante de seu comportamento alimentar (Cohen, 1998; Ulijaszek, 2002).

A partir de então, o homem realizou significativos avanços na agricultura, aprimorou o manejo da pecuária e aperfeiçoou as tecnologias para produção de alimentos processados, tornando-os mais disponíveis e facilitando o consumo que antes não era tão simples (Ferreira, 2010; Lawrence et al., 2015). A dieta e o estilo de vida humanos sofreram mudanças bruscas e rápidas decorrentes da industrialização, da urbanização, do desenvolvimento e da globalização do mercado, gerando profundo impacto no estado de saúde e nutricional em todo o planeta Terra. Inicialmente os alimentos *in natura* e os outros componentes da alimentação eram produzidos e comercializados localmente, mas com a expansão comercial e o ingresso do ramo alimentício no mercado internacional na forma de *commodities* passaram a atingir uma escala global (WHO, 2003).

Como consequência o comportamento alimentar foi severamente afetado e houve alteração do padrão de consumo de alimentos para dietas densas em energia com alto teor de gordura, em especial as gorduras saturadas e as gorduras *trans*, e baixa quantidade de carboidratos não refinados, levando a práticas dietéticas pouco saudáveis e ao excesso de alguns

nutrientes ou deficiências de outros para o que não estávamos adaptados. Em associação às mudanças no padrão alimentar, o homem passou a manter um estilo de vida sedentário devido ao aumento no uso de transporte motorizado, à redução da realização de tarefas manuais no trabalho, à utilização de eletrodomésticos e eletrônicos em casa e à prática de atividades de lazer de pouca exigência física (Garn e Leonard, 1989; WHO, 2003).

Existe um contraponto muito importante para esta mudança na forma como o ser humano consome alimentos e se relaciona com a comida, pois, embora mais de 500.000 anos separem o homem contemporâneo dos ancestrais caçadores-coletores que habitavam a Terra na Idade da Pedra, a constituição genômica humana primordial, salvo alterações epigenéticas, pouco mudou em relação aos nossos ancestrais do período Paleolítico, sobretudo aqueles que viveram no Nordeste da África (Eaton, 2006).

Contínuos esforços multidisciplinares vêm estabelecendo uma visão do padrão nutricional para o qual o genoma humano foi originalmente destinado com igual compreensão do meio epigenético dentro do qual a dieta existente à época e os genes dos hominídeos interagiram, eis que se tem observado mudanças positivas na saúde do homem com adoção de dieta semelhante à praticada naquele momento, sobretudo em relação às doenças crônicas como diabetes, esclerose múltipla, problemas cardíacos e síndrome metabólica (Eaton, 2006; Otten, et al., 2017).

Neste sentido, é preciso lembrar que, embora a seleção natural tenha proporcionado ao homem adaptação nutricional, há anos já enfrentamos diversos problemas de saúde relacionados à alimentação e para os quais a moldagem genética prévia não nos preparou (Eaton e Konner, 1985).

2.5.2 O comportamento alimentar na sociedade contemporânea

Em alguns países do mundo as revoluções industriais, agrícolas e tecnológicas e a estabilidade social, política e econômica propiciaram um abastecimento alimentar de grande porte e prontamente disponível, conduzindo a uma segurança alimentar praticamente inquestionável em que o abundante suprimento de alimentos está vinculado às mudanças na quantidade e na qualidade dos componentes da dieta e no estilo de vida do homem. Se tomarmos como exemplo a população norte-americana, cujo comportamento alimentar atual é mundialmente refletido em virtude do alcance global das redes de *fast-food*, veremos que até o início do século passado a composição da dieta não era muito diferente daquela mantida pela maioria dos nossos ancestrais, todavia da metade do século XX em diante o consumo de gordura, principalmente gordura do tipo saturada, aumentou (Acheson, 2013).

Então, é possível dizer que o ser humano passou por uma transição nutricional, sendo que na atualidade é formada por cinco padrões de comportamento. O primeiro padrão corresponde ao já repetidamente mencionado período paleolítico; o segundo padrão reflete o surgimento da agricultura, os momentos de fome pelos quais a humanidade passou e uma piora no estado nutricional; o terceiro é representado pela diminuição da fome conforme a elevação da renda; o quarto padrão, também mencionado anteriormente, é aquele em que a dieta composta por alimentos menos interessantes do ponto de vista nutricional e a diminuição nos níveis de atividade física leva ao aumento de doenças, em especial as crônicas; e, por fim, o quinto padrão é marcado por uma tentativa de reverter as tendências negativas adquiridas anteriormente na busca por um envelhecimento bem sucedido (Popkin, 2006).

O padrão quatro foi rapidamente adotado em países com população de baixa e média rendas e tem-se observado gradativa aceleração desta tendência em nações economicamente desenvolvidas e nas quais há prevalência de maior renda. A dieta ao redor do globo terrestre está a cada dia que passamos tornando-se mais densa em energia, o consumo de açúcar e de

gorduras vegetais vem aumentando e os alimentos ricos em fibras vêm sendo substituídos por comidas processadas (Popkin, 2006). Afora isso, o acesso a alimentos industrializados foi bastante facilitado a medida que as redes de supermercado em conjunto com grandes fabricantes de alimentos processados foram expandindo-se, inclusive em países de menor renda como o Brasil, modificando os mercados agroalimentares destas regiões (Reardon e Berdegúe, 2002). Outra prova da mudança do consumo alimentar no Brasil é o avanço desenvolvido na produção de oleaginosas de alto rendimento, como a soja, e no refino de óleos vegetais de alta qualidade, o que reduz o custo de cozimentos e frituras, da produção de margarina e de óleos para salada, do preparo de refeições e da propagação da manteiga em relação a produtos que tem como base gorduras provenientes de animais (Drewnowsk e Popkin, 1997).

Um modo esclarecedor de vislumbrar essas diferenças na ingestão diária de certos tipos de alimentos é a análise de como modificou a composição nutricional da alimentação humana desde que fomos geneticamente adaptados aos alimentos naturalmente disponíveis, cuja variedade não sofreu consideráveis mudanças até os dias atuais. Assim, podemos dividir a dieta em três principais macronutrientes, quais sejam proteínas, lipídios e carboidratos, na quantidade de fibras consumidas, nos micronutrientes e na ingestão de energia (Eaton, 2006).

Como dito anteriormente, o consumo de gorduras por diversos fatores sofreu significativo aumento, sendo que dados da população americana estimam que nos anos 1950 a ingestão de energia na dieta proveniente de gorduras elevou-se de 34% para 40% a 42% e foi novamente reduzida para 36% em 1984 (Stephen e Wald, 1990). Nota-se que até meados do século passado consumia-se uma quantidade de gordura semelhante aos ancestrais da Idade da Pedra, que era de 35%, entendendo-se que não houve grandes transformações neste sentido durante tal período. No entanto, uma diferença alarmante e que pode trazer consequências nutricionais desfavoráveis é o aumento de gorduras saturadas, as quais eram consumidas na

média de 7,5% no período paleolítico e passaram a representar 16% das gorduras totais ingeridas em 1960 (Cordain et al., 2000; Eaton, 2006; e Acheson, 2013).

Segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde ou WHO (do inglês *World Health Organization*), o consumo de gorduras deve limitar-se a 30% da ingestão energética total diária para adultos, sendo preferíveis as gorduras insaturadas, como aquelas encontradas em peixes, abacates, nozes e azeites de oliva, às saturadas, que estão presentes em alimentos como carne rica em gordura, manteiga, óleo de palma, queijos, dentre outros. A WHO ainda salienta que as gorduras *trans* industriais adicionadas a alimentos processados, *fast food*, pizzas, tortas, biscoitos, margarinas e pastas não integram uma dieta saudável. O ideal, de acordo com a organização, seria um consumo inferior a 10% de gorduras saturadas e menor que 1% de gorduras *trans*, com substituição de ambas por gorduras insaturadas (WHO, 2015).

A respeito dos carboidratos temos que nossos ancestrais consumiam cerca de 35% deste macronutriente em relação à ingesta total diária de energia e em média de 2 a 3% provinham de mel, o que se pode equiparar ao consumo de açúcar adicionado aos alimentos, tão presente nas formas processadas ingeridas atualmente (Cordain et al., 2000; Cordain et al., 2005). Utilizando novamente o exemplo dos norte-americanos contemporâneos, tem-se que os mesmos ingerem cerca de 50% de sua ingesta total de energia diária em carboidratos e destes 15% são obtidos por meio de açúcares adicionadas aos alimentos durante o processo, preparo ou consumo (Eaton, 2006).

A WHO recomenda como ideal o consumo de no máximo 1% da ingestão de energia diária em açúcares adicionados para que não haja prejuízos à saúde e que os carboidratos da dieta devem ser retirados de fontes como frutas, legumes, leguminosas, nozes e grãos integrais, lembrando que batatas, batatas doces, mandioca e outras raízes contendo amido não são classificadas como frutas ou vegetais (WHO, 2015). Ao contrário de tal disposição, nos dias de hoje os grãos de cereais representam a maior fonte de carboidratos em todo o mundo e o

consumo de grãos refinados em muito é superior a ingesta de grãos integrais, sendo que em comparação aos nossos ancestrais muito pouco acesso havia a este tipo de alimento e realmente a principal forma de ingerir carboidratos eram as frutas e vegetais, que, por sua vez, induzem repostas glicêmicas mais favoráveis ao bom funcionamento do organismo humano (Cordain et al., 2005, Eaton, 2006; Seal et al., 2016).

Ademais, açúcares costumam ser adicionados a bebidas como sucos concentrados de frutas e néctares de frutas, elevando ainda mais o consumo de carboidratos devido à sua falsa aparência de saudável (WHO, 2015). Outro componente da dieta contemporânea recentemente introduzido e que eleva o consumo de carboidratos são os produtos lácteos, igualmente indutores de reação glicêmica indesejável. A ingestão de carboidratos seria equivalente quantitativamente ao passado se todo o açúcar adicionado fosse removido da dieta e a equivalência qualitativa ocorria se a ingesta de laticínios e grão de cereais fosse substituída por frutas e vegetais, que hoje aproxima-se de apenas 23% do total de carboidratos ingeridos diariamente (Eaton, 2003).

O consumo de proteínas na dieta humana sofreu relevantes modificações desde que o homem passou a caçar e alimentar-se de outros animais, com ocorrência de uma grande transformação dietética advinda do aumento da ingestão de carne em consequência das mudanças ecológicas na África associadas ao resfriamento global por volta de 2,5 milhões de anos atrás (Leonard & Robertson, 1994). Neste período a ampliação dos ambientes de pastagem abertos teria proporcionado aos animais o consumo plantas de alta qualidade devido à melhora da densidade e da distribuição dos alimentos, o que tornou a caça um recurso mais atraente aos hominídeos (Vrba, 1988).

Sabe-se que a ingesta proteica durante a existência dos caçadores-coletores na face da Terra variou conforme a latitude do local onde viviam; não obstante, o grupo de hominídeos mais semelhantes aos seres humanos, habitante da savana equatorial, consumia cerca de 30%

do consumo diário de energia em conteúdo proteico, o que equivale a aproximadamente 3g/kg por dia para um indivíduo de 70 kg que consumia ao todo 3.000 calorias diárias (Eaton e Konner, 1985; Eaton, 2006).

No ano de 2007 a WHO organizou um relatório sintetizando o que havia sido publicado até o momento a respeito da necessidade da ingestão de proteínas e aminoácidos na nutrição humana, concluindo que para 97,5% da população adulta saudável seja suficiente o consumo de 0,83g/kg de proteína ao dia (WHO, 2007). Isto significa uma redução vultuosa nas quantidades diárias deste macronutriente ao comparamos a dieta contemporânea à dieta dos nossos ancestrais, contudo a mudança no tipo de alimentos disponível desde àquela época provavelmente é a justificativa mais acertada para tal acontecimento, sendo que neste momento os cereais contribuem de modo significativo para a ingestão de proteínas em países em que as culturas alternativas e fontes animais não são viáveis ou não podem ser consumidas por motivos religiosos (Garn e Leonard, 1989; Seal, et al., 2016).

Associada às modificações no consumo dos macronutrientes mencionados, a ingestão de fibras também sofreu diminuição importante em relação à quantidade consumida pelas espécies humanas de caçadores-coletores, tendo em vista que as frutas e os vegetais ingeridos naquele momento eram substancialmente mais fibrosos que os disponíveis atualmente, com uma queda de 133 gramas de fibra alimentar por quilo de alimento para apenas 42 gramas a cada quilo (Eaton, 1990). Por outro lado, os cereais necessitam de processamento por cozimento ou por moagem e fracionamento antes de serem consumidos e a maior parte dos mesmos é processada até que se tornem farinhas refinadas, implicando na remoção das camadas externas e do germe e reduzindo a quantidade de fibras presentes. Com isso, houve redução no consumo de grãos e farinhas integrais em países industrializados e as pessoas passaram a consumir ainda menos fibras em sua alimentação diária (Seal, et al., 2016).

Sobre os micronutrientes convém mencionar que houve pouca variação desde a consolidação do genoma humano na sua atual essência, salvo algumas vitaminas e determinados minerais que tiveram seu padrão de consumo visivelmente alterado, como o sódio, cuja adição aos alimentos consumidos nos dias de hoje, especialmente aqueles industrializados, além de aumentar exponencialmente a ingestão, ainda a faz ser bastante superior a de potássio, proporção que apresentava consumo inverso na dieta humana ancestral em virtude da presença deste elemento químico em frutas e vegetais (Eaton, 2016).

Quanto à ingestão de energia há uma questão que a princípio pode ser paradoxal, mas quando se analisa com maior atenção percebe-se que é facilmente justificável. Os ancestrais humanos consumiam uma dieta considerada de alto valor calórico, visto que chegavam a ingerir cerca de 2.800 calorias por dia. No entanto, possuíam índice de massa corporal considerado normal na atualidade e metade das espessuras de dobras cutâneas dos seres humanos contemporâneos, o que se explica pelo desenvolvimento de musculatura semelhante a de atletas de alto rendimento que lhes conferia excelente funcionamento do metabolismo de energia e permitia maiores consumo e gasto calórico (Eaton et al., 1988; Eaton & Eaton, 2003).

Assim, vislumbra-se que a disponibilidade de alimentos facilmente consumíveis, as mudanças biológicas no padrão de aceitação de diversos sabores e o aumento da renda trouxeram várias alterações na maneira como nos relacionamos com a comida, sendo preciso considerar que as escolhas alimentares que resultaram nas modificações numéricas descritas nos parágrafos anteriores, além das razões sensoriais adquiridas durante a adaptação nutricional, são motivadas pela experiência envolvendo aspectos psicológicos e influências culturais (Rozin, 2002).

Provavelmente, as características alimentares compartilhadas hoje pela espécie *H. sapiens* ao redor do planeta Terra são fruto de programação genética, desde a época já citada

quando o genoma do homem foi estabelecido, e as manifestações que apresentam maiores variações são influenciadas pela experiência individual, sobretudo no que corresponde à cultura. O paladar, por exemplo, é um fato determinante ao optarmos por certos tipos de alimentos e predisposições biológicas universais sinalizam preferência a alimentos doces e gordurosos em detrimento dos sabores irritantes, amargos e fortes (Rozin, 2002).

O consumo de alimentos pelo ser humano em suas refeições relacionais aos seguintes fatores: grau de fome ou déficit de energia, quantidade de alimentos disponíveis, palatabilidade dos alimentos, variedade dos alimentos, cenário social, adequação dos alimentos para a ocasião, regras culturais sobre quantidades apropriadas para comer e acerca do tempo entre as refeições, tempo e concorrentes e memória de ter se alimentado recentemente (Rozin, 2002).

A disponibilidade e a palatabilidade dos alimentos são peças chaves na manifestação do comportamento alimentar, sendo que ambos estão sofrendo deturpações desde que o homem começou a apresentar o modo como hoje relaciona-se com a comida. Podemos dizer a preocupação com o que comemos e o quanto comemos faz parte de um eixo central no que concerne à psicologia humana sobre alimentação e que no mundo ocidental moderno existe uma disparidade entre o aumento do número de pessoas com excesso de peso e o crescimento dos casos de desordem alimentar associadas à magreza (Rozin, 2002).

O excesso de alimentos disponíveis presente em diversos países nos dias atuais vem conduzindo o homem a mudanças no que se refere a quantidade geral de alimentos consumida e ao tamanho das porções em cada refeição (Rozin, 2002). Um exemplo de como o tamanho da porção afeta o consumo é que em uma comparação entre a França, onde as porções servidas geralmente apresentam menores quantidade de alimento, e o Estados Unidos, em que porções absurdamente abundantes em alimentos estão incluídas nos cardápios de diversos restaurantes do país, os franceses demonstram índice de massa corporal inferior aos norte-americanos

porque mesmo em tamanho reduzido as porções são suficientes para gerar satisfação (Rozin et al., 2003).

O fato de sentir fome e a saciedade, ambos parâmetros fisiológicos relacionados ao ato de comer, estão intimamente relacionados com o comportamento alimentar e aspectos referentes a externalidades, como o tempo em que se passa na presença de alimentos e a situação que se está vivenciando. Com isso, afora as consequências do tamanho das porções na saúde humana, condições externas e influência socioculturais determinam sobremaneira as preferências alimentares definidas durante a evolução dos seres humanos (Mela, 1996; Rozin, et al., 2003).

Há muito tempo vivemos em um ambiente com grande facilidade de obtenção de alimentos extremamente palatáveis, o que estimula o consumo desregulado de alimentos e leva ao excesso de peso e, conseqüentemente à obesidade, que atualmente é um dos principais agravos de saúde relacionados à má alimentação e tornou-se uma verdadeira epidemia em todo o mundo, fazendo com que a busca pela compreensão desta condição volte-se à base evolutiva da alimentação (González-Muniesa, 2017; Rush e Yan, 2017).

O aumento do número de obesos e pessoas com sobrepeso preocupou sobremaneira os pesquisadores da área da saúde e desde que esta ocorrência foi percebida incontáveis estudos têm como objetivo não só as suas causas, mas também o lamentável rol de doenças associadas, como diabetes e Alzheimer (Chan, et al., 1994; Naderali, Ratcliffe e Dale, 2009). Outros dados preocupantes referem-se ao crescimento de quadros de depressão e ansiedade na infância relacionados a índices de massa corporal elevados, bem como ao aumento da prevalência de déficit de atenção e transtorno de hiperatividade em crianças e adolescentes com excesso de peso (Rofey, et al., 2009; Waring e Lapane, 2008).

Um elemento que pode elevar o risco para o desenvolvimento de sobrepeso é o ato de comer em resposta a fatores emocionais internos, conforme tem sido abordado pela teoria psicossomática (Bruch, 1964; van Strien et al., 2012). Por outro lado, o excesso no consumo de alimentos tem sido observado em virtude da dificuldade de pessoas com sobrepeso ou obesas em perceber a quantidade adequada de alimento requerida para satisfazer a sua necessidade nutricional, uma vez que o ato de comer nestes casos pode estar relacionado à resposta a estímulos externos, tais quais o cheiro, o visual e o sabor da comida, conforme aduz a teoria da externalidade (Schachter, 1971). Ambas as teorias partem da premissa que as pessoas com tendência a alimentar-se de modo exagerado apresentam menor consciência acerca dos sinais de fome e saciedade (Ferrer-Garcia, et al., 2017).

O ambiente obesogênico presente em nosso cotidiano decorre do enorme número de estímulos alimentares às comidas pouco saudáveis e ricas em carboidratos refinados e gorduras saturadas e *trans* e agrava ainda mais a condição de quem tem sobrepeso ou é obeso (Ferrer-Garcia, et al., 2017). Sobre a resposta alimentar a estímulos externos é preciso salientar que existe uma diferença entre sugestões externas normativas e sensoriais, pois aquelas normativas, como o tamanho da porção, afetam todos indiscriminadamente, contudo, quando se trata de sugestões sensoriais, a exemplo das propriedades dos alimentos, como serem mais ou menos palatáveis, percebe-se um efeito fortemente maior sobre determinadas pessoas, quais sejam obesos, famintos e quem se encontra em dietas restritivas (Herman e Polivy, 2008).

Os estudos sobre a relação entre o excesso no consumo de alimentos e as razões emocionais, psicológicas e externas para que isso ocorra muitas vezes são inconclusivos e controversos, porém foi encontrado um resultado interessante em que a exposição à sugestão está intimamente vinculada à ansiedade, inclusive antecipada, levando a comportamentos compulsivos e com o tempo quem tem tendência a engordar em virtude de compulsão alimentar associa as sugestões ambientais e temporais a altos níveis de ansiedade antecipatória, o que se

chama “fome bulímica” (Martínez-Mallen, et al., 2007; Ferrer-Garcia, et al., 2017). Além disso, a repetição da exposição à estímulos específicos gera uma resposta psicofisiológica que é experimentada subjetivamente como ansiedade alimentar e desencadeia compulsão, esta que ao ser vinculada a sugestões reforçadas aumenta a probabilidade de novos episódios (Koskina et al., 2013).

As modificações do comportamento alimentar expostas geram implicações negativas na saúde humana nos mais variados estágios da vida dos seres humanos, podendo impactar desde a gestação e a formação do embrião/feto até a velhice. Durante a gravidez a mulher é influenciada pelos mesmos fatores que o restante da população e ainda está sujeita a mudanças comportamentais e metabólicas próprias do estado gravídico, sendo que o impacto do ambiente em que vive e suas escolhas alimentares vêm sendo constantemente estudados por produzirem diversos efeitos na saúde do embrião, do feto e do recém-nascido, afora de poderem trazer consequências futuras na vida adulta (Gilmore, Klempel-Donchenko e Redman, 2015), o que será aprofundado no tópico a seguir.

2.5.3 O comportamento alimentar materno durante a gestação

A gravidez pode ser considerada um estágio peculiar na vida humana em que as preocupações com saúde assumem outro patamar e as consequências da falta de cuidado atingem, além do organismo materno, o ser humano que está em formação, cujo período de crescimento e desenvolvimento é o mais vulnerável de toda a sua existência e inspira proteção (Franko & Walton, 1993; Lucyk e Furumoto, 2008). Neste momento particularmente importante do ciclo reprodutivo, o corpo feminino sofre intensas modificações em seu tamanho e forma em um curto espaço de tempo e é necessário que a gestante promova mudança em seus hábitos para acompanhar a série de acontecimentos que envolve a gestação, como, por exemplo, adequação de sua dieta aos requisitos nutricionais do feto (Duncombe et al., 2008).

No que concerne ao comportamento alimentar a gestação pode ser considerada um momento crucial, uma vez que, ao mesmo tempo em que a gestante necessita aumentar seu peso em virtude do crescimento do embrião/feto e dos anexos embrionários, o ganho de peso deve acontecer mediante o consumo de uma dieta nutricionalmente adequada e com a escolha dos alimentos corretos, o que costuma tornar a alimentação um grande desafio frente às transformações neuroendócrinas que afetam o metabolismo, o apetite e o humor (Russell, Douglas e Ingram, 2001; Gomes et al., 2015; Barguer, 2010).

O comportamento alimentar manifestado durante a gravidez pode trazer consequências fisiológicas diretas ao feto e estressá-lo de modo a afetar de forma permanente a expressão de seus genes (Barguer, 2010). Contudo, assim como em relação a maioria das pessoas na sociedade contemporânea, as mulheres têm apresentado sobrepeso e obesidade, sendo que muitas delas engravidam nesta condição e a conservam durante a gestação e o aleitamento, e mesmo aquelas que engravidam dentro de uma faixa de peso eutrófica estão ganhando muito peso na gravidez, o que se torna um agravo para a sua saúde a do bebê (*Institute of Medicine*, 2009).

As exteriorizações do comportamento alimentar de uma gestante sofrem as mais variadas influências, como as condições financeiras para aquisição de alimentos de alta qualidade nutricional, as reações de seu organismo a ingestão de alimentos, os hábitos alimentares anteriores à gestação, suas circunstâncias sociais e o contexto cultural no qual está inserida (Baião e Deslandes, 2008). Embora existam diferenças, a maioria das sociedades apresentam crenças semelhantes no que corresponde ao estado de vulnerabilidade em que a mãe e o feto se encontram no período gestacional, sobretudo a respeito dos malefícios do consumo de bebidas alcoólicas, do uso de tabaco, da falta de atividade física, da condição psicológica alterada e da alimentação inadequada (Helman, 2009).

Há neste sentido que se salientar que cada mulher de acordo com as manifestações socioculturais da sociedade em que vive tende a fazer escolhas alimentares que, além de contemplarem as necessidades nutricionais que uma gravidez impõe, satisfaçam os seus anseios emocionais, podendo inconscientemente perturbar a dieta planejada para o seu estado gravídico (Baião e Deslandes, 2008). As manifestações culturais com maior potencial de influenciar o comportamento alimentar das mulheres durante a gestação são a memória, as tradições, as relações sociais e familiares, a mídia e as noções de saúde, doença e estética (Junges, 2010).

Ademais, ainda são comuns em diversas sociedades crenças como aquelas de que se o desejo da gestante não for atendido o bebê pode nascer com alguma marca, justificando assim as extrapolações nutricionais. Porém, não se pode deixar de mencionar que as crenças culturais sobre alimentação na gravidez, mesmo que às vezes controversas, baseiam-se na vontade de proteção ao binômio gestante-bebê muitas vezes focada no momento pelo qual a mulher está passando em que assume um novo *status* social, o de mãe (Baião e Deslandes, 2008; Helman, 2009; Monticelli, 1996).

