

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

ROBERTA GIORGI SILVEIRA

**PROGRAMAÇÃO NUTRICIONAL DO DESENVOLVIMENTO DA
PROLE POR CONSUMO MATERNO DE DIETA HIPERLIPÍDICA:
UM ENFOQUE ENDÓCRINO-METABÓLICO E ÓSSEO**

PELOTAS

2022

ROBERTA GIORGI SILVEIRA

**PROGRAMAÇÃO NUTRICIONAL DO DESENVOLVIMENTO DA PROLE POR
CONSUMO MATERNO DE DIETA HIPERLIPÍDICA:
UM ENFOQUE ENDÓCRINO-METABÓLICO E ÓSSEO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Saúde e Comportamento.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda Nedel

PELOTAS
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S587

Silveira, Roberta Giorgi

Programação nutricional do desenvolvimento da prole por consumo materno de dieta hiperlipídica: um enfoque endócrino-metabólico e ósseo. / Roberta Giorgi Silveira. – Pelotas: UCPEL, 2022.

205 f.

Tese (doutorado) – Universidade Católica de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento, Pelotas, BR-RS, 2022.

Orientadora: Fernanda Nedel.

1. Dieta materna hiperlipídica. 2. Obesidade. 3. Hormônios tireoideos. 4. Metabolismo. 5. Crescimento ósseo. I. Nedel, Fernanda. II. Título.

CDD 610

**PROGRAMAÇÃO NUTRICIONAL DO DESENVOLVIMENTO DA
PROLE POR CONSUMO MATERNO DE DIETA HIPERLIPÍDICA:
UM ENFOQUE ENDÓCRINO-METABÓLICO E ÓSSEO**

Conceito final: _____

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Rachel Krolow Santos Silva Bast

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund

Profa. Dra. Fernanda Pedrotti Moreira

Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis

Orientadora – Prof.^a Dr.^a Fernanda Nedel

Dedicatória

Dedico esse trabalho à Gaia (*in memoriam*) por ter ficado ao meu lado mesmo nos momentos em que tudo era caos, por ter me ensinado a ser resiliente e por ter me permitido conhecer o amor incondicional.

"Cada uno da lo que recibe

Y luego recibe lo que da

Nada es más simple

No hay otra norma

Nada se pierde

Todo se transforma"

(Jorge Drexler)

RESUMO

O desenvolvimento da prole pode ser programado por um consumo materno de dieta hiperlipídica (*high-fat diet*, HFD), levando a modulações fenotípicas. Modelos animais de simulação de dieta ocidental humana começaram a ser utilizados para compreender a influência de tal exposição nos níveis de neurotransmissores cerebrais relacionados ao apetite da prole devido aos crescentes casos de obesidade e diabetes infantil em todo o mundo. Porém, atualmente sabe-se que múltiplos órgãos e sistemas são geralmente afetados, e os efeitos variam conforme as condições do modelo, como idade materna no início da exposição à HFD, duração da manipulação da dieta materna e obesidade pré-concepcional. Embora existam diversos estudos pré-clínicos sobre a programação nutricional promovida por HFD materna, persistem lacunas em relação à função tireoidea e permanecem divergências sobre determinados aspectos referentes ao metabolismo. Ademais, a literatura científica carece de informações sobre o desenvolvimento físico e o crescimento ósseo influenciados por HFD materna, pois os estudos publicados não relatam dados sobre ossos formados por ossificação intramembranosa, a exemplo dos craniofaciais. Portanto, a presente tese tem como objetivo investigar a influência de HFD materna (52% de energia proveniente de gordura) desde a peripuberdade de ratas Wistar estendendo-se pelo acasalamento, gestação e lactação até o desmame no desenvolvimento endócrino-metabólico e ósseo da prole em comparação com a prole de ratas em dieta controle normolipídica (12% de energia proveniente de gordura). A abordagem endócrino-metabólica é apresentada no artigo “*Nutritional programming of thyroid hormones deficiency and metabolic state disruption in adolescent offspring by a maternal high-fat diet*”, no qual foi relatado que a prole exposta à HFD materna (*offspring of dams exposed to high-fat diet*, OHFD) diferiram significativamente da prole controle apresentando redução dos níveis séricos dos hormônios tireoideos (tiroxina e triiodotironina) com desequilíbrio em suas razões molares e alterações metabólicas (níveis séricos diminuídos de *high-density lipoprotein* - HDL e excessivos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol não-HDL, maior taxa específica de ganho de massa corporal, obesidade, eficiência energética superior e acúmulo de gordura). O foco ósseo é abordado no artigo “*Nutritional programming of physical development and bone growth of offspring by a maternal high-fat diet*” ao reportar que OHFD demonstrou extensa redução nas medidas ósseas relacionadas ao crescimento corporal longitudinal e a diferentes mensurações craniofaciais dos primeiros dias de vida até o final da adolescência, bem como atraso na erupção dos incisivos mandibulares e em teste neurocomportamental no período de lactação. Ao analisar conjuntamente os dados de ambos os artigos, percebe-se que a HFD materna em exposição prolongada causa na prole deficiência de hormônios tireoideos, acentuado desequilíbrio metabólico e retardo no desenvolvimento físico e no crescimento ósseo. As alterações metabólicas e desordens esqueléticas observadas em OHFD ocorrem geralmente na insuficiência de hormônios tireoideos, principalmente nas janelas de desenvolvimento avaliadas, sinalizando uma íntima relação entre os fenótipos evidenciados pelo grupo exposto à HFD materna. Em conclusão, os resultados da presente tese indicam que mulheres férteis, grávidas e lactantes devem evitar o padrão de dieta ocidental em virtude da possível extrapolação dos resultados manifestados no modelo animal para humanos que experienciem uma condição materna semelhante.

Palavras-chave: dieta materna hiperlipídica, obesidade, hormônios tireoideos, metabolismo, crescimento ósseo.

ABSTRACT

The offspring's development can be programmed by a maternal high-fat diet (HFD) consumption, leading to phenotype modulations. Animal models of human Western diet simulation started to be used to comprehend the influence of a maternal HFD exposure on brain levels of appetite-related neurotransmitters in offspring due to the growing cases of childhood obesity and diabetes worldwide. However, it is now known that multiple organs and systems are usually affected, and the effects vary according to model conditions, such as maternal age at the beginning of HFD, duration of maternal diet manipulation, and preconception obesity. Although there are several preclinical studies on the nutritional programming promoted by maternal HFD, gaps remain regarding thyroid function, and some points of metabolic status persist unclear. Furthermore, the scientific literature lacks information on physical development and bone growth influenced by maternal HFD, as published studies do not report data concerning bones formed by intramembranous ossification, such as those of the craniofacial structure. Therefore, the present thesis aims to investigate the influence of a maternal HFD (52% energy from fat) from peripuberty of female Wistar rats through mating, gestation and lactation until weaning in endocrine-metabolic and bone offspring development compared to offspring from dams exposed to a normolipidic control diet (12% energy from fat). The endocrine-metabolic approach is presented in the article "Nutritional programming of thyroid hormones deficiency and metabolic state disruption in adolescent offspring by a maternal high-fat diet", in which it was reported that the offspring of dams exposed to HFD (OHFD) differed significantly from the control offspring showing a reduction in serum levels of thyroid hormones (thyroxine and triiodothyronine) with an imbalance in their molar ratios, and metabolic alterations (decreased serum levels of high-density lipoprotein - HDL, excessive serum levels of triglycerides, total cholesterol and non-HDL cholesterol, higher specific rate of body mass gain, obesity, superior energy efficiency, and fat accumulation). The bone focus is addressed in the article "Nutritional programming of physical development and bone growth of offspring by a maternal high-fat diet" by demonstrating that the OHFD showed an extensive reduction in bone measurements related to longitudinal body growth and different craniofacial assessments from the first days of life to late adolescence, as well delayed of mandibular incisor eruption and neurobehavioral assessment at lactation period. When jointly analyzing the data from both articles, it is noted that maternal HFD in prolonged exposure causes in the offspring thyroid hormones deficiency, pronounced metabolism imbalance, and retarded physical development and bone growth. The metabolic changes and skeletal disorders observed in the OHFD are usually occurred in thyroid hormones insufficiency, especially in the evaluated development windows, signaling an intimate relationship between the phenotypes evidenced by the maternal HFD exposed group. In conclusion, findings from the current thesis indicate that fertile, pregnant, and lactating women may be should avoid the western diet pattern given the possible extrapolation of the outcomes manifested in the animal model to humans who experience a similar maternal condition.

Keywords: maternal high-fat diet, obesity, thyroid hormones, metabolism, bone growth.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Projeto

- Figura 1** - Proposta de modelo de desenvolvimento de obesidade e doenças da civilização promovidas pelos consumo de dieta ocidental..... 35
- Figura 2** - Proposta de modelo exposição à dieta materna hiperlipídica para avaliar o metabolismo (eficiência alimentar, índice de massa corporal, gordura abdominal e níveis séricos de lipídios) e hormônios da tireoide circulantes na prole adolescente..... 60
- Figura 3** - Proposta de modelo exposição à dieta materna hiperlipídica para avaliar o desenvolvimento ósseo da prole por meio de medidas corporais (eixos cranianos e comprimentos corporal e da cauda), teste locomoção e avaliação da estrutura óssea (medidas morfométricas ósseas de crânio, mandíbula, fêmur e tibia, histologia óssea de osso longos e curtos e análise de imagem)..... 63
- Figura 4** - Proposta de modelo exposição à dieta materna hiperlipídica para avaliar a existência do risco de doenças cardiovascular mediante análise dos seguintes fatores: obesidade/sobrepeso, acúmulo de gordura corporal, hipotireoidismo, alteração no perfil lipídico, elevação dos índices aterogênicos, esteatose hepática, alterações morfológicas do tecido adiposo e aumento dos níveis séricos de IL-1, IL-6, TNF- α e γ -GT..... 66
- Figura 5** - Diferenças entre os percentuais de produção de T3 pela glândula tireoide e por células localizadas extratireoide no ser humano e no rato conforme a participação das enzimas deiodinases DIO1 e DIO2..... 74
- Figura 6** - Na circulação de ratos 100% de T4 provém da glândula tireoide, enquanto entre 55 a 65% de T3 ocorre via secreção glandular e 35 a 45% é convertido a partir de T4 na periferia, o que pode ocasionar a redução de ambos hormônios condições anormais de funcionamento do órgão endócrino..... 75
- Figura 7** - Pirâmide dos níveis de evidência científica..... 93
- Figura 8** - Exemplo de diagrama de fluxo de acordo com o PRISMA..... 95
- Figura 9** - Etapas de uma revisão sistemática de literatura..... 97

Figura 10 - Desenho experimental.....	104
Figura 11 - Medidas mandibulares e cranianas. A) I - distância entre a inserção do incisivo inferior e o processo coronoide, II - distância entre a inserção do incisivo inferior e o processo condilar e III - distância entre a inserção do incisivo inferior e o processo angular; B) Comprimento da linha de dentes; C) Altura do rosto com os dentes; superiores), e D) IV - distância entre os dentes incisivos e os dentes pré-molares e V - comprimento do alvéolo.....	107
Artigo 1	
Graphical abstract	138
Figure 1 - Experimental research design.....	165
Figure 2 - Body measurements and thyroid hormones profile of the dams. A) Body weight. B) Lee index. C) Thyroid hormones profile. Data represent mean \pm standard deviation, n CD = 3; n HFD = 3. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison between groups by Student's t-test. c: centimeters; g: grams; nmol/L: nanomoles per litre.....	166
Figure 3 - Body measurements of the offspring in weeks after weaning. A) Body weight. B) Lee index. C) Body weight gain. D) Specific rate of body mass gain. Data represent mean \pm standard deviation, n OCD = 10; n OHFD = 10. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison between groups by Student's t-test. g: grams; c: centimeters.....	167
Figure 4 - Nutritional determinations of the offspring in weeks after weaning. A) Food consumption. B) Energy intake. C) Feed efficiency. Data represent mean \pm standard deviation, n OCD = 10; n OHFD = 10. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison groups by Student's t-test. g: grams; kcal: kilocalories; BW: body weight; %: percentage.....	168

Figure 5 – Correlation between thyroid function markers and the total cholesterol serum levels. A) Total thyroxine serum levels showed a strong negative correlation with total cholesterol in the OHFD group. B) T4/T3 molar ratio showed a moderate negative correlation with total cholesterol in the OHFD group. C) T3/T4 molar ratio showed a moderate positive correlation with total cholesterol in the OHFD group. mmol/L: milimoles per litre; nmol/L: nanomoles per litre; r: Pearson correlation coefficient; R2: coefficient of determination..... 169

Artigo 2

Graphical abstract..... 172

Figure 1 - Experimental research design..... 199

Figure 2 - Traced for linear cephalometric measurement. The landmarks we used are the highest point of the nasal bone (H), the most prominent point between incisal edges of upper incisors (Iu), the larger gap between the upper incisor and upper molar (Dia), upper molar alveoli (UMA), the most posterior-superior point of the coronoid process (Cor), the most posterior-superior point on the mandibular condyle (Co), the most posterior point of the angular process (Go), lower molar alveoli (UMA), the most inferior and anterior point on the alveolar process (Id)..... 200

Figure 3 - Morphometric measurements of the offspring in weeks after birth. A) Body length. B) Tail length. C) Tail length /body length ratio. Data represent mean ± standard deviation, n OCD = 12; n OHFD = 12. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison between groups by Student's t-test. mm: millimeters..... 201

Figure 4 - Cranial axes of the offspring in weeks after birth, neurobehavioral assessment and open filed test. A) Mediolateral cranial axis. B) Anteroposterior cranial axis. C) Latency in righting and negative geotaxis reflex. D) Number of counts of crossing and rearing of the open filed test. Data represent mean ± standard deviation, n OCD = 12; n OHFD = 12. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison groups by Student's t-test. mm: millimeters..... 202

Considerações finais

Figura 1 - Apresentação dos principais resultados referentes aos artigos incluídos no volume..... 204

LISTA DE TABELAS

Projeto

Tabela 1 - Descrição da estratégia de busca na bases de PubMed destinada à elaboração da revisão de literatura correspondente ao artigo 1, 2 e 3.....	28
Tabela 2 - Alterações no perfil hormonal relacionado à tireoide e no perfil lipídico em ratos expostos a métodos de indução de hipotireoidismo.....	86
Tabela 3 - Composição nutricional da dieta controle (3.5 kcal/g) e da dieta hiperlipídica (4.9 kcal/g).....	103
Tabela 4 - Cronograma.....	117
Tabela 5 - Orçamento.....	118

Artigo 1

Table 1 - Nutritional composition of control diet (3.5 kcal/g) and high-fat and hypercaloric diet (4.9 kcal/g).....	163
Table 2 - Biological analysis of OCD and OHFD. Data represent mean \pm standard deviation (SD). <i>P</i> -values marked with bold indicate statistically significant differences between the groups.....	164

Artigo 2

Table 1 - Nutritional composition of control diet (3.5 kcal/g) and high-fat and hypercaloric diet (4.9 kcal/g).....	194
Table 2 - Cephalometric landmarks uses for linear measurements.....	195
Table 3 - Linear cephalometric measurements corresponding to mandibular length and skull length and height.....	196
Table 4 - Linear cephalometric measurements of skull and mandible of the OCD and OHFD groups. Data represent mean \pm standard deviation (SD). <i>P</i> -values marked with bold indicate statistically significant differences between the groups.....	197
Table 5 - Percentage of morphometric and linear cephalometric measurements reduction of the OHFD in comparison with OCD group.....	198

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCA	<i>Anteroposterior cranial axis</i>
APO-1	<i>Apolipoprotein A-I</i>
BWG	<i>Body weight gain</i>
CAD	Consumo absoluto de dieta
CD	<i>Control diet</i>
CEEA-UFPEL	<i>Comitê de ética em experimentação animal da Universidade Federal de Pelotas</i>
CEPT	<i>Cholesteryl ester transfer protein</i>
cm	<i>Centímetros ou centimeters</i>
Co	<i>Most posterior-superior point on the mandibular condyle</i>
Cor	<i>Most posterior-superior point of the coronoid process of the mandible</i>
CT	Colesterol total
Dia	<i>Diastema</i>
DIO1	Iodotironina deiodinase tipo 1 ou <i>type 1 iodothyronine deiodinase</i>
DIO2	Iodotironina deiodinase tipo 2 ou <i>type 2 iodothyronine deiodinase</i>
DIO3	Iodotironina deiodinase tipo 2 ou <i>type 2 iodothyronine deiodinase</i>
DP	Desvio padrão
ERICA	Estudo de riscos cardiovasculares em adolescentes
FC	<i>Food consumption</i>
FE	<i>Feed efficiency</i>
γ -GT	Gama-glutamil transferase
g	grama ou <i>grams</i>
g/100g BW	<i>Gram per 100 grams of body weight</i>
Go	<i>Most posterior point of the angular process of the mandible</i>
H	<i>Highest point of the nasal bone</i>
HDL	<i>High-density lipoprotein</i>
HTs	Hormônios tireoideos
HFD	<i>High-fat diet</i>

Id	<i>Most inferior and anterior point on the alveolar process of the mandible</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
Iu	<i>Prominent point between incisal edges of upper incisors</i>
kcal	Quilocaloria ou <i>kilocalorie</i>
kcal%	<i>Percent of total energy</i> ou <i>percentual do total de energia</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LI	<i>Lee index</i>
LMA	<i>Lower molar alveoli</i>
MHFD	<i>Maternal high-fat diet</i>
MLCA	<i>Mediolateral cranial axis</i>
mm	<i>Millimeters</i>
mmol/L	Milimoles por litro ou <i>millimoles per liter</i>
MMI	Metimazol
Não-HDL	Colesterol não-HDL
non-HDL	Colesterol non-HDL
nmol/L	Nanomol por litro ou <i>nanomole per liter</i>
NPS	Nanopartículas de poliestireno
OCD	<i>Offspring exposed to maternal control diet</i>
OHFD	<i>Offspring exposed to maternal high-fat diet</i>
P1	Dia pós-natal 1 ou <i>postnatal day 1</i>
P5	Dia pós-natal 5 ou <i>postnatal day 5</i>
P10	Dia pós-natal 10 ou <i>postnatal day 10</i>
P21	Dia pós-natal 21 ou <i>postnatal day 21</i>
P42	Dia pós-natal 42
P47	Dia pós-natal 47 ou <i>postnatal day 47</i>
P54	Dia pós-natal 54 ou <i>postnatal day 54</i>
PTU	Propiltiouracil
RCF	<i>Relative centrifugal force</i>
SD	Sprague-Dawley ou <i>standard deviation</i>

T2DM	Type 2 diabetes mellitus
T3	Triiodotironina ou <i>triiodothyronine</i>
T4	Tiroxina ou <i>thyroxine</i>
TC	Total cholesterol
TG	Triglicérides ou <i>triglycerides</i>
TH	Thyroid hormones
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRH	<i>Hypothalamic thyrotrophin-releasing hormone</i>
TSH	Thyroid-stimulating hormone
TT4	<i>Total thyroxine</i>
TT3	<i>Total triiodothyronine</i>
UMA	<i>Upper molar alveoli</i>

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	17
PROJETO.....	19
1. IDENTIFICAÇÃO.....	20
1.1 Título	20
1.2 Doutoranda.....	20
1.3 Orientadora.....	20
1.4 Instituição.....	20
1.5 Curso.....	20
1.6 Linha de pesquisa.....	20
1.7 Data.....	20
2. INTRODUÇÃO.....	21
3. OBJETIVOS.....	23
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos aos artigos propostos.....	23
3.2.1 Artigo 1.....	23
3.2.2 Artigo 2.....	23
3.2.3 Artigo 3.....	24
3.2.4 Artigo 4.....	24
4 HIPÓTESES.....	25
4.2.1 Artigo 1.....	25
4.2.2 Artigo 2.....	25
4.2.3 Artigo 3.....	25
4.2.4 Artigo 4.....	26
5 REVISÃO DE LITERATURA	27
5.1 Estratégia de busca.....	27
5.2 Contexto histórico da transição nutricional humana.....	29
5.3 Comportamento alimentar materno.....	36
5.4 Modelos animais de simulação do consumo humano de dieta ocidental.....	42
5.4.1 A importância da espécie <i>Rattus norvegicus</i> na experimentação animal.....	42

5.4.2 Modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e porque Wistar é a estirpe mais adequada.....	46
5.5 Programação do desenvolvimento por consumo de dieta materna hiperlipídica em pesquisas pré-clínicas.....	55
5.6 Metabolismo e efeitos dos hormônios tireoideos.....	68
5.6.1 Metabolismo dos hormônios tireoideos.....	68
5.6.2 Efeitos dos hormônios tireoideos.....	74
5.7 Perfil lipídico em modelos animais de deficiência de hormônios tireoideos.....	80
5.8 A necessidade de revisões sistemáticas para modelos biológicos pré-clínicos.....	87
6. METODOLOGIA	100
6.1 Artigos 1, 2 e 3.....	100
6.1.1 Animais, desenho experimental e obtenção das amostras biológicas.....	100
6.1.2 Consumo da dieta e mensurações físicas dos animais.....	105
6.1.3 Testes de desenvolvimento neurocomportamental.....	108
6.1.4 Avaliação da atividade locomotora em campo aberto.....	109
6.1.5 Análises bioquímicas.....	109
6.1.6 Análises de imagens radiológicas.....	110
6.1.7 Análises histológicas.....	111
6.1.8 Análises estatísticas.....	113
6.6 Artigo 4.....	114
6.6.1 Seleção do tema.....	114
6.6.2 Pergunta de revisão e critérios de inclusão e exclusão.....	115
6.6.3 Busca eletrônica, seleção de artigos e extração de dados.....	115
7. CRONOGRAMA.....	117
8. ORÇAMENTO.....	118
REFERÊNCIAS	119
ARTIGO 1.....	136
ARTIGO 2.....	170
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	203

APRESENTAÇÃO

A presente tese de doutorado é apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutora pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Comportamento (PPGSC) da Universidade Católica de Pelotas (UCPel). Tem como objetivo investigar em estudo pré-clínico como o consumo de dieta materna hiperlipídica em longa exposição influencia o desenvolvimento endócrino-metabólico e ósseo da prole.

Este volume está dividido em duas partes. A primeira parte refere-se ao projeto de pesquisa intitulado “Programação nutricional do desenvolvimento da prole por consumo materno de dieta hiperlipídica: um enfoque endócrino-metabólico e ósseo”, qualificado e aprovado pela banca avaliadora formada pela Profa. Dra. Rachel Krolow Santos Silva Bast, pelo Prof. Dr. Rafael Guerra Lund, pela Profa. Dra. Fernanda Pedrotti Moreira e pelo Prof. Dr. Adriano Martimbianco de Assis. O projeto se subdivide em: identificação, introdução, objetivos, hipóteses, revisão de literatura, metodologia e referências.

A segunda parte deste volume contempla os dois artigos resultantes do projeto de pesquisa. Os artigos estão apresentados conforme as normas dos periódicos aos quais foram ou serão submetidos. O primeiro artigo, intitulado “*Nutritional programming of thyroid hormones deficiency and metabolic state disruption in adolescent offspring by a maternal high-fat diet*”, está submetido ao periódico *Molecular and Cellular Endocrinology* e teve como objetivo avaliar a programação nutricional promovida por dieta materna hiperlipídica nos níveis séricos de hormônios tireoideos e do perfil lipídico, na composição corporal e no comportamento alimentar da prole, sobretudo durante a adolescência. O segundo artigo, intitulado “*Nutritional programming of physical developmental and bone growth of offspring by a maternal high-fat diet*”, será submetido ao periódico *Physiology & Behavior* e teve como

objetivo investigar a programação nutricional promovida por dieta materna hiperlipídica no desenvolvimento físico e neurocomportamental e no crescimento ósseo da prole desde os primeiros dias de vida à adolescência tardia.

Por fim, os demais artigos propostos no projeto ainda estão em fase de construção e serão finalizados e submetidos a revistas das respectivas áreas em momento futuro. Ademais, a tese está formatada segundo as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e os artigos seguem a formatação indicada pelas revistas mencionadas. A construção da tese segue o modelo indicado pelo Programa de Pós-graduação em Saúde e Comportamento da Universidade Católica de Pelotas.

PROJETO

1.IDENTIFICAÇÃO

1.1 Título: Programação nutricional do desenvolvimento da prole por consumo materno de dieta hiperlipídica: um enfoque endócrino-metabólico e ósseo

1.2 Doutoranda: Roberta Giorgi Silveira

1.3 Orientadora: Fernanda Nedel

1.4 Instituição: Universidade Católica de Pelotas (UCPel)

1.5 Curso: Doutorado em Saúde e Comportamento

1.6 Linha de pesquisa: Pesquisa experimental aplicada à saúde

1.7 Data: dezembro/2022

2. INTRODUÇÃO

A dieta consumida em muitos países ao redor do mundo atualmente é denominada ocidental, pois reflete um padrão de consumo que se iniciou no Ocidente, mas está se fazendo a cada instante igualmente presente no Oriente, trazendo prejuízos à saúde humana por ser altamente palatável e rica em gordura e carboidrato (Popkin; Ng, 2022). Assim como o restante da população, as mulheres em idade fértil, as gestantes e as lactantes na sociedade contemporânea estão expostas a ambientes em que predominam alimentos hiperlipídicos e ao longo dos anos a instalação desse padrão alimentar deturpado do que seria ideal ao ser humano durante o pré-natal, a gestação e a lactação tem demonstrado impactar de forma negativa as proles expostas indiretamente a tal condição (Sullivan; Nousen; Chamlou, 2014; Horan et al., 2016).

Considerando-se que limites éticos impedem pesquisas invasivas tanto em está gerando uma nova vida quanto em embriões, fetos, recém-nascidos e crianças e que determinados desfechos demandam acesso a órgãos vitais, os estudos sobre programação nutricional do desenvolvimento por dieta materna hiperlipídica ficaram relegadas à pesquisa pré-clínica (Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017). O modelo animal utilizado para simular o consumo de dieta ocidental pelo ser humano em roedores implica na necessidade de manutenção de dieta hipercalórica contendo dentre 35 a 60% de energia proveniente de gordura, devendo a exposição ocorrer por ao menos três semanas para produção de fenótipo semelhante ao encontrado no homem (Marques et al., 2016). Além disso, quando a investigação se refere a programação do desenvolvimento por exposição à dieta materna hiperlipídica o percentual de gordura deve ser mantido entre 40 e 60% e o ideal é que a manipulação da dieta permeie tanto o período pré-gestacional quanto a gestação e a lactação até o desmame, permitindo assim que

os fenótipos observados assemelhem-se aos das proles humanas (Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017).

No entanto, embora existam diversas publicações de pesquisas pré-clínicas sobre a programação nutricional promovida por dieta materna hiperlipídica, até então ainda restam lacunas como o estudo dos hormônios tireoideos após observação das condições de modelo experimental acima citadas, bem como no que concerne à avaliação dos marcadores de perfil lipídico triglicerídios, eis que divergente, e lipoproteína de alta densidade, que é muito pouco explorada (Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017). Ademais, a literatura científica no tema carece de informações sobre o desenvolvimento físico influenciado por dieta materna hiperlipídica, uma vez até o momento não há publicação reúna informações sobre acompanhamento do crescimento ósseo das proles no decorrer de seu amadurecimento, especialmente no que diz respeito a osso que não o fêmur (Buckels et al., 2021). Ainda, as morfologias cardíaca e vascular parecem estar bastante contempladas em estudos que buscam compreender os efeitos do consumo de dieta materna hiperlipídica no sistema cardíaco da prole, porém inexistem publicações que abordem o risco cardiovascular, sobretudo na adolescência (Espírito-Santo et al., 2022)

Outrossim, percebe-se que o número de estudos sobre a modulação do perfil lipídios em hipotireoidismo induzido em ratos Wistar mesmo que significativo, não aparenta ser concordante, o que dificulta a elaboração de discussões sobre o assunto na área. Com isso, o presente trabalho buscará preencher algumas das lacunas sobre os sistemas endócrino-metabólico e ósseo na prole de ratos Wistar expostos indiretamente à dieta hiperlipídica por meio de consumo materno desde a puberdade da mãe até o desmame dos filhotes e também revisar sistematicamente a literatura a respeito dos marcadores de perfil lipídico após indução de hipotireoidismo em ratos da estirpe retro citada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar em modelo animal a extensão dos efeitos decorrentes do consumo de uma dieta materna hiperlipídica desde a puberdade até o desmame em condições endócrinas, metabólicas, ósseas e de risco cardiovascular na prole de ratos machos da estirpe Wistar e revisar sistematicamente a literatura sobre os efeitos estirpe-específicos de modelos de indução de hipotireoidismo primário no perfil lipídico.

3.2 Objetivos específicos aos artigos propostos

3.2.1 Artigo 1

Avaliar os impactos do consumo de dieta materna hiperlipídica da peripuberdade ao final da lactação nos níveis séricos de hormônios tireoideos e marcadores de perfil lipídico, e no índice de obesidade, no acúmulo de tecido adiposo, nas medidas corporais e nas determinações nutricionais da prole de machos de rato Wistar após o desmame, sobretudo na adolescência.

3.2.2 Artigo 2

Avaliar os impactos do consumo materno de dieta hiperlipídica da puberdade ao desmame no desenvolvimento físico, no neurocomportamento, nos parâmetros osteométricos

e na microestrutura óssea de proles de macho de rato Wistar desde os primeiros dias de vida até a adolescência.

3.2.3 Artigo 3

Avaliar os impactos do consumo materno de dieta hiperlipídica da puberdade ao desmame à saúde hepática, às características do tecido adiposo, aos níveis séricos de citocinas inflamatórias e marcadores de dano hepático e cardíaco e aos índices aterogênico, mensurando, assim, o risco de doença cardiovascular de proles de ratos Wistar machos na adolescência.

3.2.4 Artigo 4

Revisar sistematicamente a literatura atual acerca do impacto estirpe-específico aos parâmetros bioquímicos do perfil lipídico em modelos de indução de hipotireoidismo primário em ratos da estirpe Wistar.

4. HIPÓTESES

4.1 Artigo 1

Os efeitos da exposição indireta à dieta hiperlipídica por meio do consumo materno desde a puberdade até o desmame impactam a prole de machos adolescentes gerando disfunção da tireoide, desordem lipídica, consumo excessivo de energia, alta eficiência energética, acúmulo de tecido adiposo e obesidade.

4.2 Artigo 2

A prole de machos demonstra alterações no desenvolvimento físico desde os primeiros dias de vida e em condições ósseas morfológicas e morfométricas ao final da adolescência em decorrência da exposição indireta ao consumo materno de dieta hiperlipídica desde a puberdade até o desmame sem que haja prejuízo à funcionalidade, o que se relaciona com a disfunção tireoidea observada no artigo 1.

4.3 Artigo 3

A exposição indireta à dieta hiperlipídica por meio do consumo materno desde a puberdade até o desmame influenciam o desenvolvimento da prole de machos adolescentes gerando alteração no perfil lipídico de modo a elevar os índices aterogênicos, o que em conjunto com a deficiência de hormônios tireoideos reportada no artigo 1, a obesidade, o aumento dos níveis séricos de proteínas inflamatórias e marcadores de dano hepático e

cardíaco e as alterações estruturais nos tecidos hepático e adiposo aumenta o risco de doença cardiovascular.

4.4 Artigo 4

Modelos cirúrgicos, genéticos, farmacológicos, radiológicos e dietéticos com diferentes especificações são utilizados como indutores de hipotireoidismo em ratos Wistar, gerando alterações diversas no perfil lipídico decorrentes de vias metabólicas relacionadas a cada modelo aplicado.

5. REVISÃO DE LITERATURA

5.1 Estratégia de busca

A estratégia de busca de publicações científicas sobre os artigos 1, 2 e 3 a integrar este projeto aconteceu em contexto exploratório com a intenção de identificar na literatura as palavras-chaves mais adequadas aos objetivos propostos. A busca foi precedida pela definição dos termos MeSH (*Medical Subject Headings*) uma vez que a base de dados principalmente utilizada foi PubMed, a qual possui vocabulário controlado para indexação de artigo mediante aplicação de descritores previamente estabelecidos pela *National Library of Medicine* do *National Center for Biotechnology Information*. Ao procurar-se pelo termo MeSH usando a palavra "maternal" (grafia idêntica em português e inglês) a base de dados remete ao termo mother, no entanto, é comum o uso da expressão "*maternal high-fat diet*" (em tradução livre do inglês dieta materna alta em gordura) como palavra-chave nas publicações encontradas sobre o assunto.

Na busca usando apenas os termos "*high-fat diet*" e "*mother*" (mãe na língua inglesa) ou tão-só "*maternal high-fat-diet*" o número de artigos encontrados é bastante limitado, motivo porquê se optou em buscar os artigos incluídos na revisão de literatura a partir da palavra "*maternal*" e da expressão "*high-fat diet*" somadas ao operador booleano "AND". Embora exista o termo MeSH exato para hormônios da tireóide na tradução para o inglês "*thyroid hormones*" a busca na base dados desse modo limita o resultado, uma vez que nem sempre os artigos avaliam todos os hormônios da tireoide, razão que culminou na escolha de outro termo MeSH, qual seja "thyroid".

Ademais, foram utilizados os termos MeSH para desenvolvimento ósseo, "*bone development*", e doença cardiovascular, "*cardiovascular risk*". Posteriormente, os termos foram combinados e inseridos na base de dados PubMed, sendo a busca refinada para o idioma inglês e sem limite de tempo (tabela 1). A partir das publicações encontradas procedeu-se a seleção dos artigos que descrevessem experimentos pré-clínicos com similaridades ao que se realizará para obtenção dos resultados concernentes aos artigos 1, 2 e 3. Portanto, foram incluídos estudos que utilizaram modelo animal usando roedores, em especial ratos, para avaliar os efeitos do consumo materno de dieta hiperlipídica na prole em suas mais diversas fases de vida nos hormônios tireoideos¹ (HTs), no desenvolvimento ósseo e na avaliação do risco cardiovascular.

Tabela 1 - Descrição da estratégia de busca na bases de PubMed destinada à elaboração da revisão de literatura correspondente ao artigo 1, 2 e 3.

Termos de busca	Número de artigos encontrados	Resumo lidos	Artigo lidos na íntegra	Artigos incluídos na revisão de literatura
"high-fat diet" AND maternal AND thyroid	7	5	3	3
"high-fat diet" AND maternal AND "bone development"	13	11	11	11
"high-fat diet" AND maternal AND "cardiovascular risk"	44	21	18	0

Em virtude de os efeito da dieta materna hiperlipídica no perfil lipídico da prole terem sido revisados sistematicamente em dois artigos publicados em 2017 optou-se por utilizar tais dados na revisão de literatura a seguir (Ribaroff et al., 2017; Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017). A

¹ O adjetivo vernáculo adequado para tireoide é tireoideo ou tireoidea, sendo que as palavras costumemente utilizadas "tireoideano" ou "tireoideana" estão equivocadas tanto no radical quanto na desinência.

observação dos desfechos de interesse em animais modificados geneticamente ou com condições não fisiológicas previamente presentes ao início da dieta implicou em não inclusão dos estudos como referencial teórico. Considerando-se o intuito de vislumbrar as consequência da exposição indireta à dieta hiperlipídica em constituintes do sistema endócrino procurou-se incluir os estudos que apresentassem avaliações biológicas, sobretudo bioquímicas, que possuem correlação com o tema.

5.2 Contexto histórico da transição nutricional humana

Na sociedade contemporânea no que diz respeito a nutrição encontramos dois grandes paralelos que trazem de modo bastante semelhante diversas preocupações de saúde pública, pois nos países de alta renda e em muitos de baixa e média renda é possível perceber que existe um estado de transição nutricional em que doenças não transmissíveis, dentre as quais obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão, apresentam altas taxas de mortalidade e morbidade em adultos e prevalência em franco crescimento (Colin Bell, 2002; Caleyachetty et al., 2021; Popkin; Ng, 2022).

Por outro lado, em países de renda inferior há fome e desnutrição que levam adultos à redução da estatura corporal e à magreza extrema (Popkin; Ng, 2022). Em ambas as situações uma importante preocupação na área da saúde converge às desregulações do sistema metabólico, sendo que em locais onde há tendência para o consumo de uma dieta desequilibrada derivada do ambiente obesogênico e do sedentarismo decorrente da dificuldade de encaixar exercícios físicos na atarefada rotina que nos permeia, o desafio se torna ainda maior em virtude do aparecimento de sobrepeso e de doenças não transmissíveis relacionadas apresentar ritmo acelerado (Ng;Popkin, 2012; Popkin; Ng, 2022).

As maiores transformações dietéticas vivenciadas até o presente momento decorreram dos processos de industrialização, urbanização e globalização que transcorreram no mundo em especial nos últimos três séculos (Baker et al., 2020). O crescimento do mercado internacional possibilitou ao setor alimentício a expansão comercial dos produtos industrializados, tornando-os mais acessível ao público em geral, que automaticamente passou a consumir alimentos ultraprocessados e reduziu o consumo de frutas, legumes e verduras *in natura* e outros componentes da dieta produzidos sem ultraprocessamento e comercializados localmente, modificando, portanto, o padrão alimentar anteriormente exibido que se baseava na ingestão de quantidades significativas de fibras e proteínas (Garn; Leonard, 2009).

Os alimentos ultraprocessados possuem como característica elevadas concentrações de sódio, açúcar, gordura trans e grãos refinados, o que os torna hiperpalatáveis e proporciona um rápido crescimento do segmento que os produz (Popkin; Ng, 2022). Além disso, nos países de baixa e média renda se vislumbra na atualidade em associação ao consumo de alimentos ultraprocessados, que estão intimamente ligados à uma saúde precária, a ingestão aumentada de alimentos chamados na língua inglesa de *high-fat street foods*, que em tradução livre pode-se definir como comidas de rua altas em teor lipídico (Reardon et al., 2021).

À troca de alimentos nutricionalmente adequados por uma dieta pobre em qualidade nutritiva deu-se a denominação "modelo de transição nutricional", cujo termo foi cunhado por Popkin desde a década de 90 e vêm sendo constantemente estudado desde então (Popkin; Ng, 2022). O fenômeno de conversão para o consumo de uma dieta rica em gordura saturada, sódio, açúcares e carboidratos refinados e baixa quantidade de fibras e componentes de origem natural presente no modelo de transição nutricional foi determinado como "dieta ocidental" em função de estar fortemente presente nos Estados Unidos da América, no Reino

Unido e em outros países da Europa, todos localizados na porção ocidental do globo terrestre (Cordain et al., 2007; Azzam, 2021).

Contudo, embora tenha ocorrido uma ocidentalização do termo, é sabido que mesmo diante de diferenças regionais nos padrões adotados em muitos países os efeitos no estado nutricional e na saúde decorrentes da transição nutricional demonstram similaridade em todo o globo (Popkin et al., 1993; Monteiro et al, 1995; Meenaksh et al., 2016; Pingali, 2007). O estilo de dieta indutora de doenças não transmissíveis permanece em muitos países, porém há algum tempo tem-se observado que existe uma mudança de comportamento na tentativa de reverter os efeitos deletérios já conhecidos, o que é limitado em países de renda mais baixa em virtude da dificuldade de acesso econômicos a opções mais saudáveis que nem sempre estão ao alcance de todos (Popkin; Ng, 2022).

A transição nutricional apresenta quatro diferentes estágios: coleta de alimentos, fome, recuo da fome, doenças crônicas e mudança de comportamento, os quais refletem a maneira que o homem se relaciona com os alimentos por escolha ou por fatores externos aos seus desejos (Popkin; Ng, 2022). O estágio de coleta de alimentos, estágio 1, concerne àquele onde ainda não havia controle da agricultura (período Paleolítico) e, portanto, o consumo de animais e plantas selvagens era a opção disponível, bem como consumia-se apenas água como bebida líquida e havia trabalho intensivo, o que fazia com que o homem fosse magro e robusto e a mortalidade fosse preponderantemente causada por doenças infecciosas (Popkin; Ng, 2022).

O estágio 2, marcado pela fome, representa o momento para o humanidade em que se vivia uma monocultura agrícola, onde cereais dominavam a dieta e os alimentos passaram a ser minimamente processados, no entanto, a atividade de trabalho continuava intensa, causando o surgimento de deficiências nutricionais e declínio da estatura corporal (Popkin;

Ng, 2022). O recuo da fome, estágio 3, foi marcado pelo consumo de frutas, vegetais e proteínas animais, pouca gordura, muitas fibras e uma dieta fracamente variada, fator este que fez culminar em deficiência da saúde materna e infantil, doenças de desmame e nanismo (Popkin; Ng, 2022).

As doenças crônicas como obesidade e doenças crônicas relacionadas à nutrição determinantes do estágio 4 derivam do consumo de alimentos com quantidades elevadas de gorduras e açúcares, bebidas açucaradas, mudanças nas tecnologias de trabalho, aumento das atividades de lazer e do sedentarismo e surgimento dos alimentos ultraprocessados (Popkin; Ng, 2022). Por fim, as mudanças de comportamento presente no estágio 5 marcam o retorno a ingestão de alimentos minimamente processados e de bebidas baixas em calorias ou água, a troca do sedentarismo por atividade física intencional e a dominância do consumo de comida "de verdade" (em que estejam ausentes alimentos altamente industrializados), o que leva a redução na gordura corporal e nas doenças crônicas relacionadas à nutrição e melhora na prevenção de doenças, extendendo o envelhecimento saudável (Popkin; Ng, 2022).

A dieta ocidental, tipicamente hipercalórica, hiperlipídica e hiperglicemiante, e o estilo de vida marcado pela falta da prática de exercícios físicos característicos do estágio 4 da transição nutricional não possibilitaram ao organismo humano adaptações genéticas para uma mudança tão significativa, levando a distorções no metabolismo que estava ajustado para metabolizar os alimentos conforme havia se adaptado durante a evolução ao longo de milhões de anos (Eaton; Konner, 1985; Popkin; Ng, 2022). Esse conjunto de fatores converge para o desequilíbrio do sistema metabólico, que carece de uma sintonia muito bem regulada para que funcione de forma adequada.

Um dos principais motivos do ser humano ter evoluído e atingido o estado atual de desenvolvimento provém das transformações que ocorreram em nossa dieta ao longo do

surgimento da espécie *Homo sapiens*, a qual foi fortemente influenciada por suas espécies ancestrais (Eaton; Konner, 1985). As inserções e modificações dos tipos de alimentos disponíveis com o passar do tempo implicou em adaptações metabólicas para que o organismo humano pudesse metabolizar de forma adequada os alimentos que passou a ingerir (Eaton; Konner, 1985).

A resposta às influências da dieta no organismo do *H. sapiens* em sua constituição genética atual está diretamente relacionada tanto aos primeiros pertencentes à espécie quanto aos antepassados hominídeos, períodos em que foi preciso enfrentar dificuldades encontradas em relação à exploração de recursos alimentares, pois a disposição de alimentos sofria variações consoante o período paleontológico, a localização geográfica e as condições sazonais (Eaton; Konner, 1985). As mudanças ocasionada pela industrialização e pela globalização no modo como o ser humano passou a consumir alimentos gerou um contrassenso em relação à forma com o nosso corpo metaboliza os nutrientes, uma vez que se afasta de maneira importante da quantidade e da qualidade consumidas nos instantes em que nosso código genético foi moldado e, salvo alterações epigenéticas, poucas modificações nos separam da formação de genes humanos primordialmente constituídos no que tange à metabolização de alimentos (Eaton, 2006).

Os problemas de saúde relacionados à alimentação, tão presentes na sociedade contemporânea, são um considerável indicativo de que a nossa moldagem genética prévia evidentemente não nos preparou para a forma como estamos nos alimentando (Eaton; Konner, 1985). Por tal motivo, o padrão nutricional consumido pelo homem à época em que o genoma foi estabelecido até este instante ainda é objeto de intensos estudos multidisciplinares (Eaton, 2006). Inclusive, recentes pesquisas clínicas observaram que algumas doenças crônicas, como diabetes, esclerose múltipla, doenças cardíacas, síndrome do ovário

policístico, autismo e síndrome metabólica, apresentam melhora com a adoção de dietas com características próximas às dietas de nossos antepassados (Otten et al., 2017).

Ademais, a ocidentalização das populações tem trazido à tona não somente enfermidades até então diretamente relacionadas ao metabolismo de alimentos, quais sejam obesidade, diabetes mellitus tipo 2 e hipertensão consoante mencionado anteriormente, mas vem sendo observado um aumento crescente na incidência de outras doenças crônicas a exemplo de aterosclerose, doença arterial coronariana, derrame cerebral, doenças autoimunes, câncer e osteoporose (Kopp, 2019). Essas doenças que acometem o ser humano e apresentam cronicidade são aquelas que mais trazem preocupação do ponto vista de políticas públicas e demandam esforços científicos, uma vez que tendem a se estender no tempo e tornar dificultoso o tratamento (Airhihenbuwa et al., 2021).

Não apenas o estilo de vida ocidental como um todo vem sendo constante pesquisado, pois ao longo do tempo foi percebida a importância de estudar os efeitos de como cada micronutriente impacta na saúde humana e também da influencia da prática ou ausência de exercícios físicos rotineiros (Popkin; Ng, 2022). Conforme citado anteriormente, o excesso no consumo de lipídios visto em algumas sociedade representa preocupação à saúde humana, sendo que é sabido que a dieta hiperlipídica, principalmente aquela rica em gorduras saturadas, causa aumento nos níveis de lipídios lipotóxicos, que são metabolicamente mais perigosos do que a alta ingestão de gorduras poliinsaturadas e carboidratos (Castro-Alves; Orešič; Hyötyläinen, 2019). Estudos em humanos demonstraram que o consumo de mais de 30% de energia proveniente de gordura pode gerar aumento da adiposidade corporal, facilmente levando ao desenvolvimento de obesidade (Hariri; Thibault, 2010).

Dentre as principais distorções do metabolismo relacionadas aos problemas trazidos pela transição nutricional, pode-se incluir a produção das espécies reativas de oxigênio,

hiperinsulinemia, resistência à insulina, inflamação de baixo grau e ativação anormal dos sistema nervoso simpático e renina-angiotensina-aldosterona (Kopp, 2019). O metabolismo encontra-se distorcido porque em não havendo adaptação dos genes para a metabolização dos alimentos resta ao corpo humano tentar controlar as mudanças na dieta por meio de mecanismos epigenéticos, o que se considera uma difícil tarefa, pois o controle por epigenética costuma depender de fatores ambientais que alteram constantemente a expressão de genes e os fenótipos a estes relacionados (Kopp, 2019). A modulação de fenótipos pode afetar não apenas quem consome diretamente uma dieta para a qual não estamos adaptados, mas também quem se expõe indiretamente ou às suas consequências, ou seja, o embrião e o feto em desenvolvimento no útero materno de mães expostas à dieta e ao estilo de vida ocidentalizados (figura 1) (Kopp, 2019).

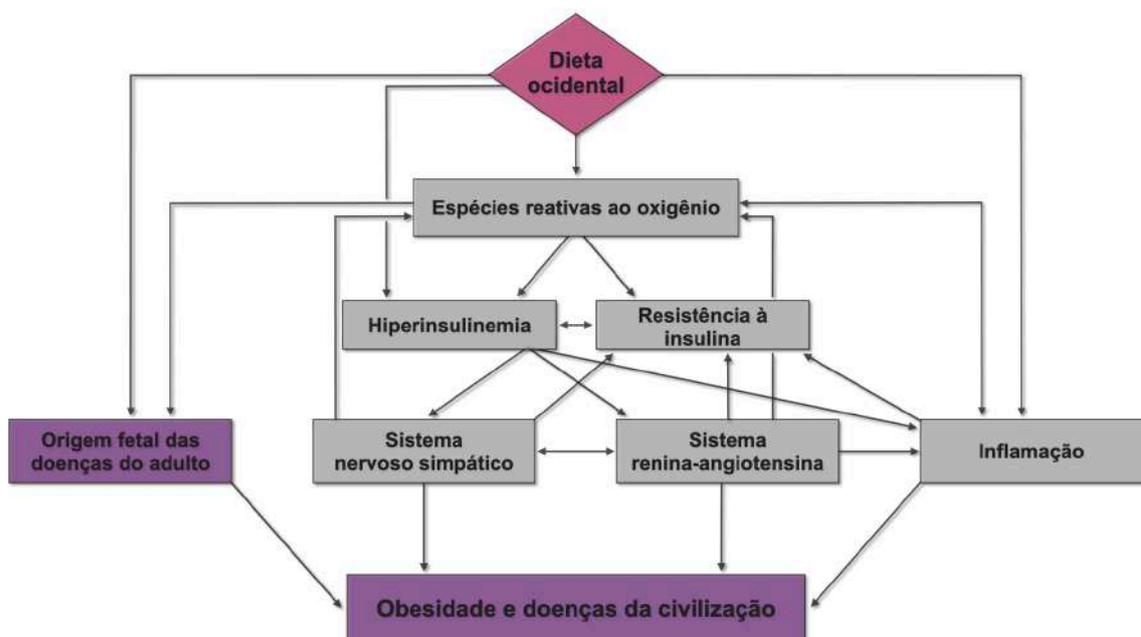


Figura 1 - Proposta de modelo de desenvolvimento de obesidade e doenças da civilização promovidas pelos consumo de dieta ocidental.

O elevado consumo de gordura na população geral conduz a distúrbios metabólicos e consequentemente a doenças crônicas como diabetes mellitus tipo 2, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares quando comparado com dietas saudáveis (Schulze et al., 2005; He et al, 2014; Mente et al., 2009). Mesmo um curto período de exposição à dieta hiperlipídica pode causar aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL da sigla para a expressão na língua inglesa *low density lipoprotein*) e triglicerídeos intra-hepáticos, alteração do metabolismo ósseo, alterações na composição da microbiota da mucosa colônica, endotoxina sérica, permeabilidade intestinal e adaptação metabólica do músculo esquelético (Bowser et al., 2020; Parry et al, 2020; Burén et al, 2021; Varley et al., 2022). Além disso, assim como a exposição direta à dieta hiperlipídica esta prejudicando a saúde humana, a exposição indireta ao tipo de nutrição proveniente de tal comportamento alimentar está prejudicando o desenvolvimento da prole, como será explicitado a seguir.

5.3 Comportamento alimentar materno

As modificações do comportamento alimentar anteriormente expostas geram implicações negativas na saúde humana nos mais variados estágios da vida dos seres humanos, podendo impactar desde a gestação na 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; Redman, 2005). Os efeitos da exposição a um ambiente uterino

insalubre foram estabelecidos pela “hipótese de Barker” por volta do final do século 20, que sinalizava a origem de algumas doenças em fase mais tardias da vida, como a doença arterial coronariana, o acidente vascular cerebral e a diabetes, devido a complicações fetais decorrentes de desnutrição materna (Barker, 1998). Posteriormente, o conceito formulado por Barker foi ampliado para incluir o estágio pós-natal no modelo de desenvolvimento das origens da doença crônica, doravante denominado “origens desenvolvimentistas da saúde e da doença” (Barker et al., 2017).

Assim, eventos de estímulo ou insultos ocorridos em fases críticas do desenvolvimento podem programar consequências duradouras na prole, levando a: (1) programação fetal a partir de gatilhos no ambiente intrauterino, (2) programação lactacional quando a exposição ocorre no período pós-natal precoce durante a amamentação e (3) programação de desenvolvimento se o gatilho for apresentado desde a vida fetal até o desmame. Considerando o poder da dieta materna e do estado nutricional materno no estabelecimento da programação de desenvolvimento da prole, o foco inicial da teoria das origens do desenvolvimento permaneceu na desnutrição materna (Cerf, 2015).

No entanto, as características do padrão alimentar da sociedade contemporânea têm chamado a atenção para as consequências do consumo materno excessivo de gordura na saúde da prole diante das evidências de programação fetal, lactacional e do desenvolvimento induzidas por dieta hiperlipídica, sendo que 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 com alterações estruturais fisiológicas e metabólicas (Barguer, 2010; Kopp, 2019).

A gravidez corresponde a 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 (Franco; Walton, 1993; Feskens et al., 2022). 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, esse ganho 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 (Barguer, 2010; Feskens et al., 2022). 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 (Rasmussen; Yaktine, 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; Deslandes, 2008). Embora existam diferenças, a maioria das sociedades apresentam crenças semelhantes no que atine 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; 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 (Helman, 2009).

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 (Baião; Deslandes, 2008; Helman, 2009). 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.

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 (Davies; Wardle, 1994; Clark et al., 2009; Shloim et al., 2014). 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; Wardle, 1994; Clark et al., 2009; Shloim et al., 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 (Clark; Ogden, 1999). 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 (Clark; Ogden, 1999).

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 (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 já foi averiguado que há associação entre a compulsão alimentar e os sintomas de ansiedade apresentados durante a gravidez (Soares et al., 2009).

Estudos epidemiológicos, 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 (Gomes et al., 2015). 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 (Gomes et al., 2015). 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).

Diante da dificuldade de estudar tipos de dieta em seres humanos em função das muitas influências ambientais a que nos expomos diariamente, sobretudo em gestantes, lactantes, embriões, fetos e crianças, uma opção interessante é a pesquisa com modelos animais, sendo importante, portanto, compreender como funcionam os modelos animais de simulação de consumo humano de dieta ocidental tanto por exposição direta quanto indireta por meio de consumo materno, o que será explorado no item a seguir (Hariri; Thibault, 2010; Marques et al., 2016).