Ao contrário do que ocorre com determinadas mulheres que mantêm um padrão de alimentação compatível com o ganho de peso esperado e desejado em uma gravidez, determinadas gestantes parecem apresentar problemas no que se refere ao consumo de alimentos e às mudanças no corpo decorrentes da gestação. Enquanto algumas passam a adotar dietas restritivas e pouco saudáveis pelo medo de engordar e pela insatisfação com a imagem corporal decorrente da gestação, ambos em função das imposições culturais modernas pela manutenção de um estereótipo de magreza, outras aproveitam a oportunidade para exagerar no consumo de alimentos, alegando que devem comer mais porque precisam alimentar mais de uma pessoa ou como diz o ditado popular “comer por dois”. (Davies e Wardle, 1994; Clark, et al., 2009a; Shloim, 2014.).

No período gestacional as mulheres costumam estar mais disponíveis a discutir e repensar o seu comportamento alimentar, estando receptivas a orientações e estimuladas a mudanças comportamentais. Todavia, é possível constatar que apesar disto ainda estão sujeitas a distúrbios e descompensações alimentares, a exemplo da compulsão, que aparece como a principal desordem no comportamento alimentar durante a gestação. Estudos mais antigos já revelavam que mulheres grávidas ingerem mais calorias, preocupam-se menos com a qualidade do que consomem e demonstram uma frequência menor de distúrbios alimentares restritivos. Maus hábitos alimentares associado ao consumo compulsivo de alimentos podem contribuir para aumento do ganho de peso, retenção do peso adquirido na gestação e obesidade em período pós-parto (Clark and Ogden, 1999; Soares, et al., 2009).

Convém mencionar que é comum a ocorrência de distúrbios alimentares em maior ou menor grau juntamente com desordens psiquiátricas como a depressão maior, o transtorno bipolar, a maioria das desordens de ansiedade, a bulimia nervosa, o abuso de substâncias químicas e o uso compulsivo de álcool. Como não poderia ser de outro modo, gestantes estão sujeitas a estas perturbações tanto quanto mulheres não grávidas e foi averiguado em pesquisas anteriores que há associação entre a compulsão alimentar e os sintomas de ansiedade apresentados durante a gravidez (Javaras, et al., 2008; Soares, et al., 2009).

Estudos recentes, inclusive realizados no Brasil, vêm demonstrando uma necessidade cada vez maior de priorizar orientações sobre comportamento alimentar no pré-natal, eis que tem sido observada a prática de hábitos não saudáveis durante a gestação. Assim como foi constatado em gestantes residentes no estado de São Paulo em pesquisa realizada no ano de 2015, na qual se verificou o consumo de biscoitos industrializados e refrigerante por 86,4% e 69,9% das entrevistadas, respectivamente, e a ingestão de frutas e salada crua diariamente por menos da metade do número total de participantes. Além disso, quando as gestantes incluídas no estudo em comento foram comparadas com mulheres não-grávidas residentes em capitais

brasileiras foi averiguado que aquelas consumiam maior quantidade de carne com excesso de gordura e leite integral (Gomes et al., 2015).

A intensificação com os cuidados alimentares maternos na gestação e os estudos, sobretudo epidemiológicos envolvendo o assunto, tiveram como ponto de partida a teoria da origem fetal de doenças adultas publicada há mais de 25 anos. Inicialmente, as pesquisas se direcionaram para situações extremas em que o feto poderia ser afetado, como a desnutrição, contudo, ao longo dos anos percebeu-se que desvios menores no que se considera um pré-natal ideal igualmente poderia trazer impactos negativos na vida pós-natal (Hales e Barker, 1992; Kunz e King, 2007).

Em virtude do vultuoso aumento de casos de diabetes gestacional e do sobrepeso na gravidez estes foram os primeiros enfoques das pesquisas clínicas sobre tema. Diversas pesquisas passaram a correlacionar problemas agravos de saúde em proles provenientes de gestação em que foi constatada obesidade materna, como predisposição à síndrome metabólica, desenvolvimento de obesidade na idade adulta, hiperfagia e defeitos do tubo neural (Srinivasan, et al., 2006; Stothard, et al., 2009).

A seguir descobriu-se que o risco do aparecimento de várias doenças durante a idade adulta está associado ao desenvolvimento fetal com influência direta do estado nutricional materno durante a concepção e a gravidez, o que implica em necessidade ainda maior de controle nutricional dos alimentos consumidos por mulheres em idade fértil e por gestantes. É sabido que mesmo antes da implantação do embrião no útero materno o óvulo fertilizado e o blastocisto respondem à qualidade nutricional do ambiente presente nos tubos de falópio e que o desenvolvimento inicial do feto e da placenta estão vinculados a partição de nutrientes, que caso não sejam adequados provocam aumento do risco para certas doenças (Lowensohn, Stadler e Vaze, 2016).

Inúmeras variações na ingestão de macro e micronutrientes podem estar associadas a prejuízos na formação embrionária/fetal, como, por exemplo, o aumento em duas vezes do risco de defeitos do tubo neural frente ao consumo de alimentos com elevado índice glicêmicos pela mãe na gestação e a redução de tal frequência com a diminuição da ingestão deste tipo de alimento ainda no período pré-concepcional (King, 2006).

Outros problemas de desenvolvimento fetal vinculados à nutrição materna durante a gravidez são malformações do sistema nervoso central, em especial do tubo neural, quando presente deficiência de ácido fólico (Hibbard e Smithells, 1965; Smithells, Sheppard e Schorah, 1976), redução do número e da densidade das fibras musculares em deficiência de proteína (Mallinson, et al., 2007), aumento dos receptores de angiotensina II tipo 1 (WU, et al., 2016), dentre outros.

Em virtude do padrão de alimentação ter sido modificado nos últimos anos com substituição de grande parte dos alimentos provenientes da natureza e da carne de origem animal por produtos industrializados contendo enormes quantidades de gorduras, principalmente gorduras saturadas e gorduras *trans*, tornou-se fundamental direcionar atenção sobre como esta alteração alimentar atinge a gestante e o feto durante a gravidez. Embora o consumo de gorduras integre as recomendações nutricionais durante a gestação em função de seu uso como fonte de energia, transporte das vitaminas A, D, E e K, que são lipossolúveis, e formação de ácidos graxos, a quantidade e a qualidade das gorduras ingeridas são fundamentais para que não sejam causados prejuízos a própria mãe e ao feto. Dietas ricas em gordura, principalmente aquelas de má-qualidade, têm sido relacionadas ao aumento da resistência à insulina, do risco de diabetes e dos níveis séricos de colesterol para a gestante (Bowers, et al., 2012; Chen, et al., 2010; Park, et al., 2013).

O consumo de dieta balanceada e rica em frutas e vegetais, carboidratos de alta qualidade produzidos com grãos integrais, proteínas provenientes de feijões, carnes magras de

origem animal, frutos do mar e peixes deve ser encorajado à todas as gestantes. Assim, como a redução de carne vermelha, açúcares adicionados e comidas processadas. No entanto, maiores definições a respeito da nutrição materna para um excelente desenvolvimento fetal são difíceis de serem determinados com confiança quando se trata de gravidez humana, seja por motivos éticos, pelo tempo de gestação, pelas variações genéticas e também pelas diferenças na expressão de nossos genes, estas decorrentes das variações epigenéticas em resposta ao ambiente em que as gestantes estão inseridas (Lowensohn, Stadler e Vaze, 2016).

Além disso, como dito antes, os danos à saúde da prole provenientes da ingestão excessiva de gorduras na gravidez são alvo constante das pesquisas biomédicas relacionadas ao tema e até então muito já foi descoberto; contudo, por ser uma área consideravelmente recente de estudo ainda restam diversas lacunas a serem exploradas. Dessa forma, o uso de modelos animais e as pesquisas científicas de base demonstram ser a melhor opção para elucidação de pontos críticos específicos em que a prole está sujeita a doenças em períodos posteriores ao parto (Kunz e King, 2007), que é o modo em que o presente trabalho pretende avaliar a influência de uma dieta materna rica em gordura durante o pré-natal, a gestação e o pós-parto no desenvolvimento neurológico do feto.

2.5.4 O desenvolvimento neurológico fetal

Dentre os órgãos que constituem o corpo humano o mais complexo é o sistema nervoso central (SNC), motivo que torna os seus componentes fontes inesgotáveis de pesquisas científicas, com produção de resultados rotineiramente surpreendentes, a exemplo da descoberta sobre a incrível plasticidade capaz de conduzir à regeneração. Dentre os tipos celulares integrantes do SNC, os neurônios têm sido frequentemente investigados no que diz respeito a sua origem e desenvolvimento. Chama-se o processo fisiológico que origina neurônios funcionais a partir de células progenitoras de neurogênese, o qual envolve pelo menos

dois elementos: proliferação celular, que é a produção de novas células, e sobrevivência celular, concernente a capacidade das novas células produzidas conforme o seu destino de especificação atingirem a maturidade (Ahmed, 2009; Ming e Song, 2005; Tozuka, Wada e Wada, 2009).

É plausível iniciar o entendimento de como as células nervosas são produzidas a partir da formação do neuroepitélio, que ocorre pela conversão da ectoderme ventral em tubo neural após sinalização da mesoderme dorsal (Spemann e Mangold, 1923, reimpresso em 2001). A parede do tubo neural, por sua vez, é constituída por células neuroepiteliais capazes de proliferar-se simetricamente com produção de duas células neuroepiteliais para cada célula neuroepitelial (Alvarez-Buylla, et al., 2001; Shimojo, Ohtsuka, e Ryoichiro, 2008).

A medida que a parede descrita vai se tornando mais espessa, as células neuroepiteliais vão alongando-se e transformando-se nas denominadas células da glia radial, que possuem corpos celulares na zona ventricular do córtex cerebral, e também em fibras radiais que alcançam a superfície pial do encéfalo. Diferentemente das células neuroepiteliais, as células da glia radial apresentam divisão assimétrica, em que cada célula da glia radial originará uma outra célula da glia radial e um neurônio imaturo ou um progenitor basal. A aptidão de proliferar-se, autorrenovar-se e diferenciar-se em linhagens celulares diversas ou específicas, características das células neuroepiteliais e das células da glia radial, faz com que ambas sejam consideradas células-tronco/progenitores neuronais, as quais serão denominadas no presente projeto apenas como células-tronco neuronais ou NSC (do inglês *neural stem cell*). Os primeiros passos do desenvolvimento neuronal são críticos para que seja formado um pool de células-tronco que posteriormente tenham capacidade de originar os tipos celulares do SNC com funções diversas e distintas (Malatesta et al., 2000; Paridaen e Huttner, 2014; Lee, Lee e Mody, 2014).

Enquanto os neurônios imaturos irão migrar da zona ventricular ao longo das fibras radiais para a placa cortical, local em que amadurecerão, os progenitores basais migrarão para

a região reconhecida como a principal fonte de neurônios do SNC, a zona subventricular (SVZ, do inglês *subventricular zone*) do hipotálamo, onde poderão proliferar ou originar novos neurônios. As células da glia radial por processo de neurogênese irão originar diversos tipos de neurônios, primeiramente formando neurônios das camadas mais profundas e depois neurônios da camada superficial da SVZ, região em que constituem a população celular predominante. Ademais, as células da glia radial produzirão células da glia, como astrócitos e oligodendrócitos, cujo procedimento completo de diferenciação é denominado gliogênese (Noctor, et al., 2002; Shimojo, Ohtsuka, e Ryoichiro, 2008; Paridaen e Huttner, 2014).

Em embriões e recém-nascidos são encontradas diversas zonas neurogênicas, sendo que em a maioria dos neurônios de todas as regiões cerebrais tem como precursor as células da glia radial em algum estágio do neurodesenvolvimento (Todd, et al., 2004). A camada germinativa do terceiro ventrículo é uma das fontes de NSCs, que no período de formação fetal migram para o parênquima cerebral para, então, diferenciarem-se (Stachowiak, et al., 2014). Durante o desenvolvimento do hipotálamo em embriões de roedores entre dias 10,5 e 18,5 a neurogênese é vista na expansão do pool de NSCs constituintes nas porções medial e frontal das paredes do terceiro ventrículo (Sousa-Ferreira, Almeida e Cavadas, 2014). No estágio pós-natal recente de ratos albinos observou-se que a neurogênese ainda persiste pela diferenciação de células da glia radial em mais de um nicho neurogênico, quais sejam os ventrículos laterais, toda a extensão do terceiro ventrículo, o aqueduto e o quarto ventrículo, contudo em dez dias após o nascimento da prole apenas a parede do terceiro ventrículo ainda apresenta células da glia radial (Seress, 1980).

Então, considerando-se que o terceiro ventrículo é uma das regiões neurogênicas do embrião que permanece ativa por mais tempo no pós-natal com considerável quantidade de células radiais da glia exercendo função de célula-tronco/progenitora neuronal, merece esse local de pool de NSC especial interesse quando se pretende estudar NSC, células progenitoras

neuronal e neurogênese. Curiosamente, pesquisas destinadas ao estudo de como o comportamento alimentar durante a gestação impacta o desenvolvimento neurológico do embrião/feto encontraram no terceiro ventrículo hipotalâmico um local alvo da dieta materna, o que será posteriormente aprofundado (Chang, et al., 2008; Stachowiak, et al., 2014).

Em jovens e adultos a neurogênese ainda persiste, no entanto, restringe-se à zona subependimal dos ventrículos laterais, também chamada zona ventricular-subventricular, e à zona subgranular do giro dentado, localizado no hipocampo de roedores e humanos (Doetsch et al., 1999; Paridaen e Huttner, 2014). Os neurônios formados em cérebros adultos são importantes para a nossa saúde neurológica uma vez que, conforme pesquisas recentes, consistem em um fator determinante para a plasticidade cerebral, cujo local primordial de ocorrência corresponde ao hipocampo (Jessberger et al., 2009; Sahay et al., 2011). Além disso, a produção de novos neurônios funcionais na vida adulta está relacionada às funções cognitivas, como a memória espacial, relacionadas ao hipocampo (Farioli-Vecchioli, et al., 2008; Dupret, D., et al., 2008).

Com isso, a compreensão do processo de formação de células nervosas desde as primeiras NSCs até um neurônio em estágio final de desenvolvimento são fundamentais para que sejam conduzidas novas pesquisas com o objetivo de prevenir danos e tratar as doenças neurológicas e seus desdobramentos. As NSCs modificam suas características morfológicas e sua competência durante a formação do SNC e existem determinadas etapas a serem seguidas para que não haja diferenciação prematura e sejam produzidos tipos celulares precoces, levando à desorganização na forma e na citoarquitetura do cérebro (Ahmed, et al., 2009).

As células-tronco e as células progenitoras se mantêm em estado indiferenciado ou são estimuladas a diferenciarem-se mediante a ativação de diversos genes com participação das vias de sinalização e seus fatores de transcrição, sendo que as NSCs estão sujeitas principalmente à

ação de três principais vias: Wnt/ β -catenin, Notch e Shh-Gli (Kalani et al., 2008; Artvanis-Tsakonas, Rand e Lake, 1999; Palma e Ruiz-i-Altaba, 2004).

É importante dar enfoque à participação de Notch no desenvolvimento neurológico embrionário e fetal porque sua função de sinalização é marcada por diversas mutações de perda de função que levam à diferenciação precoce das células progenitoras neuronais e defeitos na maturação do sistema nervoso, como prejuízo à sobrevivência celular e migração desordenada de células progenitoras (Gaiano e Fishell 2002; Lütolf 2002; Zhang, Engler e Taylor, 2017). A ausência da proteína NOTCH1 leva à redução do pool de células-tronco neuronais em adultos devidos às consequências da falta de sinalização (Basak et al., 2012; Ables et al., 2010).

A via de sinalização Notch está envolvida na regulação do balanço entre diferenciação neuronal e expansão das células progenitoras neuronais, onde os fatores de transcrição HES1 e HES5 são efetores essenciais que codificam sinais de repressão transcricional, regulam a manutenção da célula no estado indiferenciado e reprimem a diferenciação neuronal ao serem expressos em NSCs embrionárias (Ohtkusa, et al., 1999; Sakamoto, 2003; Hatakeyama, et al., 2004). Os genes *HES*, que são alvo de Notch, sustentam a divisão simétrica em que uma NSC era apenas proliferar, formando duas novas NSC sem que haja formação de tipo celular diferenciado (Zhang, Engler e Taylor, 2017).

HES1 e HES5 reprimem a expressão de genes proneurais e, por isso, regulam a inibição da diferenciação neuronal e a manutenção das NSCs (Shimojo, Ohtsuka e Kageyama, 2011). A forma como a proteína HES1 atua para manter a célula-tronco em estado indiferenciado é através da inibição da atividade do gene proneural *MASH1*, pois, como foi observado em ratos, na perda de HES1 os níveis de MASH1 e a quantidade de células-tronco neuronais MASH1-positivas aumentam (Ahmed, 2009; Cau, et al., 2000). Ao contrário da ação

negativa de HES1, quando expressas as proteínas NUMB2 e NUMB4 aumentam os níveis de expressão de MASH1 (Bani-Yaghoub, et al., 2007).

O controle da expressão de determinadas proteínas ainda pode ocorrer por outros mecanismos como as proteínas de ligação ao RNA neuronal, dentre as quais MUSASH1, ou MSI1, desempenha papel fundamental em células neuronais precursoras, tornando tal proteína um marcador deste tipo celular (Okano, 1995; Good et al., 1998; Imai, et al., 2001). A proteína MSI1 foi identificada em mamíferos como altamente presente em células-tronco e células progenitoras neuronais no desenvolvimento do SNC durante o período embrionário e durante a diferenciação celular seus níveis vão diminuindo, indicando a sua participação na manutenção do estado indiferenciado, o que se dá pelo aumento da sinalização Notch por repressão do RNA mensageiro (mRNA) alvo *mNUMB* (Sakakibara S, et al., 1996; Imai, et al., 2001; Okano, 2005).

Afora a regulação pelas vias sinalizadoras citadas e a interferência de outras influências do ambiente celular, durante a neurogênese as NSCs estão sujeitas a terem sua expressão gênica controlada pela epigenética. Dentre algumas formas regulatórias de natureza epigenética podemos citar as metilações do DNA e as modificações de histonas, ambos participantes do controle temporal e espacial da manifestação genética, e o silenciamento por microRNAs (miRNAs) (Okano, 1995; MuhChyi et al., 2013).

Os miRNAs são pequenos RNAs compostos por aproximadamente 22 nucleotídeos que demonstraram capacidade de suprimirem a expressão de genes mediante o silenciamento genético pós-transcricional pela inativação por repressão traducional ou degradação de seus mRNAs complementares, atuando, assim com função regulatória (Bartel, 2004; Oliveira et al., 2015).

Um exemplo da interferência dos miRNAs sobre as NSCs compreende a ação de miR-9 ao modular a expressão do efetor Notch/HES1 por interação com seu mRNA inativando a

produção da proteína e, com isso, impedindo a manutenção do estado indiferenciado anteriormente comentada. O miR-9 exerce, em verdade, um loop de feedback-negativo com HES1, uma vez que se verificou que o gene codificador de tal miRNA também pode ser reprimido por este efector (Bonev et al. 2011, 2012; Coolen et al. 2012). Ademais, vê-se que o miR-9 e sua vertente irmã miR-9* têm como alvo mRNA de NOTCH2 e também HES1 em humanos, reduzindo a expressão gênica e estimulando a diferenciação das NSCs. Portanto, a interação entre a via de sinalização Notch e miR-9/9* contribui para a determinação do destino celular de NSCs (Roese-Koerner et al. 2016).

Em virtude de todo o acima exposto, verifica-se que o desenvolvimento cerebral nas fases embrionária, fetal, pós-natal e adulta é de extrema importância para a integridade neurológica do homem e que por envolver etapas e sinalizações de tão delicada regulação merece especial atenção. A manutenção de uma dieta rica em gorduras na idade adulta, segundo dados epidemiológicos de longa data, pode estar ligada ao aumento do risco de demência, o que talvez decorra, de acordo com estudos realizados em animais, do decréscimo de neurogênese hipocampal e dos níveis de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF, da denominação na língua inglesa *brain-derived neurotrophic factor*) causado por este tipo de alimentação, que representa o principal padrão de consumo alimentar na atualidade (Kalminj, 1997; Tozuka, Wada e Wada, 2009; Park, et al., 2010).

Estudos vêm demonstrando cada vez mais a relevância da nutrição materna nos estágios iniciais da vida humana, sendo que a obesidade materna e a exposição da mãe a dietas obesogênicas, como aquelas ricas em gorduras, são sugeridas como interferências permanentes nas estruturas e funções cerebrais de seus descendentes (Niculescu e Lupu, 2009). A continuação de pesquisas voltadas para essa área são fundamentais e devem ser priorizadas, uma vez que prejuízos ao desenvolvimento cerebral em fetos estão relacionados a desordens neurológicas como autismo, cuja prevalência aumentou nos últimos anos e ainda inspira

elucidações acerca de sua etiologia (Stachowiak, et al., 2013; Lai, Lombardo e Baron-Cohen, 2013).

2.5.5 Neurogênese no hipocampo do cérebro adulto e depressão

O hipocampo, como dito antes, é o local estrito de ocorrência de neurogênese em adultos, principalmente ao considerarmos a zona subgranular e o giro dentado. Logo a seguir da descoberta da plasticidade neuronal ao longo da vida humana diversas pesquisas têm sido desenvolvidas no intuito de relacionar deficiências no processo de produção de novos neurônios a uma infinidade de doenças cerebrais e desordens psiquiátricas, sobretudo se considerarmos alterações hipocampais que possam implicar em problemas na manutenção do desenvolvimento de células-tronco neuronais, como, por exemplo, desregulação nas vias de sinalizadoras dos fatores de transcrição.

Os sinais e fatores envolvidos na neurogênese embrionária estão correlacionados às especificações de seus destinos celulares. Em se tratando de neurogênese em período embrionário a regulação do desenvolvimento celular pode influenciar na manutenção do repouso ou a ativação de células maduras, ou seja, interferindo no comportamento das células-tronco neuronais adultas (Urbán e François, 2016).

A alta capacidade proliferativa das células-tronco neuronais embrionárias deixa de ser observada em células-tronco adultas, as quais pode permanecer longos períodos no estágio G0 do ciclo celular, assim como outras células e tecidos maduros. Ademais, a variabilidade de tipos celulares produzidos é mais um diferencial, pois quando embrionária a célula-tronco neuronal dá origem a populações de diversos precursores neuronais na matriz dentada, que formarão a maciça população de neurônios no cérebro maduro. Na forma adulta a diferenciação da célula-tronco é restrita, limitando-se a um único subtipo de neurônios, neurônios granulares do giro

dentado ou a um número muito restrito de células neuronais como os neurônios granulares e periglomerulares da zona ventricular-subventricular (Zhao et al., 2008; e Ming e Song, 2011) (Figura 1).

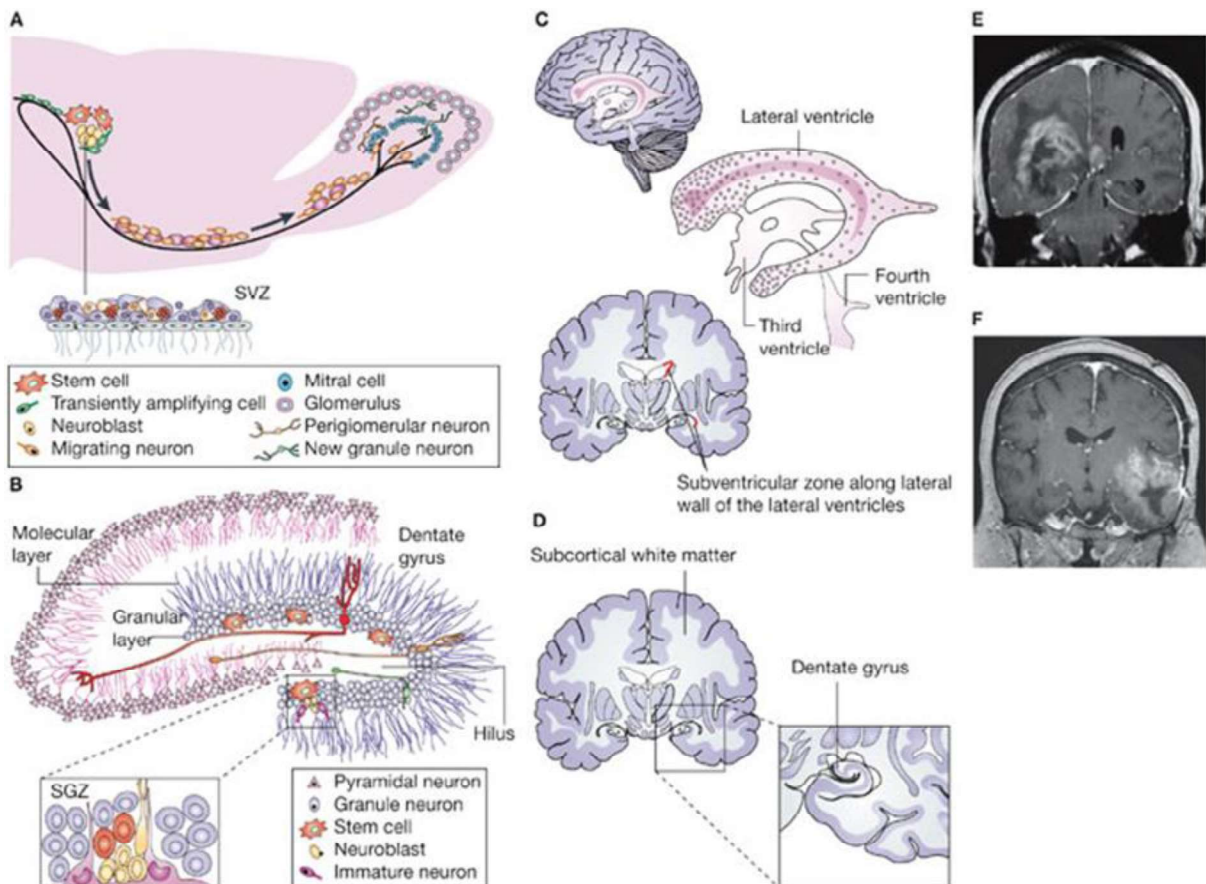


Figura 1. Células-tronco neuronais em cérebros adultos de mamíferos. **A)** Corte sagital através do ventrículo lateral de cérebro de roedores mostrando a zona subventricular ou SVZ – área de neurogênese e gliogênese adultas. Esta região se situa na lateral dos ventrículos do prosencéfalo e é composta por três tipos principais de células. Os astrócitos B multipotentes, que foram identificados como genuínas células-tronco genuínas da SVZ e são capazes de proliferar transitoriamente precursors tipo C, os quais originarão, por mitose, neuroblastos tipo A ativos. As células do tipo A, quando divididas, migram tangencialmente para o bulbo olfatório onde se integram como novos neurônios. **B)** A zona subgranular ou SGV do giro dentado localizada no interior do hipocampo constitui outra importante área de neurogênese adulta. Nesta região é provável que astrócitos do tipo B produzam precursors intermediários do tipo D, que originam neurônios granulares do tipo G. **C)** No cérebro adulto humano, a população de astrócitos na SVZ é organizada como uma fita perivascular onde foram identificadas células-tronco neuronais. Em contraste na SVZ de roedores não há sinais de cadeias de migração tangencial. **D)** A zona germinal de hipocampus adultos humanos é localizada no giro dentado. Vem sendo demonstrada neurogênese nesta região em adultos humanos. **E, F)** Gliomas malignos são comumente encontrados próximos às zonas germinais do SNC. A imagem de ressonância

magnética (T1 com gadolínio) de dois pacientes mostra um glioblastoma fronte-parietal direito próximo a lateral da SVZ (E) e um glioblastoma no lobo temporal direito, incluindo a formação do hipocampo (F) (Dietrich, Imitola e Kesari, 2008).