5.4 Modelos animais de simulação do consumo humano de dieta ocidental

As abordagens metabólicas, em cujo contexto estão inseridas as causas e consequências do desequilíbrio orgânico provocado pelo consumo da dieta de padrão ocidentalizado, quando estudadas em modelo animal demonstram fenótipo mais equivalente em ratos quando comparado aos camundongos, provavelmente em virtude da semelhança fisiológica que a espécie *Rattus norvegicus*, também denominado rato de laboratório, apresenta em relação ao homem (Jacob, 1999, Xu et al., 2016). Nesse sentido, antes de adentrar nas peculiaridades dos modelos animais de simulação do consumo humano de dieta ocidental, é importante pontuar o surgimento destes animais como modelos de experimentação e a origem das duas estirpes de rato mais utilizadas, Wistar e Sprague-Dawley (SD).

5.4.1 A importância da espécie *Rattus norvegicus* na experimentação animal

As estirpes puras de rato e camundongo foram estabelecidas ao redor do início dos anos 1900 e a partir de então o camundongo foi escolhido como modelo de estudo genéticos em mamíferos e os ratos se tornaram o modelo de escolha de fisiologistas, nutricionistas e outros pesquisadores da área biomédica (Jacob, 1999; Sengupta, 2013). Um dos motivos da preferência de pesquisadores de assuntos voltados à compreensão de questões fisiológicas e biomédicas pelos ratos, afora a similaridade fenotípica, decorre também do maior tamanho deste animal, o que facilita as intervenções experimentais e a coleta de material biológicos e espécimes a serem analisadas (Jacob, 1999; Sengupta, 2013).

Desde o final do século passado até os dias atuais estirpes puras de ratos são usadas para pesquisas nas áreas de dependência química, envelhecimento, doenças autoimunes, comportamento, doenças do sangue, câncer de mama, doenças cardiovasculares, doenças dentais, doenças de pele e cabelo, endocrinologia, crescimento e reprodução, desordem metabólicas, nutrição, fisiologia, desordens ósseas, toxicologia, dentre muitas outras (grifo nosso) (Jacob, 1999; Szpirer, 2020; Moreno-Sosa et al., 2021; Dorraji et al., 2022; Hu et al., 2022; Kumar; Diwan; Sharma, 2022; Jeong et al., 2022; Li et al., 2022; Liao et al., 2022; Liu et al., 2022; Madalena et al., 2022; McFalls et al., 2022; Motawee et al., 2022; Nnoruka et al., 2022; Pan et al., 2022; Silveira et al., 2022; Tia et al., 2022; Wei et al., 2022).

As extensas pesquisas em ratos no campo fisiológico culminaram em uma fisiologia extremamente bem documentada e percebeu-se que a espécie é adequada a coletas de sangue seriadas, manipulação cirúrgica e mensurações fisiológicas como pressão sanguínea com uso de implante telemétrico (Szpirer, 2020). Além disso, uma variedade de estirpes foi criada a partir de seleção reprodutiva de animais que expressassem um fenótipo desejado, permitindo que se alcançasse uma geração de modelos genético de patologias complexas e traços poligênicos (Szpirer, 2020). (Maheshwari et al., 2018).

Em 1915, a partir do cruzamento de ratas albinas Wistar originárias do Instituto Wistar com ratos machos selvagens cinza capturados ao redor de Berkeley (Califórnia, EUA) os pesquisadores Long e Evans desenvolveram a estirpes de ratos conhecidas como Long-Evans, e a empresa Sprague-Dawley Animal Company sediada em Madison (Wiscosin, EUA) criou a estirpe de rato SD a partir de um cruzamento entre um macho híbrido de origem desconhecida e uma fêmea albina Wistar (Fuochi et al., 2022; Gileta et al., 2022). Além disso, outras estirpes de ratos usadas em pesquisas laboratoriais, como, por exemplo, Wistar Munich, Brown Norway, Wistar Kyoto (consanguínea), Wistar Furth (consanguínea) Wistar

Hannover (não-consanguínea), Wistar Unilever (não-consanguínea), Lewis (consanguínea), rato espontaneamente hipertensivo e rato espontaneamente hipertensivo propenso a acidente vascular cerebral, possuem em comum a estirpe Wistar como ancestral (Hilsdorf; Krieger, 1999; McCormick, 2017; Modlinska; Pisula, 2020). Sendo assim, é possível observar que uma quantidade maciça de pesquisas com modelos animais envolve diretamente a estirpe Wistar ou estirpes que derivaram dessa linhagem.

Ao longo dos anos após o início das pesquisas laboratoriais com roedores, o mundo mudou drasticamente tanto no sentido de evolução de tecnologia quanto ao surgimento de novas doenças e à capacidade ampliada de detecção e diagnóstico das enfermidades já existentes. Uma das tecnologias mais impactantes aplicada a modelos animais para simular condições de saúde humanas foi a manipulação genética de camundongos ocorrida no final dos anos 1980 quando os pesquisadores Capecchi, Evans e Smithies criaram um camundongo com expressão de genes modificada mediante uso de células embrionárias, o que conhecemos atualmente como *knockout* (Smithies et al., 1985; Thomas et al., 1986; Kuehn et al., 1987). A pesquisa lhes rendeu o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2007, uma vez que transformou o entendimento sobre os processos de desenvolvimento normal e de doença e identificou novos caminhos para a terapia médica.

A mutagênese do genoma em ratos ocorreu em período posterior, mais precisamente em 2003, quando equipe do cientista Gould desenvolveu modelos de *knockout* em três estirpes de ratos diversas, quais sejam Wistar-Furth, Fischer 344 e SD (Zan et al., 2003). À época, já era salientado que por serem os ratos amplamente utilizados como modelos em pesquisas biomédicas e frequente preferidos como modelos de roedores em muitas áreas de pesquisas da psicologia e da patobiologia era de suma importância que métodos para produção de interrupção de genes em ratos *knockout* fossem realizados (Zan et al., 2003).

Assim, até mesmo quando se trata de manipulação genética, os ratos passaram a estar no topo dos modelos animais para estudo de condições de saúde humanas, como, por exemplo, no estudo de Yang et al. em que foi desenvolvido um modelo de deficiência do receptores do hormônio tireotrofina pituitária em ratos para aprofundamento da pesquisa científica sobre a importância da saúde tireoidea no crescimento e no desenvolvimento (Yang et al., 2018). A justificativa para a necessidade de produzir tal modelo decorre de ser o hipotireoidismo congênito um doença endócrino-metabólica comum e pouco estudada do ponto de vista genético e a escolha do rato por promover maior quantidade de amostra, permitindo avaliação acurada, ser mais fisiologicamente semelhante ao homem e demonstrar fenótipo vistos em humanos que não são reproduzidos em camundongos (Yang et al., 2018).

Então, é possível inferir que dentre os modelos de roedores para estudos de doenças que acometem o homem o rato se encontra como um animal mais fácil de trabalhar e com considerável semelhança ao ser humano. No entanto, alguns pesquisadores optam por camundongos em virtude do custo mais baixo, ciclo reprodutivo extremamente rápido (frequentemente de três semanas, já que podem acasalar no mesmo dia do nascimento das proles) e necessidade de pequeno espaço. Os modelos pré-clínicos em animais roedores foram refinados ao longo dos anos, tornando mais valiosa a translação dos efeitos obtidos para o humano e intensificando o tipo de estudo, que em meio a tantas pesquisas diversas vem se voltando para o uso de diferente dietas animais, a exemplo da dieta hiperlipídica como analogia à dieta consumida no estágio 4 da transição nutricional. Para aprofundar o assunto, o item seguinte abordará os modelos animais de simulação do consumo humano de dieta ocidental mais frequentemente utilizados e a diferença entre as espécies, trazendo também considerações espécie-específicas.

5.4.2 Modelos animais de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e porque Wistar é a estirpe mais adequada

O fenótipo induzido pela dieta de padrão ocidental apresenta sobrepeso ou obesidade, dislipidemia², hiperglicemia, resistência à insulina, hipertensão e/ou acúmulo de tecido adiposo abdominal, que são sinais e sintomas integrantes do *cluster* da síndrome metabólica, ao qual unem-se igualmente o aumento do risco de doenças cardiovasculares e a diabetes mellitus tipo 2 (Trandafir et al., 2022). O desenvolvimento da obesidade e seus fatores de risco, por exemplo, apresentam melhores respostas quando estudados em dietas indutoras de obesidade, tendo em vista que o modelo demonstrou reproduzir com maior confiabilidade a obesidade humana em comparação com modelos genéticos, o que associado ao controle de condições, quando se trabalha com modelos animais, facilita a compreensão das consequências e mecanismos envolvidos (de Moura e Dias et al., 2021). Então, é comum a dieta aplicada a modelos animais com intuito de observar o que vem acontecendo desde a instalação do 4º estágio da transição alimentar também ser chamada de dieta indutora de obesidade.

Um dos protocolos de dieta aplicados em roedores para simular a dieta ocidental humana são dietas com alto conteúdo lipídico em percentuais superiores a 35% de energia proveniente de fontes de gordura com redução das quantidades de proteína e micronutrientes, sendo que em dietas onde se pretende a indução de obesidade os percentuais variam entre 45 e 60% decorrentes de suplementação com banha de porco, em que prepondera gordura do tipo saturada, ou óleo de soja (Hintze et al., 2018). Além de estudos que visam observar os efeitos

² Dislipidemia é designação utilizada para descrever anormalidades nos níveis séricos de lipídios, incluindo superprodução ou deficiência. Um perfil lipídico sérico anormal pode incluir elevação de colesterol total, triglicérides e da lipoproteína de alta densidade e diminuição da lipoproteína de alta densidade.

da exposição direta à dieta hiperlipídica, existem também estudos pré-clínicos que buscam avaliar os desfechos fenotípicos em proles após exposição materna à alimentação rica em lipídios, os quais, conforme revisão sistemática sobre o tema, apresentam variação de energia proveniente de gordura entre 40 e 60% (Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017). Por ser o fenótipo da síndrome metabólica consideravelmente abrangente no sentido de amplitude das alterações que compõem essa condição clínica é comum que os estudos sobre as consequências da ingesta do modelo de dieta em questão busquem tal fenótipo, o que implica em inúmeras publicações na área que ajudam a estabelecer as características da metodologia a ser aplicada no presente projeto (Lasker et al., 2006; Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017; Zhao et al., 2018; Mayer et al., 2022).

As espécies mais frequentemente usadas para estudo de dietas indutoras de obesidade, o desfecho de maior interesse e que é refletido pelo excesso de gordura corporal, nos últimos seis anos são os ratos, nas estirpes SD e Wistar, e os camundongos, na estirpe C57BL/6J (de Moura e Dias et al., 2021). Sobre o tema convém esclarecer que as dietas ricas em açúcares não são capazes de produzir em roedores as mudanças metabólicas características da obesidade, porquanto não induzem aumento do índice de adiposidade e de tecido adiposo visceral e corporal de modo significativo (de Moura e Dias et al., 2021). Ademais, outro tipo de dieta eventualmente utilizado em estudos acerca da repercussão da dieta ocidental em organismo de mamíferos é a dieta de cafeteira, no entanto, os resultados desta aplicação necessitam ser interpretados com cautela, eis que a elevada palatabilidade pode implicar em aumento do consumo de dieta, incluindo comportamento compulsivo, gerando assim aumento de peso, alteração no padrão dia-noite de alimentação de roedores e mudanças na sinalização dopaminérgica (de Moura e Dias et al., 2021).

Desse modo, a opção por modelo de dieta hiperlipídica quando há intenção de avaliar fenótipos semelhantes aos decorrentes do consumo de dieta ocidental é a mais acertada, no entanto, alguns preceitos básicos precisam ser levados em consideração (de Moura e Dias et al., 2021). Para que haja o acúmulo de tecido adiposo inerente à obesidade é preciso ocorrer consumo excessivo de calorias, incorrendo em necessidade de a dieta além de hiperlipídica ser hipercalórica, o que não necessariamente se traduz em aumento do consumo bruto de quantidade de alimentos para que se desenvolva o fenótipo desejado, até mesmo porque o potencial sacietógeno da dieta com alto teor lipídico resulta em menor montante de alimento ingerido com consequente elevação da ingesta calórica (de Moura e Dias et al., 2021). Outra questão a ser levada em consideração é o tempo de duração da exposição à dieta, sendo que períodos além de três semanas podem gerar resultados superiores para a indução de obesidade e que a consolidação do perfil fenotípico de obesidade e das alterações metabólicas características, como, por exemplo, níveis séricos elevados de triglicerídeos, acontece entre a décima e a décima segunda semanas (Savetsky et al., 2015; Marques et al., 2016; Matias et al., 2018).

Quantos aos camundongos mais comumente utilizados em dietas de indução de obesidade cumpre ressaltar que a estirpe C57BL/6J é preferencialmente escolhida devido a maior suscetibilidade em acumular gordura, ganhar peso corporal e desregular o metabolismo da glicose. A estirpe de rato SD apresenta comportamento alimentar similar ao do homem em relação ao excesso no consumo de dieta, levando a aumento de peso corporal e mudanças no metabolismo de lipídios. Já os ratos da estirpe Wistar são mais suscetíveis ao desenvolvimento de obesidade por meio da alimentação, uma vez que tendem a consumir maior quantidade de dieta hiperlipídica quando comparados à estirpe SD e também apresentam metabolismo lipídico, como captação de ácidos graxos e liponeogênese, e interrelação entre genes e dieta

mais favorável à indução de obesidade por dieta (Miranda et al., 2018; de Moura e Dias et al., 2021).

Afora a inegável contribuição das estirpes de camundongos na pesquisa que envolvem roedores expostos à dieta hiperlipídica, considera-se as estirpes de rato retro citadas como padrão este tipo de estudo. Contudo, não é possível comparar diretamente as estirpes de rato SD e Wistar, já que estudos demonstram algumas mudanças metabólicas que são observadas em Wistar e não observadas em SD (Marques et al., 2016). Quando comparadas as estirpe SD e Wistar após exposição a dieta hiperlipídica com 45% da energia proveniente de lipídios Wistar demonstra aumento em: (1) ingestão de calorias por dia, (2) peso corporal mais rápido decorrente de expansão do tecido adiposo, (3) liberação de leptina por grama de massa gorda e (4) níveis séricos de creatinina, leptina, triglicérides e albumina e também diferença na composição da flora bacteriana intestinal, o que indica efeitos mais rápidos e evidentes (Marques et al., 2016). Quando a estirpe Wistar é exposta à dieta hiperlipídica e hipercalórica com cerca de 50% de energia proveniente de gordura a presença: (1) obesidade, (2) mudanças no perfil lipídico como níveis séricos ou plasmáticos aumentados de leptina, colesterol total e triglicérides e reduzidos de lipoproteína de baixa densidade (HDL da sigla para a expressão em inglês *high-density lipoprotein*), (3) intolerância à glicose, (4) acúmulo de tecido adiposo e (5) alterações hepáticas, as quais são recorrentes e atualmente representam um consenso na literatura (Akiyama et al., 1996; Lasker et al., 2019; de Moura e Dias et al., 2021).

Considerando-se que a obesidade é um característica fundamental para que se entenda os efeitos da dieta ao estilo ocidental tanto no homem quanto em roedores é de suma relevância que sejam estabelecido os meios pelos quais as mesma pode ser mensurada, sendo que embora os sejam organismos diferentes os métodos para avaliação de ambos são semelhantes. A ocorrência da obesidade em roedores pode ser avaliada por determinação de

adiposidade corporal, cálculo de massa corporal e métodos como absorptometria radiológica de dupla energia (de Moura e Dias et al., 2021). A adiposidade corporal é um parâmetro frequentemente avaliado em estudos envolvendo ratos submetido à dieta hiperlipídica, principalmente quando não observada diferença no peso corporal ou no ganho de peso corporal, uma vez que pode o ganho de tecido adiposo branco em virtude de sua densidade não refletir ganho de peso corporal total (de Moura e Dias et al., 2021). O tecido adiposo branco a ser analisado para tanto é a gordura visceral, já que corresponde ao maior depósito de adipócitos que circunda os órgãos abdominais, rico em vascularização e inervação e ativo inflamatória e metabolicamente, o que o torna sensível à lipólise levando à liberação de citocinas inflamatórias, ácidos graxos e triglicerídeos (de Moura e Dias et al., 2021).

As vias metabólicas e a interação entre genes e dieta são fatores que influenciam no acúmulo de gordura visceral e considerando os modelos de dieta hiperlipídica em ratos tem-se que a estirpe Wistar apresenta expressão de genes no tecido adiposo subcutâneo diferenciada quando comparada à estirpe SD, justificando o elevado acúmulo de gordura encontrado em ratos Wistar (de Moura e Dias et al., 2021). Afora isso, em ratos Wistar alimentados com dieta hiperlipídica há a aumento do tamanhos dos adipócitos do tecido visceral, isto é, hipertrofia, e aumento no número de adipócitos no tecido adiposo subcutâneo, que se pode traduzir em hiperplasia de tal tecido, sendo essas alterações decorrentes de elevação no captação de ácidos graxos e lipogênese (de Moura e Dias et al., 2021).

O aumento de tecido adiposo pode causar hipóxia, que leva a prejuízo na produção e liberação de hormônios reguladores de obesidade, como, por exemplo, leptina, adiponectina e grelina, e também a exacerbação da resposta inflamatória, dos pontos chaves quando se trata de obesidade (de Moura e Dias et al., 2021). Na ocorrência de acúmulo elevado de tecido adiposo provavelmente há dano às células musculares, pois o excesso de gordura pode torná-

las mais suscetíveis à degradação protéica e apoptose, indicando que as dietas hiperlipídicas indutoras de obesidade aplicadas em modelo animal usando roedores promovem mudanças metabólicas e morfológicas características da obesidade humana (de Moura e Dias et al., 2021).

A respeito da avaliação do tecido adiposo visceral como critério para determinação de obesidade conveniente tecer alguns comentários sobre a particularidade deste tecido em roedores (Chusyd et al., 2016). O tecido adiposo visceral em ratos, também considerado tecido adiposo branco, proveniente da região perigonadal, que corresponde aos corpos gordurosos epididimal para machos e periovariano para fêmeas, e da região retroperitoneal, o qual se situa no entorno dos rins, corresponde aos depósitos de gordura intra-abdominal em humanos (Chusyd et al., 2016). Além disso, também compõe o tecido visceral em ratos o corpo gorduroso mesentérico, no entanto, esse é muito pouco estudado em roedores devido à limitações na manipulação cirúrgica e na separação de veias contaminantes (Chusyd et al., 2016). O tecido adiposo da região perigonadal é o maior depósito de gordura em roedores e também o mais acessível, sendo, portanto, frequentemente utilizado quando se trata de analisar gordura abdominal (Chusyd et al., 2016).

O excesso de tecido adiposo visceral em humanos está associado a aumento do risco de resistência à insulina e disfunção metabólica, de dislipidemia e do desenvolvimento de um perfil metabólico desfavorável. Em ratos submetidos à lipectomia, i. e., remoção cirúrgica do tecido adiposo das regiões epididimal e retroperitoneal, foi observado melhora da ação insulínica, maior longevidade e redução da tumorigênese (Chusyd et al., 2016). Já o aumento de tecido visceral em roedores foi associado a elevação de liberação de citocinas pró-inflamatórias (Chusyd et al., 2016). Um estudo publicado por Tekus et al. em 30 machos da estirpe Wistar relacionou o peso dos tecidos adiposos das regiões epididimal e retroperitoneal

obtidos *post mortem* e expressos em grama de tecido adiposo dividida por grama de peso corporal de cada animal com a gordura local total avaliada por microtomografia computadorizada. Foi encontrada correlação fortemente positiva (r da região epididimal: 0,73; r da região retroperitoneal: 0,81) e estatisticamente significativa ($P < 0,001$) (Tekus et al., 2017).

Além disso, no mesmo estudo após analisarem 77 machos Wistar relatou-se que existe uma correlação positiva igualmente forte entre a espessura total da dobra cutânea e os tecidos adiposos das regiões epididimal (r : 0,76, $P < 0,001$) e retroperitoneal (r : 0,77, $P < 0,001$) obtidos do mesmo modo (Tekus et al., 2017). Sendo assim, é possível entender como justificável em estudo com ratos, em especial da estirpe Wistar, inferir o percentual de gordura corporal total por meio da análise proporcional de cada região tecidual e determinar a quantidade de tecido adiposo abdominal a partir da soma dos corpos gordurosos perigonadal e retroperitoneal (Tekus et al., 2017).

A obtenção dos tecidos adiposos para verificação das métricas acima descritas sucede-se à eutanasia dos animais, que se faz necessária à excisão tecidual, sendo que para avaliar a obesidade *in vivo* pode-se recorrer a outros métodos, como, por exemplo, o índice de Lee desenvolvido em 1929 para determinar a área de superfície de ratos brancos com aplicação na expressão de resultados metabólicos mediante a observação de variedade entre as espécies na análise de composição corporal (Lee, 1929). Ao publicar a sua fórmula matemática, que será descrita a seguir, Lee assevera que as fórmula existentes até aquele momento ao relacionar o peso corporal com o comprimento corporal consideravam a medida da cernelha até a raiz da cauda, o que não correspondia a medidas em outros animais e também não apresentava relação constante entre o comprimento total do nariz ao ânus (naso-anal), equivalente em roedores ao comprimento do corpo (Lee, 1929).

Então, o pesquisador efetuou em animais de diferentes sexo, idade e condições cinco medidas corporais: naso-anal, cernelha-anal, do nariz a ponta da cauda, alcance das patas dianteiras e alongamento das patas traseiras, e removeu a pele e o pelo dos animais, fazendo posteriormente uma série de procedimentos para determinar qual seria a medida de comprimento e a fórmula mais adequadas para analisar a massa corporal de ratos, qual seja $[\sqrt[3]{\text{peso corporal(g)}/\text{comprimento naso-anal(cm)}}]$ (Lee, 1929). Ao realizar tal estudo, Lee não aplicou tal fórmula para diferenciar os valores de animais com padrão corporal normal de animais obesos, o que foi feito apenas em 1967 por Bernardis e Patterson quando correlacionaram o já denominado "índice de Lee" com conteúdo gorduroso de carcaças de ratas com lesões hipotalâmicas causadoras de obesidade no desmame e em idade adulta, sendo que tanto em relação ao peso seco quanto ao peso úmido dos animais quando comparados aos seus respectivos controles foram observados valores *P* estatisticamente significantes ($< 0,01$) (Bernardis; Patterson, 1968).

Posteriormente, Simson e Gold em 1982 fizeram extensas verificações acerca do percentual de tecido adiposo e o índice de Lee em ratas com obesidade induzida mediante dieta e observaram que ao desmame as ratas obesas apresentavam índice de Lee próximo a 0,320 enquanto para as não obesas o valor era de aproximadamente 0,305 e à idade adulta o índice demonstrado foi de cerca 0,299 para as ratas do grupo controle e ao redor de 0,332 para as ratas do obesas (Simson; Gold, 1982). A partir de então, o índice de Lee passou a apresentar um confiável parâmetro para determinação de obesidade em roedores e é usado até os dias atuais, sendo reportado em 75 publicações indexadas na base de dados Science Direct desde o início do ano de 2022 até então (de Moura e Dias et al., 2021; Feng et al., 2022; Sulistyowati et al., 2022; Zhao et al., 2022).

Ademais, estudos publicados avaliando o índice de Lee em ratos a partir da adolescência revelam que ratos não obesos, assim como os adultos, demonstram valores inferiores a 0.300, enquanto os obesos se encontram em faixas iguais ou superiores a esse valor (Kanareck et al, 2007; Novelli et al., 2007; Debarba et al, 2020). Com isso, depreende-se que a confirmação do fenótipo atinente às mudanças fisiológicas provocadas pelo consumo de dieta hiperlipídica pode ocorrer de diversas formas quando se estuda em roedores, o que torna as pesquisas ainda mais válidas.

Assim, as pesquisas sobre o assunto continuam a prosperar e passaram a abordar diferentes sistemas que vão além daqueles atingidos pela síndrome metabólica tão peculiar à dieta ocidental humana. Dentre as mais recentes publicações acerca do impacto da dieta hiperlipídica no organismo dos ratos tem-se que há prejuízo à saúde da tireoide mediante alterações na morfologia e secreção da glândula tireoidea concomitante à produção de anticorpos contra componentes tireoideos, impacto à saúde óssea por redução na densidade mineral óssea dos ossos da tíbia e do fêmur e redução dos níveis ósseos de cálcio, fósforo, magnésio e zinco e prejuízo à saúde cardiovascular por aumento nos índices que avaliam o risco da doença, redução dos índices anti-aterogênicos e aumento dos níveis séricos que avaliam função do coração (Sahin et al., 2021; Ismail et al., 2022; Liao et al., 2022).

Afora as consequências à exposição direta à dieta hiperlipídica, também vêm sendo avaliado como a exposição indireta intrauterina ou durante a lactação à dieta materna hiperlipídica pode afetar a prole desde o nascimento até a idade adulta mediante a aplicação em modelos animais, tópico este que será aprofundado no item a seguir.

5.5 Programação do desenvolvimento por consumo de dieta materna hiperlipídica em pesquisas pré-clínicas

Diante do vultuoso aumento de casos de diabetes gestacional e do sobrepeso na gravidez decorrentes dentre outros do tipo de alimentação retro relatada, estes foram os primeiros enfoques das pesquisas clínicas sobre tema, a quais passaram a correlacionar agravos de saúde em proles provenientes de gestação em que foi constatada obesidade materna, a exemplo de predisposição à síndrome metabólica, desenvolvimento de obesidade na idade adulta, hiperfagia e defeitos do tubo neural (Stothard, et al., 2009). 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 consumidos em quantidades provocam aumento do risco para certas doenças, sinalizando que os cuidados devem ser adotados muito antes da concepção (Lowensohn; Stadler; Vaze, 2016).

Inúmeras variações na ingesta 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). 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 (Youness et al., 2022). Dietas hiperlipídicas, 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; 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, bem como deve haver redução da ingestão de carne vermelha, açúcares adicionados e comidas processadas (Abdollahi, et al., 2021). No entanto, infelizmente, as nações ocidentais testemunharam um aumento progressivo no número de jovens nascidos após o consumo de dieta hiperlipídica materna durante a gravidez e a lactação e a prevalência de obesidade materna na pré-concepção também aumentou nas últimas décadas (Sullivan; Nousen; Chamlou, 2014). Conjuntamente, 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, dificultando a ampliação de pesquisas na área clínica (Lowensohn; Stadler; Vaze, 2016).