Enquanto no embrião e no estágio pós-natal recente a neurogênese acontece como um processo natural de concepção, em indivíduos em idade adulta a produção de neurônios tem início em uma célula quiescente. Este último corresponde a uma ação mais dinâmica e regulada por estímulos fisiológicos ou estados patológicos, com mecanismos moleculares envolvendo fatores de transcrição e sinais extracelulares de ativação, proliferação e diferenciação distintos dos precursores embrionários (Urbán e François, 2016) (Figura 2).

Embora ainda não esteja completamente elucidado, estímulos externos e vias sinalizadoras estão associados às moléculas BMPs, Notch, e GABA, atuando na quiescência; e WNT, fatores de crescimento de insulina (IGFs) e SHH, atuando na ativação, no que diz respeito a regulação da neurogênese no giro denteado em adultos (Ming e Song, 2011; e Faigle e Song, 2013) (Figura 2).

É possível, com base nos sinalizadores já vistos, perceber que pelo menos três marcadores participam do controle celular em células-tronco neuronais embrionárias e adultas, quais sejam, BMPs, Notch e WNT. Assim como respondem a diferentes sinais para manter o estado de repouso ou iniciar uma atividade, as células-tronco neuronais adultas também apresentam genes diversos: quando quiescentes expressam Hes1, Hes5, P57, FOXO3 e REST, se ativas exibirão TLX, ASC11 e Ccnd2 e caso se encontrem sem estado determinado serão marcadas com SOX2, PAX6, GFAP e GLAST (Urbán e François, 2016) (Figura 2).

A participação da via de sinalização Notch durante a neurogênese na vida adulta é fundamental no que concerne a regulação da manutenção do *pool* de células-tronco existentes

na zona subgranular e no giro dentado do hipocampo e a sobrevivência dos novos neurônios formados por deficiência dendrítica. Em estudos prévios foi constatado que no hipocampo adulto a perda da função indutora de Nocthl ao afetar dramaticamente a proliferação, o destino celular e a sobrevivência das células-tronco neuronais faz com que haja aumento do número de progenitores que saem do ciclo celular, enquanto a superexpressão da porção intracelular do receptor para Notch implica em diminuição desta saída (Breunig, et al., 2007; Liu e Ni Song, 2016).

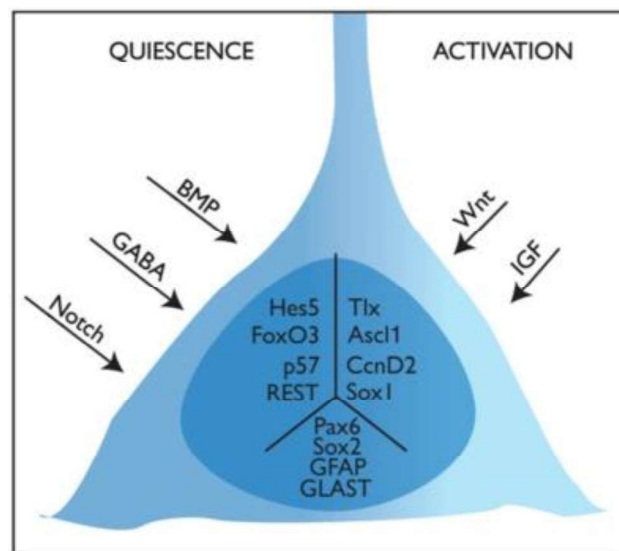


Figura 2. Quiescência e ativação da célula-tronco neuronal adulta. Os fatores extracelulares relacionados à atividade da célula-tronco neuronal adulta quiescente BMP, GABA, Notch, WNT e IGF estão representados na figura, bem como os fatores intracelulares de quiescência (Hes5, P57, FOX03 e REST), de ativação (TLX, ASC11 e CcnD2) e quando não se possui uma função definida (SOX2, PAX6, GFAP e GLAST) (Urbán e François, 2016).

Em continuidade ao comentário sobre os principais fatores de transcrição envolvidos na via de sinalização Notch se faz cogente mencionar que durante o desenvolvimento cerebral a via de sinalização Notch ativa a expressão do gene Hes inibindo a diferenciação neuronal por reprimir genes proneuronais, como Asc11 e Neurog2. Pesquisas tem observado que a repressão de tais genes acarreta progressão do ciclo celular, mas de modo insuficiente para induzir a

diferenciação celular, o que implica em manutenção do estado de quiescência (Lee, 1997; Imayoshi et al., 2013; Andersen et al., 2014).

Níveis diversos de atividade de genes proneuronais geram diferentes possibilidades em relação ao estado da célula-tronco neuronal: quiescência quando há baixa atividade, proliferação nos momentos de atividade baixa ou intermediária e diferenciação se a presente alto nível de ativação (Boareto e Taylor, 2017) (Figura 3).

Além da participação das vias de sinalização e seus fatores de transcrição, não há como deixar de comentar que existem outros mecanismos que influenciam na ativação do processo de neurogênese no adulto, como, por exemplo o fator de crescimento BDNF. Os fatores de crescimento e os respectivos receptores são encontrados como expressos em quase todas as regiões do cérebro adulto, havendo maior densidade destes no hipocampo e no neocórtex (Lu, et al., 2014; e Kumar, et al., 2017). A superexpressão de BDNF resulta em neurogênese no giro dentado e na zona subventricular do hipocampo em idade adulta e (Liu e Song, 2016).

Um importante motivo para as constantes pesquisas acerca da neurogênese no cérebro adulto é a sua relação com a depressão, que constitui uma relevante causa de debilidade a nível mundial e, por isso, grandes esforços vem sendo realizados com a intenção de esclarecimento da fisiopatologia de tal doença para melhorar das opções terapêuticas disponíveis até o momento. No final do século XX Jacobs e colaboradores postularam o que se denominou teoria neurogênica para a depressão, segundo a qual existem prejuízos à neurogênese adulta na região do hipocampo decorrentes dos efeitos deletérios do estresse, considerado o principal agente causal na etiologia da depressão (Jacobs, van Praagh e Gage, 2000).

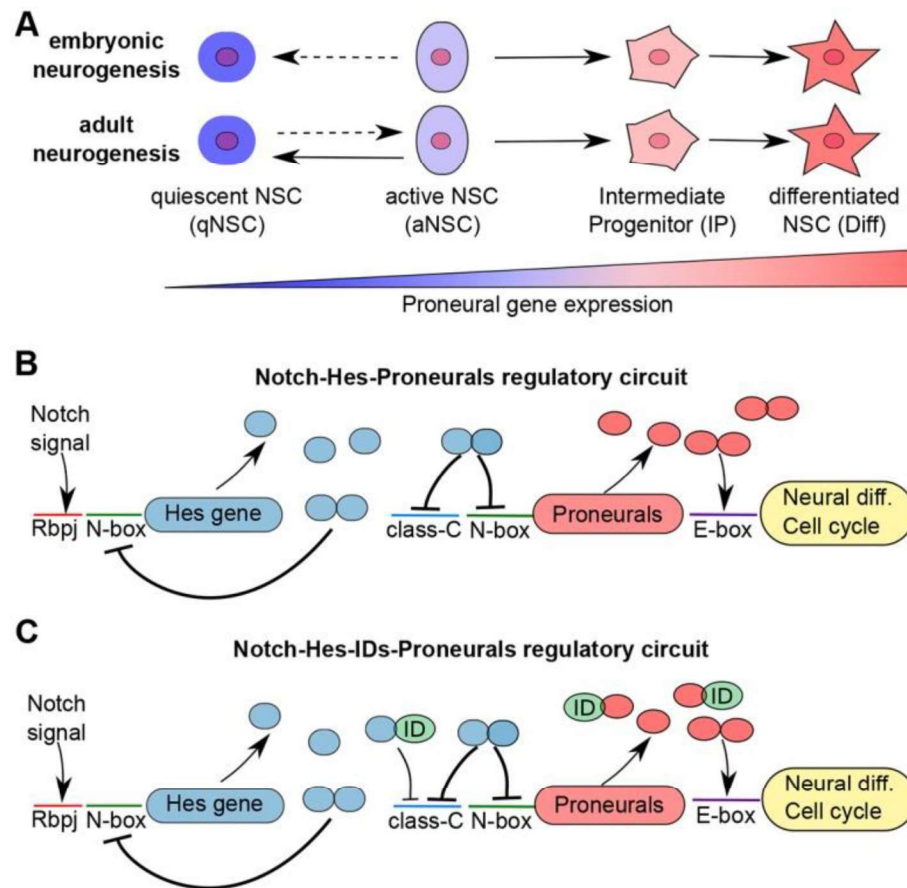


Figura 3. Processo de diferenciação das células-tronco neuronais embrionárias e adultas e reguladores. (A) O destino da célula-tronco neuronal no cérebro do embrião/feto e do adulto é dependente de níveis de expressão de fatores de transcrição proneuronais. Durante a neurogênese embrionária a maioria das células-tronco neuronais se encontra em estado ativo de mitose (aNSC) enquanto apenas um pequeno número de células está em estado quiescente (qNSC) e mantém-se inativas até a idade adulta. Em nichos neurogênicos adultos, ao contrário, a maioria das células-tronco neuronais está inativa mitoticamente e raramente transitam para o estado ativo (aNSC). Em aNSCs níveis baixos de atividade proneuronal conduzem o ciclo celular para progressão, mas são insuficientes para induzir diferenciação. Na ausência de atividade dos fatores de transcrição as células estão quiescentes (qNSC) e alta atividade dos mesmos leva à diferenciação (Diff). (B) Interação dos fatores de transcrição proneuronais Notch-Hes. A sinalização Notch por meio da proteína de ligação ao DNA (IDs) Rbpj ativa a expressão dos genes Hes. A sinalização Notch através da proteína de ligação ao DNA Rbpj ativa a expressão dos genes Hes. A proteína Hes reprime a expressão de genes proneuronais, incluindo *Asc11* e *Neurog 2* via sítios N-box e class-C, e a sua própria expressão por blindar os sítios N-box nas regiões promotoras. Fatores de transcrição proneuronal ativam a progressão e a diferenciação do ciclo celular pela via sítio E-box. (C) Interação atualmente conhecida entre Notch-Hes-IDs-proneurais. Formas heterodímeras de IDs com fatores de transcrição Hes, que não são capazes de blindar sítio N-box, mas podem blindar sítios class-C, ainda que com

eficiência mais baixa do que os hemodímeros de Hes. IDs também podem formar heterodímeros com fatores proneuronais que são incapazes de ativar os genes de diferenciação e progressão do ciclo celular (Boareto e Taylor, 2017).

Desde a proposta original os inúmeros estudos subsequentes evoluíram e, ao contrapor a teoria antes formulada, passaram a argumentar que o decréscimo na geração de novos neurônios no hipocampo contribui para a patogênese da depressão e que o enriquecimento da neurogênese hipocampal adulta é requisitado para o sucesso do tratamento antidepressivo (Duman 2004; Sahay e Hen 2007). A hipótese então suscitada foi suportada pelos achados seguintes que demonstraram que os medicamentos antidepressivos estimulam a produção de novos neurônios no cérebro adulto com possibilidade de reparação parcial das anomalias estruturais no hipocampo de paciente deprimidos (Sheline, et al. 2003; Bremner e Vermetten 2004; Perera, et al. 2008).

Com isso, passou-se a investigar quais hipóteses para a redução da neurogênese em adultos poderiam ser admitidas no que se refere a comportamentos depressivos e duas destas estão relacionadas às vias de transcrição e aos fatores de crescimento retro descritos. No compete a via de sinalização Notch foi encontrado que a mesma contribui para o aparecimento do estado de anedonia na depressão e que o aumento da expressão do gene NOTCH1 está associado a sintomas de ansiedade e comportamento depressivo em humanos que sofreram abuso sexual, o que o indica como um mecanismo patológico para o desenvolvimento da depressão característica desta condição psiquiátrica (van Veen, et al., 2012; e Steine, et al., 2016). Ademais, a deleção de um tipo de receptor de tropomiosina quinase, o TrkB, que é cognato do receptor de BDNF, resultou em diminuição da neurogênese no hipocampo adulto e aumento do comportamento ansioso (Bergami, et al., 2009).

Sendo assim, quando se pretende estudar as causas fisiopatológicas envolvidas na depressão, especialmente ao considerar-se o envolvimento da neurogênese neste distúrbio psiquiátrico, torna-se indispensável ponderar a possibilidade do envolvimento de tais alterações.

2.5.6 A influência do comportamento alimentar materno no desenvolvimento neurológico e na manifestação do comportamento depressivo na prole

Ciente de que o comportamento alimentar materno pode trazer prejuízos da mais variada ordem aos embriões/fetos submetidos às consequências de uma alimentação desregrada por suas progenitoras, torna-se imperioso investigar quais alterações nutricionais de fato são prejudiciais à saúde dos nascituros. Conforme dito anteriormente, em conjunto com todo o arsenal de mudanças trazidas pela gestação e as questões socioculturais, estamos vivendo em um ambiente onde a oferta de alimentos pouco saudáveis acompanhada pela redução da atividade física está refletindo uma epidemia de obesidade e, por outro lado, o bombardeamento de informações destinadas à cultura da magreza como ideal de corpo feminino, o que pode dificultar à aderência das gestantes ao consumo de alimentos adequados ao estado gravídico.

Os primeiros estudos envolvendo modificações cerebrais em fetos mediante a manipulação da dieta materna foram motivados pela elevação no número de crianças obesas e dos casos de diabetes tipo II infantil, que, dentre outros, suscitaram o envolvimento do sistema hipotalâmico controlador da ingestão de alimentos modificado pela dieta materna durante a gestação em distúrbios fisiológicos e comportamentais de longo prazo da prole, sendo sugerido que pesquisas posteriores tivessem como foco as diferenças entre dietas no período gestacional rica em carboidratos *versus* ricas em gorduras ou rica em gordura saturada *verus* rica em gordura instaurada (Deckelbaum e Williams, 2001; Pinhas-Hamiel;Roccini, 2002; McMillen e Robinson, 2005; Taylor e Poston, 2007).

De outra banda, estudos relativamente recentes observaram que o consumo de alimentos gordurosos em excesso por jovens e adultos está relacionado a alterações neurológicas e às funções cognitivas nestas fases da vida, como problemas de memória e prejuízos à neurogênese (Boitard, et al., 2012), redução da plasticidade neuronal (Molteni, et al., 2002), modulação dos efeitos na plasticidade sináptica e na cognição pela interação entre o estresse oxidativo e os níveis de BDNF (Wu, Ying e Gomez-Pinilla, 2004) e dificuldades de aprendizagem espacial (Cui, et al., 2012).

Uma hipótese para o aparecimento destas disfunções está representada pela diminuição da capacidade de produção de novos neurônios no hipocampo, que tem importante papel para as funções cognitivas, o que estimulou pesquisadores a aprofundarem o conhecimento a respeito de como a reprodução deste padrão de dieta por gestantes poderia repercutir na saúde do feto e na vida adulta de sua prole, impactando negativamente locais específicos do cérebro e suas habilidades relacionadas ao desempenho cognitivo (Page, 2014).

Como exemplos da interferência de uma dieta rica em gorduras no pré-natal nas características comportamentais da prole tem-se o aumento do risco de condutas anormais vinculadas à ansiedade (Peleg-Raibstein, Luca e Wolfrum, 2012; Sasaki et al., 2013), a possibilidade de retardo do desenvolvimento físico e neurológico com a exacerbação dos sintomas de depressão e atitudes agressivas (Giriko, et al., 2013), os distúrbios de aprendizagem (Page, Jones e Anday, 2014) e a alterações de memória na vida adulta (Janthakhin Y, et al., 2017). Outras alterações decorrentes do consumo exagerado de alimentos gordurosos durante a gestação são aquelas que provocam mudanças neurológicas relacionadas a disfunções no metabolismo, como sensibilidade hipotalâmica resistente à leptina (Férezou-Viala, et al., 2007) e desequilíbrio nas redes reguladoras do apetite (Chang, et al., 2008).

Devido aos conhecidos efeitos da obesidade materna sobre o desenvolvimento cerebral fetal e a maioria das dietas obesogênicas serem representadas pelo consumo de alimentos

altamente gordurosos, pesquisadores passaram a promover esforços no sentido de descobrir se determinadas alterações durante a formação do SNC eram capazes de impactar tanto os componentes teciduais e celulares do cérebro quanto o amadurecimento das funções neurológicas quando presente exposição da prole à alimentação rica em gorduras nos períodos de pré-natal, gravidez, pós-natal recente e tardio e, também, adulto. Até o momento, ao menos nove artigos sobre o tema foram publicados nos últimos dez anos, sendo que, em função das já estabelecidas alterações neuroendócrinas do feto frente à alimentação materna em que a fonte predominante são as gorduras, os estudos pioneiros basearam-se no envolvimento dos peptídeos orexigênicos para orientar as suas pesquisas (Chang, et al., 2008; Gupta, et al., 2009).

Uma das primeiras publicações relevantes sobre o tema, da autoria de Chang e colaboradores, ao fundamentar-se em estudos próprios produzidos anteriormente e outros realizados na área, teve como premissa que os peptídeos orexigênicos neuropeptídeo Y (NPY), galanina, encefalina, dinorfina e orexina apresentam expressões alteradas nas estruturas hipotalâmicas em exposição a dietas ricas em gordura ou injeções de emulsões gordurosas (Leibowitz e Wortley, 2004; Leibowitz, et al., 2004; Chang, et al., 2007; Chang, et al., 2008).

Na pesquisa retro mencionada (Chang, et al., 2008), após submeter fêmeas prenhas de ratas Sprague-Dawley a dieta rica em gordura a partir do sexto e do nono dia de prenhez observou-se que na prole exposta em relação aos controles houve estímulo à proliferação do neuroepitélio e das células precursoras neuronais no terceiro ventrículo hipotalâmico, o qual se revelou um sítio alvo da alimentação materna. Ainda foi constatado aumento da proliferação e da diferenciação de neurônios responsivos aos peptídeos orexigênicos e de sua migração através das regiões hipotalâmicas. Afora isso, foi verificado que os descendentes de ratas que consumiram dieta rica em gordura durante a gestação apresentaram aumento do peso corporal, preferência por alimentos gordurosos, elevação dos níveis séricos de triglicerídeos, leptina e

insulina e maior acúmulo de gordura corporal em até 70 dias depois do nascimento (Chang, et al., 2008).

Um estudo bastante semelhante foi conduzido por Gupta e colaboradores aproximadamente na mesma época, no qual a obesidade materna induzida por dieta rica em gorduras antes e durante a gestação de ratas Sprague-Dawley demonstrou como alterações hipotalâmicas nos fetos expostos aumento nos níveis de mRNA e proteína para receptores de leptina e insulina e no mRNA de peptídeos relacionados à regulação do apetite NPY, peptídeo relacionado à proteína agouti e pro-opiomelanocortina. A exemplo dos resultados de Chang e colaboradores, constatou-se aumento nos níveis séricos de leptina e insulina, porém, o peso corporal entre os fetos expostos e não-expostos à dieta materna rica em gordura não apresentou diferença significativa (Gupta, et al., 2009).

A seguir, estudos posteriores voltaram-se mais especificamente para os impactos que as dietas indutoras de obesidade e ricas em gordura causam na formação do SNC da prole, sendo enfatizado o prejuízo ao desenvolvimento celular, sobretudo de NSCs localizadas no hipocampo (Tozuka, Wada e Wada, 2009; Niculescu e Lupu, 2009). Aqui, cabe um parêntese para com reforço nas informações antes mencionadas esclarecer o motivo pelo qual os autores encontraram alterações em tal região específica do cérebro, que aparentemente decorre do fato de ser o local em que se vislumbra maior plasticidade morfológica e sináptica do cérebro devido à possibilidade de produção de novos neurônios em fetos, recém-nascidos e por toda a vida adulta (Tozuka, Wada e Wada, 2009).

Tozuka, Wada e Wada observaram que a dieta rica em gordura indutora de obesidade materna leva ao acúmulo de lipídios peroxidados no hipocampo e afeta à divisão das células progenitoras no cérebro da prole. O estudo avaliou as consequências do consumo excessivo de gorduras desde a concepção até a maior parte da lactação em fêmeas de camundongos

C57BL/6J de 4 semanas de idade, avaliando tanto as ratas prenhas como embriões, fetos e filhotes em estágio pós-natal em grupos de exposição e controle (Tozuka, Wada e Wada, 2009).

A análise das matrizes deu-se para constatar aumento do peso, hiperlipidemia e tolerância anormal à glicose, uma tríade característica da síndrome metabólica. Em relação ao estágio pós-natal inicial foi observado presença de lipídios peroxidados no soro nos dias 10 (P10) e 21 após o nascimento (P21) e no giro dentado do hipocampo (P21) possivelmente ocasionando declínio da neurogênese na zona subgranular por afetar a mobilidade, a diferenciação e a proliferação de NSCs. Acerca do desenvolvimento durante o pós-natal, ainda se averiguou que a dieta materna rica em gordura pode gerar obesidade e hiperlipidemia e durante a amamentação e os resultados obtidos indicaram níveis anormais de glicemia e colesterol sérico, peso corporal, triglicerídeos, tamanho aumentado dos adipócitos e acúmulo excessivo de lipídios no fígado, o que não persistiu depois do desmame (Tozuka, Wada e Wada, 2009).

Além dos estudos *in vivo*, Tozuka, Wada e Wada efetuaram cultura celular dos progenitores neuronais do hipocampo de filhotes no primeiro dia de pós-natal (P1) para examinar os efeitos da peroxidação lipídica sobre a proliferação celular, encontrando a mesma em condições reduzidas quando comparados aos controles. Outro dado relevante foi a variação da capacidade proliferativa das células do giro dentado em relação aos dias pós-natal 49 (P49) e 98 (P98), sendo que em momento mais próximo ao nascimento foi visualizada diminuição da proliferação dos progenitores celulares das proles cuja mãe foi alimentada com dieta rica em gordura e em período tardio o mesmo não foi observado. Com isso, foi sugerido que a obesidade materna, embora possa afetar a neurogênese nos instantes posteriores ao nascimento, talvez não afete a produção de novos neurônios em estágios mais avançados (Tozuka, Wada e Wada, 2009).

O segundo estudo com foco nas alterações do desenvolvimento do hipocampo diante da dieta materna rica em gordura foi promovido e publicado por Niculescu e Lupu, em que fêmeas de camundongo C57BL/6 de 8 semanas de idade foram alimentadas com dieta rica em gordura e dieta controle entre 10 semanas antes do acasalamento até 17 dias após a concepção. Os resultados obtidos se basearam na investigação do desenvolvimento cerebral em no décimo sétimo dia embrionário (E17) e foi visto que a proliferação de progenitores neuronais estava aumentada no neuroepitélio hipocampal e do córtex e diminuído no giro dentado, a apoptose era diminuída no hipocampo e havia redução de diferenciação de neurônios calretinina-positivos no giro dentado de fetos de mães expostas à dieta com alto teor de gorduras. Ademais, constatou-se que a dieta materna rica em gordura induz a fetos pequenos para idade gestacional e à reabsorção fetal (Niculescu e Lupu, 2009).

Em relação a determinados achados Tozuka, Wada e Wada e Niculescu e Lupu apresentam discordância. Enquanto Niculescu e Lupu encontraram decréscimo na neurogênese de fetos em E17, Tozuka, Wada e Wada não reportaram tal diferença quando comparadas as proles expostas à dieta materna rica em gordura aos grupos controle, assim como não foi relatada diferenças entre o peso corporal dos fetos (Tozuka, Wada e Wada, 2009; Niculescu e Lupu, 2009).

Voltando à estratégia de avaliação dos impactos ao desenvolvimento do hipotálamo embrionário vinculada a peptídeos orexígenos Poon e colaboradores em 2012 publicaram sua pesquisa realizada com ratas prenhas submetidas a dieta rica em gordura e dieta controle do quarto ao décimo nono dia de prenhez e posterior análise dos hipotálamos de fetos de ambos os grupos e também culturas celulares dos dias embrionários 18 (E18) a 23 (E23) para testar a viabilidade celular de neurônios hipotalâmicos. Em resumo, os resultados do estudo encontraram que os neurônios de fetos expostos à dieta materna rica em gordura apresentaram altos níveis dos peptídeos encefalina e NPY detectados pela expressão de seus mRNAs e

indicaram a possibilidade de utilizar o sistema *in vitro* para analisar tal efeito. Por fim, sugerem os autores que a exposição pré-natal à dieta rica em gordura altera a programação do desenvolvimento hipotalâmico da prole, principalmente no que se refere aos neurônios. Cumpre ressaltar que os próprios pesquisadores fazem uma ressalva bastante relevante a respeito do pouco tempo de exposição das ratas prenhas à dieta, o que pode levar a conclusões não inteiramente satisfatórias, a exemplo do peso corporal semelhante entre o grupo exposto e o grupo controle (Poon, et al., 2012).

O estudo seguinte foi publicado em dezembro de 2013 por Stachowiak e colaboradores, sendo na pesquisa realizada identificado que a dieta materna rica em gordura produz impacto negativo aos circuitos cerebrais fetais com alterações hipotalâmicas e de outras regiões envolvidas em diversas funções comportamentais, possivelmente causando anormalidades ao neurodesenvolvimento da prole. De modo diferente dos estudos já citados, neste caso fêmeas de ratos Sprague-Dawley foram submetidas a uma dieta rica em gorduras saturadas e outra dieta controle desde os vinte e quatro dias de vida, empenharam com cento e vinte dias e foram mantidas em tais dietas até o dia embriônico 21, quando os fetos foram removidos para análise imuno-histoquímica de seus cérebros dissecados (Stachowiak, et al., 2013).

Observou-se que em relação ao grupo controle os fetos expostos à dieta materna rica em gordura saturada apresentavam menor número de células cerebrais com receptores para insulina, menos camadas nucleares e núcleos pequenos, arredondados e de tamanho mais uniforme em células cerebrais, desorganização celular nas camadas corticais do cérebro e diferente distribuição de neurônios maduros formando estruturas colunares mais apertadas (Stachowiak, et al., 2013).

Em sequência tem-se o artigo publicado por Giriko e colaboradores que ao submeter ratas Wistar a dieta rica em gordura exclusivamente durante a amamentação, ocorrida entre o

primeiro e o vigésimo primeiro dias após o nascimento das proles, verificou atraso no desenvolvimento físico e neurológicos dos filhotes expostos à dieta gordurosa consumida pela mãe, bem como determinou nesses animais aumento de agressividade e manifestação de comportamento depressivo. Foram encontrados resultados expressivos em relação ao grupo experimental no que concerne à redução do consumo alimentar pelas mães nos dias 7 e 21 após o parto, redução do comprimento corporal da prole nos dias 1 e 2 depois do nascimento, redução do comprimento dos eixos mediolateral e anteroposterior da cabeça da prole e aumento de peso da prole na idade adulta, decréscimo nos comportamentos de escalar e nadar e aumentos nos escores de agressividades (Giriko, et al., 2013).

O sétimo artigo de interesse por ordem da data de publicação foi produzido por Page, Jones e Anday e trata-se de um estudo mais abrangente por ter avaliado os efeitos de uma dieta materna rica em gordura saturada no pré-natal, durante a gestação, no pós-natal e na prole recém desmamada na expressão genética do hipocampo e nas funções cognitivas de memória e aprendizagem da prole exposta ao excesso de alimento gorduroso. Foram utilizadas no experimento 24 ratas de Sprague-Dawley divididas em dois grupos, um exposto à dieta rica em gorduras saturadas e outro mantido sob alimentação controle com dieta equilibrada em macronutrientes, ambos no período que se estendeu desde um mês antes do acasalamento até o desmame de suas proles. Assim como as mães, os filhotes depois de desmamados consumiram o mesmo tipo de dieta de suas progenitoras até a idade adulta de 110-118 dias (Page, Jones e Anday, 2014).

Os ratos das proles avaliadas por Page, Jones e Anday tiveram seus desempenhos comportamentais de memória, aprendizagem e atividade locomotora verificados mediante os testes de Morris Water Maze e do campo aberto. Em relação à exposição da prole à dieta materna rica em gordura quando comparada ao grupo controle identificou-se no estágio pós-natal capacidade reduzida de aprendizagem espacial, dificuldade de memorização, elevação dos

níveis séricos de glicose e corticosterona e da gordura visceral e diminuição dos níveis de mRNA e proteína de BDNF e NGF (do inglês *nerve growth factor*). Por outro lado, nos ratos adultos que foram expostos à alimentação com excesso de gordura tanto durante a gestação quanto após o desmame houve redução da atividade locomotora e dos níveis de mRNA e proteína de NGF e aumento do peso e da gordura visceral (Page, Jones e Anday, 2014).

Considerando a constatação dos efeitos da dieta materna rica em gorduras na gestação e no aleitamento sobre o desenvolvimento SNC, principalmente no que se refere à neurogênese, os últimos artigos publicados acerca do tema direcionaram suas pesquisas para a via de sinalização Notch, que, como mencionado no item anterior, possui extrema importância na regulação do equilíbrio entre os estados diferenciado e indiferenciado das NSCs e na formação do pool de tais células encontrados em adultos, as quais serão responsáveis pela produção de novos neurônios (Yu, *et al.*, 2014; Mendes-da-Silva, *et al.*, 2015).

Yu e colaboradores mantiveram fêmeas de camundongos C57BL/6J divididas em dois grupos randomizados, sendo um exposto a dieta basal e outro a dieta rica em gordura durante três semanas antes do acasalamento até o nascimento das proles. As análises incluíram o peso corporal, o comprimento, o peso do tecido adiposo e os níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e glicose das fêmeas prenhas e as NSCs das proles, estas que após dissociação do tecido cerebral foram cultivadas por seis dias. As matrizes a quem foi oferecida dieta rica em gordura demonstraram aumento de peso corporal, ganho maior de tecido adiposo e elevação da concentração sérica de colesterol. As NSCs dos camundongos neonatos expostos à dieta com excessiva quantidade de gordura, depois de terem sido identificadas, revelaram aumento na produção das proteínas MSI1, MSI2, HES1 e NOTCH1 e não apresentaram variação nos níveis de mRNA de *HES1* e *HES5*, o que implica em ativação da via Notch, afetando a maturação final dos neurônios (Yu, *et al.*, 2014).

A penúltima publicação encontrada sobre o tema teve seu experimento efetuado no Brasil por Mendes-da-Silva e colaboradores e em função dos resultados produzidos pelo trabalho de Yu, et al. motivaram-se a aprofundar o que já havia sido descoberto, em especial a respeito de HES5 devido a insignificância da variação anteriormente encontrada (Mendes-da-Silva, et al., 2015).

De forma diversa da pesquisa que serviu como sua fonte de inspiração, o trabalho oriundo do estudo brasileiro submeteu fêmeas de camundongo Swiss à dieta rica em gorduras e à dieta controle desde as três semanas anteriores ao acasalamento até a lactação, oferecendo às proles desde o desmame até o vigésimo dia alimentação controle. As fêmeas matrizes que foram submetidas à dieta rica em gordura apresentaram elevação do peso corporal nos períodos em que foram analisadas, salvo durante a lactação; afora isso, sua massa de tecido adiposo gonadal e retroperitoneal estava aumentada, assim como a de seus filhotes. Em relação à prole foi observado nos camundongos que foram expostos à dieta materna gordurosa em todas as fases do estudo maior peso corporal, aumento do tecido adiposo gonadal, elevação dos níveis de mRNA e da proteína de HES5 e de mRNA de NOTCH1 na região hipocampal e decréscimo da expressão de MASH1. Assim, verificou-se ativação da via de sinalização Notch no hipocampo dos descendentes de mães alimentadas com dietas ricas em gorduras, que possivelmente resulta em desordens neurológicas na vida adulta em função do quadro pró-inflamatório induzido pelo tipo de alimentação materna (Mendes-da-Silva, et al., 2015).

Por fim, tem-se a pesquisa publicada por Lin e colaboradores que ponderou a programação de desordens de comportamento induzida por estresse em virtude de dieta materna rica em gordura e realizou análise de parâmetros biológicos, bioquímicos e comportamentais. O estudo submeteu ratas Sprague-Dawley ao consumo de alimentação gordurosa desde 10 dias antes do acasalamento até o final da lactação, sendo as proles posteriormente divididas em grupos exposto à dieta controle e à dieta experimental e também a ambiente sem estresse e com

estresse leve imprevisível e crônico, ambos igualmente submetidos aos tipos de dieta citados (Lin, et al., 2015).

Os resultados obtidos conduziram os pesquisadores às seguintes conclusões no que se refere aos animais expostos apenas à dieta rica em gordura quando comparados com aqueles submetidos somente ao consumo de dieta controle: aumento do peso corporal da prole, do consumo de dieta pela prole após o desmame, dos níveis de cortisol sérico após episódios de estresse, não redução dos níveis de cortisol sérico com o passar do tempo de exposição a ambiente de estresse e diminuição da atividade de criação 56 dias após o nascimento. Frente aos efeitos observados os autores sugerem que a dieta materna rica em gordura influencia ao desenvolvimento de depressão na idade adulta em resposta a desafios estressores (Lin, et al., 2015).

Percebe-se que as pesquisas científicas com animais apontam fortemente que a prática de uma dieta rica em gorduras e a obesidade materna podem ser um gatilho para alterações no desenvolvimento cerebral da prole, como se pode deduzir a partir estudos já vistos abordando o assunto por meio de alterações na expressão de peptídeos orexígenos e outras proteínas importantes para o hipocampo, peroxidação lipídica, testes comportamentais e interferência em vias de sinalização de mudança no estado das células. Apesar disso, nem todos os mecanismos celulares e moleculares e as alterações comportamentais foram esclarecidos e alguns dados encontrados foram conflitantes e inconsistentes, permanecendo, portanto, uma lacuna que urge em ser preenchida ante a relevância do tema.

Com isso, o projeto de pesquisa então sugerido tem a finalidade de buscar compreender algumas das respostas ainda obscuras no que diz respeito ao modo como o consumo materno de dieta rica em gordura nos estágios pré-natal, gestacional e de lactação pode estar causando alterações ao desenvolvimento físico, neurológico e comportamental da prole. Ademais, com intenção de facilitar o entendimento a proposta aqui apresentada seguem em anexos tabelas

com os principais artigos utilizados como justificativa para o delineamento experimental e a escolha dos procedimentos metodológicos (Tabela 1, Tabela 2, Tabela 3 e Tabela 4 do Anexo D).

2.6 METODOLOGIA

2.6.1 Animais e dieta

Serão utilizados 10 fêmeas de rato albino Wistar (*Rattus norvegicus*) com 35 dias de vida e 5 machos com 60 dias de vida da mesma linhagem, todos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os animais serão mantidos em caixas plástica (65x25x15cm) com água quanto à disposição desde o início até o final da execução do experimento. O ambiente de alojamento terá temperatura controlada ($24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) e iluminação artificial das 6 horas até às 18 horas.

As fêmeas serão randomizadas e divididas em dois grupos: dieta controle, que receberá ração padrão de laboratório (55% de carboidrato, 22,5% de proteína e 14,5% de gordura – Nuvilab – Nuvital Nutrientes S/A; Curitiba, Paraná, Brasil) (Anexo II), e experimental, que receberá dieta rica em gordura (ração padrão de laboratório enriquecida com banha de porco e óleo de soja – 20,9% de carboidrato, 27,1% de proteína e 52,0% gordura).

Os machos serão mantidos em dieta com alimentação padrão durante todo o período. As fêmeas serão submetidas às dietas referentes aos grupos citados a partir de 35 dias até o término da lactação, que se dará 18 dias depois do nascimento das proles (P18). Aos 60 dias de idade as fêmeas e os machos serão acasalados com alojamento conjunto por cinco dias e a prenhez será confirmada através do exame de esfregaços vaginais para a presença de espermatozoides. As fêmeas prenhas serão mantidas em caixas individuais.

Após o nascimento dos animais, que será considerado como dia um do pós-natal (P1), haverá ajuste para 10 animais por ninhada permanecendo tanto os machos quanto as fêmeas. Após o desmame (P18) serão mantidos somente os machos, onde os mesmos serão separados

em 3 animais por gaiola, sendo estes mantidos com dieta controle até o 60º seguinte ao nascimento (P60). O desenho experimental da presente pesquisa está representado na figura 4.

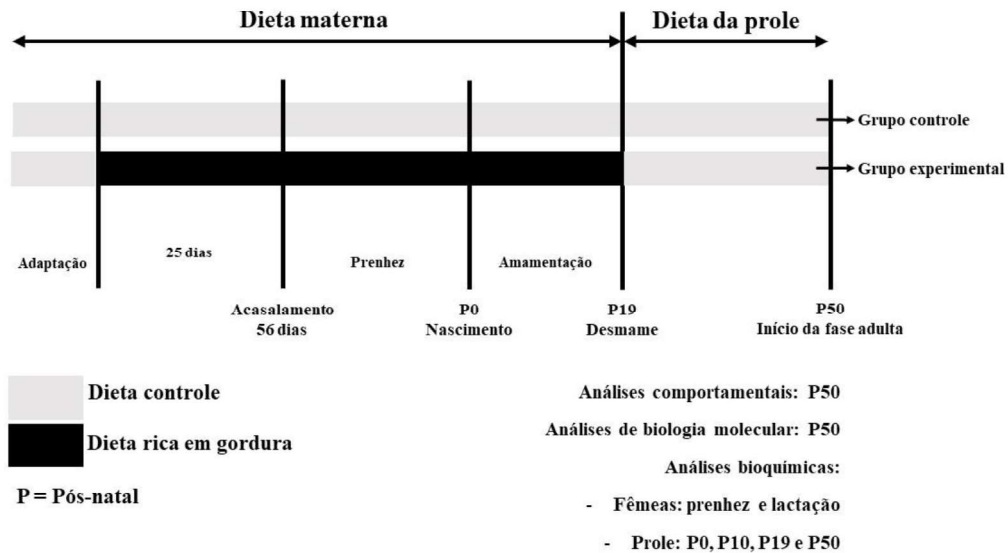


Figura 4 – Desenho experimental do projeto de pesquisa.

Visando a realização do presente projeto em que se busca avaliar, em especial, as consequências de consumo materno de dieta rica em gordura aos seus descendentes, serão utilizadas os filhotes das proles de grupos controle e experimental, e para isso, como dito, tanto as fêmeas quanto os machos que irão acasalar devem ser adquiridas do Biotério da UFPel de acordo com o seguinte cálculo experimental estatístico: $n = 1 + [2C * (s/d)^2]$, onde $C = (z\alpha + z\beta)^2$. O intervalo de confiança de 0,95 foi utilizado ($z\alpha$ tabelado estatisticamente = 1,96), com o poder do teste em 95% ($z\beta$ tabelado = 1,645), dessa forma $C = (1,96 + 1,645)^2 = 12,996$. Utilizou-se a razão entre as medias da variável “expressão do mRNA Notch” (=0,8), uma vez que se trata de um dos principais desfechos do presente estudo assim $n = 1 + [2 * 12,996 * (0,8)^2] = 17,63$. Arredondando o n para o próximo número inteiro, $n = 18$ filhotes de cada sexo em cada grupo.

O cálculo estatístico apresentado acima refere-se aos filhotes que inicialmente serão divididos em 2 grupos com n=36/cada (I-Controle e II-Experimental), totalizando 72 animais (36 fêmeas e 36 machos). Considerando-se ninhadas de 8 filhotes e que precisaremos 50% de filhotes machos e 50% de filhotes fêmeas, com 9 ratas Wistar adultas é possível totalizar 72 filhotes. Computando-se ainda uma taxa de mortalidade 10%, seriam necessários 79 filhotes e para isso 10 ratas Wistar adultas seriam necessárias para atingir este número de filhotes. Por isso, devem ser adquiridos do Biotério da UFPel 10 ratas Wistar as quais serão cruzadas com 5 ratos Wistar (2 fêmeas/ 1 macho).

Os procedimentos com os animais serão realizados de acordo com o “Guia para cuidados e Uso de animais de Laboratório” do National Research Council (NRC, 2011) sendo minimizado todo e qualquer tipo de sofrimento que possa ser infligido, e ao final do experimento serão descartados de modo adequado conforme as práticas do Biotério Central da UFPel.

2.6.2 Mensurações físicas e de consumo da dieta

O peso corporal das mães será mensurado antes da implementação das dietas controle e experimental e após uma vez por semana até o final do experimento. O peso corporal da prole será mensurado semanalmente desde o nascimento até P60, utilizando para tanto balança digital com subsequente registro em planilhas de controle de peso.

Assim com o peso, o comprimento dos animais será mensurado semanalmente para posterior determinação do índice de Lee, conforme a fórmula abaixo descrita:

$$\frac{\sqrt[3]{\text{massa corporal (g)}}}{\text{comprimento focinho-ânus (cm)}} \cdot 1.000$$

O comprimento da cabeça da prole referente aos eixos mediolateral (a distância entre os orifícios dos ouvidos) anteroposterior (distância entre o focinho e a articulação cabeça-pescoço) serão realizados com o auxílio de um paquímetro digital (Stainless Hardened, 0.03 mm precision) (Giriko, et al., 2013).

Para a mensuração do tecido adiposo retroperitoneal e gonadal, os mesmos serão dissecados das mães após a lactação, momento em que ocorrerá a indução da morte, e nas proles no instante posterior à realização dos testes comportamentais (P60), quando a eutanásia será realizada por inalação de isoflurano seguida de coleta de sangue por punção cardíaca. A seguir, o material será pesado em balança analítica digital (Bel Engineering, modelo Mark 210A, sensibilidade de 0,0001g).

O consumo de ração será avaliado na caixa de moradia em períodos de 72 horas, colocando-se à disposição uma quantidade conhecida de alimento e medindo-se o restante após decorrido o tempo estabelecido. A dieta das ratas mães será mensurada desde a implementação da dieta rica em gordura para o grupo controle até o final do período de lactação das proles (P18) e a dieta das proles do desmame até P60.

2.6.3 Maturação de características físicas da prole

São observadas durante o período de amamentação as seguintes características física da prole: desdobramento do pavilhão auditivo externos de ambas as orelhas para a posição totalmente ereta, abertura do conduto interno auditivo de ambas as orelhas, visibilidade e apalpação dos incisivos inferiores e rompimento visível das membranas que recobrem os olhos. O dia em que cada característica for observada pela primeira vez será determinante da idade de maturação para cada análise em particular (Smart e Dobbing, 1971; Deiró, et al., 2006; Giriko, et al., 2013).

2.6.4 Coleta e Análise do material biológico

2.6.4.1 Obtenção das amostras biológicas

Serão coletadas amostras de sangue por punção na veia caudal das fêmeas (gestação e lactação) e das proles (lactação – P10, desmame – P19, e início da fase adulta – P50) com centrifugação a 3.000 rcf por 5 minutos a 4° C seguida de armazenamento de alíquotas de soro em freezer -80° C até a realização das análises bioquímicas.

Após os testes comportamentais e feita a eutanásia o cérebro das proles será dissecado conforme o método de Sijker (Spijker, 2011), que constitui um modo de dissecação em múltiplas regiões cerebrais de um único cérebro baseado em atlas já existente (Williams, 1999). O hipocampo será bilateralmente removido e rapidamente homogeneizado em 50 mM Tris-Cl pH 7,4 (1:4, p/v). O homogenato será centrifugado a 2.400 rfc por 15 minutos a 4° C e a fração sobrenadante centrifugada a baixa velocidade irá ser utilizada nos ensaios descritos a seguir.

2.6.4.2 Ensaio de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

O RNA total dos hipocampus das proles será extraído usando o reagente TRIzol (Invitrogen Corporation, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de hipocampo serão tratadas com DNase por meio da utilização de kit de DNA-free (Ambion, EUA), seguindo o protocolo do fabricante.

As amostras de RNA total serão avaliadas quanto a sua concentração e pureza, através do espectrofotômetro NanoDrop 2000/2000c (Thermo Fisher Scientific). A concentração de RNA será dada em ng/μl. A pureza das amostras de RNA, por sua vez, será analisada a partir das razões A260/280 e A260/230.

A seguir será realizada a transcrição reversa para cDNA com síntese da primeira fita mediante uso de 2 µg de RNA utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, UK) para o Notch1, Hes5 e Hes1; e o Kit de Transcrição Reversa TaqMan miRNA (Thermo Fisher Scientific) para o microRNA 9-1; ambos os kits seguindo as recomendações do fabricante. De posse das amostras de cDNA, essas deverão ser mantidas em -80°C até a análise pela técnica de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR).

A técnica de RT-PCR será utilizada para detectar a expressão dos mRNAs Notch1, Hes5 e Hes1 e microRNA 9-1 referidos na Tabela 5. Para esse processo, será utilizado os kits SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, UK), para os mRNAs Notch1, Hes5 e Hes1 e kit Taq Man Fast Advanced Master Mix (Thermo Fisher Scientific) para o microRNA 9-1, conforme as especificações do fabricante (Tabela 5).

Gene	Assay ID	Sequence	Referência
microRNA 9-1	Mm04231512_s1	F: 5'-gtctggatccagactacggaggtccagg-3' R: 5'-gtctaagcttccaaaaatccctcctgcagctcg-3	Gu, et al., 2017
Notch1	Mm00435249_m1	F: 5'-gatggcctcaatgggtacaag-3' R: 5'-tcggtgttgatgtcacagt-3	Yu, et al., 2014
Hes1	Mm01342805_m1	F: 5'-tcaacacgacaccggacaac-3' R: 5'-atgccggagctatcttctt-3'	Yu, et al., 2014
Hes5	Mm00439311_g1A	F: 5'-agtccaaggagaaaaaccga-3' R: 5'-gctgtgttcaggtagctgac-3'	Yu, et al., 2014

Tabela 5: Caracterização dos mRNAs e microRNA que serão alvo de análise de expressão no hipocampo das proles submetidas a dieta rica em gordura versus proles expostas a dieta controle. F: forward, R: reverse.

2.6.4.3 Ensaio de western blot

A concentração de proteínas no sobrenadante armazenado após a dissecação do hipocampo da prole será verificada por meio do método de ligação de Bradford (Bradford,

1976). O sobrenadante será ressuspenso em solução tampão de Laemmli fervida por cinco minutos e depois separada em um aparelho para placas de gel em miniatura (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). As proteínas serão eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose por 90 minutos a 120 V constantes. A referida membrana de nitrocelulose será, então, sondada com anticorpos contra as proteínas Notch1 (goat polyclonal IgG, 1:500, sc-6014), 120 kDa, a ser adquirido de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA), e também Hes5 (rabbit polyclonal IgG, 1:500, ab25374), 19 kDa, e Hes1 (rabbit polyclonal IgG, 1:200, ab71559), 30 kDa, ambos comprados da empresa Abcam (Cambridge, MA, USA).

Subsequentemente haverá incubação com anticorpos secundários conjugados-HRP (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Os resultados serão visualizados pela utilização de autorradiografia com filme de raio-x e pré-flash Kodak XAR. As intensidades das bandas serão quantificadas pela densitometria óptica das autorradiografias obtidas (Scion Image Software, ScionCorp, MD, USA) (Melo, et al., 2014; Mendes da Silva, et al., 2015).

2.6.4.4 Ensaio bioquímicos

Os ensaios bioquímicos realizados nas amostras sanguíneas da mãe e das proles e no hipocampo das proles. Para tanto serão os mesmos realizados por meio de *kits* comerciais. Serão aferidas as concentrações séricas de glicose (Blood Glucose Monitor, TheraSense, Alameda, CA) triglicerídeos (Triglyceride Assay Kit - Quantification ab65336, Abcam, Cambridge, MA, USA) e colesterol (Cholesterol Assay Kit - HDL and LDL/VLDL, ab65390, Cambridge, MA, USA) nas mães e nas proles mediante técnicas enzimáticas colorimétricas e as concentrações hipocámpicas de BDNF (BDNF Polyclonal Antibody, PA1-9522, Invitrogen Antibodies, Carlsbad, Califórnia, EUA) e cortisol (Cortisol Parameter Assay Kit, KGE008B, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EUA) pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) nas proles.

2.6.5 Testes de reflexo

2.6.5.1 Teste do reflexo de endireitamento

No teste do reflexo de endireitamento o animal será colocado em decúbito dorsal, sendo medida a ocorrência ou não da resposta de virar o corpo para a posição de decúbito ventral. O critério para registro desse reflexo é que, ao virar-se, o animal fique com as quatro patas espalmadas na superfície. O período de latência máximo para este teste é de 30 segundos. Este reflexo será observado no 5º dia da lactação.

2.6.5.2 Teste reflexo de geotaxia negativa

No teste do reflexo de geotaxia negativa os filhotes são colocados em uma rampa de 45 graus de inclinação, a 5 cm do final inferior dessa superfície, com a cabeça direcionada para baixo. Anota-se a latência (não superior a 30 segundos), para os animais voltarem a posição oposta, ou seja, voltados com a cabeça para cima. Quando os animais não apresentam o reflexo na primeira tentativa é possível testar mais uma vez com a mesma latência. A ocorrência na primeira, segunda ou terceira tentativas também será registrada. A geotaxia negativa será observada no dia 10 da lactação. A latência máxima é de 1 minuto.

2.6.6 Testes comportamentais

2.6.6.1 Teste do reconhecimento de objetos

O teste de memória de reconhecimento de objetos o animal utiliza uma arena de campo aberto de 50 x 50 x 39 cm, de paredes altas, feita de madeira compensada, com a parede frontal e tendo o soalho dividido em 12 quadrantes iguais por linhas pretas (Dere, et al., 2005). Os animais são habituados ao ambiente de teste durante 4 dias com 20 minutos por dia para livre exploração do aparato na ausência de objetos. No primeiro dia, que é uma sessão de treino, os

animais serão colocados na arena contendo dois objetos diferentes (A e B) feitos com metal ou vidro e fixados à arena com fita adesiva para livre exploração por 5 minutos.