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, que é o modo em que o presente trabalho pretende avaliar a influência de uma dieta materna hiperlipídica durante o pré-natal, a gestação e o lactação no desenvolvimento endócrino-metabólico e ósseo da prole. Os primeiros estudos envolvendo modificações em fetos de animais 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* hiperlipídicas ou ricas em gordura saturada *versus* ricas em gordura instaurada (Pinhas-Hamiel et al, 1996, Deckelbaum; Williams, 2001).

Devido aos provável efeitos da obesidade materna sobre o desenvolvimento fetal e a maioria das dietas consumidas na atualidade serem representadas pelo consumo de alimentos altamente gordurosos, pesquisadores passaram a promover esforços no sentido de avaliar parâmetros cerebrais relacionados ao controle do apetite quando presente exposição à alimentação hiperlipídica nos períodos de pré-natal, gravidez e pós-natal recente e tardio para mensurar se os fenótipos desenvolvidos pelas mães poderia também ser estimulado nas proles. Uma das primeiras publicações relevantes sobre o tema, da autoria de Chang e colaboradores, revelou que a prole de ratos exposta à dieta materna hiperlipídica demonstrou aumento do peso corporal, preferência por alimentos gordurosos, elevação dos níveis séricos de triglicerídeos, leptina e insulina e maior acúmulo de gordura corporal (Chang et al., 2008).

Um outro estudo publicado nos primeiros anos depois de iniciadas as pesquisa no tema revelou que a prole de roedores quando exposta à dieta hiperlipídica indutora de obesidade demonstrou acúmulo de lipídios peroxidados no hipocampo, obesidade, níveis séricos anormais de colesterol, ganho de peso corporal, tamanho aumentado dos adipócitos e acúmulo excessivo de lipídios no fígado (Tozuka, Wada, Wada, 2009). Nesta seara, importante salientar que a exposição materna a dieta hiperlipídica rica em gordura saturada e a presença de obesidade na mãe nos períodos pré-concepção, gestação e lactação pode igualmente descompensar o metabolismo materno e desregular o equilíbrio entre as reações de oxidação e redução na unidade formada entre mãe-placenta e feto, potencializando os efeitos negativos da dieta hiperlipídica em coocorrência de ambos (Urbonaite et al., 2022).

Mediante análise detalhada em revisão sistemática sobre os distúrbios do perfil lipídico causados por exposição à dieta materna hiperlipídica em prole de ratos foi observado que se tem especialmente aumento dos níveis de triglicerídeos e colesterol total após a manipulação nutricional da gestação até a lactação (Ribaroff, et al., 2017). Em relação ao colesterol não-HDL, estudos descrevem um aumento nos níveis séricos desse marcador de status lipídico em filhotes de roedores expostos à dieta materna hiperlipídica (Dumolt et al., 2019; Takashima et al., 2021). No entanto, as alterações nos níveis séricos de HDL após dieta materna hiperlipídica em ratos não é um consenso científico, pois tanto o aumento quanto a diminuição foram relatados (Dong et al, 2011; Oliveira et al., 2011; Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017). Tellechea, Mensegue e Pirola realizaram uma revisão sistemática e meta-análise sobre a associação entre a dieta materna hiperlipídica e o fenótipo da síndrome metabólica da prole e relataram que poucos autores avaliaram a HDL e sugerem três hipóteses de forma: o pequeno efeito nas proles, que a programação precoce não ocorreria em ratos e o potencial reverso do efeito pelo acesso da prole à ração padrão após o desmame (Tellechea; Mensegue;

Pirola, 2017). Aprofundando a questão, a revisão também detalhou que as circunstâncias da idade materna (adulta jovem) no início da exposição, dieta materna na gestação e na lactação e a fonte animal de gordura influenciam na diminuição dos níveis de HDL (Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017).

Além disso, o aumento da gordura corporal, como o maior acúmulo de tecidos adiposos abdominal e perigonadal tem sido frequentemente associado a fenótipos de prole de ratos como efeitos metabólicos de longo prazo após exposição à dieta materna hiperlipídica e na prole de ratos machos independente do método utilizado para determinar a adiposidade, incluindo o peso do tecido adiposo, o excesso de gordura nas regiões foi determinado (Ribaroff et al., 2017; Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017). Outras publicações sobre a programação nutricional do metabolismo por dieta materna hiperlipídica e em relação reportam resistência à insulina, desenvolvimento intestinal inibido e microbiota intestinal alterada e esteatose hepática (Wankhade et al., 2018; Xie et al., 2018; Akhaphong et al., 2022). Ademais, desfechos recentemente relatados sobre o tema são aumento da elasticidade do tendão supraespinal, atraso no desenvolvimento físico e neurocomportamental, alterações moleculares relacionados ao transtorno do espectro do autismo, aumento do comportamento anedônico e expansão do aneurisma da aorta abdominal (Giriko, et a., 2013; Bolam et al. 202; Curi et al., 2021; Gawlińska et al., 2021, Saburi et al., 2021).

Embora já se conheça bastante sobre o impacto ao desenvolvimento do metabolismo da prole após exposição à dieta materna hiperlipídica, até o momento, a maioria das pesquisas pré-clínicas se concentrou na composição corporal, consumo absoluto de alimento, marcadores de diabetes, e em hormônios relacionados ao apetite no estágio fetal, nascimento, desmame ou idade adulta. E, ainda que o metabolismo tenha sido bastante pesquisado,

parâmetros de composição corporal e alimentares foram limitadamente relatados, há discordância sobre determinados marcadores lipídicos e avaliação destas variáveis conjuntamente a dos HTs, os quais como se verá a seguir estão intimamente ligados ao metabolismo lipídico, não foi suficientemente explorada, em especial durante a adolescência, implicando na necessidade de estudos (figura 2).

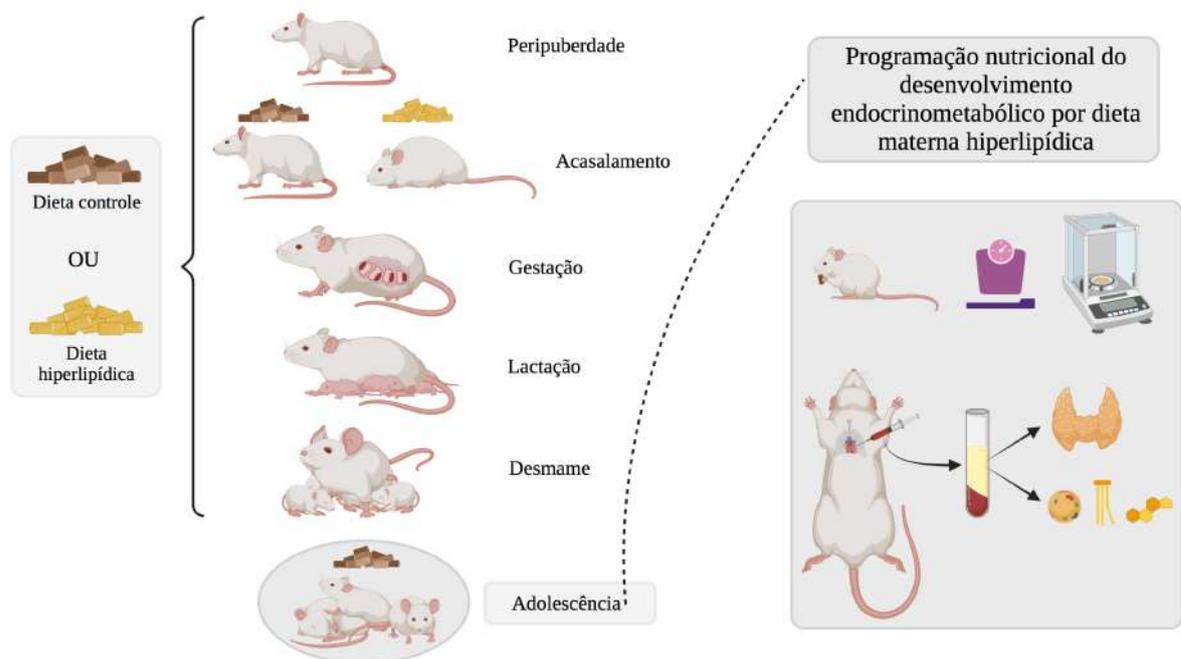


Figura 2 - Proposta de modelo exposição à dieta materna hiperlipídica para avaliar o metabolismo (eficiência alimentar, índice de massa corporal, gordura abdominal e níveis séricos de lipídios) e hormônios da tireoide circulantes na prole adolescente.

Sobre a glândula tireoide pouquíssimo foi analisado no que concerne às alterações do órgão ou da biossíntese de seus produtos após exposição à dieta materna hiperlipídica. Suter e colegas relataram disfunção tireoidea fetal em um de modelo primata não humano de dieta materna hiperlipídica devido à diminuição do níveis séricos de HTs e na transcrição de genes necessários para produzir HTs, alteração no código de histonas do promotor de receptores de

HTs e interrupção na expressão de enzimas atuantes na produção biológica de tais hormônios (Suter et al., 2012). Portanto, os autores demonstraram que a exposição à dieta materna hiperlipídica impacta negativamente o eixo tireoideo-fetal por meio de alterações transcricionais e epigenéticas em mamíferos (Suter et al., 2012). Além disso, dois modelos de programação de desenvolvimento expondo ratas Wistar à dieta materna hiperlipídica com 28.6% de energia proveniente de gordura do pré-natal ao desmame, avaliaram HTs no soro ao desmame e na idade adulta da prole, revelando níveis séricos de HTs aumentados no desmame (Franco et al., 2012) e nenhuma alteração na idade adulta (Franco et al., 2012; Souza et al., 2019).

Diferentemente dos aspectos pertinentes ao metabolismo e aos HTs, o desenvolvimento somático da prole expostas à dieta materna hiperlipídica já foi melhor estudado, sendo que, no entanto, ainda persistem pontos a serem esclarecidos. Estudos realizados para avaliar o desenvolvimento ósseo de fetos em roedores observaram que a partir do 17º dia embrionário os animais expostos à dieta materna hiperlipídica apresentam tamanho pequeno para a idade gestacional, maior taxa de reabsorção fetal, diminuição do comprimento e de ossos longos fetais, decréscimo na formação óssea, no volume ósseo total e na mineralização, aumento de marcadores de senescência e redução do potencial para diferenciação de osteoblastos (Liang et al., 2009; Niculescu; Lupu, 2009; Chen et al., 2012; Chen et al., 2018). Já nos primeiros dias após o nascimento, mais especificamente dias 1 e 2, em proles de ratas Wistar alimentadas com dieta hiperlipídicas (52% de energia proveniente de gordura) somente durante a gestação foi encontradas reduções expressivas no comprimento corporal e nos comprimentos cerebrais dos eixos mediolateral e anteroposterior (Giriko et al., 2013).

Durante a lactação da prole de machos e fêmeas de ratas Wistar expostas à dieta hiperlipídica (41% de energia proveniente de gordura) desde 10 semanas antes do acasalamento até o dia 19 de vida dos filhos, idade da análise, restou demonstrado que o fêmur das proles do grupo experimental apresentou aumento da densidade mineral óssea, maior conteúdo percentual molar de ácidos graxos insaturados e menos concentração de ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6, estando o último correlacionado com a densidade e o conteúdo mineral ósseos (Miotto et al., 2013; Miotto et al., 2015). Em proles de ratas expostas à dieta hiperlipídica (60% de energia proveniente de gordura) apenas durante a gestação e a lactação foi demonstrado que ao nascimento e ao desmame houve aumento da fração do volume de osso trabecular provavelmente proveniente do aumento da atividade osteoblástica e em 15 semanas pós-natal redução do tamanho do fêmur e do fração do volume de osso trabecular em machos e aumento do número e da superfície de osteoclastos (Kushwaha et al., 2021).

Outro estudo em proles adultas (22 semanas de vida) de ratas expostas a dieta materna hiperlipídica induzida desde 6 semanas antes do acasalamento até o desmame relatou aumento das frações absoluta e proporcional do volume de osso trabecular e da espessura óssea da 5^a vértebra, sendo que nesta pesquisa foi analisado também o peso corporal dos animais em 8, 18 e 22 semanas após o nascimento e tanto em 8 quanto em 18 semanas as proles apresentam menor peso corporal do que os animais do grupo controle, o que não ocorreu nas 22 semanas, podendo indicar diferenças corporais entre o período do início da vida adulta (8 semanas) e a idade em que houve a criteriosa avaliação óssea (Peric Kacarevic et al., 2016). Contudo, percebe-se que existe um lapso de tempo ainda não analisado, sobretudo no que se refere a um percentual intermediário de conteúdo de gordura na dieta materna hiperlipídica dentro do que pode ser considerado o modelo proposto para simular

humano de dieta ocidental mais adequado, qual seja o período entre o desmame e a idade adulta, que é representado pela adolescência em ratos da estirpe Wistar (figura 3).

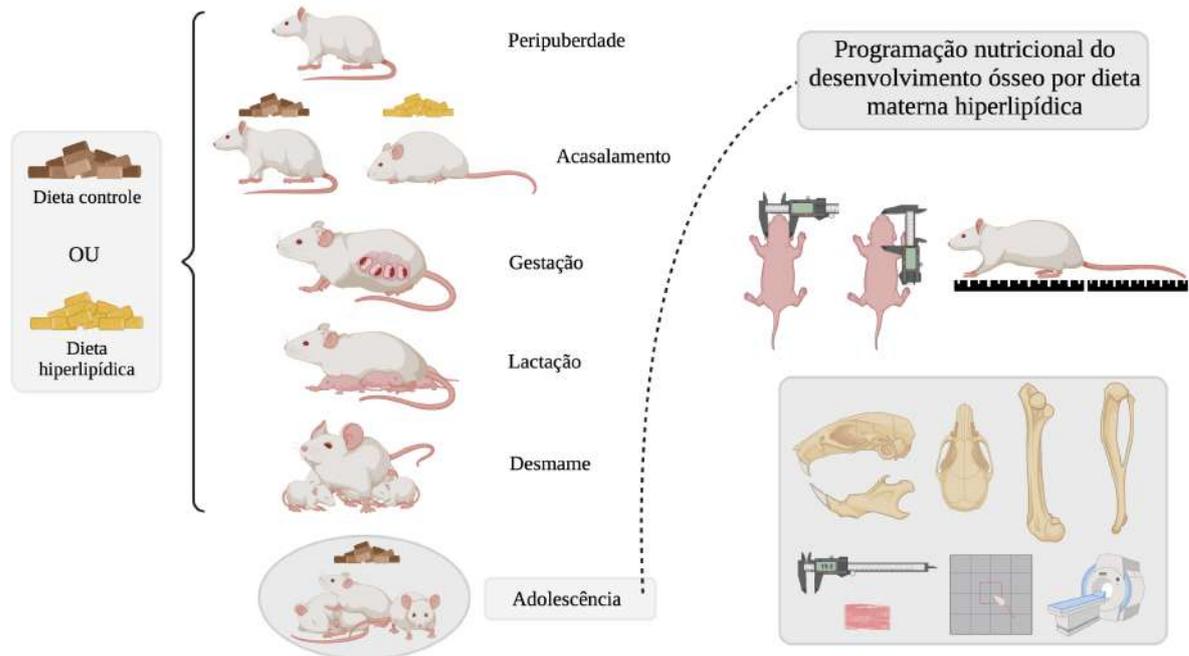


Figura 3 - Proposta de modelo exposição à dieta materna hiperlipídica para avaliar o desenvolvimento ósseo da prole por meio de medidas corporais (eixos cranianos e comprimentos corporal e da cauda), teste locomoção e avaliação da estrutura óssea (comprimentos ósseo de crânio, mandíbula, fêmur e tíbia, histologia óssea de osso longos e curtos e análise de imagem).

Por fim, no que diz respeito à saúde cardiovascular das proles expostas à dieta materna hiperlipídica, embora muito seja explorado sobre as alterações histomorfométricas cardíacas durante a lactação e em idade adulta, ainda não existem relatos acerca do risco de doença cardiovascular em qualquer idade. Ao longo dos anos desde que o iniciou-se o estudo em animais sobre a influência da dieta materna hiperlipídica (60% de energia proveniente de gordura) no desenvolvimento cardíaco de ratos denotou-se que no estágio fetal e os primeiros dias de vida existem alterações de aumento do peso do coração, do tamanho e da porcentagem

de cardiomiócitos, desorganização miofibrilar do miocárdio e do ventrículo esquerdo; já em camundongos expostos a dieta materna com o mesmo percentual de gordura foi observado em estágio embrionário (17 dias de gestação) a presença de defeito na formação da artéria aorta, mudanças na formação do septo ventricular e aumento do número de células apoptóticas no endocárdico e no miocárdio ventricular (Yanqing Wu, et al., 2017 Xue et al., 2019) .

O aumento do peso do coração foi reportado também em diversos momentos da idade adulta tanto de ratos quanto de camundongos expostos a dieta materna hiperlipídica com variadas concentrações de gordura, sendo encontrado: (1) hipertrofia em cardiomiócitos de ratos SD com 77 dias de vida, (2) aumento da espessura do ventrículo esquerdo, do fração de elastina e da quantidade e área de ocupação de colágeno, em coração de ratos Wistar com 100 dias de vida, (3) aumento importante de áreas de lesão ateroscleróticas em camundongos C57BL/6J machos e fêmeas com 140 dias de idade, (4) aumento do lúmen aórtico de rato Wistar com 180 dias de vida, e (5) diminuição do volume de células endoteliais aórticas de ratos SD machos e fêmeas com 180 dias de idade (Parente; Aguila; Mandarin-de-Lacerda, 2008; Armitage et al., 2015; Wakana et al., 2015; Vicente et al., 2016; Siddeek et al. 2019; Vicente et al., 2019).

A relevância desses achados importa na necessidade de avaliação de parâmetros que possam trazer ainda mais prejuízos àqueles já detectados no momentos anteriores ao nascimento e nos primeiros dias de pós-natal e em conjunto atuem para potencializar o risco de aparecimento de condições relacionadas às doenças cardiovasculares como a aterogênese. A desregulação dos componentes do perfil lipídico, que tem de um lado os lipídios potencialmente aterogênicos colesterol e triglicerídeos e de outro a lipoproteína anti-aterogênica HDL, pode gerar a predição de eventos cardiovasculares mediante o cálculo de

índices aterogênicos, o que facilita o acesso ao risco cardiovascular visto que são parâmetros bioquímicos passíveis de serem acessados via análise sorológica (Zhu et al, 2015). No entanto, é possível que muitos estudos sobre efeito da dieta materna hiperlipídica nas proles não tragam esse tipo de variável, pois em virtude de a HDL ser usado como integrante das equações que geram os índices citados e a maioria das pesquisas sobre o assunto não relatar o marcador lipídica como dito anteriormente, fica prejudicada a análise e por isso não haja relatos sobre o desfecho até então.

Ademais, outros possíveis preditores de risco cardiovascular, como aumento dos níveis séricos de marcadores de inflamatórios interleucinas 1 (IL-1) e 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral α (TNF- α) e da enzima γ -glutamil transferase (γ -GT), esteatose hepática não-alcoólica, acúmulo de gordura abdominal, obesidade e hipotireoidismo não foram avaliados conjuntamente em prole exposta à dieta materna hiperlipídica (Biondi; Klein, 2004; Kastrati, 2016; Villanueva et al., 2018; Cercato; Fonseca, 2019; Tana et al. 2019; Amin et al., 2020). Considerando-se que o quanto antes esses preditores possam ser identificados, sendo que todos aqui descrito apresentam fácil acesso mediante técnicas pouco ou nada invasivas, é possível tentar diminuir o risco e promover uma melhor expectativa de vida diante das altas taxas de morbidade e mortalidade exibidas nas doenças cardiovasculares. Porém, para que sejam adotadas medidas que ajudem a mitigar os riscos, como acontece com as mudanças de hábitos alimentares e a prática de exercício físicos e o tratamento correto de hipotireoidismo, é muito importante rastrear o quanto antes o aparecimento de tais fatores de perda e pelo fato de as alterações subclínicas relacionadas à aterogênese iniciarem em fase precoces com observação de doenças inflamatória desde a infância.

O estudo de riscos cardiovasculares em adolescentes (ERICA) na forma de inquérito multicêntrico de base escolar realizado no Brasil identificou que dentre 70 mil estudantes de 12 a 17 anos 25,5% apresentavam obesidade ou sobrepeso, 47,3% possuíam níveis séricos baixos de HDL e 2,6% eram acometidos por síndrome metabólica, o que coloca essa faixa etária como um relevante período para adoção de estratégias de intervenção que atinjam fatores de risco modificáveis (Cureau et al., 2019). Assim, ainda que muito se recorra aos modelos animais para avaliar a programação nutricional por dieta materna hiperlipídica, o risco de doença cardiovascular ainda não foi avaliado e, pelo que se depreende dos estudos em humanos, analisar os fatores de risco mencionados na adolescência parece ser ideal no sentido de observar se os efeitos da dieta materna estão presentes mesmo com a cessação da exposição indireta a partir da lactação (Lewitt; Baker, 2020) (figura 4).

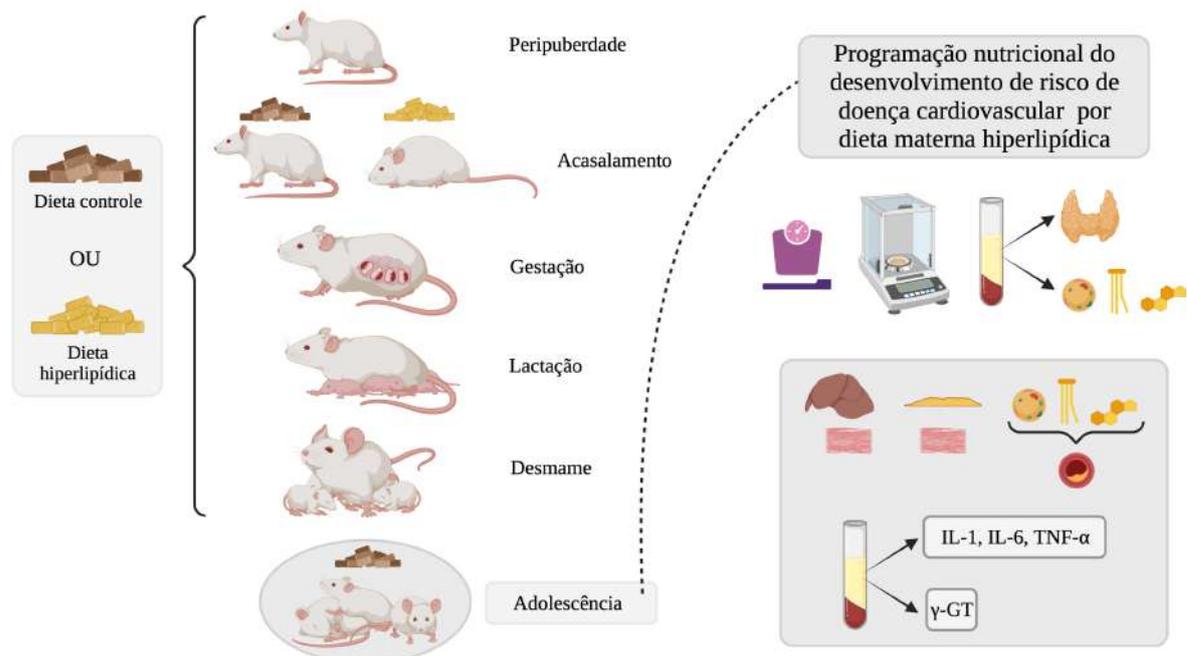


Figura 4 - Proposta de modelo exposição à dieta materna hiperlipídica para avaliar a existência do risco de doenças cardiovascular mediante análise dos seguintes fatores: obesidade/sobrepeso, acúmulo de gordura corporal, hipotireoidismo, alteração no perfil lipídico, elevação dos índices aterogênicos, esteatose hepática, alterações morfológicas do tecido adiposo e aumento dos níveis séricos de IL-1, IL-6, TNF- α e γ -GT.

Com isso, juntando as informações expostas até então sobre modelos de animais de simulação de consumo humano de dieta ocidental e a aplicação de seus métodos para observação de programação nutricional é preciso ter em mente que a literatura tem mostrado extensivamente que modelos animais que pretendem reproduzir os hábitos alimentares de humanos na dieta ocidental precisam usar um regime de dieta hiperlipídica de longo prazo, direcionando a escolha para início da manipulação da dieta materna por volta da puberdade, permitindo indução da obesidade até o acasalamento. Além disso, como dito anteriormente tem sido demonstrado que para observar a programação do desenvolvimento do metabolismo da prole após a exposição materna à dieta materna, recomenda-se dieta à base de banha com fontes de gordura representando 40 a 60% da energia total, devendo-se respeitar tal intervalo para que se reproduza um modelo adequado (Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017).

Outro ponto a ser observado sobre a dieta é que as dietas hipercalóricas maternas que promovem a obesidade materna e se estendem do período pré-natal ao desmame são mais influentes na programação de alteração metabólica da prole, implicando em necessidade de atentar-se ao conteúdo calórico e iniciar precocemente à exposição das futuras mães à dieta hiperlipídica. Por fim, em ratos, a manutenção da dieta hiperlipídica na amamentação e a obesidade preexistente ao acasalamento afetam a composição lipídica do leite materno (aumento do conteúdo de ácidos graxos de cadeia longa em detrimento dos ácidos graxos de cadeia média), levando a um comportamento alimentar modificado do filhote e provavelmente contribuindo para as mudanças metabólicas de longo prazo na prole, o que igualmente precisa ser levado em consideração ao pensar-se na metodologia de projeto que pretenda estudar o assunto (Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017).

Sublinhadas tais considerações, é preciso sinalizar que para melhor compreensão de como a dieta hiperlipídica materna poderia influenciar no comprometimento da glândula

tireoide e nos parâmetros metabólicos relacionados, alguns dos principais desfechos do presente projeto, se faz importante o esclarecimento acerca do metabolismo e dos efeitos dos hormônios tireoideos e de como os modelos animais para doenças da tireoide, sobretudo quando há deficiência na produção hormonal, vêm sendo apresentado pela literatura, já que é de amplo conhecimento que há papel fundamental da tireoide no delineamento do perfil lipídico e no desenvolvimento dos sistemas ósseo e o cardiovascular.

5.6 Metabolismo e efeitos dos hormônios tireoideos

5.6.1 Metabolismo dos hormônios tireoideos

A tireoide é uma glândula endócrina bilateral presente em todos os vertebrados e localizada na região inferior do porção anterior do pescoço cuja função é produzir e secretar HTs bem como de controlar a homeostase de iodo no organismo (Walling; Picut; Remick, 2016). Em humanos, o primeiro divertículo da tireoide se forma na quarta semana do desenvolvimento como uma proliferativa massa sólida do endoderma no forame ceco que se tornará a língua, migrando posteriormente para baixo no pescoço em desenvolvimento via ducto tireoglosso em direção à cartilagem cricoide, onde irá permanecer (Stewart; Rizzolo, 2012). Quando o desenvolvimento ocorre normalmente, o ducto tireoglosso involui ao redor do final da quinta semana (Stewart; Rizzolo, 2012). A tireoide isolada desenvolve dois lobos distintos conectados por um istmo ao tecido e continua a descender até alcançar o seu destino final ao redor do final da sétima semana de desenvolvimento embrionário (Stewart; Rizzolo, 2012). A seguir, as células dos corpos ultimobraquiais invadem a tireoide em desenvolvimento e formam as células parafoliculares, ou células C, que produzem calcitonina (Stewart;

Rizzolo, 2012). Enfim, o tecido conjuntivo da glândula da tireoide se forma a partir de célula invasoras da crista neural (Stewart; Rizzolo, 2012). A glândula da tireoide é o primeiro órgão endócrino a se tornar ativos em humanos, o que acontece por volta da 24^a semana de gestação e permite o desenvolvimento dos órgãos fetais dependentes de HTs (Stewart; Rizzolo, 2012).

Em ratos, o desenvolvimento da glândula da tireoide pode ser considerado atrasado quando comparado ao humano tanto no que diz respeito ao estágio fetal quanto ao pós-natal, pois nestes roedores até o dia gestacional 17 a glândula da tireoide não produz hormônios ativamente, significando que até próximo do parto há inatividade glandular, uma vez que o tempo médio de gestação em ratos é de 21 dias (Choksi et al., 2003). Há também imaturidade dos ratos ao serem comparados aos humanos quando se trata do estado da glândula tireoide e do eixo hipotálamo-pituitária-tireoide ao nascimento, sendo que o processo de amadurecimento em tais animais irá ocorrer durante os estágios neonatal e infantil de desenvolvimento e na primeira metade da fase juvenil e a maturação completa tanto da glândula quanto do eixo ocorrerá tão-só após os 28 dias de nascimento, cerca de uma semana após desmame que normalmente acontece aos 21 dias; já em humanos o amadurecimento de ambos se dá na metade do estágio neonatal (Stolc; Knopp, 1982; Walling; Picut; Remick, 2016).

A glândula da tireoide em ratos amplia seu tamanho devido ao aumento da quantidade de deposição de colóides (substância clara rica em proteínas) e à proliferação de células foliculares epiteliais tireoideas durante a lactação, momento em que paralelamente há elevação dos hormônios tireotrofina pituitária, ou hormônio estimulante da tireoide (TSH, do inglês *thyroid-stimulating hormone*), e tiroxina (3,5,3',5'-tetraiodotironina ou T4) (Walling; Picut; Remick, 2016). Além das células foliculares, foram a glândula da tireoide as células parafoliculares C, cuja função é produzir o hormônio calcitonina que irá atuar na presença da

redução de cálcio sérico e regulará a concentração deste íons em conjunto com o hormônio da paratireoide (Walling; Picut; Remick, 2016). À microscopia óptica as células C somente se tornam visíveis nos ratos no dia pós-natal 21, as quais a partir de então apresentam baixa atividade mitótica até o dia pós-natal 42 (Walling; Picut; Remick, 2016).

Estudos estereológicos demonstram que entre o dia de nascimento dos ratos e o dia pós-natal 120 o número de células C na glândula tireoide aumenta em nove vezes e o tamanho celular quadriplica, sendo que a densidade diminui entre duas e três vezes (Conde et al., 1995). Entre os dias 40º e 42º após o nascimento a glândula tireoide dos ratos começa a apresentar dimorfismo sexual, sendo que nos machos adultos as células epiteliais foliculares são mais volumosas e contêm vacúolos citoplasmáticos, além de possuírem menos molóides quando comparadas com a das fêmeas (Banu; Govindarajulu; Aruldas, 2002). O dimorfismo deriva de que o hormônio andrógeno sensibiliza as células foliculares epiteliais de machos a efeitos estimulatórios de TSH, estando esta mudança fisiológica correlacionada com o rápido aumento dos níveis andróginos durante o período peripuberal (Banu; Govindarajulu; Aruldas, 2002).

Depois de estar constituída e madura, em ambas espécies citadas a glândula tireoide passa liberar no sistema circulatório T₄, que é considerado um pró-hormônio, e 3,5,3'-triodotironina (T₃), o hormônio considerado biologicamente ativo devido à interação de alta afinidade (10 vezes maior) com os receptores intracelulares dos HTs e promover ações essenciais para o desenvolvimento do sistema nervoso, o crescimento linear, o metabolismo energético, a termogênese, o metabolismo hepático de nutrientes, a homeostase dos fluídos corporais e do sistema cardiovascular (Ortiga-Carvalho et al., 2016). A produção dos HTs é determinada pelo eixo hipotálamo-pituitária-tireoide mediante controle em feedback negativo pelos seguintes passos: o hormônio liberador de tireotrofina hipotalâmico (TRH, do inglês

hypothalamic thyrotrophin-releasing hormone) estimula a síntese e a secreção de TSH, que por sua vez estimulará a glândula tireoide a estimular as etapas endógenas de biossíntese e secreção de HTs, os quais irão controlar a secreção de TRH e TSH para manutenção de seus níveis fisiológicos (Ortiga-Carvalho et al., 2016). Dito isso, importante mencionar que diante de uma redução nos níveis circulantes de HTs aumentará a produção e a secreção de TRH e TSH, enquanto o oposto ocorrerá caso haja aumento nos níveis plasmáticos de T4 e T3 (Ortiga-Carvalho et al., 2016).

Os HTs são metabolizados por glicuronidação, sulfatação e deiodinação, sendo que o metabolismo mais frequente ocorre por deiodinação mediante a conversão de T4 em T3 pela ação das iodotirosina deiodinases tipo 1 (DIO1) e tipo 2 (DIO2) por ação deiodinase no anel externo 5', a degradação de T4 em T3 reverso (rT3, metabólito sem habilidade de ligação ao receptor de hormônios tireoideos) por DIO1 ou deiodinase tipo 3 (DIO3), a degradação de T3 por DIO1 ou DIO3 e de rT3 por DIO1 ou DIO2 em 3,3'-diiodothyronine (3,3'-T2) (metabólito inativo) e outras diiodotironinas e monoiodotironinas presentes no soro apenas como traços. Assim sendo, o metabolismo dos HTs por meio das enzimas deiodinases determina a atividade biológica de tais hormônios e a regulação da deiodinação é um importante passo no controle deste processo (Peeters; Visser, 2000; Ortiga-Carvalho et al., 2016).

Em humanos, a enzima DIO1 é predominantemente expressa na glândula tireoide, cérebro, fígado e rim, a enzima DIO2 é expressa na glândula tireoide, no cérebro, na hipófise, no tecido adiposo marrom, na útero, na placenta e nos músculos esquelético e cardíaco e a enzima DIO3 é altamente expressa no sistema nervoso central, placenta, tecidos fetais e neonatais (Ortiga-Carvalho et al., 2016). A alta expressão de DIO3 em tecidos fetais humanos, sobretudo placenta, principalmente durante a segunda semana de gestação é importante em

função do início da atividade da glândula da tireoide no feto (Ortiga-Carvalho et al., 2016). Em ratos, embora a expressão das enzimas deiodinases apresenta-se bastante semelhante, no entanto, a expressão da enzima DIO2 restringe-se a à hipófise, ao cérebro, ao tecido adiposo marrom, ao útero e à placenta, sendo expressa em níveis extremamente baixo (Gereben et al., 2011; Bernal, 2017). Além disso, na placenta de ratos existe um rápido aumento de DIO3 entre os dias 14 e 16 ou 17 de gestação e a seguir uma redução na expressão é observada (Yoshida; Suzuki; Sakurada, 1984). À título de curiosidade, a disponibilidade do ácido desoxirribonucleico complementar de DIO1 de rato foi proveu a primeira sequência primária de enzimas deiodinases, revelando diversas características importantes da estrutura e da atividade enzimática (Bianco et al., 2002).

DIO1 e DIO3 se encontram localizadas na membrana plasmática e DIO2 se situa no retículo endoplasmático (Gereben et al., 2008a; Gereben et al., 2008b). A expressão de DIO1 na membrana plasmática é útil à produção extracelular de T3 em e humanos contribui significativamente para o pool plasmático de T3 (Gereben et al., 2008a; Gereben et al., 2008b). A proximidade de DIO2 do núcleo, por estar localizada no retículo endoplasmático, contribui para a disponibilização de T3 a nível intracelular e apresenta duração aproximada de 30 minutos por degradação proteosomal por mecanismo acelerado por T4 ou rT3, diferente de DIO1 e DIO3 que apresentam longas meias-vidas, cujo tempo é de aproximadamente 12 horas para DIO1 (Gereben et al., 2008a; Gereben et al., 2008b). O hormônio T4 reduz a atividade de DIO2 rápida e potencialmente para controlar com eficácia a disponibilidade de T3 nos tecidos, sendo que em situações em que haja diminuição dos níveis séricos de T4 ocorre o aumento da atividade de DIO2 em tecido como o sistema nervoso central para preservar o nível intracelular de T3 (Gereben et al., 2008a; Gereben et al., 2008b). Outro tecido que se promove essa intensificação na produção de DIO2 é o ósseo, o que foi

demonstrado pela mineralização óssea prejudicada e aumento do risco de fratura em camundongos com *knockout* genético de DIO2 e em humanos que carregam polimorfismo *missense*³ no gene *Dio2* (Heemstra et al., 2009; Bassett et al., 2010).

Na glândula tireoide, DIO1 é predominantemente regulada por TSH e na presença de hipotireoidismo⁴, condição em que os níveis de TSH estão elevados predominando sobre níveis reduzidos de HTs, a expressão da enzima DIO1 na glândula tireoide é altamente estimulada, o que pode ser estimado pela razão dos valores molares dos níveis séricos entre T3 e T4, sobretudo, pela condição anteriormente narrada de na tireoide de ratos haver atividade enzimática apenas de DIO1 (St Germain,; Galton; Hernandez, 2009; Dietrich et al., 2016). DIO2 atua sobre controle inibitório dos HTs e igualmente tem sua expressão aumentada em caso de hipotireoidismo, o que em ratos acontece a nível extratireoideo em virtude da baixa expressão desta enzima na glândula tireoide, e na ocorrência de hipertireoidismo⁵ haverá redução de atividade enzimática na tentativa de diminuir a quantidade de T3 disponível. Por fim, e como não poderia deixar de ser, a atividade de DIO3 é aumenta no hipertireoidismo e reduzida no hipotireoidismo (Ortiga-Carvalho et al., 2016).

Dito isso, é possível inferir que as deiodinases contribuem de forma inequívoca para manutenção dos níveis plasmáticos e intracelulares de T3. Em humanos saudáveis, apenas uma pequena fração de T3 sérico deriva de secreção pela glândula tireoide, pois a maciça quantidade de T3 circulante provém de deiodinação extratireoidea. Enquanto cerca de 20% dos níveis circulantes de T3 em humanos são derivados da glândula tireoide, em ratos esse

³ O polimorfismo de mutação *missense* ocorre quando há uma mudança no DNA que resulta em uma aminoácido diferente sendo codificado em uma posição particular da proteína resultante, o que pode implicar em alteração de função.

⁴ Hipotireoidismo corresponde a denominação da síndrome que resulta em secreção anormalmente baixa de hormônios tiroideos pela glândula da tireoide, gerando decréscimo da taxa metabólica basal.

⁵ O hipertireoidismo decorre da hipersecreção dos hormônios tiroideos pela glândula tireoide, o que provoca aumento da taxa metabólica basal.

percentual é de até 60%, indicando participação mais /pronunciada desse órgão endócrino em roedores do que em humanos (Ortiga-Carvalho et al., 2016) (figura 5).

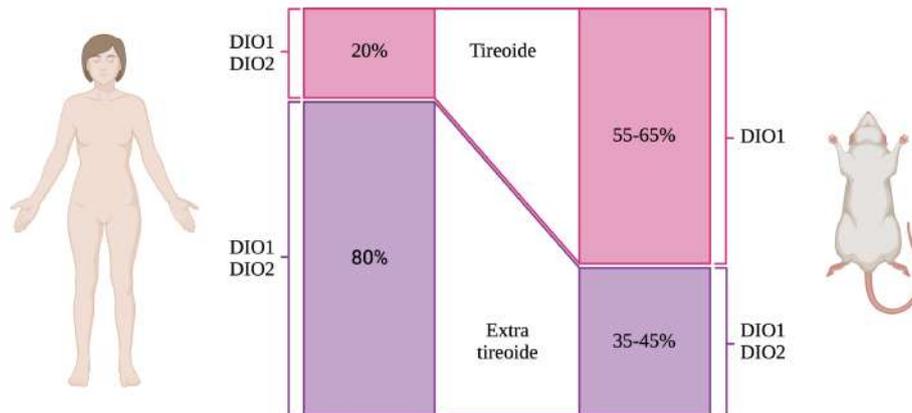


Figura 5 - Diferenças entre os percentuais de produção de T3 pela glândula tireoide e por células localizadas extratireoide no ser humano e no rato conforme a participação das enzimas deiodinases DIO1 e DIO2.

No primeiro estudo em ratos que dirimiu a celeuma existe sobre essa questão, também esclareceu que em ratos T3 pode ser fornecido a partir da síntese de novo na tireoide, ou deiodinação fenólica ou tirosil de T4 no nível do tecido (Chanoine et al., 1993). Assim, a proporção de T3 circulante em ratos torna a análise desses níveis séricos tão útil para prever a saúde da tireoide quanto a avaliação de T4 (figura 6).

5.6.2 Efeitos dos hormônios tireoideos

Os HTs exercem seus efeitos mediante os receptores de hormônio da tireoide, os quais são parte da superfamília de receptores nucleares que medeiam a ação genômica de compostos como hormônios, esteroides, vitaminas e outros sinalizadores químicos e são altamente conservados entre as espécies, de invertebrados a vertebrados complexos. A

relevância dos HTs na evolução é considerada um ponto-chave devido a sua partição nos processos de diferenciação, crescimento e metabolismo de diversos organismos, sendo que o seu envolvimento regulação da transcrição de genes é visto como o principal mecanismo para explicar a ação hormonal. Em ratos, foi observado que na presença de hipotireoidismo T3 estimula a síntese de ácido ribonucleico no fígado precedendo tanto a síntese de proteínas quanto a oxidação mitocondrial (Kelley; Turner; RehKeay, 1995; Thornton, 2009; Wiesner et al., 2010; Brent, 2012; Ortiga-Carvalho et al, 2016).

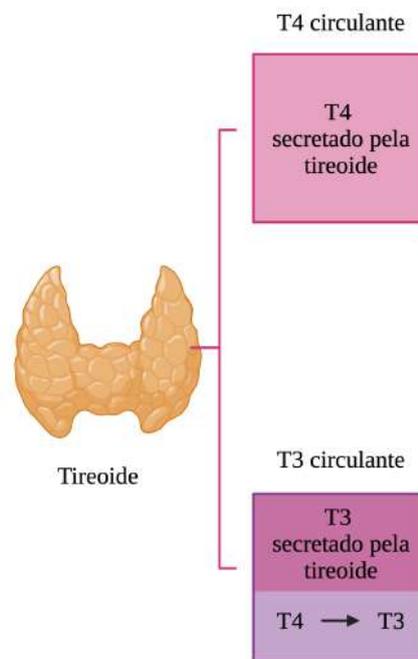


Figura 6 - Na circulação de ratos 100% de T4 provém da glândula tireoide, enquanto entre 55 a 65% de T3 ocorre via secreção glandular e 35 a 45% é convertido a partir de T4 na periferia, o que pode ocasionar a redução de ambos hormônios condições anormais de funcionamento do órgão endócrino.

Afora os efeitos genômicos, os HTs exercem ações não genômicas, no entanto, há predomínio de regulação gênica mediada por receptores a nível nuclear (Ortiga-Carvalho et al., 2016). Posteriormente à entrada nas células, os HTs migram para o núcleo, onde se ligam

aos receptores com alta afinidade e especificidade e formam um complexo que aciona o processo de regulação da transcrição de genes, que pode estimular ou inibir a expressão da proteína codificada (Davis; Davis, 2002; Cheng; Leonard; Davis, 2010). As ações não genômicas ainda precisam de maiores esclarecimentos, porém, vêm sendo constantemente estudadas e a maioria dos efeitos intracelular não genômicos conhecidos é independente de ferramentas transcricionais, atividade de receptor nuclear e síntese protéica, e apresenta como características curta duração, variando entre segundos e minutos, e ocorrência na membrana celular, na mitocôndria e em outras organelas (Ortiga-Carvalho et al, 2016). Um dos melhores efeitos não canônicos descritos é indução de polimerização da actina nos astrócitos, segundo estudo realizado *in vitro*, o qual destacou a importância do evento para organização da orientação neural de moléculas extracelulares no processo de neurodesenvolvimento (Siegrist-Kaiser et al., 1990; Ortiga-Carvalho et al, 2016). Em ratos com hipotireoidismo, foi observada redução dos níveis de actina no cerebelo nos dias pós-natais 15 e 16 quando comparado a ratos saudáveis, ou seja, eutiroideos (Faivre-Sarrailh; Rabie, 1988).

Os mecanismos de ação supra mencionados ocorrem em diversos órgãos e sistema no organismo de diversas espécies de mamíferos, contudo, a seguir serão brevemente descritos os efeitos dos hormônios tireoideos no crescimento, desenvolvimento e na estrutura óssea, no sistema cardiovascular e no metabolismo de nutrientes, uma vez que objetos de interesse do presente projeto. Os HTs participam de modo importante crescimento normal linear e na diferenciação e maturação dos tecidos, sendo que em crianças com hipotireoidismo se observa atraso nos desenvolvimentos mental e físico, os quais se manifestam por crescimento fraco e demora na aquisição de habilidades relacionadas ao desenvolvimento normal, como sustentar a cabeça, sentar, falar e caminhar (Williams, 2008). Os efeitos dos HTs na maturação óssea são evidenciados pela parada no crescimento, maturação atrasada da cartilagem e atraso na

idade óssea no hipotireoidismo e crescimento linear acelerado, avanço na idade óssea e fusão das epífises precoce, prejudicando a estatura final, no hipertireoidismo (Williams, 2008). Os HTs atuam na cartilagem epifisária estimulando a ossificação endocondral, que determinará o crescimento linear de ossos longos, implicando em alterações ósseas quando há desregulação hormonal (Robson et al., 2000).

Embora seja um assunto bastante explorado até o momento os efeitos dos HTs sobre as células ósseas e cartilaginosas ainda estão sob constante investigação, sendo que é sabido que condrócitos e osteoblastos exibem receptores HTs, enquanto sua presença em osteoclastos e osteócitos ainda não está estabelecida (Varga; Spitzer; Klaushofer, 2004). Na cartilagem, há estímulo da expansão clonal das células progenitoras com simultânea inibição da proliferação celular, o que leva a condrócitos hipertróficos (Robson et al., 2000). Ademais, na cartilagem também sofre atuação dos HTs no sentido de aumentar a síntese protéica na matriz extracelular, de outras proteínas participantes na mineralização e degradação da cartilagem, e do fatores parácrinos que envolvem a ossificação endocondral (Waung; Bassett; Williams, 2012). Os HTs agem direta ou indiretamente na formação óssea sobre os osteoclastos e na reabsorção óssea sobre os osteoclastos, sendo que T3 estimula a função, a proliferação e a diferenciação de osteoblastos e aumenta a síntese de componentes da matriz óssea e de fatores que regulam a função dos osteoclastos (Varga; Spitzer; Klaushofer, 2004). No hipotireoidismo pode haver redução da remodelação óssea com baixas taxas de formação óssea e reabsorção, o que resulta em deficiência de mineralização, e no hipertireoidismo ocorre elevada remodelação óssea com predomínio de encurtamento do período de reabsorção, levando a perda de mineralização óssea (Wexler; Sharretts, 2007).

Os HTs também influenciam no desenvolvimento do sistema cardiovascular, uma vez que afetam diretamente o coração ao estimular a expressão de diversos genes (Dillman, 2010).

O crescimento normal e a função dos cardiomiócitos sofrem função direta de T3 no controle da expressão de seus genes, bem como tal hormônio também previne a expressão de genes fetais, permitindo dessa forma que o coração se desenvolva corretamente (Klein; Ojamaa, 2001; Dillman, 2010). Na presença de hipotireoidismo há associação com resistência periférica, volume de sangue diminuído, bradicardia e redução da contração atrial e caso haja hipotireoidismo severo o débito cardíaco em repouso é diminuído em função de menor volume cardíaco e da frequência cardíaca (Almeida et al., 2009; Iordanidou; Hadzopoulou-Cladaras; Lazou, 2010).

Além disso, esforços recentes vêm sendo empenhados no sentido de esclarecer as consequências das disfunções de HTs na saúde cardiovascular, sendo descoberto que podem ocorrer alterações eletrofisiologia cardíaca com arritmias, na vasculatura com aterosclerose e no miocárdio com insuficiência cardíaca. Inclusive, tanto o tireotoxicose subclínica quanto o hipotireoidismo subclínico estão sendo sugerido com maior frequência como contribuintes de aumento do risco cardiovascular (Cappola et al, 2019). Com isso, tem-se que o excesso ou a deficiência de hormônios podem conduzir a modificações na fisiologia cardíaca, e nesse contexto é preciso lembrar que como dito acima os HTs participam do metabolismo de lipídios com frequente relação à mudanças no peril lipídico que podem culminar com o desenvolvimento de doença cardiovascular e contribuir para o risco de morbidade prematura e morte (Cappola et al, 2019).

Os HTs aumentam tanto a síntese quanto a degradação de lipídios, sendo que o hipotireoidismo associado com acúmulos de colesterol e triglicerídios em função da redução do estado metabólico e no hipertireoidismo há predomínio da lipólise (Mullur; Liu; Brent, 2014). A influência dos HTs no metabolismo de lipídios decorre do estímulo hepático à síntese de ácidos graxos e sua esterificação em triglicerídeos bem como ao aumento da

oxidação de ácidos graxos⁶ (Mullur; Liu; Brent, 2014). Os HTs estimulam a síntese de colesterol, promovem absorção de colesterol via regulação positiva da expressão do receptor de LDL e estimulam os efeitos da enzima colesterol 7 α -hidroxilase, melhorando o do metabolismo de colesterol em ácidos biliares (Ness; Lopez, 1995). Em humanos com hipotireoidismo, geralmente há elevação dos níveis séricos de colesterol causados pela redução da depuração plasmática de colesterol e uma mínima conversão em ácidos biliares, enquanto o oposto é observado em paciente com hipertireoidismo (Weiss; Refetoff, 1996).

A síntese e a degradação protéicas são igualmente controladas por HTs à medida que foi observado que em ambos os casos de desregulação na produção hormonal afetam o conteúdo corporal proteico (Silva, 2013). Em condições de hipertireoidismo observa-se a predominância de estado catabólico, que conduz à perda de proteína muscular e em outros tecidos, contribuindo para redução do peso corporal em hipertireoidismo severo (Silva, 2013). Já quando há hipotireoidismo, a degradação protéica é reduzida em maior extensão do que a síntese protéica, especialmente no que se refere à albumina, que se acumula e translada ao interstício tecidual devido à aumento da permeabilidade dos capilares, podendo causar edema, o qual constitui a razão para o aumento de peso observado na redução de HTs (Silva, 2013). Por fim, sobre o metabolismo de nutrientes, os hormônios tireoideos influenciam o metabolismo de carboidratos, ainda que não seja observada hiperglicemia em humanos hipo ou hipertireoideos (Verga Falzacappa et al., 2011). Durante o período fetal os HTs promovem o desenvolvimento normal das células das ilhotas pancreáticas e a manutenção de seu tropismo (Verga Falzacappa et al., 2011). Assim como ocorre com o metabolismo de lipídios,

⁶ A oxidação de ácidos graxos ocorre em múltiplas regiões da células, sendo que na mitocôndria acontece beta-oxidação, no peroxissomo pode haver alfa e beta-oxidação e no retículo endoplasmático o tipo de oxidação ocorrida é a omega. A beta oxidação é uma fonte significativa de energia quando há estados de alta demanda de energia e promove considerável porção de energia requerida pelos músculos esqueléticos e cardíacos e rins na falta de glicogênio.

o metabolismo de carboidratos é reduzido no hipotireoidismo e aumentado no hipertireoidismo (Fukuchi et al., 2002). A influência hormonal no metabolismo de carboidratos se dá por aumento da gliconeogênese hepática por meio da ação direta em receptores de HTs, ação central no hipotálamo elevando o fluxo simpático para o fígado e aumento da expressão da proteína transportadora de glicose 4 nas membranas dos tecidos muscular esquelético e adiposo (Brunetto et al., 2012).

Considerando-se o HTs exercem papel importante no metabolismo de lipídios e na determinação do perfil lipídico, conforme as citações anteriormente expostas, e por ser este um dos principais pontos a serem abordados no artigo 1, se faz necessário um item esclarecedor acerca dos modelos de indução de hipotireoidismo em ratos e da interferência desta condição no perfil lipídico, já que até o presente momento não se tem conhecimento da ocorrência natural de tal condição nestes animais.

5.7 Perfil lipídico em modelos animais de deficiência de hormônios tireoideos

O hipotireoidismo, como mencionado no item 5.6, decorre da deficiência de HTs e quando não tratado pode aumentar tanto a morbidade quanto a mortalidade tornando a patologia uma importante questão de saúde (Thvilum et al., 2013). Pode-se dividir o hipotireoidismo em duas principais categorias: hipotireoidismo primário, que decorrer da incapacidade da glândula tireoide em produzir adequadamente HTs, e hipotireoidismo secundário ou central, no qual, embora haja funcionamento normal da glândula tireoide, estão presente anormalidades na glândula pituitária ou no hipotálamo, o que prejudica a sinalização das vias envolvida na metabolização de HTs (Chaker et al., 2022). Ao redor do globo a etiologia mais prevalente de hipotireoidismo primário é a deficiência alimentar de

iodo, pois, ainda que encontrado em pequenas concentrações nos organismos de mamíferos, é este um micronutriente essencial para a biossíntese dos HTs por ser elemento constituinte das suas moléculas, sendo que na falta do halogênio pode ocorrer impedimento ou dificuldade na produção tanto de T3 quanto de T4 pela glândula tiroide (Chaker et al., 2022).

A segunda causa responsável por elevar a prevalência de hipotireoidismo primário decorre da doença autoimune denominada tireoidite de Hashimoto, que costuma ser mais comum em regiões iodo-suficientes. Outras causas de hipotireoidismo são uso de drogas que interferem na biossíntese de HTs, como a amiodarona (princípio ativo que contém iodo em sua molécula), por exemplo, terapias com iodo radioativo, cirurgias de remoção da tiroide (tireoidectomia), radioterapia na cabeça ou na região do pescoço, dentre outros (Chaker et al., 2022).