O teste será repetido após 180 minutos para testar a memória de curta duração ou 24 horas depois do treino para testar a memória de longa duração. No teste de memória curta será usado um novo objeto C e no teste de memória longa será utilizado um novo objeto D e o animal permanecerá na arena por 5 minutos. As posições dos objetos (familiar ou novo) serão randomizadas e a arena será limpa entre os testes.

Define-se a exploração pelo ato de cheirar ou tocar o objeto com o nariz e/ou as patas dianteiras. Sentar ou andar em torno do objeto não é considerado comportamento exploratório. O tempo gasto explorando cada objeto será marcado por um observador cego ao tratamento recebido pelo animal e expresso em percentual do total de tempo de exploração computado em segundos (Rossato, et al., 2007). O teste de memória de reconhecimento de objeto será realizado nas proles entre os dias 50 e 51 após o nascimento.

2.6.6.2 Teste do campo aberto

O teste de campo aberto busca analisar a atividade locomotora e exploratória, memória de habituação e aferição da ansiedade. Os animais das proles serão gentilmente colocados na mesma arena utilizada para o teste de memória de reconhecimento de objetos e o número de vezes que o animal cruzar as linhas pretas e elevar-se sobre as patas traseiras será registrado durante os 5 minutos em que será permitida a livre exploração do ambiente. Após 24 horas os animais serão colocados no campo aberto para livre exploração por outros 5 minutos e os mesmos parâmetros serão mensurados com intuito de testar a habituação ao ambiente. O teste do campo aberto será realizado nas proles entre os dias 52 e 53 após o nascimento.

O fenótipo do tipo ansioso para o comportamento de cada animal será determinado de acordo com o tempo de duração do teste gasto para explorar as áreas central e periférica do

campo. A relação entre o período permanecido na periferia/centro será calculado para determinar o comportamento da prole como ansioso ou não.

2.6.6.3 Teste do labirinto em cruz elevado

O teste do labirinto em cruz elevado é um teste comportamental usado para medir a ansiedade com base na preferência inata dos roedores por espaços escuros e fechados e no medo não condicionado de altura e áreas abertas (Handley e Mithani, 1984). Será utilizado um aparelho em forma de cruz com dois braços abertos e dois braços fechados de 50 x 10 cm, paredes de 40 cm e posicionado a 50 cm do chão.

Os animais serão colocados em um quadrado central aberto de 10 x 10 cm e formado na intersecção dos quatro braços, sendo que de o posicionamento inicial será de frente para o braço aberto oposto ao braço fechado e durante 5 minutos os animais permanecerão imperturbados para explorem o labirinto. Níveis baixo de ansiedade serão indicados por aumento do tempo e no número de entrada nos braços abertos (Walf e Frye, 2007) e menor ocorrência de comportamento de avaliação de risco, ou seja, alongamento, postura fechada e retorno aos braços fechado (Cruz et al., 1994; Doremus et al. 2006, Rodgers e Dalvi, 1997). O teste do labirinto em cruz elevado será realizado nas proles no dia 55 após o nascimento.

2.6.6.4 Teste da esQUIVA inibitória

A esQUIVA inibitória consiste em um aparelho com a parte frontal confeccionada em acrílico transparente, medindo 50 x 25 x 25 cm. O soalho é uma grade de barras de bronze paralelas de 0,1 cm de calibre, separadas entre si por 1 cm. Na parte esquerda, sobre a grade, há uma plataforma de fórmica com 7 cm de largura e 2,5 cm de altura (Izquiero, et al., 1992). O animal é colocado sobre a plataforma no interior de uma caixa com o soalho metálico conectado a um estimulador elétrico. A natureza exploratória dos animais tende a estimular a exploração do restante da caixa. Antes da execução do teste os animais são submetidos a sessão

de treino individual, onde são gentilmente colocados sobre a plataforma fixa na lateral esquerda da caixa de esquivas inibitória e é permitida a exploração de toda a caixa. Após alguns segundos, o animal desce para a plataforma com as quatro patas na grade de barras de bronze eletrificáveis para explorar o resto da caixa e recebe um choque elétrico de 0,4 a 0,5 mA por 2 a 3 segundos. A seguir o animal é retirado da caixa de teste e recolocado na sua caixa de residência (Vianna, et al., 2001). Para avaliar a memória formada durante a sessão treino os animais serão submetidos a sessões de teste em 180 minutos e 24 horas depois do treinamento com intenção de analisar as memórias de curta e longa duração, respectivamente, em função do tempo de latência de descida da plataforma. Quanto mais o animal reter a memória formada durante o treino, maior será a latência de descida da plataforma no momento do teste. O teste da esquivas inibitória será realizado nas proles entre os dias 56 e 57 após o nascimento.

2.6.6.5 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado será executado igualmente aos 50 dias do nascimento dos animais da prole com exposição a situação de estresse inescapável, agudo e de curta duração, e análise do tempo de resposta ativa versus momento passivo. Durante o período inicial é comum o predomínio de comportamentos ativos, onde o animal tenta escapar da situação supostamente aversiva. Após o primeiro ou segundo minuto dos cinco minutos totais da sessão de teste, em geral, vislumbra-se comportamento passivo de imobilidade. Caso a imobilidade seja detectada antes do tempo previsto há interpretação de falha na persistência do comportamento de fuga, ou seja, desespero comportamental (Cryan, Markou e Lucki, 2002).

Os animais da prole serão colocados primeiramente por 15 minutos em cilindros de vidro de 50 cm de altura e 20 de diâmetro contendo água até 35 cm de profundidade em temperatura de 25 ± 1 °C para treinamento, sem que haja coleta de dados. Após 24 horas serão recolocados no cilindro durante 5 minutos e a sessão será registrada por dois observadores treinados. O comportamento de escalada representativo da fuga deverá consistir em

movimentos ascendentes das patas dianteiras dentro e fora da água, enquanto a imobilidade será atribuída à permanência do animal flutuando na água sem que exista atividade adicional além da necessária para manter a cabeça fora da água (Lin, et al., 2015).

2.6.7 Análise Estatística

Os resultados serão expressos como a média \pm erro padrão da média (SEM). Os ensaios serão analisados pelo teste ANOVA seguido de pos-hoc quando necessário e por teste-T de Student não pareado. Os dados de esQUIVA inibitória que serão analisados pelo teste de Kruskal-Wallis seguidos de Mann-Whitney.

2.6.8 Aspectos éticos

Serão usadas todas as estratégias que visam minimizar o número de animais usados em cada experimento. O tamanho do grupo foi planejado segundo o relato da literatura e cálculo amostral para cada um dos modelos e/ou ensaios, conforme equação estatística acima mencionada.

Os ensaios experimentais foram escolhidos visando induzir o mínimo desconforto possível; em muitos casos a metodologia descrita na literatura é adaptada, abdicando-se de medidas que tragam mais danos aos animais e ou introduzindo alternativas que levem ao menor desconforto. Todos os procedimentos operacionais realizados estarão embasados no *Guide for the Care and Use for Laboratory Animals* – ILAR/EUA e no Manual para Técnicos em Bioterismo (COBEA/Brasil).

Ademais, estarão em acordo com *Ethical Guideline for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals*, como indicado pela *International Association for the Study of Pain* (IASP) e obedecem às normas propostas pela Declaração Universal dos Direitos dos Animais

(UNESCO - 27 de janeiro de 1978) e Princípios Internacionais Orientadores para a Pesquisa Biomédica Envolvendo Animais (*Council for International Organizations of Medical Sciences* - CIOMS).

Os animais serão eutanasiados isoladamente dos demais para que não haja estresse. Em relação ao descarte do material biológico, o mesmo será acondicionado em sacos plásticos e colocado sob refrigeração, utilizando freezer destinado apenas para este fim. O descarte final do material será feito pelo Biotério Central.

2.7 Cronograma

Atividades		1º semestre de 2017	2º semestre de 2017	1º semestre de 2018	2º semestre de 2018
Fase I	Revisão de literatura				
	Seleção do tema				
	Elaboração do projeto de pesquisa				
Fase II	Execução dos procedimentos experimentais com animais				
Fase III	Elaboração do artigo				
	Defesa da dissertação				

2.8 Orçamento

Descrição	Valor unitário	Subtotal
Dietas Controle e Rica em Gordura	R\$ 500,00	R\$ 500,00
Ponteiras e microtubos	R\$ 400,00	R\$ 400,00
Luvas	R\$ 20,00	R\$ 200,00
Reagentes diversos	R\$ 5.000,00	R\$ 5.000,00
<i>Kits</i> para Bioquímica	R\$ 200,00	R\$ 2.000,00
Reagentes para RT-PCR	R\$ 6.000,00	R\$ 6.000,00
Total		R\$ 14.100,00

ANEXO I – Tabelas

Tabela 1- Identificação dos estudos encontrados a respeito do tipo de animal, percentual de gordura da dieta, início e término da alimentação experimental, idade das fêmeas ao acasalamento, tempo de vida da prole na avaliação e sexo da prole avaliado.

Autores	Tipo de animal	Percentual de gordura da dieta		Início da dieta	Término da alimentação	Idade das fêmeas ao acasalamento	Tempo da prole na avaliação	Sexo da prole avaliado
Tozuka, Wada e Wada, 2009	Camundongo C57BL/6J	Rica em gordura Dieta balanceada	32% 4%	6 semanas antes do acasalamento	Prenhez ou lactação (dia 16)	10 semanas	E18, P21, P49, P70 e P98	Macho
Niculescu e Lupu, 2009	Camundongo C57BL/6	Rica em gordura Dieta balanceada	60% 10%	8 semanas de idade da mãe	E17	18 semanas	E17	Macho
Stachowiak et al., 2013	Rato Sprague-Dawley	Rica em gordura Dieta balanceada	52% 14,7%	24 dias de idade da mãe	E21	Aproximadamente 120 dias	E21	
Giriko et al., 2013	Rato Wistar	Rica em gordura Dieta balanceada	59,5% 10,9%	1º dia pós-natal	21º dia pós-natal	60 dias	P60 – teste do nado forçado e do campo aberto P110 - teste de choque nas patas	Macho
Yu et al., 2014	Camundongo C57BL/6J	Rica em gordura Dieta balanceada	35% 10%	5 semanas de idade da mãe	Nascimento	8 semanas	Nascimento	
Mendes da Silva et al., 2015	Camundongo Swiss	Rica em gordura Dieta balanceada	23,6% 14,5%	3 semanas antes do acasalamento	Lactação (P18)		P28	Macho
Lin et al., 2015	Rato Sprague-Dawley	Rica em gordura Dieta balanceada	21% 45%	Entre 120 e 140 dias de idade da mãe	Lactação	130 e 150 dias	P56, P120, P127, P134 e P141	Macho

E17: Embryonic day 17 P21: Postnatal day 21 P60: Postnatal day 60 P120: Postnatal day 120

E18: Embryonic day 18 P28: Postnatal day 28 P70: Postnatal day 70 P127: Postnatal day 127

E21: Embryonic day 21 P49: Postnatal day 49 P98: Postnatal day 98 P134: Postnatal day 134

P18: Postnatal day 18 P56: Postnatal day 56 P110: Postnatal day 110 P141: Postnatal day 141

Tabela 2 – Origem e comparação entre os percentuais de macronutrientes das dietas utilizadas nos estudos encontrados.

Autores	Origem	Gordura		Carboidrato		Proteína	
Tozuka, Wada e Wada, 2009	Clea Japan, Tokyo, Japan	Controle Dieta rica em gordura	4% 32,4%	Controle Dieta rica em gordura	50,5% 28,8%	Controle Dieta rica em gordura	25,6% 25%
Niculescu e Lupu, 2009	Controle - D12450B, Research Diets, New Brunswick, New Jersey Dieta rica em gordura - D12492, Research Diets	Controle Dieta rica em gordura	4,3% 34,9%	Controle Dieta rica em gordura	67,3% 26,3%	Controle Dieta rica em gordura	19,2% 26,2%
Stachowiak et al., 2013		Controle Dieta rica em gordura	10,9% 59,5%	Controle Dieta rica em gordura	70% 24,4%	Controle Dieta rica em gordura	19% 16%
Giriko et al., 2013	Nuvilab – Nuvital Nutrientes S/A; Curitiba, Parana, Brazil	Controle Dieta rica em gordura	14,7% 52%	Controle Dieta rica em gordura	52,2% 20,9%	Controle Dieta rica em gordura	33% 27,1%
Yu et al., 2014	BHFK Bio-Technology, Beijing, Japan	Controle Dieta rica em gordura	10% 35%	Controle Dieta rica em gordura	71% 49%	Controle Dieta rica em gordura	19% 16%
Mendes da Silva et al., 2015	NUVILAB® Cr-1, Nuvital, Paraná, Brasil	Controle Dieta rica em gordura	4,5% 23,6%	Controle Dieta rica em gordura	55% 41,2%	Controle Dieta rica em gordura	22,5% 20,8%
Lin et al., 2015	Medicience Ltd., Jiangsu, China	Controle Dieta rica em gordura	21% 45%	Controle Dieta rica em gordura	63% 35%	Controle Dieta rica em gordura	17% 20%

Tabela 3 – Comparação dos tipos de avaliações realizadas nos artigos encontrados.

Autores	Parâmetros biológicos	Análises bioquímicas	Análises de biologia molecular	Análises comportamentais	Análise histoquímica
Tozuka, Wada e Wada, 2009	<ul style="list-style-type: none"> - Peso corporal da mãe e da prole - Consumo diário da dieta pela mãe antes e durante a gestação 	<ul style="list-style-type: none"> - Teste de tolerância à glicose nas mães - Avaliação sorológica da prole para colesterol, triglicerídeos, ácidos graxos livres, peroxidação lipídica, oxidação proteica, corticosterona e cortisol 	<ul style="list-style-type: none"> - Western Blot do hipocampo, cerebelo e córtex cerebral da prole para malondialdeído, 4-hidroxi-5-hexenal e β-actina 		<ul style="list-style-type: none"> - Imuno-histoquímica dos tecidos cerebrais e adiposos para malondialdeído, BrdU, Pax6, calbindin-D-28K, fosfo-histona H3 e doublecortina - Imuno-histoquímica dos tecidos adiposos do abdômen
Niculescu e Lupu, 2009	<ul style="list-style-type: none"> - Peso das mães ao início do tratamento e semanalmente durante 10 semanas - Peso corporal da prole viáveis em E17 - Peso dos cérebros da prole em E17 				<ul style="list-style-type: none"> - Imuno-histoquímica do tecido cerebral da prole para histona fosforilada H3, caspase-3 e calretinina
Stachowiak, et al., 2013					<ul style="list-style-type: none"> - Imuno-histoquímica em secções coronais do cérebro da prole para neuropeptídeo Y, peptídeo relacionado ao gene agouti, receptor de insulina, α-MSH, Nestina, β-III tubulina e TOPRO
Giriko, et al., 2013	<ul style="list-style-type: none"> - Peso corporal materno durante a lactação - Consumo diário da dieta pela mãe - Peso corporal, comprimento corpo e comprimentos dos eixos mediolateral e ântero-posterior da cabeça 			<ul style="list-style-type: none"> - Teste do nado forçado com score - Teste do campo aberto - Teste de choque nas patas para comportamento defensivo e agressivo 	
Yu, et al., 2014	<ul style="list-style-type: none"> - Peso corporal da mãe - Comprimento da mãe - Tecido adiposo da mãe 	<ul style="list-style-type: none"> - ELISA para avaliar colesterol, triglicerídeos e glicose séricos da mãe 	<ul style="list-style-type: none"> - PCR em células-tronco neuronais neonatais para Notch1, Msi1, Msi2, Hes1 e Hes5 - Western Blot em células para Hes, Musashi1 e Notch1 		

Mendes da Silva, et al., 2015	<ul style="list-style-type: none"> - Peso corporal da mãe e da prole - Cálculo de massa gorda retroperitoneal e gonadal da mãe - Peso dos cérebros da prole 	<ul style="list-style-type: none"> - Western Blot em tecido do hipocampo da prole para HeS5, Mash1, Notch1 e β-actina - PCR do hipocampo da prole para Notch1, HeS5 e Delta 1 	<ul style="list-style-type: none"> - Imunofluorescência com marcação de células BrdU positivas no tecido hipocampal da prole
Lin, et al., 2015	<ul style="list-style-type: none"> - Peso corporal da prole da prole - Consumo diário da dieta pela prole após o desmame 	<ul style="list-style-type: none"> - Radioimunoensaio para corticosterona sérica da prole 	<ul style="list-style-type: none"> - Teste de preferência ao açúcar - Teste do nado forçado - Teste do campo aberto

α -MSH: Hormônio alfa estimulador de melanócito

BrdU: 5-Bromo-2'-Deoxyuridine

E17: Embryonic day 17

Hes1: HeS family BHLH transcription factor 1

Hes5: HeS family BHLH transcription factor 5

Mash1: Mammalian achaete scute homolog-1

Msi1: Musashi1

Ms2: Musashi2

Pax6: Paired box 6

Tabela 4 – Apresentação dos resultados obtidos nos artigos encontrados.

Autores	Parâmetros biológicos	Análises bioquímicas	Análises de biologia molecular	Análises comportamentais	Análise histoquímica
Tozuka, Wada e Wada, 2009	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de peso após uma semana de dieta rica em gordura nas mães expostas - Redução na razão do nascimento entre machos e fêmeas no grupo submetido à dieta rica em gorduras - Aumento do peso da prole durante a lactação até P70 - Aumento do consumo alimentar diário após o desmame pelos fetos expostos à dieta materna rica em gordura 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento dos níveis de glicose em 15 e 30 minutos após injeção de glicose nas mães às 11 semanas de idade - Aumento dos níveis de colesterol e da concentração de ácidos graxos livres no soro das mães às 11 semanas de idade - Aumento dos níveis séricos de colesterol, triglicerídeos, ácidos graxos livres e glicose da prole durante a lactação 			<ul style="list-style-type: none"> - Redução do número de células progenitoras em estado proliferativo no giro dentado da prole em P21 (desmame), P49, P70 (adulto) e P98 - Redução de mitose no giro dentado da prole em P49 - Decréscimo na diferenciação celular no giro dentado da prole em P49 - Aumento do tamanho dos adipócitos das mães às 11 semanas de idade - Aumento do tamanho dos adipócitos da prole durante a lactação
	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de peso corporal materno durante as 10 semanas de exposição à dieta rica em gordura 				<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da mitose celular nas zonas ventriculares e subventriculares do hipocampo e do córtex da prole em E17 - Redução da mitose celular no giro dentado em E17 - Redução da apoptose celular nas áreas Ammon's Horn e Fimbria do hipocampo da prole em E17 - Redução dos níveis de Calretinina no giro dentado da prole em E17

Stachowiak et al., 2013				<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da disposição de progenitores neurais, que foram encontradas tanto no hipocampo quanto no córtex cerebral dos fetos em E21 - Formação das camadas corticais com colunas apertadas de neurônios recém diferenciados dos fetos em E21
Giriko et al., 2013	<ul style="list-style-type: none"> - Redução do consumo alimentar das mães em P7 e P21 - Redução do comprimento corporal da prole em P1 e P2 - Redução dos eixos mediolateral e anteroposterior da cabeça da prole - Aumento de peso da prole adulta 			<ul style="list-style-type: none"> - Decréscimo nos comportamentos de escalar e nadar - Aumento dos scores de agressividade
Yu et al., 2014	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento do ganho de peso corporal das mães - Aumento da gordura corporal das mães 	- Níveis elevados de colesterol sérico da mãe	- Aumento na expressão de Msi1, Msi2, Notch1 e Hes1	
Mendes da Silva et al., 2015	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento do peso corporal das mães antes do acasalamento, no acasalamento e até a segunda semana de prenhez - Aumento da massa gorda adiposa da mãe nos tecidos gonadais e retroperitoniais - Aumento da massa gorda da prole em 82% no tecido adiposo gonadal e 353% no tecido adiposo retroperitoneal - Aumento do peso corporal da prole da lactação até o desmame 		<ul style="list-style-type: none"> - Aumento da proteína e da expressão de mRNA Hes5 no hipocampo da prole - Aumento da expressão dos níveis de mRNA de Notch1 no hipocampo da prole - Diminuição dos níveis de expressão de mRNA de Mash1 no hipocampo da prole 	

Lin et al., 2015	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento do peso corporal da prole dos fetos - Aumento do consumo diário da dieta pela prole após o desmame 	<ul style="list-style-type: none"> - Elevação do cortisol em episódios de estresse sofrido pela prole - Não redução do cortisol de acordo com o tempo de exposição ao estresse com aconteceu com os descendentes da prole controle 	<ul style="list-style-type: none"> - Diminuição da atividade de criação da prole em 56 dias após o nascimento
------------------	---	--	--

E17: Embryonic day 17 P21: Postnatal day 21 Hes1: HeS family BHLH transcription factor 1

E21: Embryonic day 21 P49: Postnatal day 49 Hes5: HeS family BHLH transcription factor 5

P1: Postnatal day 1 P70: Postnatal day 70 Mash1: Mammalian achaete scute homolog-1

P2: Postnatal day 2 P98: Postnatal day 98 Msi1: Musashi1

P7: Postnatal day 7

ANEXO II – Especificação técnica da dieta controle

NUVILAB CR-1



Especificação Técnica

Descrição

NUVILAB CR-1 é uma Ração para animais de laboratório.

20/05/2016

Rev. n° 01

Composição Básica

Milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio (sal comum), vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, niacina, pantotenato de cálcio, ácido fólico, biotina, cloreto de colina, sulfato de ferro, monóxido de manganês, óxido de zinco, sulfato de cobre, iodato de cálcio, selenito de sódio, sulfato de cobalto, lisina, metionina, BHT.

Propriedades

O produto apresenta a forma física em peletes de coloração bege a marrom. Envasado em sacarias de 10 ou 20 kg.

Níveis de Garantia

NUVILAB CR-1 tem em sua composição os seguintes níveis mínimos de garantia por quilo:

Umidade (máx)	125	g/kg	Matéria Mineral (máx)	90	g/kg
Cálcio (mín-máx)	10-14	g/kg	Prot Bruta (mín)	220	g/kg
Fibra Bruta (máx)	70	g/kg	Fósforo (mín)	8.000	mg/kg
Extrato etéreo (mín)	40	g/kg	Vitamina A (mín)	13.000	UI/kg
Vitamina D3 (mín)	2.000	UI/kg	Vitamina E (mín)	34	UI/kg
Vitamina K3 (mín)	3	mg/kg	Vitamina B1 (mín)	5	mg/kg
Vitamina B2 (mín)	6	mg/kg	Vitamina B6 (mín)	7	mg/kg
Vitamina B12 (mín)	22	mcg/kg	Niacina (mín)	60	mg/kg
Pant de cálcio (mín)	20	mg/kg	Ácido Fólico (mín)	1	mg/kg
Biotina (mín)	0,05	mq/kg	Colina (mín)	1.900	mq/kg
Sódio (mín)	2.700	mq/kg	Ferro (mín)	50	mq/kg
Manganês (mín)	60	mq/kg	Zinco (mín)	60	mq/kg
Cobre (mín)	10	mq/kg	Iodo (mín)	2	mq/kg
Selênio (mín)	0,05	mq/kg	Cobalto (mín)	1,5	mq/kg
Fluor (máx)	80	mq/kg	Lisina (mín)	12	q/kg
Metionina (mín)	4.000	mg/kg	BHT	100	mg/kg

Dosagem

Administração à vontade, através de comedouros suspensos.

Indicação de Uso

Ração pronta para uso, indicado para alimentação de camundongos e ratos de laboratório.

Conservação

Conservar o produto em ambiente seco e arejado, sobre estrados, evitando-se luz e calor excessivos.

- Prazo de validade: 06 meses após a data de fabricação.

Registro

PRODUTO ISENTO DE REGISTRO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – INDÚSTRIA BRASILEIRA

2.9 REFERÊNCIAS

- ACHESON, K. J.. Diets for body weight control and health: the potential of changing the macronutrient composition. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 67, 4p. 62–466, 2013.
- ADAIR, L. S.. Long-term consequences of nutrition and growth in early childhood and possible preventive interventions. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser.*, v. 78, p. 111-120, jan. 2014.
- AHMED, S., et al.. Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adh. Migr.*, v. 34, p. 412-24, out-dez 2009.
- ALVAREZ-BUYLLA, A.; GARCIA-VERDUGO, J. M., TRAMONTIN, A. D.. A unified hypothesis on the lineage of neural stem cells. *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 2, p. 287–293, 2001.
- ANDERSEN, J., et al.. A transcriptional mechanism integrating inputs from extracellular signals to activate hippocampal stem cells. *Neuron*, v. 83, p. 1085-1097, 2014).
- ANDERSSON, J., et al.. Left ventricular remodelling changes without concomitant loss of myocardial fat after long-term dietary intervention. *Int J Cardiol.*, v. 1, n. 216, p. 92-6, ago. 2016.
- ANTHONY, T. E., et al.. Radial Glia Serve as Neuronal Progenitors in All Regions of the Central Nervous System. *Neuron*, v. 41, n. 6, p. 881 – 890, 2004.
- ARTAVANIS-TSAKONAS, S.; RAND, M. D.; LAKE, R. J.. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*, v. 284, p. 770-776, 1999.
- BAIÃO, M. R.; DESLANDES, S. F.. Alimentação na gestação e puerpério. *Rev. Nutr.*, Campinas, v. 19, n. 2, p. 245-253, abr. 2006.
- BAIÃO, M. R.; DESLANDES, S. F.. Gravidez e comportamento alimentar em gestantes de uma comunidade urbana de baixa renda no Município do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 24, n. 11, p. 2633-2642, nov. 2008.
- BANI-YAGHOUB, M., et al.. A switch in numb isoforms is a critical step in cortical development. *Developmental Dynamics*, v. 236, n. 696-705, 2007.
- BARGUER, M. K.. Maternal nutrition and perinatal outcomes. *J Midwifery Womens Health.*, v. 55, n. 6, p. 502-11, nov.-dez. 2010.
- BARTEL, D. P.. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281-97, jan. 2004.
- BEAL, T., et al.. Global trends in dietary micronutrient supplies and estimated prevalence of inadequate intakes. *PLoS One*, v. 12, n. 4, e0175554, abr. 2017.

BERGAMI, M., BERNINGER, B., CANOSSA, M.. Conditional deletion of TrkB alters adult hippocampal neurogenesis and anxiety-related behavior. *Communicative & Integrative Biology*, v. 2, n. 1, p. 14-16, 2009.

BLUMENSCHINE, R. J.. Hominid carnivory and foraging strategies, and the socio-economic function of early archaeological sites. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 334B, p. 211–221, 1991.

BOARETO, M., IBER, D., TAYLOR, V.. Differential interactions between Notch and ID factors control neurogenesis by modulating Hes factor autoregulation. *Development*, v. 144, n. 19, p. 3.465-3.474, 2017.

BOITARD, C., et al.. Juvenile, but not adult exposure to high-fat diet impairs relational memory and hippocampal neurogenesis in mice. *Hippocampus*, v. 22, n. 11, p. 2095–2100, 2012.

BONEV, B.; PISCO, A.; PAPALOPULU, N.. MicroRNA-9 reveals regional diversity of neural progenitors along the anterior-posterior axis. *Dev. Cell*, v. 20, n. 1, p. 19-32, 2001.

BONEV, B.; PISCO, A.; PAPALOPULU, N.. MicroRNA-9 modulates Hes1 ultradian oscillations by forming a double-negative feedback loop. *Cell Rep.*, v. 2, n. 1, p. 10–18, 2012.

BOWERS, K., et al. A prospective study of prepregnancy dietary fat intake and risk of gestational diabetes. *Am J Clin Nutr.*, v. 95, p. 446-453, 2012.

BRADFORD, M. M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248–254, 1976.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p..

BREMNER, J. D; VERMETTEN, E.. Neuroanatomical changes associated with pharmacotherapy in posttraumatic stress disorder. *Ann NY Acad Sci.*, v. 1032, p. 154–157, 2004.

BREUNIG, J. J., et al.. Notch regulates cell fate and dendrite morphology of newborn neurons in the postnatal dentate gyrus. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 104, n. 51, p. 20558-20563, 2007.

BRUCH, H.. Psychological aspects in overeating and obesity. *Psychosomatics*, v. 5, n. 5, p. 269-274, 1964.

BUCHER, T., et al.. Nudging consumers towards healthier choices: a systematic review of positional influences on food choice. *Br J Nutr.*, v. 115, n. 12, p. 2252-63, jun. 2016.

CALLE, E. E., KAAKS, R.. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer.*, v. 4, v. 8, p. 579-91, aog. 2004.

- CASTRO, Priscila da Silva; CASTRO, Maria Beatriz Trindade de; KAC, Gilberto. Aderência às recomendações dietéticas do Institute of Medicine (Estados Unidos) e o seu efeito no peso durante a gestação. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 29, n. 7, p. 1311-1321, jul. 2013.
- CAU, E., et al.. Hes genes regulate sequential stages of neurogenesis in the olfactory epithelium. *Development*, v. 127, p. 2323-32, 2000.
- CHAN, J. M., et al.. Obesity, fat distribution, and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care.*, v, 17, p. 9, p. 961-9, set. 1994.
- CHANG, G. Q., et al.. Maternal high-fat diet and fetal programming: Increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci.*, v. 28, n. 43, p. 12107–12119, nov. 2008.
- CHEN, X., et al.. Differences in maternal circulating fatty acid composition and dietary fat intake in women with gestational diabetes mellitus or mild gestational hyperglycemia. *Diabetes Care*, v. 33, p. 2049–2054, 2010.
- CINTI, S.. The adipose organ. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, v. 73, n. 1, p. 9-15, jul. 2015.
- CLARK, A., et al.. My baby body: A qualitative insight into women's body-related experiences and mood during pregnancy and the postpartum. *Journal of Reproductive and Infant Psychology*, v. 27, n. 4, p. 330–345, 2009.
- CLARK, M., OGDEN, J.. The impact of pregnancy on eating behaviour and aspects of weight concern. *Int J Obes Relat Metab Disord.*, v. 23, n. 18-24, 1999.
- COHEN, N. M.. *The emergence of health and social inequalities in the archaeological record*. In *Human Biology and Social Inequality*, Cambridge: Cambridge University Press, 1998, p. 249–271.
- CONNER, M.; JOHNSON, C.; GROGAN, S.. Gender, sexuality, body image and eating behaviours. *J Health Psychol.*, v. 9, n. 4, p. 505-15, jun. 2004.
- COOLEN, M., et al.. miR-9 controls the timing of neurogenesis through the direct inhibition of antagonistic factors. *Dev Cell*, v. 2, n. 5, p. 1052-1064, 2012.
- CORDAIN, L., et al.. Plant-animal subsistence ratios and macronutrient energy estimations in worldwide hunter-gatherer diets. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 71, p. 682–692, 2000.
- CORDAIN, L., et al.. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81, p. 341–354, 2005.
- CRYAN, J. F., MARKOU, A., LUCKI, I.. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 23, p. 238–245, 2002.
- CUI, Y., et al.. High-fat diets impairs spatial learning of mice in the Y-maze paradigm: ameliorative potential of α -lipoic acid. *J. Med. Food*, v. 15, n. 8, p. 713–717, 2012.

- DAVIES, K.; WARDLE, J.. Body image and dieting in pregnancy. *Psychosom Res.*, v. 38, n. 8 p. 787-99, nov. 1994.
- DECKELBAUM R. J; WILLIAMS, C. L., Childhood obesity: the health issue. *Obes. Rev.*, v. 9, supl. 4, p. 239S-243S, 2001.
- DEIRÓ, T.C., et al.. Sertraline delays the somatic growth and reflex ontogeny in neonate rats. *Physiol. Behav.*, v. 87, n. 2, p. 338–344, 2006.
- DEIRÓ, T. C., et al., Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 37, n. 10, p. 1503–1509, 2004.
- DIETRICH, J.; IMITOLA, J.; KESARI, S.. Mechanisms of Disease: the role of stem cells in the biology and treatment of gliomas. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 5, n. 7, p. 393-404, jul. 2008.
- DREWNOWSKI, A., POPKIN B. M.. The nutrition transition: new trends in the global diet. *Nutr Rev.*, v. 55, p. 31-43, 1997.
- DUMAN, R. S.. Neural plasticity: Consequences of stress and actions of antidepressant treatment. *Dialogues Clin Neurosci.*, v. 6, p. 157–169, 2004.
- DUNCOMBE, D., et al. How well do women adapt to changes in their body size and shape across the course of pregnancy? *Journal of Health Psychology*, v. 13, n. 4, p. 503–515, 2008.
- DUPRET, D., et al.. Spatial relational memory requires hippocampal adult neurogenesis. *PLoS ONE*, v. 3, p. 1–14, 2008.
- EATON, S. B.; EATON, S. B. III. An evolutionary perspective on human physical activity: implications for health. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 136A, p. 157–159, 2003.
- EATON, S. B.; KONNER M.. Paleolithic nutrition. A consideration of its nature and current implications. *New England Journal of Medicine*, v. 312, n. 5, p. 283–289, 1985.
- EATON, S. B.. *Fibre intake in prehistoric times*. In *Dietary Fibre Perspectives, Reviews and Bibliography*, London: John Libby, v. 2, 2 ed., p. 27–40, 1990.
- EATON, S. B.; EATON, S. B. III; KONNER, M. J.. Paleolithic nutrition revisited: a twelve year retrospective. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 51, p. 207–216. 1997.
- EATON, S. B.; KONNER, M.; SHOSTAK, M.. Stone Agers in the fast lane: chronic degenerative diseases in evolutionary perspective. *American Journal of Medicine*, v. 84, p. 739–749, 1988.
- EATON, S. B.. The ancestral human diet: what was it and should it be a paradigm for contemporary nutrition? *Proc Nutr Soc.*, v. 65, n. 1, p. 1-6, fev. 2006.

- ECKEL, R. H., KRAUSS, R. M. American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor for coronary heart disease. *AHA Nutrition Committee*, v. 97, n. 21, p. 2099-100, jun. 1988.
- FARIOLI-VECCHIOLI, S., et al.. The timing of differentiation of adult hippocampal neurons is crucial for spatial memory. *PLoS Biol.*, v. 6, p. 2188–2204, 2008.
- FERREIRA, Aurélio Buarque de Holanda. Minidicionário Aurélio da Língua Portuguesa. 7ª ed. revista e atualizada. Curitiba: Positivo, 2004.
- FERREIRA, S. R. G.. Alimentação, nutrição e saúde: avanços e conflitos da modernidade. *Cienc. Cult.*, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 31-33, out. 2010.
- FERRER-GARCIA M., et al.. Eating behavior style predicts craving and anxiety experienced in food-related virtual environments by patients with eating disorders and healthy controls. *Appetite*, v. 117, p. 284-93, out. 2017.
- FISHELL G., KRIEGSTEIN A. R. Neurons from radial glia: the consequences of asymmetric inheritance. *Curr. Opin. Neurobiol.*, v. 13, p. 34–41, 2003.
- FOLEY, R. A.. *Another Unique Species. Patterns in Human Evolutionary Ecology*. Harlow, Essex: Longman Scientific and Technical, 1987, p. 313.
- FOX, P.; YAMAGUCHI, C.. Body image change in pregnancy: a comparison of normal weight and overweight primigravidas. *Birth*, v. 2, n. 1, p. 35-40. Mar. 1997.
- FRANKO, D. L., WALTON, B. E.. Pregnancy and eating disorders: A review and clinical implications. *International Journal of Eating Disorders*, v. 13, p. 41–48, 1993.
- FRIEDEWALD, W.T.; LEVY, R.I. FREDRICKSON, D.S.. Estimation of the low density lipoprotein in plasma without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem*, v. 18, p. 499-502, 1972.
- FUJITA, S.. The discovery of the matrix cell, the identification of the multipotent neural stem cell and the development of the central nervous system. *Cell Struct. Funct.*, v. 28, p. 205–228, 2003.
- GARN, S. M., LEONARD, W. R.. What did our ancestors eat? *Nutr. Rev.*, v. 47, n. 11, p. 337–345, 1989.
- GILMORE, A.; KLEMPPEL-DONCHENKO, M.; REDMAN, L. M.. Pregnancy as a window to future health: Excessive gestational weight gain and obesity. *Semin Perinatol.*, v. 39, n. 4, p. 296-303, jun. 2015.
- GIRIKO, et al.. Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 31, n. 8, p. 731–739, 2013.
- GOES, A. T., et al.. Neuroprotective effects of swimming training in a mouse model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, v. 256, p. 61–71, 2014.

GOMES, C. B., et al.. Práticas alimentares de gestantes e mulheres não grávidas: há diferenças? *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, Rio de Janeiro, v. 37, n. 7, p. 325-332, jul. 2015.

GONZÁLEZ-MUNIESA, P., et al.. Obesity. *Nat Rev Dis Primers*, v. 3, 17034, jun. 2017.

GOOD, P. J., et al.. The human Musashi homolog1 (MSI1) encoding the homologue of Musashi/Nrp-1, a neural RNA-binding protein putatively expressed in CNS stem cell and neural progenitor cells. *Genomics*, v. 52, p. 382–384, 1998.

GÖTZ M.; HUTTNER W. B.. The cell biology of neurogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v. 6, p. 777–788, 2005.

GU, X., et al. miR-124 and miR-9 mediated downregulation of HDAC5 promotes neurite development through activating MEF2C-GPM6A pathway. *J Cell Physiol*. V. 233, P. 673-687, 2018.

GUPTA, A., et al.. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J. Endocrinol*, v. 200, n. 3, p. 293-300, mar. 2009.

HALES, C. N., BARKER, D. J.. Type 2 (non-insulin-dependant) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*, v. 35, n. 7, 595e601, 1992.

HATAKEYAMA, J., et al.. Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*, v., 131, p. 5539-50, 2004.

HENG, J.; GUILLEMOT, F.. Proneural proteins and the development of the cerebral cortex. In *Cortical Development*, 2013, Tokyo: Springer, p. 19-41.

HERMAN, C. P., POLIVY, J.. External cues in the control of food intake in humans: the sensory-normative distinction. *Physiol Behav.*, v. 94, n. 5, p. 722-8, ago. 2008.

HIBBARD, E. D; SMITHELLS, R. W.. Folic acid metabolism and human embryopathy. *Lancet*, v. 285, n. 73698, p. 1254, 1965.

IMAI, T., et al.. The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol Cell Biol.*, v. 21, p. 3888–3900, 2001.

IMAYOSHI, I., et al.. Oscillatory control of factors determining multipotency and fate in mouse neural progenitors. *Science*, v. 342, p. 1203-1208, 2013.

Institute of Medicine (US) and National Research Council (US). *Weight Gain During Pregnancy: Reexamining the Guidelines*. Washington, DC: National Academies Press, 2009.

ISAAC, G.. Aspects of human evolution. In *Evolution from Molecules to Men*. Cambridge: Cambridge University Press, 1983. p. 509–544.

ISAAC, G. L.; CRADER, D. C.. To what extent were early hominids carnivorous? An Archeological Perspective. In *Omnivorous Primates: Gathering and Hunting in Human Evolution*. New York: Cambridge Univ. Press, 1981, p. 37–103.

JAVARAS, K. N., et al.. Co-occurrence of binge eating disorder with psychiatric and medical disorders. *J Clin Psychiatry*, v. 69, p; 266-273, 2008.

JUNGES, C. F.. *Influências da cultura no comportamento alimentar de gestantes: contribuições para enfermagem. 2010.* 107 p.. Dissertação – Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 26 de novembro de 2010.

KAGEYAMA, R., et al.. Roles of bHLH genes in neural stem cell differentiation. *Exp Cell Res*, v. 306, p. 343-8, 2005.

KANEKO, Y., et al.. Musashi1: evolutionarily conserved markers for CNS progenitor cells including neural stem cells. *Dev Neurosci.*, v. 22, p. 138–152, 2000.

King, J. C.. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr.*, v. 26, p. 271-91, 2006.

KOSKINA, A., CAMPBELL, I. C., SCHMIDT, U.. Exposure therapy in eating disorders revisited. *Neurosci Biobehav Rev.*, v. 37, n. 2, p. 193-208. Fev. 2013.

KUMAR, A., et al.. Regulatory role of NGFs in neurocognitive functions. *Reviews in the Neurosciences*, v. 28, n. 6, p. 649-673, 2017.

KUNZ, L. H., KING, J. C.. Impact of maternal nutrition and metabolism on health of the offspring. *Semin Fetal Neonatal Med.*, v. 12, p. 71-77, 2007.

LAMPREA, M. R., et al.. Dissociation of memory and anxiety in a repeated elevated plus-maze paradigm: forebrain cholinergic mechanisms. *Behavioral Brain Research*, v. 117, p. 97-105, 2000.

LÁSZLÓ, S.. Development and structure of the radial glia in the postnatal rat brain. *Anatomy and Embryology*, v. 160, n. 2, p. 213-226, jul. 1980.

LAWRENCE, M., et al.. Public health nutrition and sustainability. *Public Health Nutr.*, v. 18, n. 13, p. 2287-92, set. 2015.

LEE J. E., et al.. A Multimodal, Nonpharmacologic Intervention Improves Mood and Cognitive Function in People with Multiple Sclerosis. *J Am Coll Nutr.*, v. 36, n. 3, p. 150-68, mar.-abr. 2017.

LEE, H. K.. Neural transcription factors: from embryos to neural stem cells. *Molecules and Cells*, v. 37, n.10 p. 705–712, 2014.

LEONARD, W. R.; Robertson, M. L.. Evolutionary perspectives on human nutrition: the influence of brain and body size on diet and metabolism. *American Journal of Human Biology*, v. 6, p. 77–88, 1994.

LEONARD, W. R.; Robertson, M. L.. Rethinking the energetics of bipedality. *Current Anthropology*, v. 38, p. 304–309, 1997.

LEONARD, W. R.. *Human nutritional evolution.* In *Human Biology. An Evolutionary and Biocultural Perspective.* New York: Wiley-Liss, 200, p. 295–343.

LIN, et al.. Maternal high fat diet programs stress-induced behavioral disorder in adult offspring. *Physiology & Behavior*, v. 152, aprte A, p. 119-27, 2015.

LIU, H.; SONG, N.. Molecular Mechanism of Adult Neurogenesis and its Association with Human Brain Diseases. *Journal of Central Nervous System Disease*, v. 8, p. 5-11, 2016.

LOWENSOHN, R. I.; STADLER, D. D.; VAZE, C.. Current Concepts of Maternal Nutrition. *Obstetrical & Gynecological Survey*, v. 71, n. 7, p. 413-26, 2016.

LU, B.; NAGAPPAN, G.; LU, Y. BDNF and synaptic plasticity, cognitive function, and dysfunction. In: *Neurotrophic Factors*. Tokyo: Springer, 2014, p. 223–250.

LUCYK, J. M.; FURUMOTO, R. V.. Necessidades nutricionais e consumo alimentar na gestação: uma revisão. *Comun. ciênc. Saúde*, v. 19, n. 4, p. 353-363, out.-dez. 2008.

LÜTOLF, S.. Notch1 is required for neuronal and glia differentiation in the cerebellum. *Development*, v. 129, p. 373–385, 2002.

MALLINSON, J. E., et al.. Fetal exposure to a maternal low-protein diet during mid-gestation results in muscle-specific effects on fibre type composition in young rats. *Br. J. Nutri.*, v. 98, p. 292–299, 2007.

MANHEIMER, E. W., et al.. Paleolithic nutrition for metabolic syndrome: systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr.*, v. 102, n. 4, p. 922-32, out. 2015.

MARTINEZ-MALLÉN, E., et al.. Cue exposure in the treatment of resistant adolescent bulimia nervosa. *Int J Eat Disord.*, v. 40, n. 7, p. 596-601, nov. 2007.

Mazon, J. N., et al.. The impact of obesity on neurodegenerative diseases. *Life Sciences*, v. 182, p. 22-28, 2017.

MELA, D.. Eating behaviour, food preferences and dietary intake in relation to obesity and body-weight status. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 55, p. 803–16, 1996.

MELO, A. M., et al.. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism*, v. 63, n. 5, p. 682–692, 2014.

MENDES-DA-SILVA, et al.. Increased expression of Hes5 protein in Notch signaling pathway in the hippocampus of mice offspring of dams fed a high-fat diet during pregnancy and suckling. *International Journal of Developmental Neuroscience*, v. 40, p. 35-42, 2015.

Michaelis Dicionário Brasileiro da Língua Portuguesa. Disponível em: <http://michaelis.uol.com.br/busca?id=pqGO>.

MIKKELSEN, B. E. Images of foodscapes: introduction to foodscape studies and their application in the study of healthy eating out-of-home environments. *Perspect Public Health*, v. 131, p. 209–216, 2011.

MILLER F. D.; GAUTHIER A. S.. Timing is everything: making neurons versus glia in the developing cortex. *Neuron*, v. 54, p. 357–369, 2007.

MILTON, K.. *Primate diets and gut morphology: implications for human evolution*. In Food and Evolution: Toward a Theory of Human Food Habits. Philadelphia, PA: Temple University Press, 1987, p. 93–116.

MING, G. L.; SONG, H.. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.*, v. 28, p. 223–250, 2005.

MING, G. L.; SONG, H.. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*, v. 70, n. 4, p. 687-702, maio 2011.

MONTICELLI, M. Abordagem cultural do nascimento como um rito de passagem. *Revista Acta Paulista de Enfermagem*, v. 9, p. 41-44, 1996.

NADERALI E. K.; RATCLIFFE, S. H., DALE, M. C.. Obesity and Alzheimer's disease: a link between body weight and cognitive function in old age. *Am J Alzheimers Dis Other Demen*, v. 24, n. 6, p. 445-9, dez. 2009-jan. 2010.

National Research Council. Guide for care and use of laboratory animals. 8^a ed.. Washington: The National Academies Press, 2011.

NICULESCU, M. D.; LUPU, D. S.. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *International Journal Developmental Neuroscience*, v. 27, n. 7, p. 627-33, 2009.

NOCTOR, S. C., et al.. Dividing precursor cells of the embryonic cortical ventricular zone have morphological and molecular characteristics of radial glia. *J. Neurosci.*, v. 22, p. 3161-3173, 2002.

OHTSUKA T., et al., Hes1 and Hes5 as notch effectors in mammalian neuronal differentiation. *EMBO J.*, v. 18, n. 1999 Apr 15;18(8):2196-207.

OHTSUKA, T., et al.. Roles of the basic helix-loop-helix genes Hes1 and Hes5 in expansion of neural stem cells of the developing brain. *J Biol Chem*. 2001, ago. 10, v. 276, p. 32, p. 30467-74. Doi: 10.1074/jbc.M102420200. Acesso em: 26 jun. 2016.

OKANO, H., et al.. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Exp Cell Res.*, v. 306, 349-56, 2005.

OKANO, H.. Stem cell biology of the central nervous system. *J. Neurosci. Res.*, v. 69, p. 698–707, 2002.

OKANO, H.. Two major mechanisms regulating cell-fate decisions in the developing nervous system. *Dev. Growth Differ.*, v. 37, p. 619-29, 1995.

OLIVEIRA, E. H. D., et al.. *Histórico dos miRNAs*. In: PEREIRA, T. G. Introdução ao mundo dos microRNAs. São Carlos: CUBO, 2015, p. 24-32.

OTTEN J., et al.. Benefits of a Paleolithic diet with and without supervised exercise on fat mass, insulin sensitivity, and glycemic control: a randomized controlled trial in

individuals with type 2 diabetes. *Diabetes Metab. Res Rev.*, v. 33, 2017 Jan;33(1). doi: 10.1002/dmrr.2828. Epub 2016 Jun 30.

PAGE, K. C.; ELIZABETH K. J.; ENDLA K. A.. Maternal and postweaning high-fat diets disturb hippocampal gene expression, learning, and memory function. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 306, n. 8, R527-37, 2014.

PALMA, V., RUIZ I ALTABA, A.. Hedgehog-GLI signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development*, v. 131, n. 2, p. 337-45, 2004.

PARIDAEN, J. T.; HUTTNER, W. B.. Neurogenesis during development of the vertebrate central nervous system. *EMBO Rep.*, v. 15, n. 4, p. 351-64, 2014.

PARK, S., et al.. Gestational diabetes is associated with high energy and saturated fat intakes and with low plasma visfatin and adiponectin levels independent of prepregnancy BMI. *Eur J Clin Nutr.* v. 67, p. 196-201, 2013.

PELEG-RAIBSTEIN, D., LUCA, E., WOLFRUM, C.. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav. Brain Res.*, v. 233, n. 2, p. 398–404. 2012.

PERERA, T. D.; PARK, S.; NEMIROVSKAYA, Y.. Cognitive role of neurogenesis in depression and antidepressant treatment. *Neuroscientist*, v. 14, p. 326–338, 2008.

PINHAS-HAMIEL, O., et al.. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. *J Pediatr.*, v. 128, p. 608-15, 1996.

POON, K., et al.. Developmental changes in embryonic hypothalamic neurons during prenatal fat exposure. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, v. 303, n. 3, p. E432-E441, 2012.

POPKIN, B. M.. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *Am J Clin Nutr.*, v. 84, n. 2, p. 289-298, ago. 2006.

PRUT, L., BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol*, v. 463, p. 3–33, 2003.

REARDON, T., BERDEGUÉ, J. A. The rapid rise of supermarkets in Latin America: challenges and opportunities for development. *Dev Policy Ver.*, v. 20, p. 371-88, 2002.

ROCCHINI, A. P.. Childhood obesity and a diabetes epidemic. *N Engl J Med.*, v. 346, p. 854-55, 2002.

ROESE-KOERNER, B., et al. Reciprocal Regulation between Bifunctional miR-9/9* and its Transcriptional Modulator Notch in Human Neural Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Stem Cell Reports*, v. 7, n. 2, p. 207 – 219, ago. 2016.

- ROFEY D. L., et al.. A longitudinal study of childhood depression and anxiety in relation to weight gain. *Child Psychiatry Hum Dev.*, v. 40, n. 4, p. 450-4, 2009.
- ROZIN P, et al.. The ecology of eating: smaller portion sizes in France Than in the United States help explain the French paradox. *Psychol Sci.*, v. 14, v. 5, p. 450-4, set. 2003.
- ROZIN, P. *Human food intake choice: biological, psychological and cultural perspective*. In: Food Selection: from genes to culture. Levallois-Perret: Danone Institute, 2002. p. 7-26.
- RUSH E. C.; YAN, M. R.. Evolution not Revolution: Nutrition and Obesity. *Nutrients*, v. 9, n. 5, p. 519, 2017.
- RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J., INGRAM, C. D.. Brain preparations for maternity–adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation: An overview. *Prog Brain Res.*, v. 131, p. 1-38, 2001.
- SAHAY, A., HEN, R.. Adult hippocampal neurogenesis indepression. *Nat Neurosci.*, v. 10, p. 1110–1115, 2007.
- SAKAKIBARA, S., et al.. Mouse-musashi-1, neural RNA-binding protein highly enriched in the mammalian CNS stem cell. *Dev Biol.*, v. 176, p. 230-42, 1996.
- SAKAKIBARA, S., OKANO, H.. Expression of neural RNA-binding proteins in the postnatal CNS: implication of their roles in neural and glial cell development. *J Neurosci.*, v. 17, p. 8300-312, 1997.
- SAKAMOTO, M., et al... The basic helix-loop-helix genes Hesr1/Hey1 and Hesr2/Hey2 regulate maintenance of neural precursor cells in the brain. *J Biol Chem.*, v. 278, n. 44, p. 808-15, 2003.
- SAMUELSSON, A. M., et al.. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, v. 51, n. 2, p. 383-92, fev. 2008.
- SASAKI, A., et al.. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior inadulthood. *Neuro-science*, v. 240, p. 1–12, 2013.
- SCHACHTER, S.. Some extraordinary facts about obese humans and rats. *The American Psychologist*, v. 26, n. 2. 129e144, 1971.
- SEAL, C. J., et al.. Whole-grain dietary recommendations: the need for a unified global approach. *British Journal of Nutrition*, v. 115, p. 2031-38, 2016.
- SHELINE, Y. I.; GADO, M. H., KRAEMER, H. C. Untreated depression band hippocampal volume loss. *Am J Psychiatry*, v. 160, p. 1516–518, 2003.
- SHIMOJO, H.; OHTSUKA, T.; KAGEYAMA, R.. Oscillations in notch signaling regulate maintenance of neural progenitors. *Neuron*, v. 58, n. 1, p. 52–64, 2008.