A dificuldade de análise da glândula tiroide de humanos saudáveis e até mesmo daqueles hipotireoideos, mas não submetidos à tireoidectomia, conduz a uma vasta observação de hipotireoidismo em roedores que se estende ao longo tempo como meio para tentar entender como a deficiência dos HTs pode impactar o organismo de mamíferos, havendo aparente preferência por ratos, já que pois ao buscar-se pelos termos MeSH "*hypothyroidism*" (hipotireoidismo em inglês) e "*rats*" (rato em inglês) na base de dados PubMed encontra-se 5.737 publicações e ao substituir o termo por "*mice*" (camundongo em inglês) apenas 1.398 publicações são encontradas. Muito provavelmente a diferença se deve ao fato da necessidade de acesso da glândula da tiroide em determinadas análises ou procedimentos cirúrgicos, o que é facilitado em ratos em virtude do maior tamanho desses animais em relação aos camundongos. Os métodos utilizados para induzir hipotireoidismo em roedores consistem em dieta restrita em iodo, remoção da parte da glândula tiroide ou de toda a glândula, supressão da irrigação sanguínea da glândula tiroide, hipotireoidismo

congenito, administração de fármacos anti-tireoide, manipulação gênica, exposição a iodo radioativo e administração de imunossuppressores (Choi et al, 2018; Yang et al., 2018; Blas-Valdivia et al., 2021; El Deib et al., 2021; Chandra; Singh; Ganguly, 2022; Minami et al., 2022; Tapia-Martínez et al, 2022; Xie et al., 2022; .

Considerando-se que a deficiência da ingestão de iodo é o principal motivo que culmina em hipotireoidismo primário, é possível inferir que o modelo de indução de hipotireoidismo por restrição de iodo na dieta é um dos modelos que mais se aproxima da ocorrência da condição clínica em humanos. No entanto, dietas com baixa concentração de iodo são pouco disponíveis e há elevada complexidade em sua formulação, necessitando de cálculo acurado para o conteúdo de iodo e podendo levar maior tempo para o desenvolvimento do estado hipotireoideo do que outros métodos de indução. Os modelos cirúrgicos de remoção total ou parcial e interrupção no suprimento sanguíneo da glândula tiroide igualmente simulem condições humanas de pós-operatório de tireoidectomia e atrofia glândula, respectivamente, de modo bastante próximo à realidade, por, apresentam como desvantagem necessidade de cirurgião altamente treinado, possível de reação imunológica nas cirurgias parciais, perda das células parafoliculares incorrendo em prejuízo à manutenção das concentrações séricas fisiológicas de cálcio e provável dano à paratireoide, tornando bastante complexas às avaliações após a cirurgia (Ritter et al., 2015).

Os modelos genéticos são úteis para avaliar condições genéticas associadas ao hipotireoidismo a exemplo de mutações no genes codificadores o receptor de TSH ou da tireoperoxidase e fatores de transição relacionados, o que em humanos representa tão-só 5% das causas de hipotireoidismo, limitando a possível aplicação dos resultados produzidos em experimento animal a uma pequena parcela da população (Amendola et al., 2005). Ademais, a produção de animais geneticamente modificados nem sempre é fácil e apresenta custo elevado

de equipamentos e treinamento de equipe. Questões pertinentes à equipe de trabalho também afetam o modelo de uso de iodo radioativo para indução de hipotireoidismo em roedores muito usado outrora, tendo vista que por trazer de isótopo radioativo existe risco de efeito adverso para os pesquisadores que executam o experimento. Ademais, o mesmo problema referente ao dano causado pelo alcance da radioatividade às células parafoliculares acontece com o uso de iodo radioativo.

Em relação aos modelos imunológico convém esclarecer que os sistemas imune e endócrino apresentam interação íntima, dependendo o de funcionamento da glândula tireoide do status imune do organismo de mamíferos (De Luca et al., 2021). Com isso, perturbações do sistema imunológico por drogas citostáticas ou antagonista de ácido fólico podem alterar significativamente a morfologia da glândula e conseqüentemente comprometer a função endócrina (Chaddha et al, 2017). Além disso, embora não possa ser considerado um modelo em virtude das poucas publicações existes sobre o assunto até o momento, recentemente foi relatado que a exposição de ratas por 24 semanas à dieta hiperlipídica nos moldes determinados para simular a dieta ocidental consumida por humanos (60% de energia proveniente fonte de gordura) provoca alterações que se assemelham a tireoidite de Hashimoto, uma vez que restou identificada infiltração linfocitária com destruição celular (aumento de fibrose e apoptose) proveniente de processo imune mediado por auto-anticorpos (Liao et al., 20122).

Liao e colaboradores avaliaram o caráter inflamatório/imunológico da disfunção tireoidea após submissão de ratos à dieta hiperlipídica e relataram em estudo publicado em julho de 2022 alterações séricas como aumento dos níveis de anticorpos anti-tireoperoxidase e de TSH e redução tanto nos níveis de T3 quanto de T4 (Liao et al., 20122). Em 2104 já havia sido reportado que exposição de ratos à dieta hiperlipídica a partir de 12 semanas provoca

aumento dos níveis séricos de TSH, o que é uma característica do hipotireoidismo subclínico em humanos, e após de 18 semanas afora a alteração em TSH há redução dos níveis séricos de T4 total e T4 livre, indicando já algo mais próximo ao hipotireoidismo franco (Shao et al., 2014).

Por fim, no que concerne aos modelos de indução de hipotireoidismo em roedores tem-se o modelo farmacológico, o qual é o mais frequentemente utilizado em quando se usa pequenos animais como ratos e camundongos e consiste a administração do princípios ativos que promovem ação tiroeostática por desestabilizar o funcionamento das células foliculares componentes da tireoide e interromper a produção adequada de HTs, eis que é um método que pressupõe fácil administração do produto aos animais e custo reduzido quando comparado aos demais (Ekerot et al., 2013). Dentre os fármacos mais utilizados para induzir hipofunção da tireoide estão: tiocianato de potássio, propiltiouracil, metimazol, mercazolil e carbimazol (Krusius; Peltola, 1963; Redmond; Tuffery, 1978; Cooper et al., 1983; Cooper et al., 1984).

O uso amplo do modelo farmacológico de indução de hipotireoidismo em roedores se explica devido à reprodutibilidade dos sintomas clínicos típicos do hipotireoidismo em humanos, à facilidade na execução por ser possível dissolver o pó dos princípios ativos em água em razão da característica hidrofílica que apresentam e ao baixo custo em virtude da pequena quantidade de fármaco necessária para produção dos efeitos desejados (Ekerot et al., 2013). O problemas na aplicação deste modelo de indução residem em erros de cálculo de formulação e permeabilidade dos tecidos pelos fármaco, no entanto, um projeto bem planejado pode dificultar ou impedir que ambas situações ocorram (Ekerot et al., 2013).

Por ser uma glândula endócrina sensível à mudanças externas, a tireoide também se sujeita a interferentes ambientais que vão além dos componentes da dieta e medicamentosos, como, por exemplo, os plásticos tão presente em nosso dia-a-dia atualmente. Em modelos

animais de exposição a plásticos como o poliestireno em nanopartículas foi observada redução nos níveis séricos de T3 e T4 livres mesmo em concentrações baixas do toxicante, indicando a probabilidade dessa associação da exposição a também necessita ser estudada e salienta ainda mais o quanto devemos nos preocupar com a susceptibilidade do nosso sistema endócrino a tantos fatores externos consoante aqui exposto (Amereh et al., 2019). Como dito no item 5.6, o desequilíbrio na produção de HTs pode impactar o organismo de diversos modos devido aos efeitos de tais hormônios nos mais variados órgãos e sistemas, sendo que uma das alterações mais frequentemente estudadas se refere aos parâmetros bioquímicos do perfil lipídico, pois é amplamente conhecido que a absorção de colesterol aumenta no hipotireoidismo tanto em humano quanto em roedores e provoca hipercolesterolemia em ambas as espécies mesmo em hipotireoidismo subclínico (Friedman; Rosenman, 1956; Duntas; Brenta, 2018) (tabela 2).

Além disso, no hipotireoidismo franco em humanos é comum a presença de hipertrigliceridemia e níveis reduzidos de HDL, o que ainda é passível de estudos nos modelos animais de pesquisa pré-clínicas no tema em virtude de não serem os parâmetros bioquímicos em questão sempre relatados (Duntas; Brenta, 2018) (tabela 2). Ao trazer resultado de publicações em que métodos aplicados em ratos para conduzir à modificação no perfil de hormônios relacionados à tireoide semelhante ao hipotireoidismo em humanos a tabela 2 auxilia na reafirmação acerca da presença incontestemente de hipercolesterolemia no quadro, uma vez que apenas o modelo de indução por tireoidectomia não está associada a este desfecho. No que se refere aos triglicérides e à HDL percebe-se que existem resultados bastante conflitantes que levam a uma distribuição quase homogênea entre os artigos que encontraram redução ou aumento de níveis e no que diz respeito à LDL sempre que foi reportada alteração estava vinculada a aumento da concentração sérica da variável (tabela 2).

Tabela 2 - Alterações no perfil hormonal relacionado à tireoide e no perfil lipídico em ratos expostos a métodos de indução de hipotireoidismo.

Autor, data	Estirpe	Método de indução de deficiência hormonal	Perfil hormonal				Perfil lipídico		
			TSH	T4	T3	CT	TG	HDL	LDL
Liao et al., 2022	SD	Dieta hiperlipídica por 24 semanas	↑	↓	↓	↑	↑	-	↑
Badavi et al, 2021	Wistar	PTU (0,05% w/v em água) por 2 semanas	↑	↓	-	↑	↓	❖	↑
Panda et al., 2021	Wistar	PTU (0,05% w/v em água) por 6 semanas	↑	↓	↓	↑	↑	-	-
Singh et al., 2020	SD	PTU (8 mg/kg via intraperitoneal) por 4 semanas	↑	↓	↓	↑	↑	↓	↑
Amereh et al., 2019	Wistar	NPS (1 mg/kg/dia via gavage) por 5 semanas	-	↓*	↓*	↑	-	❖	❖
		NPS (3 mg/kg/dia via gavage) por 5 semanas	↑	↓*	↓*	↑	-	↓	↑
		NPS (6 mg/kg/dia via gavage) por 5 semanas	-	↓*	↓*	↑	-	↓	↑
		NPS (10 mg/kg/dia via gavage) por 5 semanas	↑	↓*	↓*	↑	-	↓	↑
Mohammadi et al., 2019	Wistar	PTU (500 mg/L em água) por 13 semanas	↑	↓	↓	❖	↓	❖	❖
Tapia-Martinez et al., 2019	Wistar	Congênito (tireoidectomia materna)	-	↓	↓	↑	↑	↓	↑
		MMI (20 g/kg/dia via gavage) por 8 semanas	↑	❖	-	↑	-	❖	↑
Gong et al, 2018	Wistar	MMI (30 g/kg/dia via gavage) por 8 semanas	↑	❖	-	↑	-	❖	↑
		MMI (40 g/kg/dia via gavage) por 8 semanas	↑	❖	-	↑	↑	❖	↑
Hwang et al., 2018	SD	PTU (10 mg/kg via intraperitoneal) por 4 semanas	↑	↓	↓	↑	↓	-	↑
Rauchová et al, 2017	Wistar	MMI (0,05% w/v em água) por 6 semanas	-	↓	❖	↑	❖	↑	↑
Jiang et al., 2016	SD	Amiodarona (120 mg/kg/dia) por 13 semanas	-	↓	↓	↑	❖	↑	❖
		Dronedarona (120 mg/kg/dia) por 13 semanas	-	↓*	↓*	↑	❖	↑	❖
Oktay et al., 2016	Wistar	MMI (75 mg/100g de dieta) por 12 semanas	↑	↓	↓	↑	↑	↑	↑
Gao et al., 2015	Wistar	MMI (10 g/kg/dia via gavage) por 12 semanas	↑	-	-	↑	❖	❖	↑
Patel et al., 2013	Wistar	Tireoidectomia	-	↓	↓	❖	↓	❖	↑
Rauchová et al, 2013	Lewis	MMI (0,05% w/v em água) por 19 semanas	-	↓	↓	↑	❖	↑	↑
Hapon et al., 2005	Wistar	PTU (0,1 g/L em água) por 4 semanas	↑	↓	↓	↑	❖	❖	-
Franco et al., 2003	Wistar	Tireoidectomia	-	-	-	↓	❖	↓	↑
Huesca-Gómez et al., 2002	Wistar	Tireoidectomia	-	-	-	❖	↓	↓	↑
Umezo et al., 1998	<i>rwd</i>	Mutação autossômica recessiva	↑	↓	-	↑	-	-	-
Staels et al., 1990	Wistar	PTU (0,1% wt/wt em água) por 4 semanas	-	-	-	↑	❖	-	-

CT: colesterol total, HDL: *high density lipoprotein* (lipoproteína de alta densidade), LDL: *low density lipoprotein* (lipoproteína de baixa densidade), MMI: metimazol, NPS: nanopartículas de poliestireno, PTU: propiltiuracil, SD: Sprague-Dawley, TG: triglicerídeos, TSH: hormônio tireoestimulante, T3: triiodotironina, T4: tiroxina, ❖ sem diferença estatística significativa, - não reportados, * dosagem de hormônios séricos livres.

Portanto, considerando-se que a tabela em questão compreende apenas um recorte pequeno da literatura e diante da percepção da necessidade de um aprofundamento maior acerca do que já foi publicado sobre o assunto até então, entende-se importantíssima a

realização de uma revisão sistemática sobre como o perfil lipídico de ratos pode ser alterado pelos modelos de indução de hipotireoidismo, sendo a relevância do tipo deste tipo de estudo abordada no tópico seguinte.

5.8 A necessidade de revisões sistemáticas para modelos biológicos pré-clínicos

A construção textual até aqui despertou o alerta de que existe escassez na literatura de uma publicação que reúna sistematicamente os dados publicados até então sobre como os modelos de indução de hipotireoidismo em ratos afetam o perfil lipídico de tais animais, uma vez que na busca de artigos para descrever o item 5.7 deparou-se com grande dificuldade em concentrar a considerável quantidade de artigos existentes sobre o tema. O primeiro relato de uma série de casos de hipotireoidismo em humanos data de 1914, enquanto a primeira publicação acerca desse tipo de manipulação endócrina em ratos remonta à 1946 em uma pesquisa destinada a entender os efeitos do hipotireoidismo no músculo cardíaco, e desde então foram publicados inúmeras pesquisas que induziram hipotireoidismo em ratos de diversas formas, obtendo os mais variados desfechos com a intenção de avaliar como o distúrbios interfere na saúde de diversos órgão e tecidos (Milne, 1914; Chen; Geiling, 1954). Quando se busca pelo termos MeSH "*hypothyroidism*" e "*rats*" na base de dados PubMed encontra-se publicações desde o ano de 1946 até 2023 (artigos a serem futuramente publicados, mas que já estão previamente indexados), sendo que muitas pesquisas avaliam o perfil lipídico ou seus constituintes.

Em uma tentativa de refinamento da busca para composição do item 5.7 no afã de compreender os efeitos estirpe-específicos por meio da troca do termo MeSH "*rats*" por "*Wistar rats*" foi revelado que existem divergências nos níveis séricos de lipídios de ratos

hipotireoideos de acordo com o modelo de indução e também dentre os modelos consoante o método indutivo e suas variáveis, o que certamente dificulta a construção de metodologias e discussões que envolvam o tema. Com isso, percebe-se uma necessidade de revisar sistematicamente o que há disponível na literatura até então visando a formação de um panorama geral a respeito dos efeitos em questão. Importante salientar nesta seara que, assim como mencionado no item 5.4, ao tratar-se de modelo animal para estudo de doenças humana é preciso, antes de mais nada, compreender que cada modo de indução pode causar interferências diferentes conforme a espécie e a estirpe a ser estudada, sobretudo no que diz respeito ao metabolismo.

Ao retomar o texto do item 5.4.1 acerca das peculiaridades dos modelos animais para desenvolvimento de pesquisas que almejem avaliar o metabolismo, salienta-se que os ratos representam a espécie com fenótipo mais condizente para tanto e, pelo menos no que diz respeito à dieta hiperlipídica (modelo amplamente utilizado para avaliar distúrbios metabólicos), a estirpe Wistar dentre aquelas que compõem a estirpe de rato é modelo mais equivalente fenotipicamente ao ser humano e existem diferenças consideráveis entre as estires que dificultariam comparações (Jacob, 1999; Xu et al., 2016; de Moura e Dias et al., 2021).

Além disso, mesmo considerando a outra estirpe de ratos frequentemente usada em modelos animais de roedores, SD, ao buscar na base de dados PubMed a diferença da quantidade de publicação relacionado a condição endócrina e as estirpes tem-se 1.179 para a estirpe Wistar em detrimento de 633 para estirpe SD. Além disso, quando comparados níveis hormonais em diferentes estires de ratos, muito além das duas comumente aplicadas em modelos animais, há diferença significativa entre os níveis do hormônio TSH, o que pode implicar em mudança nas vias de sinalização do metabolismo dos hormônios tireoideos e, por consequência, os efeitos destes no organismo animal (Xie et al., 2022). Portanto, entende-se

que, considerando as peculiaridade do fenótipo metabólico e das diferenças entre as estirpes, os ratos Wistar atendem melhor aos efeitos metabólicos provocados por doenças similares às doenças humanas.

O assunto em questão é apenas um do vasto mundo da literatura científica na área da saúde que necessita ser revisado, uma vez que o fluxo constante de publicações indexadas às bases de dados nos dias atuais as inunda de uma quantidade inumerável de informações. Contudo, a grande carga de dados disponibilizadas se não analisada adequadamente pode dificultar os desfechos finais de experimentações e a aplicação na prática clínica, até mesmo porque as metodologias utilizadas e as conclusões a que chegam os diferentes autores podem ser diferentes e contraditórias, respectivamente. Neste contexto, é preciso reunir as considerações em artigos de revisão, para que os trabalhos seguintes possam basear-se em uma referência que exponha uma análise de dados segura. Ao examinar-se em conjunto diversas publicações sobre o mesmo assunto, torna-se viável o fornecimento de resultados suficientemente mais confiáveis do que quando se realiza uma análise individual de cada uma das pesquisas relatadas, uma vez que, assim, a evidência resta comprovada. Além disso, por meio de uma verificação abrangente sobre determinado tema, pode-se identificar lacunas no conhecimento e também auxiliar na formação de novos focos de estudo.

Na prática clínica, as revisões sistemáticas de literatura há muito são empregadas para aprimorar a aplicação de descobertas recentes ou compilar o que já foi encontrado sobre uma doença específica, a exemplo de umas das primeiras revisões a que se tem conhecimento, datada de 1753 e efetuada pelo médico cirurgião da Marinha escocesa James Lind para avaliar a prevenção e o tratamento do escorbuto (Bartholomew, 19753). Depois, em 1904 o matemático Karl Pearson realizou uma meta-análise, metodologia estatística baseada em um procedimento quantitativo de combinação de resultados independentes e aplicada na análise e

síntese de dados integrantes de revisões sistemáticas de literatura, que versava sobre o efeito preventivo das inoculações contra a febre entérica (Pearson, 1904).

Após, no final da década de 1980, consolidou-se o surgimento das revisões literárias de aspecto sistemático com a publicação do livro “Effective care in pregnancy and childbirth”, embora esboços deste modelo de pesquisa já viessem sendo traçados desde a década de 1950, com relevante participação do livro “Effectiveness and Efficiency: Random Reflections on Health Services” publicado por Archie Cochrane em 1972 (Henderson-Smart; Crowther, 1997; Galvão; Pereira, 2014). Neste mesmo sentido, por volta de 1996 firmou-se a utilização da medicina baseada em evidência (EBM), prática realizada desde meados do século XIX que pode ser traduzida em uma forma de integrar a melhor evidência de pesquisa disponível para definição de diagnóstico e determinação de tratamento em todas as áreas médicas visando o cuidado individual de cada paciente (Sackett et al., 1996). A atual fundamentação para EMB pode incluir consenso ou opinião de especialistas, estudos de casos controle ou relatos de séries de casos, estudos de coorte, ensaios clínicos randomizados, artigos individuais avaliados criticamente, tópicos avaliados criticamente e revisões sistemáticas de literatura, cuja força de evidência e redução de riscos na tomada de decisões podem ser determinados pelo modo como a informação é filtrada (Masic; Miokovic; Muhamedagic, 2008).

Embora a EMB possua como bases a prática clínica em medicina, a pesquisa científica evoluiu em diversas tecnologias e tipos de estudo, sendo que atualmente existe um volume muito significativo de estudos com animais e experimentos *in vitro*, os quais igualmente geram tantos dados que se torna frequentemente necessário revisar sistematicamente as publicações indexadas. A forma como são estruturadas as revisões sistemáticas de literatura faz com que sejam uma etapa fundamental para delineamento de projetos de pesquisa

científica, tendo em vista que a partir da elaboração de tal instrumento é possível eger artigos de qualidade para apoiar o desenvolvimento de experiências futuras, ordenar o que já foi publicado a respeito do objeto de interesse e balizar as etapas a serem realizadas em atividades laboratoriais, como eleição da metodologia e dos materiais utilizados anteriormente com maior sucesso. Os estudos em *in vitro* e animais compõem o que denominamos de pesquisa pré-clínica, ou seja, aqueles experimentos feitos para avaliar as intervenções que se pretende aplicar em humanos com intenção de verificar validade, eficácia, eficiência e segurança ou na impossibilidade de avaliar um desfecho em virtude de limites éticos, como, por exemplo, acontece quando se deseja analisar interferentes no período gestacional.

Ainda que os estudos pré-clínicos não envolvam humanos e estejam na base da pirâmide dos níveis de evidência (figura 7), muitas descobertas provenientes dessas modalidades de pesquisas revolucionaram o estado científico de muitas áreas, assim como ocorreu com a descoberta dos microRNAs no nematódeo *Caenorhabditis elegans* que certamente representou um verdadeiro divisor de águas para a biologia molecular (Lee; Feinbaum; Ambros, 1993). No entanto, é preciso considerar que nem sempre é possível transladar de forma íntegra os achados em modelos animais para os seres humanos, uma vez que nem sempre a morfologia e a fisiologia são absolutamente correspondentes.

Porém, quando essas diferenças e também as similaridades são conhecidas pode-se prever como o desfecho de interesse provavelmente impacta a saúde. O olhar atento a essas considerações permite que se aplique à prática clínica somente aquilo que transcende o organismo animal para o humano, a exemplo do que ocorre com a diferença de síntese e secreção de HTs pela tireoide humana e de rato, sobretudo em relação ao T3, o que pode levar a aplicação clínica errônea dos resultados provenientes de estudos em ratos que indicam a necessidade de suplementação hormonal de liotironina sódica (L-triiodotironina, o hormônio

T3 sintético) para que haja reestabelecimento dos níveis periféricos fisiológicos dos HTs e de TSH em casos de hipotireoidismo (Santini et al., 1993).

Diferente do rato, como explicitado no item 5.6.1, o homem secreta menor quantidade de T3 da tireoide e, portanto, faz uma maior conversão periférica de T4 em T3, sendo a suplementação de levotiroxina, o hormônio T4 sintético, normalmente suficiente para reestabelecimento dos níveis séricos fisiológicos de HTs e TSH mesmo em completa disfunção tireoidea. A descoberta da necessidade de suplementação de liotironina sódica em ratos levou ao questionamento se tal suplemento seria útil para tratar hipotireoidismo em humanos, porém, os estudos clínicos divulgados até então não foram capazes de determinar se para tratamento crônico, o que reflete a maioria dos casos, há benefício adicional em relação à monoterapia com levotiroxina (Santini et al., 2019).

Com isso, demonstra-se o motivo pelo qual existe uma ordem de níveis de evidência para prática clínica no que concerne aos diferentes tipos de estudos estabelecidos em pesquisa científica (figura 7). Ademais, é preciso entender que a revisão sistemática de estudos clínicos conduz à evidência destinada à prática da clínica em medicina humana e a revisão sistemática de estudos pré-clínicos permite a compreensão como estão sendo aplicadas metodologias e quais são os resultados para um desfecho de interesse.

Apesar de a origem das revisões sistemáticas se voltar à pesquisa clínica e inicialmente às metodologias e o planejamento ser destinado às questões médicas humanas, atualmente existem diversos estudos nesse sentido tanto para pesquisas *in vitro* quanto para pesquisas *in vivo* em modelos animais (Tellechea; Mensegue; Pirola, 2017; Giorgi Silveira et al., 2020) . Quando se trabalha com pesquisa na área biológica é vital, para a elaboração de estudos de referência, que os procedimentos experimentais estejam calcados em bibliografia contundente, com imprescindível definição dos processos a serem utilizados para que o

propósito final seja alcançado e apresente importância acadêmica, impedindo gasto de tempo desnecessário.



Figura 7 - Pirâmide dos níveis de evidência científica.

Ao efetuar-se uma revisão sistemática de literatura, afóra a contribuição representada pelo próprio trabalho, faz-se possível ao pesquisador definir de modo direcionado o seu objeto de estudo, o que dificulta a produção de resultados ineficazes e viabiliza a elaboração de técnicas padronizadas a serem aplicadas nas análises mediante a observação na literatura de qual ou quais obtiveram a resposta mais ajustada. Ao longo dos anos as revisões sistemáticas foram alcançando proporções relevantes e em virtude da imposição de determinadas regras para que o processo seja verdadeiramente sistematizado houve o desenvolvimento de um guia a ser observado quando se pretende tanto delinear quanto reportar uma revisão sistemática, o PRISMA (do inglês *Preferred Reporting Items for Systematic reviews*), que deve ser

integralmente seguido para que haja transparência em relação ao motivo pelo qual a revisão foi feita, o que os revisores fizeram (como os estudos foram identificados e selecionados) e o que foi encontrado (quais foram as características dos estudos selecionados) (Page et al., 2021).

A última versão do PRISMA, publicada em 2020, apresentou itens que facilitam a execução de uma revisão original, a atualização de revisões já existentes e a atualização contínua de revisões consideradas "*livings systematic reviews*" (em tradução livre "revisões sistemáticas vivas") por serem atualizada de como constante, a exemplo do que vem acontecendo com algumas das revisões sistemáticas sobre os efeitos do responsável pela pandemia de COVID-19 (do inglês *coronavirus disease 2019*), o vírus SARS-CoV-2 (do inglês *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*), por ser uma doença causada por um vírus descoberto apenas em 2019 e com sintomas, tratamento e sequelas ainda desconhecidos até então, principalmente pelas constantes mutações que vem apresentando (Siemieniuk et al., 2020; Page et al., 2021; Zhao et al., 2022). Além disso, o PRISMA 2020, como é de praxe nas publicações do guia, estabeleceu um checklist que inclui sete sessões com 27 itens e alguns subitens e uma sugestão de modelo de diagrama de fluxo (figura 8), ambos utilizados e muitas vezes exigidos a título de transparência do processo de elaboração de revisões sistemáticas de literatura (Page et al., 2021).