SHLOIM, N., et al.. Adjusting to motherhood. The importance of BMI in predicting maternal well-being, eating behaviour and feeding practice within a cross cultural setting. *Appetite*, v. 81, p. 261-268, 2014.

SMART, J.L.; DOBBING, J.. Vulnerability of developing brain: VI Relative effects of fetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Res.*, v. 29, p. 303–314, 1971.

SMITHELLS, R. W.; SHEPPARD, S., SCHORAH, C. J.. Vitamin deficiencies and neural tube defects. *Arch Dis Childh.*, v. 51, p. 944-50, 1976.

SOARES, R. M., et al.. Inappropriate eating behaviors during pregnancy: prevalence and associated factors among pregnant women attending primary care in southern Brazil. *Int J Eat Disord.*, v. 42, n. 5, p. 387-93, jul. 2009.

SOHAIL AHMED, et al.. Transcription factors and neural stem cell self-renewal, growth and differentiation. *Cell Adhesion & Migration*, v. 3, n. 4, p. 412-24, 2009.

SOUSA-FERREIRA, L.; DE ALMEIDA, L. P.; CAVADAS, C.. Role of hypothalamic neurogenesis in feeding regulation. *Trends Endocrinol. Metab.*, v. 25, p. 80–88, 2014.

SOUZA, L. C., et al.. Aging exacerbates cognitive and anxiety alterations induced by an intracerebroventricular injection of amyloid- β 1-42 peptide in mice. *Mol Cell Neurosci.*, v. 88, p. 93-106, abr. 2018.

SPIJKER, S.. *Dissection of Rodent Brain Regions*. In: Neuroproteomics (Neuromethods). Springer Science + Business Media, LLC, 2011, pp. 13–26.

SRINIVASAN, M., et al.. Maternal hyperinsulinemia predisposes rat fetuses for hyperinsulinemia, and adult-onset obesity and maternal mild food restriction reverses this phenotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, v. 290, p. E129–E134, 2006.

STACHOWIAK, E.K., et al.. Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. *Metabolic brain disease*, v. 28, n. 4, 2013, p. 721-25.

STEINE, I. M., et al.. Implication of NOTCH1 gene in susceptibility to anxiety and depression among sexual abuse victims. *Translational Psychiatry*, v. 6, n. 12, e977, 2016.

STEPHEN, A. M.; WALD, N. J.. Trends in individual consumption of dietary fat in the United States, 1920-1984. *Am J Clin Nutr.*, v. 52, n. 3, p. 457-69, set. 1990.

STOTHARD, K. J., et al.. Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, v. 301, n. 6, p. 636-50, fev. 2009.

TOZUKA, Y., WADA, E., WADA, K.. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J.*, v. 23, n. 6, p. 1920-934. Jun. 2009.

ULIJASZEK, S. J.. Energetics methods in biological anthropology. *Yearbook of Physical Anthropology*, v. 35, p. 215–242, 1992.

ULIJASZEK, S. J.. Human eating behaviour in an evolutionary ecological context. *Proc Nutr Soc.*, v. 61, n. 4, p. 517-26, nov. 2002.

URBÁN, N.; FRANÇOIS, G.. Neurogenesis in the Embryonic and Adult Brain: Same Regulators, Different Roles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, v. 8, p. 396, 2014.

VAN STRIEN, T.; HERMAN, C. P.; ANSCHUTZ, D.. The predictive validity of the DEBQ-external eating scale for eating in response to food commercials while watching television. *International Journal of Eating Disorders*, v. 45, n. 2, p. 257-262.,2012.

VAN VEEN, T. , et al.. Different gene sets contribute to different symptom dimensions of depression and anxiety. *Am. J. Med. Genet.*, v. 159B, p. 519-528, 2012.

VRBA, E. S. *Late Pleistocene climatic events and hominid evolution*. In *Evolutionary History of the 'Robust' Australopithecines*. Hawthorne, NY: Aldine,1988, pp. 405–426.

WARING M. R.; LAPANE K. L.. Overweight in children and adolescents in relation to attention-deficit/hyperactivity disorder: results from a national sample. *Pediatrics*, v. 122, n. 1, p. e1-6, jul. 2008.

Williams, R. W. *The mouse brain library*. Neurogenetics at UT Health Science Center, 1999.

WU, L.. High sucrose intake during gestation increases angiotensin II type 1 receptor-mediated vascular contractility associated with epigenetic alterations in aged offspring rats. *Peptides*, v. 86, p. 133-44, dez. 2016.

YU, M., et al.. Maternal high-fat diet affects Msi/Notch/Hes signaling in neural stem cells of offspring mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 25, n. 2, p. 227-231, 2014.

ZHANG, R.; ENGLER, A.; TAYLOR, V.. Notch: an interactive player in neurogenesis and disease. *Cell Tissue Res.*, v. 371, n. 1, p. 73-89, jan. 2017.

ZHAO C.; DENG W.; GAGE; F. H.. Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell*, v. 132, p. 645–660, 2008.

3. ARTIGO

Effects of maternal high-fat diet consumption during preconception, pregnancy and lactation in offspring development

Roberta Giorgi Silveira^a, Cainá Corrêa do Amaral^a, Renata Leivas de Oliveira^b, Karline da Costa Rodrigues^b, Cristiane Luchese^b, Fernanda Nedel^{a*}

^aPost-Graduate Program in Health and Behavior, Catholic University of Pelotas, Rua Félix da Cunha, 412, Cep., Pelotas, RS, 96010-901, Brazil

^bResearch Laboratory in Biochemical Pharmacology (LaFarBio), Federal University of Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, 96010-900 Pelotas, RS, Brazil.

***Corresponding Author:**

Fernanda Nedel

Email: fernanda.nedel@gmail.com

Abstract

Introduction: The pattern of eating behavior based on a Western Diet usually practiced contemporaneously reinforces the idea of consumption of foods that are poor in nutritional value and with a high concentration of carbohydrates and fats. Numerous chronic diseases are associated with a high-fat diet, such as diabetes, hypertension and depression. Like the rest of society, women of childbearing, pregnant and lactating age have been presenting media responsive behavior and the ease of obtaining fatty foods. Animal studies have shown that there is an association between a high fat maternal diet and changes in several parameters related to embryonic, fetal and postnatal growth, and further research is needed to deepen the knowledge obtained so far. **Objective:** The aim of the present study was to investigate changes in the somatic development, physical and sensory-motor effects in the progeny of rats exposed to high-fat diet in the preconception, pregnancy and lactation periods, as well as the influence of diet on maternal body composition and blood glucose levels. **Methods:** Six Wistar females (37 days old) were divided into control group (CD, n = 3, Nuvilab CR-1 diet, 3.4 kcal / g, fat 4g%) and high fat diet (HFD, n = 3, 6.1 kcal / g, fat 50g%) and maintained with the respective diets until weaning (postnatal day 21). The source of fat mainly used was lard. Mothers were evaluated in physical measures (body weight, body length and Lee index) and biochemical parameters of glucose. The males of the offspring (n = 31) were analyzed according to body parameters (body weight, length and Lee index), somatic growth (mediolateral and anteroposterior cranial length), physical characteristics of maturation (unfolding of the external pavilion of both ears, opening of the auditory canal, eruption of the incisors and opening of the eyes) and reflex ontogeny (righting reflex and negative geotaxis). **Results:** Dams exposed to the high-fat diet had lower body weight (from 52 to 122 days old, $p < 0,05$) and less amount of food intake (from 108 to 122 days old, $p < 0.001$). HFD pups had lower body weight (from 5 to 21 days old, $p < 0.01$), naso-anal (14 and 21 days old, $p < 0.01$) and craniocaudal length (from 5 to 21 days old, $p < 0.01$), smaller mediolateral (from 5 to 21 days old, $p < 0.05$) and anteroposterior (from 5 to 21 days old, $p < 0.05$) axis of the head, higher Lee index (21 days old, $p \leq 0.01$), delay in negative geotaxis reflex ($p < 0.03$) and maturation of physical features ($p < 0.05$). **Conclusion:** Maternal exposure to a high-fat diet during preconception, pregnancy and lactation do not implicate in body weight increment, but even so in offspring cause changes in body composition, impair somatic growth, delay in appearance of physical features and prejudice to the reflex ontogeny.

Keywords: maternal eating behavior, high-fat diet, somatic development, physical maturation, reflex ontogeny.

Introduction

According to the World Health Organization (WHO) recommendations, the consumption of fats should be limited to 30-35% of the total daily energy intake for adults (WHO, 2015). Nowadays, however, there has been a massive embracing of the Western diet, which is composed mainly by a high intake of various type of foods with considerable quantity of fat, causing an extrapolation of the nutritional requirements (Westhoek et al., 2014; González-García et al., 2018).

Furthermore, hunger and satiety are closely related to eating habits and environmental aspects, where an extremely palatable easily obtained food stimulates the deregulated consumption (Rozin, 2002; Rush and Yan, 2017). Women in fertile age, pregnant and lactating are also exposed to these situations, which can be aggravated by the specific metabolic and psychological condition, oftentimes leading to even more eating behavior unbalanced (Russel, Douglas and Ingram, 2001; Barguer, 2010).

By a phenomenon named “fetal programming”, changes in embryonic and fetal development during this critical period of rapid cell differentiation, can predispose to postnatal diseases (Barker, 1998). In this scenario, maternal nutrition can bring serious physiological consequences to the fetus and affect permanently the expression of important genes during development, through epigenetic changes (Barguer, 2010). Additionally, even before embryonic implantation the fertilized ovum and the early blastocyst respond to the nutritional quality of the fallopian tube environment (Lowensohn, Stadler and Vaze, 2016).

Unfortunately, western nations have witness a progressive increase in the number of youngster born after maternal high-fat diet consumption during pregnancy and lactation (Sullivan, Nousen and Chamlou, 2014). However, in order to elucidate the consequences of such behavior, animal models have given substantial cues (Kunz and King, 2007).

Some physiological changes have been found in offspring from dams submitted to high-fat diet consumption during pregnancy, such as precocious puberty (Chang, 2008), reduction of neurogenesis (Niculescu and Lupu, 2009), reduction of body length (Giriko et al., 2013), leptin resistance (Choi, 2016), skeletal muscle phenotype (Dos Prazeres Oliveira, 2018) and higher body mass index (Abuaish, Spinieli and McGowan, 2018). In addition, maternal high-fat diet has been related to offspring behavioral, for example, food motivate behavior (Mitra et al., 2009), predisposition to neurological disorders (Stachowiak et al., 2013), detrimental effects of stress (Lin et al., 2015), delay reflex ontogeny (Cadena-Burbano et al., 2017), cognitive impairment (Wolfrum and Peleg-Raibstein, 2018) and anxiety-like behaviors (Abuaish, 2018).

However, despite the advances made so far, the majority of the studies published to date do not extend the mother's diet exposition for long periods. Some researches extend the high-fat diet from preconception to pregnancy (Stachowiak et al, 2013), throughout lactation (Giriko et al., 2013), pregnancy or lactation (Mendes-da-Silva et al., 2014) and from pregnancy to lactation (Cadena-Burbano et al., 2017). Since the ingestion of high-fat diet is not a habit acquired only during gestation and/or lactation, but in most cases a way of living, we aimed to investigate the somatic development, physical and

sensory-motor effects in the progeny of rats exposed to high-fat diet in the preconception, pregnancy and lactation periods; as well as the diet influence in the maternal body composition and blood glucose.

Materials and methods

Animals and diets

Six virgin female albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (37 days old) were taken from the Central Bioterium of the Federal University of Pelotas (Campus Capão do Leão). Females were divided into two randomized groups: control group (CD – control diet) ($n=3$) and experimental group (HFD – high-fat diet) ($n=3$); and exposed to the diets until weaning on the 21st postnatal day (P) according to the experimental design (Fig. 1). The CD group received a standard laboratory chow with 54% carbohydrate, 22% protein and 4% lipids (Nuvilab CR-1; Quimtia; Curitiba, Paraná, Brazil). Meanwhile, the HFD group were fed with a high-fat diet based in the enrichment of Nuvilab chow with lard, resulting in 28% carbohydrate, 11,4% protein and 50% lipids (Table 1). The food consumption was measured every 3 days approximately.

Mating was accomplished by housing females with adult males albino Wistar rat (65 days old) maintained in control diet for five days. Females and pups were individually labeled with marks on the skin to permit identification during the experiment. Controlling litter size in maternal dietary models is essential since variations in litter size may directly impact nutritional availability. In our study, litter sizes varied between 6 and 10 pups. The day of birth was considered day one (P1).

Animals were maintained in open, wire-top, polypropylene cages (20 x 30 x 13 cm) in a room that was maintained at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ with lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m. and free access to water. Close to birth and during the lactation mothers and their pups were maintained in individual cage. The experimental procedures followed the international norms for the handling, care of, and experimentation with animals that were established by the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals and approved by the Commission of Ethics in Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil (protocol number: 23110.029720/2018-42). All efforts were taken to minimize the number of animals used and their suffering.

Body composition

The body weight of the dams (HFD and CD) was measured during the pre-mating (preconception stage), mating, pregnancy, and suckling phases and body weights of the offspring at P5, P10, P14 and P21 with an electronic scale (Geom, model BEL-00052 with graduation 1 g). The body length (i.e., distance between the snout and the base of the tail, distance between the cranium and the base of the tail and distance between the snout and the end of the tail) were made using a plastic, nonextensible measuring tape, with an accuracy of 0.1 cm. These measurements were made for each pup. Lee index was calculated [$\sqrt[3]{\text{body weight (g)} \times 1000 / \text{naso-anal length (cm)}}]$ (Lee, 1929).

Maternal blood glucose

A glucose test was carried out in 37-, 45-, 52-, 64-, 72-, 85 and 93-days-old CD-fed ($n=2$) and HFD-fed ($n=3$) dams. Blood glucose levels were monitored in tail-blood samples using an Accu-Check Performa Blood Glucose Meter (Accu-Check, Roche Diagnostics, Tokyo, Japan). During lactation blood glucose levels were not performed in order to not impair breastfeeding.

Somatic growth

Somatic growth was assessed by measuring the lengths of the mediolateral head axes (MLHA, i.e., the distance between the ear holes) and the anteroposterior head axes (APHA, i.e., the distance between the snout and the head-neck articulation) were measured with digital calipers (Stainless Hardened, 0.03 mm precision) (Falcão-Tebas et al., 2012). These measurements were made for each pup at P5, P14 and P21.

Maturation of physical features

Observations of physical features (Smart and Dobbing, 1971; Deiró et al., 2004, 2006) were made daily from P1 to P21. The following physical features were observed: unfolding of the external pinnae of both ears to the fully erect position; auditory conduit opening, i.e., the opening of the internal auditory conduits of both ears; incisor eruption, i.e., the first visible and palpable cresting of the lower incisors; and eye opening, i.e., any visible break in the membranes covering either eye. The maturation age of a particular feature was defined as the day on which that feature was observed for the first time.

Development of neuromotor reflexes

Righting Reflex

The righting reflex test was carried out at P5. Pups were placed in a supine position, and the latency time to turn over their longitudinal axis to restore a normal prone position was measured. This was considered fully achieved when the pups turned 180° around their longitudinal axis, and their four paws were in contact with the plane surface within the observed 40 seconds time frame (Karalis et al., 2011).

Negative Geotaxis

The negative geotaxis test consisted of a postural reaction, making the animal face upwards, when placed on a sloped surface facing downwards. The test was carried out at P10. Rat pups were placed on a 35-cm-long inclined platform (45° slope), facing the downslope. The animals were expected to turn around 180° to face upwards and climb up the board with their forepaws reaching the upper edge of the board. The results of the test were considered negative if the pups did not succeed in this task within the observed time period of 60 seconds (Horvath et al., 2013).

Statistical analysis

For statistical analyses unpaired Student's t-tests were used. All data are expressed as the means \pm SEM. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Maternal parameters, food intake and blood glucose

The body weights (g) were measured on preconception (37 - 78 days old), pregnancy (85 - 103 days old) and lactation (108 - 122 days old). The HFD group present a statistically significant lower body weight for most part of the preconception phase [52 (158 \pm 7.6 g), 59 (175 \pm 11.9 g), 64 (180.8 \pm 11.4 g), 72 (195.2 \pm 12.4 g), 78 (203 \pm 11.7 g)], during the final period of pregnancy [98 (245.3 \pm 15.9 g), 101 (260 \pm 13 g), 103 (267 \pm 13.8 g)], and during lactation [108 (215.3 \pm 29 g), 115 (192.3 \pm 31.6 g) and 128 (176.3 \pm 26 g)] when compared to CD group (186.7 \pm 9.5 g, 199.7 \pm 8.7 g, 208.3 \pm 5 g, 231.3 \pm 5 g, 239 \pm 1.73 g, 292.5 \pm 14.8 g, 311.5 \pm 23.3 g, 323,2 \pm 18.4 g, 303.5 \pm 0.7 g, 312.5 \pm 3.53 g, 327 \pm 15.5, respectively) ($p < 0.05$, Fig. 2A). HFD dams consumed less amount of food during lactation than CD dams (105-111 11.33 \pm 1 g, 112-118 13.33 \pm 1.5 g, 119-122 14 \pm 0.5 g) when compared to control (105-111 30.5 \pm 2.1 g, 112-118 60.5 \pm 3.5 g, 119-122 75 \pm 4.9, $p < 0.001$, Fig. 2F). There were no statistically significant differences in the total body and naso-anal lengths, and the levels of blood glucose and Lee index between HFD and CD groups.

Body parameters of the offspring

During entire lactation period the mean of HFD offspring body weight at [P5 (8.6 \pm 1.71), P10 (12.6 \pm 2.7), P14 (14.7 \pm 4) and P21 (20.2 \pm 5.5)] was significantly lighter than CD offspring (11.1 \pm 0.9, 19.2 \pm 1.34, 26.1 \pm 2.43, 40.8 \pm 4.7, respectively) ($p < 0.01$, Fig. 3A).

The HFD offspring exhibited shorter body naso-anal length at P14 (6.56 \pm 0,51 cm) and P21 (7.44 \pm 0.86 cm) compared to CD offspring (8.08 \pm 0.28 cm and 10.23 \pm 0.44 mm, respectively) ($p < 0.01$, Fig. 3B). The Lee index were lower for the HDF offspring at P5 (337.6 \pm 22.23), and higher at P21 (360.63 \pm 26.76) compared to CD offspring (P5 367.13 \pm 15.13, P14 370.37 \pm 11.28 and P21 336.16 \pm 14, $p \leq 0.01$, Fig. 3C).

The craniocaudal length was also smaller for HFD offspring [P5 (7.17 \pm 0,51), P14 (9.44 \pm 1.2 cm) and P21 (12.28 \pm 1.4 cm)] when compared to CD offspring (P5 7.69 \pm 0.48 cm, P14 11.92 \pm 0.76 cm and P21 16.23 \pm 2.16 cm) ($p < 0.01$, Fig. 3D).

Somatic growth

The head axes of the HFD offspring were smaller over the period of lactation. The MLHAs of HFD offspring presented lower measures from P5 to P21 (P5 13.62 \pm 0.45 mm; P21 16.60 \pm 0.8 mm) compared to controls (P1 14.17 \pm 0.61 mm; P5 15.1 \pm 1.00

mm; P21 22.60 ± 0.8 mm, $p < 0.05$, Fig. 3E). Additionally, the HFD pups also exhibited smaller values for APHA at P5 (20.61 ± 0.8 mm), P10 (24.8 ± 0.79 mm) and P21 (31.6 ± 1.33 mm) compared to controls (P5 21.41 ± 1.27 mm, P10 27.4 ± 1.79 mm and P21 36.07 ± 1.58 mm, $p < 0.05$, Fig. 3F).

Maturation of physical features and reflex testing

There were no statically significant differences between groups in righting reflex test. However in the negative geotaxis test the reflex of HFD offspring were delayed compared to controls ($p < 0.03$, Fig. 4). Three of the four physical feature maturation parameters (unfolding of the external pinnae of both ears to the fully erect position, auditory conduit opening and incisor eruption) were delayed ($p < 0.05$, Table 2) in pups of HFD dams compared to controls.

Discussion

In the present study we showed that maternal exposure to high-fat diet during preconception, pregnancy and lactation results in the following changes in offspring: reduction in body weight and craniocaudal and naso-anal lengths, increased body mass index and delay in head growth, negative geotaxis reflex and acquisition of mature developmental patterns of physical features. The dams of both groups only showed variance along the experiment in relation to the body weight, whereas females from HFD group exhibit lower body weight before conception, during pregnancy and lactation.

First, it is important to remember that maternal exposure to a high-fat diet, independent of maternal weight, predisposes offspring to negative effects, such as increase risk to develop obesity and metabolic disorders early in life (Sullivan, Smith and Grove, 2011). Our results demonstrated that dams from HFD exhibited lower body weight than CD dams. Previous studies have shown, however, higher body weight for HFD dams (Yu et al., 2014; Mendes-da-Silva et al., 2015) or failed to show statistical differences between experimental and control groups (Cadena-Burbano et al., 2017). The lower body weight showed in this study can be partially explained by the phase and time (days) of high-fat diet exposure. In our study dams were feed with high-fat diet before conception, during pregnancy and lactation in a total of 85 days of exposure, will the above studies evaluated the gestation and lactation phasis maximum, totalizing approximately 42 days of exposure. The prolonged exposure time could have lead high-fat diet to become ketogenic. Indeed, studies have shown that high-fat diet with low protein and carbohydrate concentration maintained for 4 weeks in rats could induce similar effects than ketogenic diets (61g%) (Mohamed et al., 2009; Bielohuby et al., 2013), reducing, therefore, body mass even in situations where the sedentary lifestyle is present (Holland et al., 2016). In this scenario, it is worth of noting that HFD dams showed less food intake than controls. This can be attributed to the higher amount of energy in high-fat diet when compared to control diet, since the addition of fat elevated the energy intake in 9 kcal/g, resulting in satiety with lower amount of food. Thus, since the experimental group presented less food intake, one can assume that this group presente lower protein and carbohydrate consumption, corroborating with the ketogenic hypothesis for our results.

However, lower body weight does not necessarily imply low fat accumulation (Timmers et al., 2010), since high-fat diet may also be associated to lower body mass (Lac et al., 2008). This is possible since lean body mass (muscles) is heavier than fat mass, and the literature has shown that in a short period of exposure (3 weeks), the lean body mass increases atrophy in 26% (Roseno et al., 2015).

Regarding the offsprings, in the present study the HFD group showed lower body weight than controls, considering birth up until lactation. In similarity to our results, studies have shown that pups from dams exposed to high-fat diet, during pregnancy and lactation, show lower birth weight (Rolls and Rowe, 1982; Bayol et al., 2007). Even studies carried out with short high-fat diet exposure time and only during pregnancy, showed a 33% reduction in offspring body weight when compared to control (Venci et al., 2018). One possible explanation for this event is the reduced protein intake of dams, as discussed above, which according to previous reports have shown that the reduction of 50-60% protein intake in diet through pregnancy can reduce offsprings birth weights.

In similarity to the offsprings body weight, the naso-anal and cranio-caudal lengths of the HFD pups were smaller than controls. In agreement, the literature has shown a body length reduction at birth in offspring of dams exposed to high-fat diet in the preconception - pregnancy period (Wang et al., 2014), and pregnancy - lactation period (Giriko et al., 2013).

Interesting, when the body weight and body length measures of offspring were used to calculate body mass, the HFD pups showed a lower fat percentage in P5, which increased in P21. This result is in similarity to Abuaish et al (2018) and Barrand et al (2017), that showed higher Lee index values for HFD rat offspring in P13 (Abuaish et al., 2018) and P10 (Barrand et al., 2017), respectively, when compared to controls. The different behaviour in Lee index in P5 and P21, indicates that HFD pups have slower body length growth however they continue to gain weight. Therefore, one can hypothesize that the exposure to maternal high-fat diet, from the preconception until the end of lactation, may be an important cue in the overweight or obesity phenotype of offspring, even in the early postnatal phase.

Moreover, the HFD pups showed a reduction in the cranial axes development when compared to controls. This is in line with other studies that associated maternal nutritional with cranial growth (Santillán et al., 2010; Falcão-Tebas et al., 2012). Specifically in regard to high-fat diet, Giriko et al. (2013) observed that the head axes of HFD offspring were smaller over the period of lactation, with fluctuations in time related to one or other axes; MLHA were smaller in P1 and from P8 to P21, and APHA were smaller from P11 to P15 (Giriko et al., 2013). Our results did not show such fluctuation in MLHA and APHA, we observed a statistical difference between controls continuously from P5 to P21. This could be related to the time of high-fat diet exposure, in our study before conception, during pregnancy and lactation, totalizing 85 days, and Giriko et al. (2013) exposed only in the lactation phase, totalizing 21 days. Additionally, one possible reason for the body and axes lengths reduction, due to maternal high-fat diet, is alterations in bone structure in the fetal and postnatal development; since it has been observed that osteogenesis diminishes in rodents after 8 and 16 weeks of high-fat diet consumption (Rendina-Ruedy et al., 2016).

In regard to physical maturation and sensory-motor development we observed a delay in the unfolding of the external pinnae of both ears to the fully erect position, auditory conduit opening and incisor eruption and negative geotaxis, but not in opening eye and righting reflex of the HFD offspring compare the control pups. The lateness in features physical maturation and reflex ontogeny indicates a slow growing of the litters from HFD dams, since both aspects evaluate the progress of offspring (Smart and Dobbing, 1971; Falcão-Tebas, 2012). The reflex ontogeny is an important signal of rodent central nervous system maturation and function early in life (Smart and Dobbing, 1971; Fox, 1961). Therefore, our results are in agreement with other maternal ketogenic diet and high-fat diet studies (Soares et al., 2009; Giriko et al., 2013) which can indicate that the brain development in early phases of life is responsive to the quality and quantity of macronutrients present in the maternal diet.

Conclusion

We demonstrated that maternal high-fat diet exposure during preconception, pregnancy and lactation in rats, do not implicate in body weight increment both in mothers and offsprings. However maternal high-fat diet can impair the development of offspring, concerning body parameters, somatic growth, maturation of physical features and sensor-motor system development. The key to understand why maternal exposition to high-fat diet can influence offspring development, may not be just due to nutritional aspects, but by the modulation of micro and macronutrients in different molecular and cellular pathways, which could affect directly and indirectly the fetus.

References

- ABUAISH, S.; SPINIELI, R. L.; McGowan, P. O.. Perinatal high fat diet induces early activation of endocrine stress responsivity and anxiety-like behavior in neonates. *Psychoneuroendocrinology*, v. 98, p. 11–21, 2018. Doi:10.1016/j.psyneuen.2018.08.003.
- BARGUER, M. K.. Maternal nutrition and perinatal outcomes. *J Midwifery Womens Health.*, v. 55, n. 6, p. 502-11, 2010. Doi: 10.1016/j.jmwh.2010.02.017.
- BARKER, D. J.. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)*, v. 95, p. 115-28, 1998
- BAYOL, S.A.; FARRINGTON, S.J.; STICKLAND, N. C.. A maternal ‘junk food’ diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for ‘junk food’ and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br. J. Nutr.*, v. 843, p. 851–898, 2007. Doi: 10.1017/S0007114507812037
- BIELOHUBY, S. S., et al.. Impaired glucose tolerance in rats fed low-carbohydrate, high-fat diets. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* v. 305, n. 9, p. E1059-70, 2013 Doi: 10.1152/ajpendo.00208.2013.
- CADENA-BURBANO, E. V., et al.. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. *Nutritional Neuroscience*, p. 1–12, 2017. Doi:10.1080/1028415x.2017.1354958.
- CHANG, G. Q., et al.. Maternal high-fat diet and fetal programming: Increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating

and obesity. *J Neurosci.*, v. 28, n. 43, p. 12107–12119, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2642-08.2008>.

CHOI, J.S.. Effects of Maternal and Post-Weaning High-Fat Diet on Leptin Resistance and Hypothalamic Appetite Genes in Sprague Dawley Rat Offspring. *Clin Nutr Res.*, v. 7, n. 4, p. 276-290, 2018. Doi: 10.7762/cnr.2018.7.4.276.

DOS PRAZERES OLIVEIRA, T. R., et al.. Differential effects of maternal high-fat/high-caloric or isocaloric diet on offspring's skeletal muscle phenotype. *Life Sci.*, v. 251, p. 136-44, 2018. Doi: 10.1016/j.lfs.2018.11.011.

FALCÃO-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, 2012. Doi: 10.1017/S0007114511002947.

FOX, W. M.. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav.*, v. 13, n, 2, p. 234–41, 1965.

GIRIKO, et al.. Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression- like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 31, n. 8, p. 731–739, 2013. Doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.09.001.

GONZÁLEZ-GARCÍA, S., et al.. Carbon footprint and nutritional quality of different human dietary choices. *Science of The Total Environment*, v. 644, p. 77–94. 2018. Doi:10.1016/j.scitotenv.2018.06.339.

HOLLAND, W. C. K., et al.. Effects of a ketogenic diet on adipose tissue, liver, and serum biomarkers in sedentary rats and rats that exercised via resisted voluntary wheel running. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, v. 311, n. 2, p. R337-R351, 2016. Doi: 10.1152/ajpregu.00156.2016.

KUNZ, L. H., KING, J. C.. Impact of maternal nutrition and metabolism on health of the offspring. *Semin Fetal Neonatal Med.*, v. 12, p. 71-77, 2007. Doi: 10.1016/j.siny.2006.10.010.

LAC, G., et al.. Effects of a high fat diet on bone of growing rats. Correlations between visceral fat, adiponectin and bone mass density. *Lipids Health Dis.*, v. 7, n. 16, p. 1-4, 2008. Doi:10.1186/1476-511X-7-16.

LIN, et al.. Maternal high fat diet programs stress-induced behavioral disorder in adult offspring. *Physiology & Behavior*, v. 152-A, p. 119-27, 2015. Doi: 10.1016/j.physbeh.2015.09.023.

LOWENSOHN, R. I.; STADLER, D. D.; VAZE, C.. Current Concepts of Maternal Nutrition. *Obstetrical & Gynecological Survey*, v. 71, n. 7, p. 413-26, 2016. Doi: 10.1097/OGX.0000000000000329.

MENDES-DA-SILVA, et al.. Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. *Arq. Neuro-Psiquiatr.*, v. 72, n. 2, p. 136-144, 2014. Doi: 10.1590/0004-282X20130220.

MENDES-DA-SILVA, et al.. Increased expression of Hes5 protein in Notch signaling pathway in the hippocampus of mice offspring of dams fed a high-fat diet during pregnancy and suckling. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 40, p. 35-42, 2015. Doi: 10.1016/j.ijdevneu.2014.11.005.

MITRA, K. M., et al.. Effect of high-fat diet during gestation, lactation, or postweaning on physiological and behavioral indexes in borderline hypertensive rats. *Am. J. Physiol.*

- Regul. Integr. Comp. Physiol. v. 296, n. 1, p. R20-8, 2009. Doi: 10.1152/ajpregu.90553.2008
- MOHAMED, H. E., et al.. Biochemical effect of a ketogenic diet on the brains of obese adult rats. *J. Clin. Neurosci.*, v. 17, n. 7, p. 899-904, 2010. Doi:10.1016/j.jocn.2009.11.005.
- NICULESCU, M. D.; LUPU, D. S.. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int. J. Dev. Neurosci.*, v. 27, n. 7, p. 627-33, 2009. Doi: 10.1016/j.ijdevneu.2009.08.005.
- RENDINA-RUEDY, E., et al.. Strain differences in the attenuation of bone accrual in a young growing mouse model of insulin resistance. *J. Bone Miner. Metab.*, v. 34, n. 4, p. 380-94, 2016. Doi: 10.1007/s00774-015-0685-z.
- ROSENO, S. L., et al.. Short-term, high-fat diet accelerates disuse atrophy and protein degradation in a muscle-specific manner in mice. *Nutr Metab (Lond)*, v. 12, n. 39, p. 1-11, 2015. Doi:10.1186/s12986-015-0037-y.
- ROZIN, P. Human food intake choice: biological, psychological and cultural perspective. In: *Food Selection: from genes to culture*. Levallois-Perret: Danone Institute, 2002. p. 7-26. Doi:
- RUSH E. C.; YAN, M. R.. Evolution not Revolution: Nutrition and Obesity. *Nutrients*, v. 9, n. 5, p. 519, 2017. Doi: 10.3390/nu9050519.
- RUSSELL, J. A.; DOUGLAS, A. J., INGRAM, C. D.. Brain preparations for maternity-adaptive changes in behavioral and neuroendocrine systems during pregnancy and lactation: An overview. *Prog Brain Res.*, v. 131, p. 1-38, 2001.
- SANTILLÁN, M.E., et al.. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different omega-6:omega-3 ratios in mice. *Nutrition*, v., 26 n. 4, p. 423-431, 2010. Doi: 10.1016/j.nut.2009.06.005.
- SMART, J. L., DOBBING, J.. Vulnerability of developing brain: VI Relative effects of fetal and early postnatal undernutrition on reflex ontogeny and development of behavior in the rat. *Brain Res.*, v. 29, n. 2, p. 303-14, 1971
- SOARES, R.G. S., et al.. Somatic and reflex development in suckling rats: effects of mother treatment with ketogenic diet associated with lack of protein. *Nutr. Neurosci.*, v. 12, n. 6, p. 260-266, 2009. Doi: 10.1179/147683009X423427.
- STACHOWIAK, E.K., et al.. Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. *Metabolic brain disease*, v. 28, n. 4, p. 721-25, 2013. Doi: 10.1007/s11011-013-9437-8.
- SULLIVAN, E. L.; NOUSEN, E. K.; CHAMLOU, K. A.. Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiol Behav.*, v.123, p. 236-42., 2014. Doi: 10.1016/j.physbeh.2012.07.014.
- SULLIVAN, E. L.; SMITH, M. S.; GROVE, K. L.. Perinatal Exposure to High-Fat Diet Programs Energy Balance, Metabolism and Behavior in Adulthood. *Neuroendocrinology*, v. 93, v.1. p. 1-8, 2011. Doi:10.1159/000322038
- TIMMERS, S., et al.. Prevention of high-fat diet-induced muscular lipid accumulation in rats by alpha lipoic acid is not mediated by AMPK activation. *J Lipid Res.*, v. 51n. 2, p. 352-9, 2010. Doi: 10.1194/jlr.M000992.

Venci, R. de O., et al.. Malnutrition during late pregnancy exacerbates high-fat-diet-induced metabolic dysfunction associated with lower sympathetic nerve tonus in adult rat offspring. *Nutr Neurosci.*, v. 6, p. 1–12, 2018. Doi:10.1080/1028415x.2018.1516845.

WANG, Y. F., et al. Effect of maternal high-fat diet before and during pregnancy on bone growth of neonatal offspring rats. *Chinese journal of contemporary pediatrics*, v. 16, n. 11, p. 1143-48, 2014. Doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2014.11.015.

WESTHOEK, et al.. Food choices, health and environment: Effects of cutting Europe's meat and dairy intake. *Global Environmental Change*, v. 26, p. 196-205, 2014. Doi: 10.1016/j.gloenvcha.2014.02.004.

WOLFRUM, D.; PELEG-RAIBSTEIN, D.. Maternal overnutrition leads to cognitive and neurochemical abnormalities in C57BL/6 mice. *Nutr Neurosci.*, v. 1, p. 1-12, 2018. Doi: 10.1080/1028415X.2018.1432096.

YU, M., et al.. Maternal high-fat diet affects Msi/Notch/Hes signaling in neural stem cells of offspring mice. *J. Nutr. Biochem.*, v. 25, n. 2, p. 227-231, 2014. Doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.10.011.

Figure legend

Figure 1. Experimental research design.

Figure 2. Body weight (A), total body length (B), naso-anal lengths (C), Lee index (D), blood glucose (E) and food intake (F) of control diet dams (CD, grey circles, $n = 2$) and the dams that were exposed to a high-fat diet (HFD, black squares, $n = 4$). Food intake was measured only during preconception and lactation due to the conditions of dams maintenance at pregnancy. All values are the means \pm SEM. * $p < 0.05$ by Student's t-test.

Figure 3. Body weight (A), naso-anal length (B), Lee index (C), craniocaudal length (D) and mediolateral (E) and anteroposterior (F) head axes of control diet male pups (CD, grey circles, $n = 13$) and the male pups of dams that were exposed to a high-fat diet (HFD, black squares, $n = 18$). All values are the means \pm SEM. * $p < 0.05$ by Student's t-test.

Figure 4. Latency of righting reflex at P5 (A) and latency of negative geotaxis reflex at P10 (B) in control diet male pups (CD, grey bars, $n = 13$) male pups of dams that were exposed to a high-fat diet (HFD, black bars, $n = 18$). All values are the means \pm SEM. * $p < 0.05$ by Student's t-test.

Figure 1

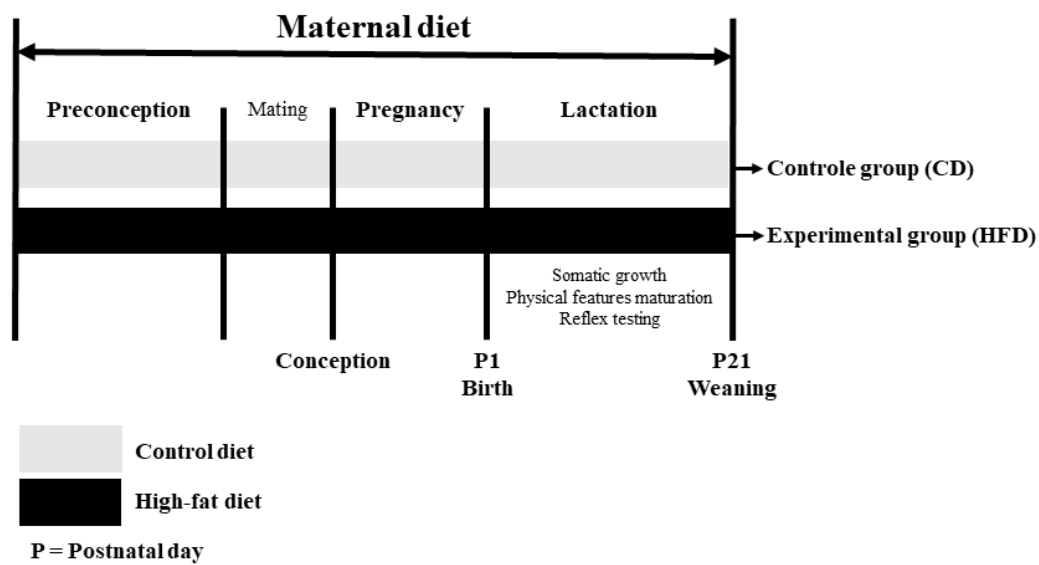


Figure 2

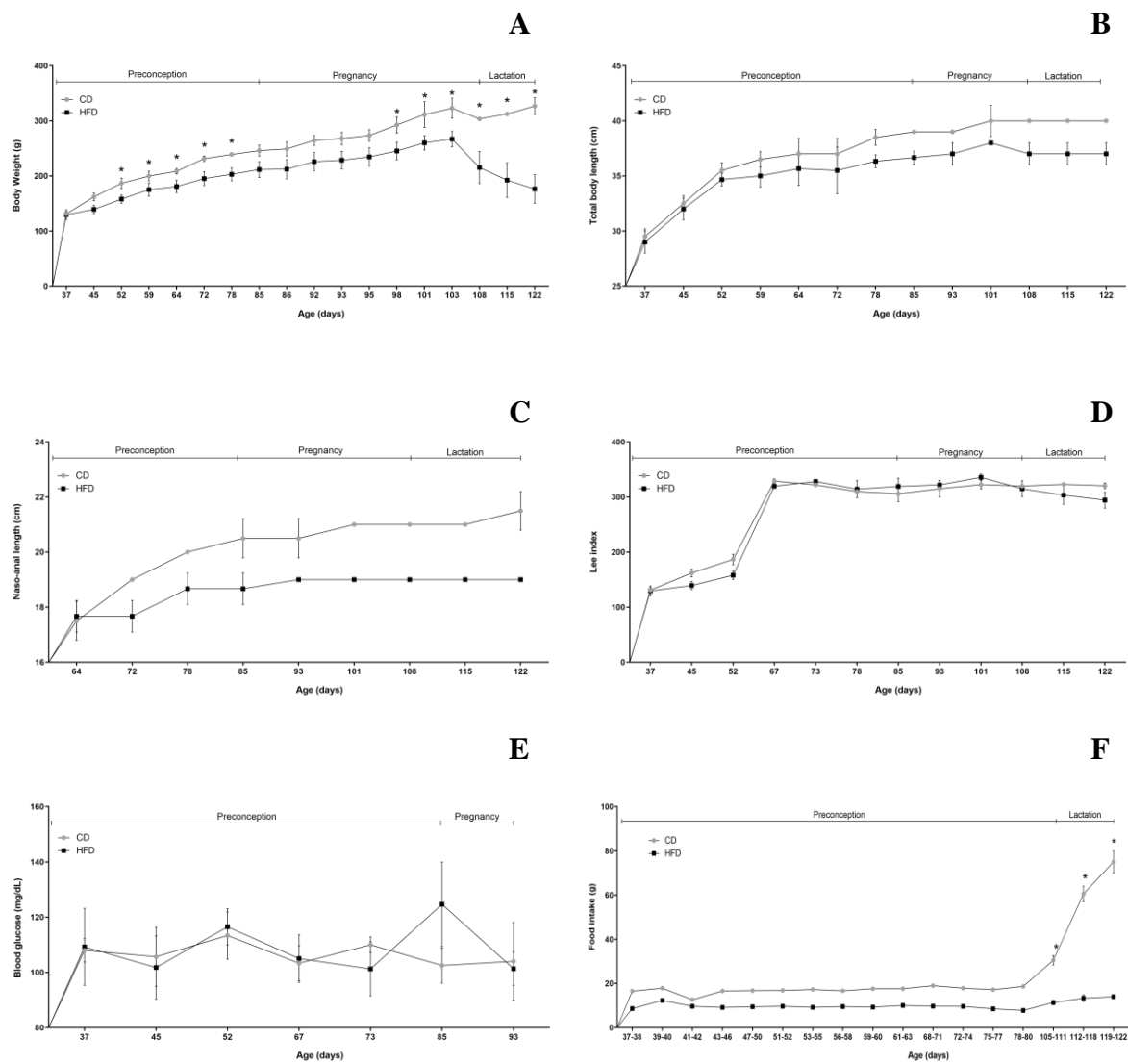


Figure 3

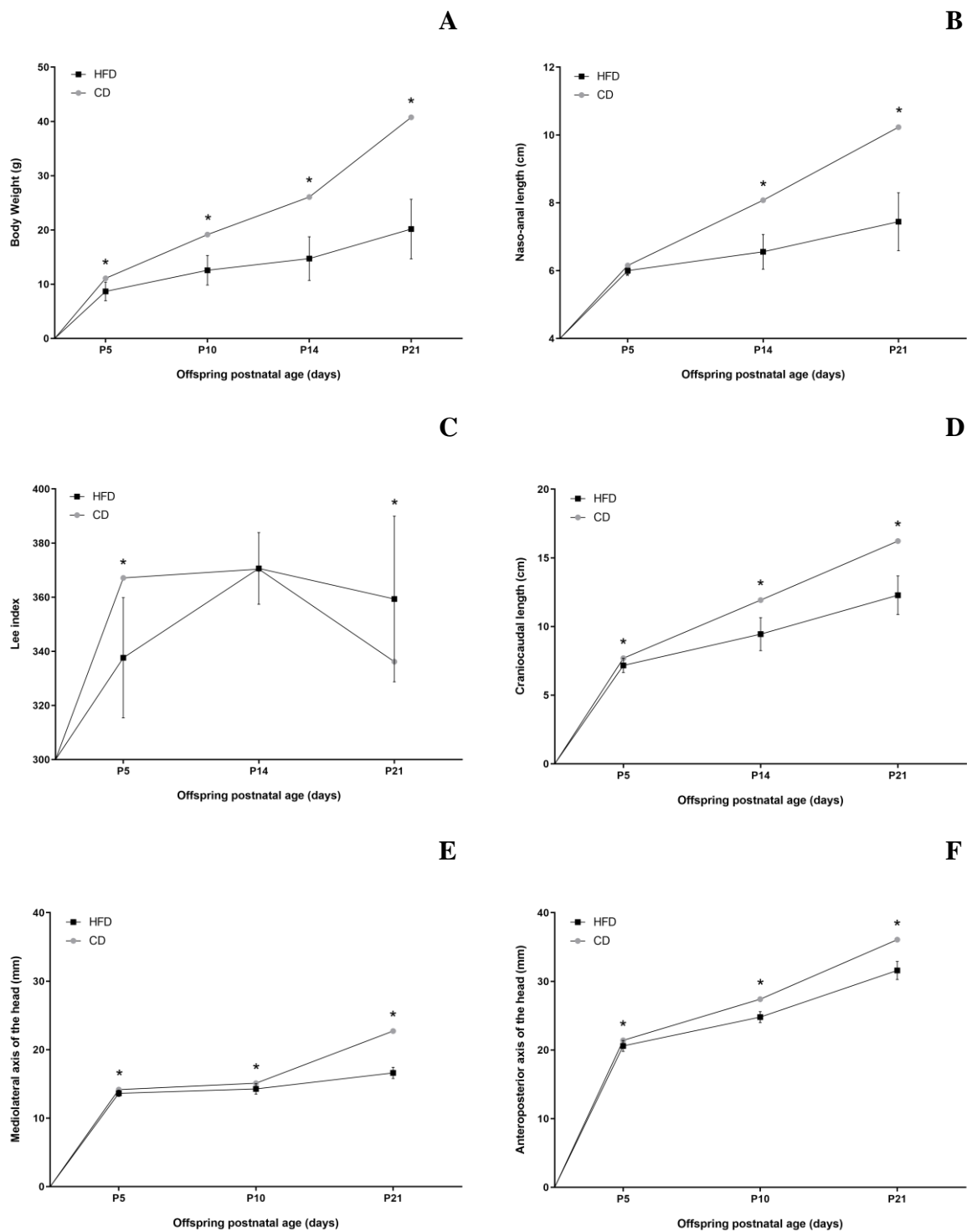
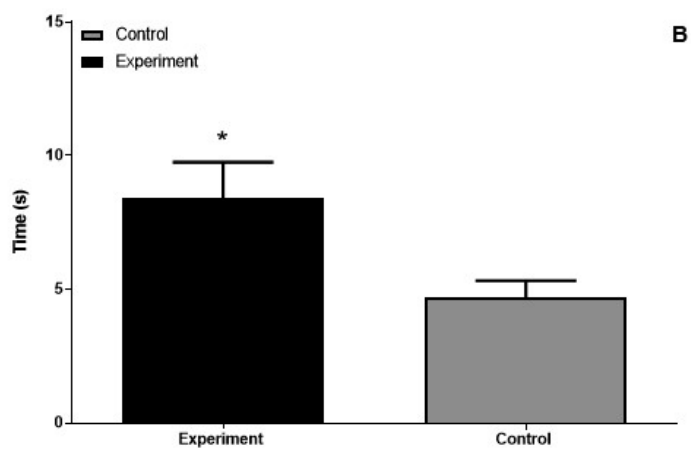
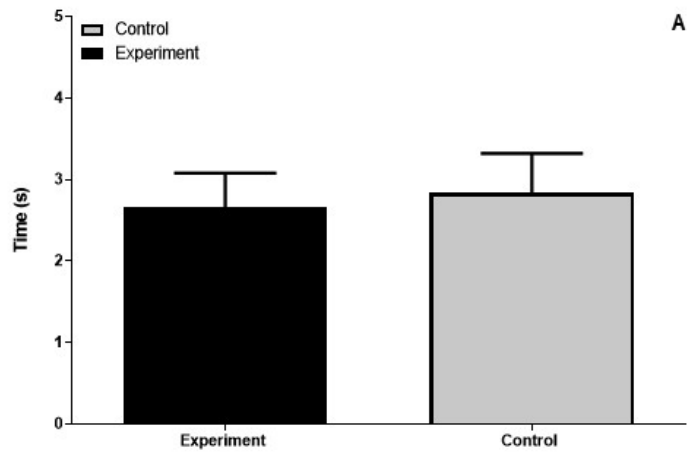


Figure 4



Tables

Table 1. Nutritional composition of control and high-fat diet fed to rat dams during preconception, pregnancy and lactation. ¹NUVILAB Cr-1, Quimtia, Paraná, Brazil.

	Control diet ¹	High-fat diet
Protein (g%)	22,0	11,4
Fat (g%)	4,0	50,1
Fibrous matter (g%)	7,0	3,6
Ash matter (g%)	9,0	4,7
Carbohydrates (g%)	54	28,1
Kcal/g	3,4	6,1

Table 2. Maturation age (days) for physical features of offspring from HFD group and CD group. All values are the means \pm SEM. * $p < 0.05$ by Student's t-test.

	Control diet group (n = 30)	High-fat diet group (n = 23)	<i>p</i> -value
Ear unfolding	7 \pm 0	8,3 \pm 0.58	0.016
Auditory conduit opening	16 \pm 0	19 \pm 1.73	0.04
Eruption of the incisors	11 \pm 0	12.3 \pm 0.58	0.016
Eyes opening	14 \pm 0	15.7 \pm 1.15	0.064

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização do presente trabalho permitiu demonstrar que a exposição materna à dieta rica em gordura durante a concepção, a prenhez e a lactação em ratos não implica em aumento do peso corporal tanto das mães quanto dos filhotes. Entretanto, a dieta materna rica em gordura pode prejudicar a prole no que diz respeito aos parâmetros antropométricos, ao crescimento somático, à maturação das características físicas e ao sistema sensorio-motor. A chave para entender as razões pelas quais a exposição à dieta materna rica em gordura pode interferir no desenvolvimento fetal e em estágio pós-natal pode ter relação não apenas com aspectos nutricionais, mas também estar relacionada à modulação de micro e macronutrientes em diferentes vias moleculares e celulares, que poderiam afetar direta e indiretamente do feto.

Por fim, cumpre salientar que no momento estão sendo realizadas as demais metodologias referentes à pesquisa em questão, quais sejam os testes comportamentais nas proles e as análises bioquímicas e de biologia molecular. Ademais, serão adicionadas a este trabalho avaliações histológicas do fêmur, da mandíbula e da maxila e a respeito do estresse oxidativo causado ao fígado das proles expostas à dieta materna rica em gordura.