A realização de uma revisão sistemática de literatura se inicia pela escolha do tema a ser abordado, sendo este um momento delicado onde podem ser necessárias adaptações até a formulação de uma pergunta suficientemente clara a respeito de um assunto que necessite ser revisado (Siddaway; Wood; Hedges, 2019). A partir de então, os passos adotados deverão obedecer a uma série de fases, que serão fundamentais para a produção da pesquisa e obtenção de resultado cujo valor prestado ao universo científico seja considerável (Siddaway; Wood; Hedges, 2019). Assim, a ordem de etapas a serem seguidas é: identificar o problema e

definir a pergunta de revisão, estabelecer o planejamento da revisão, buscar os estudos nas bases de dados que indexem publicações na área de interesse, peneirar e selecionar os estudos, extrair os dados dos estudos, determinar a qualidade dos estudos com uso de ferramentas adequadas, combinar os dados dos estudo em síntese ou meta-análise caso seja possível, discutir os resultados encontrados e elaborar uma conclusão acerca do que foi descoberto (Khan et al., 2013) (figura 9).

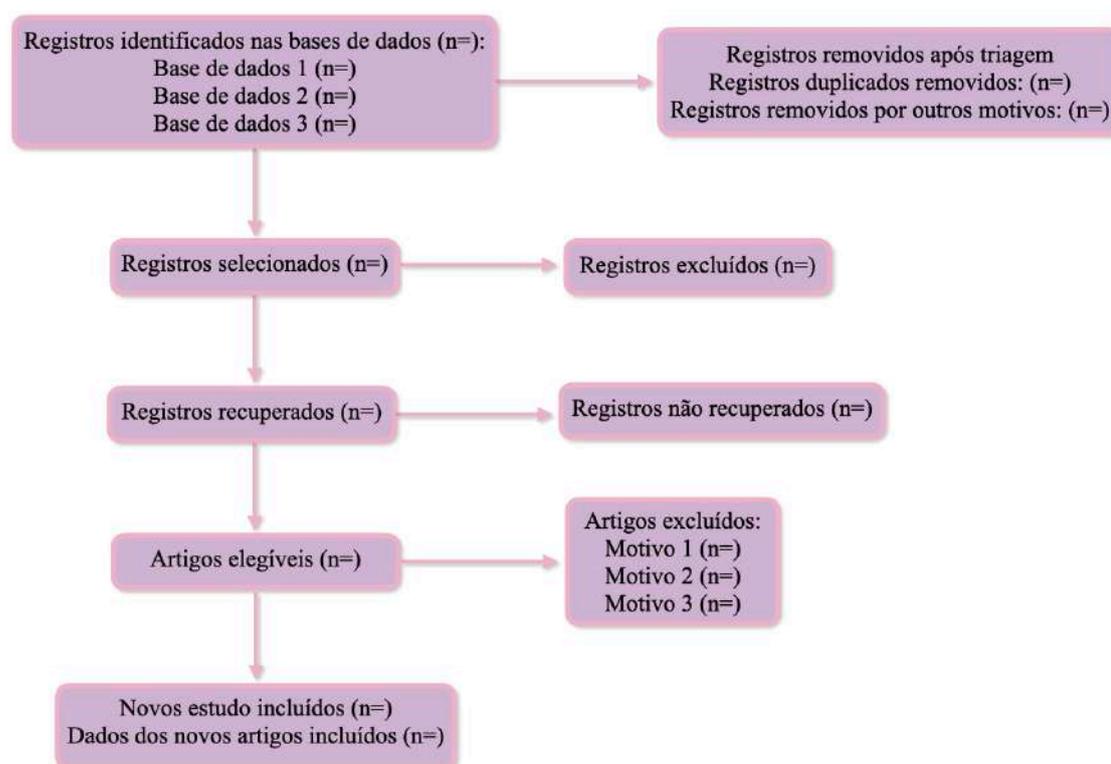


Figura 8 - Exemplo de diagrama de fluxo de acordo com o PRISMA.

Considerando-se o lapso entre a primeira busca e o término do trabalho realizado para elaborar uma revisão sistemática de literatura é preciso alertar que ao final há necessidade de atualização da busca com a consequente inclusão de estudos porventura publicados posteriormente, conservando assim a proposta de abranger o máximo de

publicações existentes sobre o assunto (Page et al., 2020). Ao identificar-se um ponto-chave que se entenda necessário de revisar sistematicamente, deve-se após definir uma pergunta de revisão que deverá ser respondida ao final do estudo.

Na sequência, deverão ser definidos os critérios de inclusão e exclusão que irão determinar quais artigos serão selecionados para compor a revisão. A partir da delimitação do tema e do estabelecimento da pergunta é preciso definir os termos que integrarão as buscas nas bases de dados, mantendo-se sempre atenção para evitar limitar em excesso a busca pelo uso de demasiados termos, eis que desse modo existe chance de perda de publicações sobre o assunto (Siddaway; Wood; Hedges, 2019). Após a definição dos termos e a busca nas bases de dados, os registros encontrados serão exportados das bases de dados em arquivos de tipo compatível com o software de gerenciamento de citações que será utilizado, sendo os mais comuns Endnote, Zotero e Mendeley, e importados de modo a formar uma biblioteca única, a qual será compartilhada com os revisores que irão selecionar os registros encontrados conforme os critérios pré-estabelecidos (Yamakawa et al., 2014; Siddaway; Wood; Hedges, 2019). Na ocorrência de dúvidas concernentes à avaliação dos dados coletados haverá de ser discutidas pelos revisores para que sejam dirimidas, sendo que na persistência da discordância deverá haver avaliação por um revisor escolhido exclusivamente para esse fim (Siddaway; Wood; Hedges, 2019).

No próximo momento precisa ser avaliada a qualidade e relevância dos artigos selecionados, por meio da observação de critérios como o fator de impacto da revista de publicação, e, principalmente, pelos critérios de inclusão e exclusão definidos em ocasião anterior com nova participação dos revisores integrantes do projeto (Khan et al., 2013; Siddaway; Wood; Hedges, 2019). Importante mencionar que, embora necessário que a

pergunta de revisão seja específica, em se tratando de estudo pré-clínicos não é interessante que haja um detalhamento tão profundo que resulte em critérios de inclusão e exclusão absolutamente rígidos, pois caso contrário a revisão sistemática poderá ser dificultada diante da escassez de estudos selecionados (Khan et al., 2013; Siddaway; Wood; Hedges, 2019).

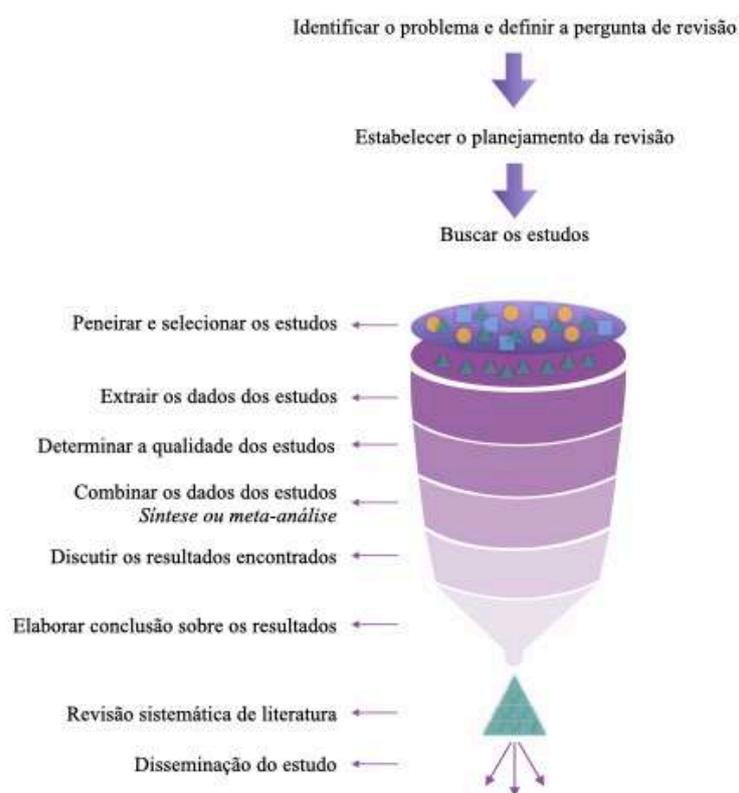


Figura 9 - Etapas de uma revisão sistemática de literatura.

Se possível, os estudos deverão ser agrupados para realização de procedimentos estatísticos, que se denomina meta-análise e gera dados novos por meio avaliação conjunta dos dados obtidos pelos estudos dos artigos selecionados (Khan et al., 2013; Siddaway; Wood; Hedges, 2019). Caso não se possa realiza meta-análise, como ocorre na presença de artigos com desenvolvimento ou resultado heterogêneos, é possível desenvolver uma meta-

análise para subgrupos, o que necessita ser feito de modo cuidadoso com a intenção de produzirem sempre um resultado confiável (Khan et al., 2013; Siddaway; Wood; Hedges, 2019).

Por fim, chega-se à conclusão com provável resposta à pergunta formulada mediante a interpretação do resultado proveniente da síntese dos resultados ou da meta-análise. Em relação às conclusões, cada estudo deve ser encarado como um quebra-cabeça, onde ao final da revisão sistemática cada peça importante será devidamente encaixada no seu devido lugar e as que não se encaixarem serão descartadas (Mulrow, 1994). Podemos encontrar peças iguais de estudos publicados mais de uma vez, peças difíceis de serem encaixadas por estarem não indexadas e possibilidade de diferentes vieses. Ainda, após a seleção e análise de dados pode-se ter um quebra-cabeça completo, no qual a meta-análise se realizou com estudos de qualidade e encontraram-se diferenças entre os mesmos permitindo a recomendação da intervenção; um quebra-cabeça incompleto, em que, embora a meta-análise tenha sido realizada com estudos de qualidade, não houve diferença entre os artigos; e a impossibilidade de montagem do quebra cabeça quando não houver seleção de estudos passíveis de submissão à meta-análise (Mulrow, 1994), o que é comum ocorrer em virtude da heterogeneidade dos estudos, principalmente no que diz respeito a pesquisas *in vitro* e *in vivo*.

No entanto, o avanço dos estudos pré-clínicos pressupõe que as revisões sistemáticas de literatura se façam cada vez mais necessárias e importantes em contextos onde há grande variabilidade de metodologias para avaliação de um mesmo desfecho. Então, a partir dos resultados obtidos em revisões sistemáticas de literatura na área biológica o revisor consolida o conhecimento que antes estava esparso e quando possível relaciona os resultados encontrados por meio de análise estatística, podendo disseminar ao meio acadêmico as suas conclusões e auxiliar pesquisas alheias e a própria pesquisa mediante a determinação dos

procedimentos metodológicos mais adequados e o que se pode esperar a partir da aplicação dos métodos revisados.

6. METODOLOGIA

A experimentação, aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas pelo protocolo número 23110.029720/2018-42, ocorreu em momento anterior a elaboração do presente projeto de pesquisa, sendo que este representará a realização de todos os métodos de análise e cálculos de amostras biológicas e análises estatísticas a seguir descritos.

6.1 Artigos 1, 2 e 3

6.1.1 Animais, desenho experimental e obtenção das amostras biológicas

Visando a realização do presente projeto em que se pretende avaliar, em especial, as consequências de consumo materno de dieta hiperlipídica aos seus descendentes, serão utilizadas informações biológicas de filhotes das proles de grupos controle e experimental, e para isso tanto as fêmeas quanto os machos que acasalaram foram adquiridos em consonância com fórmula comumente utilizada para estabelecer o tamanho da amostra quando em estudos animais se busca comparar dois grupos em razão de dados quantitativos. Desse modo, foi utilizado o cálculo experimental estatístico: $[2DP^2(Z^{\alpha/2}+Z^{\beta})^2/d^2]$, onde DP corresponde ao desvio padrão do grupo controle de estudos prévios sobre o assunto, $Z^{\alpha/2}$ representa o erro tipo 1 com nível de significância 5% (tabelado em 1,96), Z^{β} determina o poder estatístico de 80% (tabelado em 0.842) e d deriva do tamanho do efeito, o que é estabelecido pela diferença das médias da variável de interesse entre os grupos de exposição (Charan; Kantharia, 2013).

Considerando-se que no presente trabalho um dos principais objetivos é a compreensão de como a exposição indireta à dieta hiperlipídica pode influenciar o desenvolvimento da glândula tireoide a variável de escolha foram os níveis séricos de triiodotironina em nmol/L (nanomol por litro) ratos machos Wistar previamente exposto à dieta materna hiperlipídica, sendo assim para o grupo controle tem-se valores de média de 1.0861 nmol/L e de desvio padrão de 0.0614 nmol/L e para o grupo experimental média de 0.9877 nmol/L. Então, $[2(0,0614)^2(1,96+0,842)^2/(1,0861-0,9877)^2]$, o que resulta em 6,11 filhotes para uma adequada análise do efeito da dieta materna hiperlipídica na programação do desenvolvimento endócrino da prole, eis que a triiodotironina é um hormônio produzido em larga escala pela glândula tireoide em ratos e constitui o hormônio tireoidiano biologicamente ativo (Souza et al., 2019). Tendo em vista que por tratar-se de um projeto de pesquisa que apresenta intenção de avaliar desfechos de saúde mediante experimento *in vivo* não existe como efetuar arredondamentos para menos, implicando em considerar-se como número ideal a título de cálculo de amostra 7 filhotes.

O cálculo estatístico apresentado acima refere-se aos filhotes que inicialmente deveriam ser divididos em 2 grupos com n=14/cada (I-Controle e II-Experimental), totalizando 28 animais (14 fêmeas e 14 machos). Baseando-se no fato de que ratos Wistar em sistema de harém geram ninhadas de 9 filhotes e foi estimado que precisaríamos 50% de filhotes machos e 50% de filhotes fêmeas, e com 4 ratas Wistar adultas seria possível totalizar 28 filhotes (Summa et al., 1990).

Computando-se ainda uma taxa de mortalidade de 37% para o grupo experimental, uma vez que existe uma tendência de fêmeas de roedores alimentadas com dieta hiperlipídica canibalizarem suas ninhadas, seriam necessários 54 filhotes e para isso 6 ratas Wistar peri-

púberes seriam necessárias para atingir este número de filhotes (Bordeleau et al., 2022). Por esse motivo, adquiriu-se do Biotério da UFPel 6 ratas Wistar e 2 ratos Wistar (3 fêmeas/ 1 macho) (Summa et al., 1990). Sendo assim, foram utilizadas 6 fêmeas de rato albino Wistar (*Rattus norvegicus*) com 37 dias de vida (peripuberdade) e 2 machos da mesma linhagem e com igual idade das fêmeas no período em que ocorreu o acasalamento, todos provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Os animais foram mantidos aos trios em gaiolas de polipropileno abertas com tampo de arame (34 x 41 x 18 cm) em ambiente de alojamento com temperatura controlada ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), iluminação artificial das 6h às 18h e livre acesso à água e à alimentação e manuseados pelo menos uma vez por semana. Ademais, semanalmente as gaiolas domésticas foram limpas e equipadas com cama de maravalhas novas e material de enriquecimento ambiental (lascas de madeira e tubos plásticos) por um tratador profissional de animais.

As fêmeas, após uma semana de aclimação, foram randomizadas e divididas em dois grupos: controle ($n = 3$), que recebeu ração padrão de laboratório normocalórica e normolipídica (12% das calorias totais provenientes de fonte lipídica em 3,5 kcal/g – Nuvilab – Nuvital Nutrientes S/A; Curitiba, Paraná, Brasil), e experimental ($n = 3$), que recebeu dieta hipercalórica e hiperlipídica manufaturada por meio da mistura de ração padrão de laboratório pulverizada enriquecida com banha de porco (52% das calorias totais provenientes de fonte lipídica em 4,9 kcal/g) (tabela 3). Os machos foram mantidos em dieta com a mesma dieta das fêmeas durante o período que participarem do experimento, qual seja, o interregno do acasalamento. Aproximadamente seis semanas após o início da exposição às diferentes dietas aconteceu o acasalamento em alojamento conjunto das fêmeas com os machos por um período

de cinco dias completos e as dietas foram mantidas durante a prenhez e a lactação até o desmame.

A prenhez foi confirmada a partir da evolução diária do peso corporal das fêmeas e no instante em que houver confirmação as prenhes foram alojadas em gaiolas individualizadas enriquecida ambientalmente com tubos plásticos. O dia de nascimento das proles foi considerado como dia pós-natal 1 (P1) e houve ajuste de ninhadas para aproximadamente 8 animais por fêmea lactante, permanecendo nas prole ambos os sexos de animais em distribuição equânime sempre que possível. As proles não foram manipuladas até o quinto dia de nascimento para evitar possível estressor de separação materna no início da vida. Além disso, importante mencionar que a fim de evitar fatores potencialmente confundidores, como ciclos estrais e o impacto dos hormônios nas funções fisiológicas nas análises que envolverem desfechos relacionados ao sistema endócrino ou metabólico apenas os dados referentes filhotes machos serão estudados.

Table 3 - Composição nutricional da dieta controle (3.5 kcal/g) e da dieta hiperlipídica (4.9 kcal/g).

	Dieta controle ¹		Dieta hiperlipídica	
	g/100g	% kcal	g/100g	% kcal
Carboidrato	55	63	41,7	34
Proteína	22,5	25	17,2	14
Gordura	4,5	12	28,3	52
Outros componentes	18	-	12,8	-

¹NUVILAB CR-1, Quimtia, Paraná, Brazil (milho integral, farelo de soja, farelo de trigo, óleo de soja, carbonato de cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico/mineral, aminoácidos e antioxidante). g: gramas, kcal%: percentual do total de energia.

A partir do dia pós-natal 5 (P5) os filhotes foram contados, verificados quanto ao sexo, medidos, pesado e as caudas serão marcadas para identificação individual. Após o desmame em P21, ocorreu a eutanásia das lactantes e as proles foram alojadas em gaiolas contendo entre 3 e 4 animais de cada ninhada separados por sexo e expostos a dieta controle desde então até a adolescência no 54º dia seguinte ao nascimento (P54), momento em que os animais das proles foram eutanasiados. O resumo das etapas realizadas na execução do experimento estão graficamente descritos no desenho experimental a seguir (figura 10).

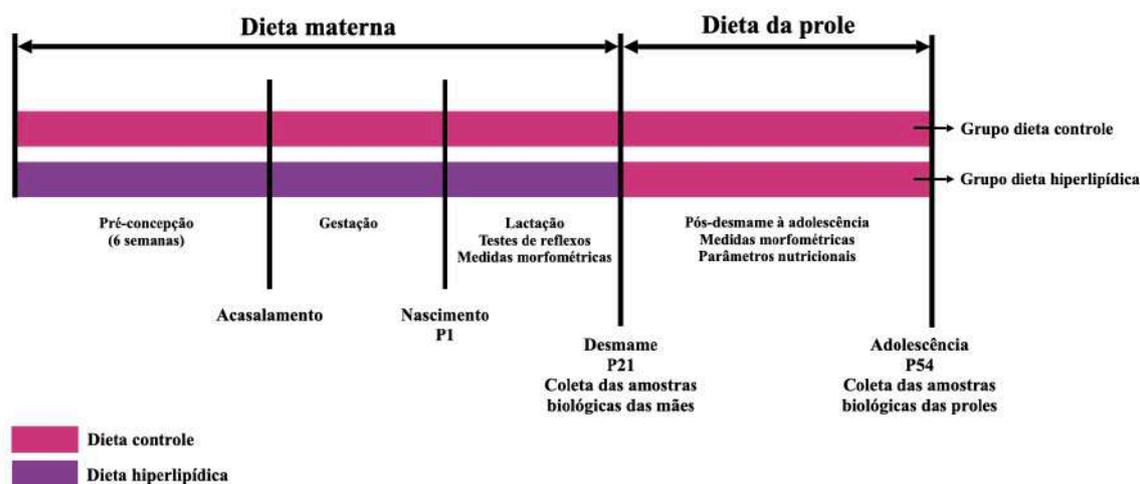


Figura 10 - Desenho experimental.

As eutanásias ocorreram por meio de superdosagem do anestésico inalatório isoflurano em concentração de 5% seguida de punção cardíaca para que animal estivesse inconsciente e, portanto, insensível à dor, e o processo aconteceu tão rapidamente quanto possível sem medo ou ansiedade conforme as recomendações do Conselho Canadense de Cuidados Animais. Além disso, todos os demais procedimentos foram 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.

O sangue total foi coletado por punção cardíaca no momento das eutanásias em tubo seco com ativador de colágeno (Becton, Dickinson and Company - BD) e centrifugado a 3.000 g (RCF do inglês *relative centrifugal force*) por 5 minutos a 4 °C (Eppendorf™ Centrifuge 5427R) com posterior armazenamento de alíquotas de soro em freezer - 80° C até a realização das análises biológicas. Os tecidos adiposos das regiões retroperitoneal e perigonadal (epididimal ou periovariana) e o fígado foram acessados através de incisão xifopúbica mediana com subsequente ressecção e igualmente foram armazenamento em freezer - 80° C objetivando a realização das análises biológicas. Os ossos do crânio, da mandíbula, do fêmur e da tíbia foram dissecados e armazenados em formol a 10% até a realização das análises biológicas.

6.1.2 Consumo da dieta e mensurações físicas dos animais

O consumo de dieta foi monitorado e calculado diariamente pela redução do resíduo (limpo e sujo) da quantidade total de alimento ofertado. As medidas corporais foram efetuadas em cada um dos animais, tanto das fêmeas mães quanto das proles. O peso corporal dos animais foi coletado uma vez semana em balança eletrônica com graduação de um grama (Geom, model BEL-00052) e expresso em gramas. As medidas corporais de comprimentos naso-anal e caudal foram avaliadas mediante uso de fita métrica plástica não-extensível com precisão de 0,1 centímetros e expressas em centímetros.

O índice de Lee, que é utilizado para avaliar a performance de crescimento em ratos e estabelecido como índice de massa corporal para ratos, será calculado pela fórmula [$\sqrt[3]{\text{peso corporal(g)}/\text{comprimento naso-anal(cm)}}$], sendo que valores iguais ou acima de 0.320 para as proles ao desmame e valores iguais ou acima de 0.300 para fêmeas mães em idade adulta e proles adolescentes serão classificados como obesidade (Lee, 1929; Bernardis ; Patterson, 1968; Ghasemi; Jeddi; Kashfi, 2021). O ganho de peso corporal será calculado semanalmente pela diminuição do peso corporal semanal inicial do peso corporal final de cada semana e expresso em gramas. A partir do tabelamento dos dados anteriormente coletados serão efetuados cálculos em equações que permitem melhor compreensão do comportamento alimentar e das variações metabólicas entre os animais que foram submetidos à experimentação.

A taxa específica de ganho de massa corporal será calculada pela divisão do peso corporal entre os tempos 2 e 1 pelo peso corporal no tempo 1 ($[(\text{peso corporal tempo 2(g)} - \text{peso corporal tempo 1(g)}) / \text{peso corporal tempo 1(g)}]$) e expressa em grama/grama (adaptado de Novelli et al., 2007). A ingesta energética será representado pelo consumo de em gramas de ração multiplicado pela energia metabolizável da dieta e dividido pelo peso corporal (Kcal/g de peso corporal) e expressa em kilocalorias/grama (Novelli et al., 2007; Ghasemi; Jeddi; Kashfi, 2021). A eficiência alimentar será calculada pela divisão do ganho de peso corporal semanal multiplicado por 100 pela ingesta energética de dieta em uma semana ($[\text{ganho de peso corporal(g)}/\text{ingesta energética(kcal)}]$) e expressa em percentual (Novelli et al., 2007; Ghasemi; Jeddi; Kashfi, 2021).

As medidas de comprimento craniano da prole referente aos eixos mediolateral (a distância entre os orifícios dos ouvidos) anteroposterior (distância entre o focinho e a

articulação cabeça-pescoço) foram realizados com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,03 milímetros (Giriko et al., 2013). No ossos coletados das proles ao final da adolescência, mediante o uso de paquímetro digital, serão mensuradas no crânio a altura do rosto com os dentes (distância entre o osso nasal e o final dos dentes incisivos superiores), a distância entre a inserção dos dentes incisivos superiores e os dentes pré-molares e o comprimento do alvéolos e na mandíbula as distâncias entre a inserção do incisivo inferior e os processo coronoide, condilar e angular e o comprimento da linha de dentes (Maynard; Downes, 2019) (figura 11).

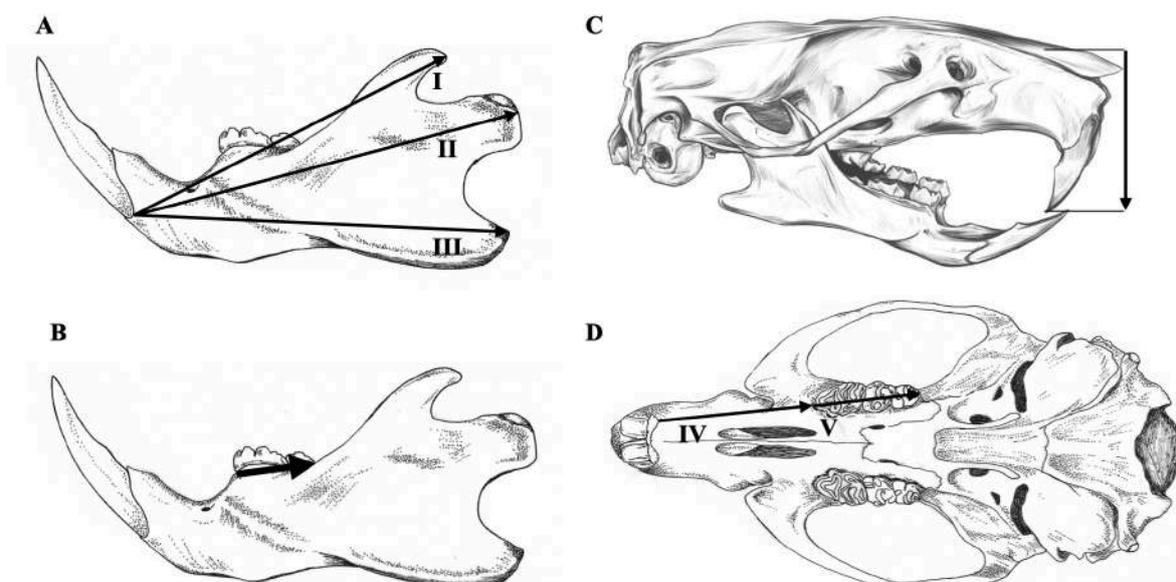


Figura 11 - Medidas mandibulares e cranianas. A) I - distância entre a inserção do incisivo inferior e o processo coronoide, II - distância entre a inserção do incisivo inferior e o processo condilar e III - distância entre a inserção do incisivo inferior e o processo angular; B) Comprimento da linha de dentes; C) Altura do rosto com os dentes; superiores), e D) IV - distância entre os dentes incisivos e os dentes pré-molares e V - comprimento do alvéolo.

Igualmente com uso do paquímetro digital serão mensurados nos ossos previamente coletados os comprimentos do fêmur pela medida entre o topo do trocânter maior e a

superfície inferior dos côndilos e da tíbia pela distância entre o topo do platô e a superfície inferior do processo maleolar lateral.

Os tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal também anteriormente coletados serão pesados em balança analítica com graduação de 0,0001 gramas (Bel, model MARK M 214Ai) para cálculo de peso proporcional ao peso corporal (tecido adiposo (g)/100 g de peso corporal) e o tecido adiposo abdominal será calculado pela soma do valor proporcional dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal.

6.1.3 Testes de desenvolvimento neurocomportamental

No teste do reflexo de endireitamento o animal foi 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 foi de 30 segundos. A observação do reflexo de endireitamento aconteceu no 5º dia da lactação. 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. Anotou-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 apresentaram o reflexo na primeira tentativa testou-se mais uma vez com a mesma latência. A ocorrência na primeira, segunda ou terceira tentativas também foi registrada. A observação do reflexo geotaxia negativa aconteceu no 10º dia da lactação.

6.1.4 Avaliação da atividade locomotora em campo aberto

O teste de campo aberto foi usado para testar a atividade locomotora da prole em PD48. O aparato de campo aberto foi feito de compensado e cercado por paredes de 30 cm de altura. O piso do aparato (40 x 40 cm) foi dividido em 9 quadrantes (3 x 3 cm). Os animais foram transferidos para a sala de testes em suas gaiolas e deixados para se aclimatar a esta sala antes do início do teste. Cada animal foi gentilmente colocado no centro da arena de campo aberto e deixado livre para explorar por 5 minutos. Após cada tentativa, o aparato foi limpo e desinfetado com álcool etílico 70%. A soma dos segmentos cruzados com as quatro patas para medir a atividade locomotora e o número de levantamento foram registrados para avaliar o comportamento exploratório.

6.1.5 Análises bioquímicas

As análises bioquímicas do soro serão realizadas no equipamento Roche Elecsys-411. Níveis séricos de colesterol total, triglicerídeos e HDL serão analisados por método enzimático colorimétrico. Colesterol total sérico, triglicerídeos e HDL serão analisados pelo método colorimétrico enzimático usando os sistemas CHOL2 COBAS (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, EUA; número de catálogo 03039773), TRIGL COBAS (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, EUA; número de catálogo 20767107) e HDLC3 (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, EUA; número de catálogo 04399803), respectivamente, e kit de ensaio de acordo com as instruções do fabricante (Roche Diagnostics). Triiodotironina total (TT3) e tiroxina total (TT4) séricas serão analisadas pelo método de imunoenensaio de eletroquimioluminescência usando os

sistemas ELECSYS T3 (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, EUA; número de catálogo 11731360) e ELECSYS T4 (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, USA; número de catálogo 12017709), respectivamente, e kit de ensaio de acordo com as instruções do fabricante (Roche Diagnostics).

IL-1, IL-6, TNF- α e γ -GT serão analisados por método de imunoenensaio de eletroquimioluminescência no equipamento anteriormente citado. Com intuito de promover uma avaliação mais acurada dos HTs a partir dos valores sérico de triiodotironina e de tirosina em nanomol/L serão calculadas as razões molares de T4/T3 e T3/T4 por divisões entre os respectivos níveis. O risco cardiovascular será previsto a partir do cálculo do índice de risco coronariano ([TC/HDL), do coeficiente aterogênico ([não-HDL/HDL]) e do índice aterogênico do plasma ([log10[TG/HDL]).

6.1.6 Análises de imagens radiológicas

As amostras de mandíbula e tibia serão submetidas à tomografia computadorizada de feixe cônico, utilizando um tomógrafo Prexion 3D® (Terarecon, San Mateo, CA, EUA). Mandíbulas e tíbias serão colocadas em caixas plásticas, cada uma composta por três compartimentos de 2,5 \times 6,0 cm contendo 1 mandíbula ou 1 tibia cada, que estarão imersas em formalina para atenuar a radiação. As caixas serão posicionadas na máquina com o auxílio de caixas de poliestireno, para adquirir uma altura ideal para o escaneamento tomográfico. Serão aplicados os seguintes parâmetros técnicos: determinação da tensão de pico90, 4 miliampère, resolução de voxel 0,1 mm, 37 segundos e campo de visão de 56 \times 52 mm. As

imagens obtidas serão armazenadas em um disco rígido no formato Digital Imaging and Communications in Medicine (DICOM).

A seguir, as imagens tomográficas armazenadas serão visualizadas e avaliadas por um examinador calibrado e cego utilizando o software Osirix 7.0 (OsiriX). A visualização Multiplanar Reconstructions Screen (MPR Screen) será utilizada para investigar os planos sagital, coronal e axial e para definir a região de interesse. Os valores de densidade óssea serão obtidos a partir da imagem do plano sagital para todas as regiões de interesse, utilizando a ferramenta Point, em unidades Hounsfield (HU). Para cada região serão analisados dois cortes consecutivos, medindo 3 pontos em cada corte anterior e posterior da mandíbula e 6 pontos para cada corte da tíbia (3 para a cortical superior e 3 para a cortical inferior). O valor médio de densidade óssea para a mandíbula será obtido pela combinação da região anterior e posterior de cada espécime e para a tíbia pela combinação das corticais superior e inferior.

6.1.7 Análises histológicas

Todas as mandíbulas e tíbias serão descalcificadas em ácido nítrico a 10% com uréia após exposição tomográfica. As mandíbulas serão hemiseccionadas e o lado esquerdo será selecionado para análise, assim como no exame tomográfico. Posteriormente, será feito um corte anteroposterior anterior ao primeiro molar, resultando em um fragmento anterior e um posterior, que serão embebidos em parafina separadamente. As tíbias serão seccionadas no ponto médio do eixo sagital e cada fragmento será embebido em parafina individualmente. Os blocos de parafina serão cortadas em cortes de 4 micrômetros e corados com hematoxilina e eosina (H&E). As lâminas histológicas obtidas das mandíbulas e das tíbias terão seções

digitalizadas usando um microscópio de luz Leica DM3000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha), conectado a uma câmera Leica DFC7000 T (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) e um computador AMD Phenom II X4 3,4 GHz com software Leica Application Suite (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha). As imagens serão capturadas com uma objetiva $\times 10$ e armazenadas em TIFF (Tagged Image File Format). Para cada lâmina, serão capturados quantos campos forem necessários para cobrir todo o tecido ósseo na região de interesse. Um examinador calibrado e cego, utilizando o software Adobe Photoshop CC (Adobe Systems, San Jose, CA, EUA) analisará as imagens. O tecido ósseo presente em cada campo será selecionado, usando ferramentas de seleção, e quantificado usando o valor de pixel do Histograma (Mahl et al., 2019). Vasos sanguíneos, espaços medulares, espaços vazios e cartilagem serão removidos da seleção. Em seguida, considerando o valor médio de pixel para cada espécime, será obtida uma proporção de volume ósseo, correspondente à proporção da área total da imagem ocupada por tecido ósseo.

Em relação ao fígado, o lobo inferior direito do fígado será seccionado longitudinalmente e imediatamente fixado em paraformaldeído a 4% em tampão fosfato salino neutro (Rodríguez-González et al., 2019). Após 24 h de fixação, os cortes hepáticos serão desidratados com etanol em concentrações crescentes de 75 a 95% e incluídos em parafina. Seções de 3 micrômetros serão coradas com H&E para determinar a extensão de esteatose e fibrose hepática. A porcentagem de área corada para gordura hepática será avaliada usando um microscópio de luz Leica DM3000 (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) com ampliação de 100x em cinco campos aleatórios em cada seção. Os campos do microscópio serão analisados usando o software AxioVisio LE versão real 4.8 (Zeiss copyright 2006–2010 Stuttgart-Alemanha). A coloração tricrômio de Masson será usada nos cortes para análise no software ImageJ (Image-Pro Plus Versão 3.1; Media Cybernetics, Inc.)

(Martelli et al., 2019). Todas as medidas histológicas serão realizadas por dois observadores independentes sem conhecimento da origem dos tecidos, e os resultados serão calculados no que concerne a gordura hepática total e área de gordura hepática (Bautista et al., 2016).

Os tecidos tecido adiposo retroperitoneal e perigonadal serão embebidos em parafina e cortados em seções de 6 micrômetros usando um micrótomo Leica RM550. As preparações serão coradas com solução de Mayer hemalum e eosina e examinadas e fotografadas com o equipamento citado anteriormente. As imagens digitais serão capturadas e posteriormente mensuradas. O software livre CellProfiler v.2.1.1 (Anne E. Carpenter e Thouis (Ray) Jones, Cambridge, EUA), que faz análises de histomorfometria e fenotipagem celular, será usado para análise histomorfométrica do tecido adiposo. Primeiramente, os contornos marginais das células nas lâminas serão separados digitalmente. Os adipócitos serão identificados usando o módulo do software Primary Object Identification. Por fim, a área dos adipócitos será medida por meio do módulo Objects Size/Shape Measurement e expressa em micrômetros quadrados. Os adipócitos serão classificados em dez classes de acordo com sua área de superfície: (1) adipócitos com área de superfície $< 2.000 \mu\text{m}^2$, (2) $2.000-2.999 \mu\text{m}^2$, (3) $3.000-3.999 \mu\text{m}^2$, (4) $4.000-4.999 \mu\text{m}^2$, (5) $5.000-5.999 \mu\text{m}^2$, (6) $6.000-6.999 \mu\text{m}^2$, (7) $7.000-7.999 \mu\text{m}^2$, (8) $8.000-8.999 \mu\text{m}^2$, (9) $9.000-10.000 \mu\text{m}^2$ e (10) $> 10.000 \mu\text{m}^2$. A porcentagem de adipócitos em cada classe será calculada para cada grupo de prole e cada tipo de tecido adiposo.

6.1.8 Análises estatísticas

Pelo menos três ninhadas por grupo serão incluídas nas avaliações a serem feitas no presente projeto ($n = 3-4$ animais por ninhada) e todas as medições, determinações, análises

biológicas e cálculos serão feitos em cada animal. As variáveis serão digitadas, duplamente checadas, e o banco de dados será analisado no software R 3.1.2. Para análise estatística, será efetuado teste-t de Student. A correlação linear de Pearson será utilizada para analisar associações entre as variáveis biológicas de interesse. Os dados serão expressos como média \pm desvio padrão, e um nível de significância de $P < 0,05$ serão considerado estatisticamente significativo para todas as variáveis..

6.6 Artigo 4

6.6.1 Seleção do tema

A seleção do tema decorreu da escrita do item 4.6 quando se percebeu que até o momento não foram sintetizadas sistematicamente os efeitos dos modelos de indução de hipotireoidismo no perfil lipídico de ratos Wistar. Inicialmente, ao tentar discorrer sobre o tema foi vislumbrado que, com exceção do colesterol total, não havia uma linearidade na produção de efeito mesmo que diante do mesmo modelo indutivo.

Posteriormente, viu-se que mesmo em modelos iguais as diferentes estirpes podem apresentar discordâncias ainda mais profundas no perfil lipídico. Sendo assim, buscou-se na literatura quais os motivos que poderiam estar levando a essas diferenças, encontrando-se que estirpes diversas, ainda que todas derivadas de ratos Wistar, podem apresentar níveis séricos de hormônios relacionados à tireoide significativamente diferente, o que pode impactar de modo desigual o metabolismo de lipídios, implicando na escolha da estirpe Wistar por ser a que representa o maior número de publicações e por isso permitirá uma visão mais ampla do panorama desejado.

Além disso, salienta-se que desde o início da estruturação do presente projeto vem se observando que existem diferenças ainda mais marcantes entre as espécies de roedores e por ser o rato que produz o fenótipo metabólico mais semelhante ao homem e o animal mais empregado em estudos sobre a glândula tireoide devido ao seu maior tamanho, considera-se justificada a escolha da espécie.

6.6.2 Pergunta de revisão e critérios de inclusão e exclusão

Ao final da revisão sistemática buscará responde-se a pergunta "como hipotireoidismo induzido em ratos da estirpe Wistar influenciam os parâmetros bioquímicos do perfil lipídico?" e os critérios de inclusão serão estudos em ratos Wistar que avaliem como métodos capazes de causar deficiência nos hormônios relacionados à tireoide e que tenham avaliados níveis séricos de TSH, T4 (total ou livre), T3 (total ou livre), colesterol, triglicerídeos, LDL e HDL. Serão excluídos estudos não originais, que não envolvam avaliação do perfil lipídico e não estejam escritos na língua inglesa.

6.6.3 Busca eletrônica, seleção de artigos e extração de dados

A busca eletrônica será realizada sem restrição de data inicial até outubro de 2022 nas bases de dados PubMed, Scopus, Scielo, ISI Web of Science, ScienceDirect e Embase. Uma busca inicial será realizada utilizando os seguintes termos MeSH de busca: "hypothyroidism" AND "wistar rats"; TITLE-ABS-KEY ("hypothyroidism"). Não usaremos o mecanismo de busca por title-abstract-keywords na base de dados PubMed porque esta opção não está disponível e conseqüente as outras opções acabam por restringir demasiadamente a busca.

Todas as referências serão gerenciadas no software Zotero (George Mason University - Virgínia/USA). Inicialmente, as referências duplicadas serão excluídas. Títulos, resumos e metodologias de estudo serão selecionados com base nos critérios de inclusão e exclusão por três revisores independentes (RG e CCdoA). As listas serão comparadas e em caso de desacordo, um consenso será alcançado por discussão. Quando não houver consenso, um quarto revisor decidirá se o artigo deve ser incluído (FN). Esta revisão sistemática seguirá as afirmações do PRISMA, com alguns ajustes pertinentes à necessidade de adaptações no que concerne a estudo envolvendo experimentação animal. Os dados serão extraídos e tabulados de forma independente por três revisores (RG e CCdoA) para serem submetidos à análise descritiva. Os casos de desacordo serão tratados conforme descrito acima. Uma metanálise, possivelmente, não será viável da provável heterogeneidade dos dados conforme análise da tabela 2.

7. CRONOGRAMA

Atividades	1º semestre de 2019	2º semestre de 2019	1º semestre de 2020	2º semestre de 2020	1º semestre de 2021	2º semestre de 2021	1º semestre de 2022	2º semestre de 2022
Revisão de literatura								
Seleção dos marcadores bioquímicos e das técnicas de análise de morfologia e estrutura dos tecidos ósseo, hepático e adiposo								
Execução das técnicas de análise bioquímica								
Análises dos resultados dos marcadores bioquímicos								
Redação do artigo 1								
Busca nas bases de dados, incorporação ao Zotero e seleção dos artigos								
Qualificação								
Redação do artigo 2								
Execução das técnicas de avaliação de morfologia e estrutura óssea								
Análise dos resultados das técnicas de avaliação de morfologia e estrutura óssea								
Redação do artigo 3								
Execução das técnicas de avaliação de morfologia dos tecidos hepático e adiposo								
Análise dos resultados das técnicas de avaliação de morfologia dos tecidos hepático e adiposo								
Redação do artigo 4								
Defesa da tese								

8. Orçamento

Descrição	Subtotal
Análises bioquímicas	R\$ 6.137,00
Análises de imagem	R\$ 2.965,00
Análises histológicas	R\$ 1.548,00
Reagentes diversos	R\$ 2.500,00
Ponteiras, microtubos e potes	R\$ 500,00
Luvas	R\$ 300,00
Total	R\$ 13.950,00

Referências

- ABDOLLAHI, S. et al. Associations between Maternal Dietary Patterns and Perinatal Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Cohort Studies. **Advances in Nutrition**, v. 12, n. 4, p. 1332–1352, 30 jul. 2021.
- AIRHIHENUWA, C. O. et al. Global Perspectives on Improving Chronic Disease Prevention and Management in Diverse Settings. **Preventing Chronic Disease**, v. 18, p. 210055, 8 abr. 2021.
- AKHAPHONG, B. et al. Maternal High-Fat Diet During Pre-Conception and Gestation Predisposes Adult Female Offspring to Metabolic Dysfunction in Mice. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, p. 780300, 17 jan. 2022.
- AKIYAMA, T. et al. High-fat hypercaloric diet induces obesity, glucose intolerance and hyperlipidemia in normal adult male Wistar rat. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 31, n. 1–3, p. 27–35, mar. 1996.
- ALMEIDA, N. A. S. et al. Connexin40 Messenger Ribonucleic Acid Is Positively Regulated by Thyroid Hormone (TH) Acting in Cardiac Atria via the TH Receptor. **Endocrinology**, v. 150, n. 1, p. 546–554, 1 jan. 2009.
- AMENDOLA, E. et al. A Mouse Model Demonstrates a Multigenic Origin of Congenital Hypothyroidism. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5038–5047, 1 dez. 2005.
- AMEREH, F. et al. Thyroid endocrine status and biochemical stress responses in adult male Wistar rats chronically exposed to pristine polystyrene nanoplastics. **Toxicology Research**, v. 8, n. 6, p. 953–963, 1 nov. 2019.
- AMIN, M. N. et al. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of cardiovascular disease and cancer. **SAGE Open Medicine**, v. 8, p. 205031212096575, jan. 2020.
- ARMITAGE, J. A. et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy: Programming adult aortic and renal dysfunction by maternal fat-rich diet. **The Journal of Physiology**, v. 565, n. 1, p. 171–184, maio 2005.
- AZZAM, A. Is the world converging to a ‘Western diet’? **Public Health Nutrition**, v. 24, n. 2, p. 309–317, fev. 2021.
- BADAVI, M. et al. Supplement therapy with apelin for improving the TSH level and lipid disorders in PTU-induced hypothyroid rats. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 2, p. 668–675, abr. 2022.
- 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. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 11, p. 2633–2642, nov. 2008.
- BAKER, P. et al. Ultra-processed foods and the nutrition transition: Global, regional and national trends, food systems transformations and political economy drivers. **Obesity Reviews**, v. 21, n. 12, dez. 2020.

- BANU, S. K.; GOVINDARAJULU, P.; ARULDHAS, M. M. Developmental profiles of TSH, sex steroids, and their receptors in the thyroid and their relevance to thyroid growth in immature rats. **Steroids**, v. 67, n. 2, p. 137–144, fev. 2002.
- BARGER, M. K. Maternal Nutrition and Perinatal Outcomes. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 55, n. 6, p. 502–511, 12 nov. 2010.
- BARKER, D. J. P. In utero programming of chronic disease. **Clinical Science**, v. 95, n. 2, p. 115, 1 ago. 1998.
- BARKER, M. et al. Translating Developmental Origins: Improving the Health of Women and Their Children Using a Sustainable Approach to Behaviour Change. **Healthcare**, v. 5, n. 1, p. 17, 20 mar. 2017.
- BARTHOLOMEW, M. James Lind's Treatise of the Scurvy (1753). **Postgraduate Medical Journal**, v. 78, n. 925, p. 695–696, 1 nov. 2002.
- BASSETT, J. H. D. et al. Optimal bone strength and mineralization requires the type 2 iodothyronine deiodinase in osteoblasts. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 16, p. 7604–7609, 20 abr. 2010.
- BAUTISTA, C. J. et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 3, p. 538–546, 14 fev. 2016.
- BERNAL, J. Deiodinases☆. Em: **Reference Module in Neuroscience and Biobehavioral Psychology**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. B9780128093245034000.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527–528, abr. 1968.
- BIANCO, A. et al. Biochemistry, Cellular and Molecular Biology, and Physiological Roles of the Iodothyronine Selenodeiodinases. **Endocrine Reviews**, v. 23, n. 1, p. 38–89, 1 fev. 2002.
- BIONDI, B.; KLEIN, I. Hypothyroidism as a Risk Factor for Cardiovascular Disease. **Endocrine**, v. 24, n. 1, p. 001–014, 2004.
- BOLAM, S. M. et al. A Maternal High Fat Diet Leads to Sex-Specific Programming of Mechanical Properties in Supraspinatus Tendons of Adult Rat Offspring. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 729427, 13 set. 2021.
- BORDELEAU, M. et al. Maternal high-fat diet in mice induces cerebrovascular, microglial and long-term behavioural alterations in offspring. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 26, 11 jan. 2022.
- BOWERS, K. et al. A prospective study of prepregnancy dietary fat intake and risk of gestational diabetes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 95, n. 2, p. 446–453, 1 fev. 2012.
- BOWSER, S. M. et al. Serum endotoxin, gut permeability and skeletal muscle metabolic adaptations following a short term high fat diet in humans. **Metabolism**, v. 103, p. 154041, fev. 2020.
- BRENT, G. A. Mechanisms of thyroid hormone action. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 9, p. 3035–3043, 4 set. 2012.

- BRUNETTO, E. L. et al. T₃ Rapidly Increases *SLC2A4* Gene Expression and GLUT4 Trafficking to the Plasma Membrane in Skeletal Muscle of Rat and Improves Glucose Homeostasis. **Thyroid**, v. 22, n. 1, p. 70–79, jan. 2012.
- BUCKELS, E. J. et al. The Impact of Maternal High-Fat Diet on Bone Microarchitecture in Offspring. **Frontiers in Nutrition**, v. 8, p. 730037, 30 ago. 2021.
- BURÉN, J. et al. A Ketogenic Low-Carbohydrate High-Fat Diet Increases LDL Cholesterol in Healthy, Young, Normal-Weight Women: A Randomized Controlled Feeding Trial. **Nutrients**, v. 13, n. 3, p. 814, 2 mar. 2021.
- CALEYACHETTY, R. et al. Ethnicity-specific BMI cutoffs for obesity based on type 2 diabetes risk in England: a population-based cohort study. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 9, n. 7, p. 419–426, jul. 2021.
- CAPPOLA, A. R. et al. Thyroid and Cardiovascular Disease: Research Agenda for Enhancing Knowledge, Prevention, and Treatment. **Circulation**, v. 139, n. 25, p. 2892–2909, 18 jun. 2019.
- CASTRO-ALVES, V.; OREŠIČ, M.; HYÖTYLÄINEN, T. Lipidomics in nutrition research. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 25, n. 5, p. 311–318, set. 2022.
- CERCATO, C.; FONSECA, F. A. Cardiovascular risk and obesity. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 74, dez. 2019.
- CERF, M. E. High Fat Programming and Cardiovascular Disease. **Medicina**, v. 54, n. 5, p. 86, 13 nov. 2018.
- CHADDHA, U. et al. A 58-Year-Old Man With Fatigue, Weight Loss, and Diffuse Miliary Pulmonary Opacities. **Chest**, v. 151, n. 6, p. e131–e134, jun. 2017.
- CHAKER, L. et al. Hypothyroidism. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 8, n. 1, p. 30, 19 maio 2022.
- 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. **Journal of Neuroscience**, v. 28, n. 46, p. 12107–12119, 12 nov. 2008.
- CHANOINE, J. P. et al. The thyroid gland is a major source of circulating T₃ in the rat. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 6, p. 2709–2713, jun. 1993.
- CHARAN, J.; KANTHARIA, N. D. How to calculate sample size in animal studies? **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 4, p. 303–306, dez. 2013.
- CHEN, G.; GEILING, E. M. K. The effect of thiamine deficiency, quinidine, hyperthyroidism and hypothyroidism on the adenosinetriphosphate content and the adenosinetriphosphate activity of the heart muscle of rats. **Federation Proceedings**, v. 5, n. 1 Pt 2, p. 169, 1946.
- CHEN, J. et al. Inhibition of fetal bone development through epigenetic down-regulation of HoxA10 in obese rats fed high-fat diet. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 3, p. 1131–1141, mar. 2012.
- CHEN, J.-R. et al. Maternal obesity impairs skeletal development in adult offspring. **Journal of Endocrinology**, v. 239, n. 1, p. 33–47, out. 2018.

- CHOKSI, N. Y. et al. Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 68, n. 6, p. 479–491, dez. 2003.
- CHUSYD, D. E. et al. Relationships between Rodent White Adipose Fat Pads and Human White Adipose Fat Depots. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, 19 abr. 2016.
- 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, nov. 2009.
- CLARK, M.; OGDEN, J. The impact of pregnancy on eating behaviour and aspects of weight concern. **International Journal of Obesity**, v. 23, n. 1, p. 18–24, jan. 1999.
- COLIN BELL, A. Ethnic Differences in the Association between Body Mass Index and Hypertension. **American Journal of Epidemiology**, v. 155, n. 4, p. 346–353, 15 fev. 2002.
- CONDE, E. et al. Postnatal variations in the number and size of C-cells in the rat thyroid gland. **Cell and Tissue Research**, v. 280, n. 3, p. 659–663, jun. 1995.
- COOPER, D. S. et al. Propylthiouracil (PTU) pharmacology in the rat. II. Effects of PTU on thyroid function. **Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 921–928, set. 1983.
- COOPER, D. S. et al. Methimazole pharmacology in the rat: studies using a newly developed radioimmunoassay for methimazole. **Endocrinology**, v. 114, n. 3, p. 786–793, mar. 1984.
- CORDAIN, L. et al. Origins and evolution of the Western diet: health implications for the 21st century. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 2, p. 341–354, 1 fev. 2005.
- CURI, H. T. et al. Maternal high-fat diet increases anhedonic behavior and modulates hippocampal Mash1 and BDNF expression in adult offspring. **Neuroscience Letters**, v. 764, p. 136239, nov. 2021.
- DAVIES, K.; WARDLE, J. Body image and dieting in pregnancy. **Journal of Psychosomatic Research**, v. 38, n. 8, p. 787–799, nov. 1994.
- DE LUCA, R. et al. Thyroid Hormones Interaction With Immune Response, Inflammation and Non-thyroidal Illness Syndrome. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 614030, 21 jan. 2021.
- DE MOURA E DIAS, M. et al. Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 13, n. 1, p. 32, dez. 2021.
- DEBARBA, L. K. et al. Neonatal nutritional programming induces gliosis and alters the expression of T-cell protein tyrosine phosphatase and connexins in male rats. **Hormones and Behavior**, v. 120, p. 104690, abr. 2020.
- DECKELBAUM, R. J.; WILLIAMS, C. L. Childhood Obesity: The Health Issue. **Obesity Research**, v. 9, n. S11, p. 239S-243S, nov. 2001.
- DIETRICH, J. W. et al. Calculated Parameters of Thyroid Homeostasis: Emerging Tools for Differential Diagnosis and Clinical Research. **Frontiers in Endocrinology**, v. 7, 9 jun. 2016.

- DILLMANN, W. Cardiac hypertrophy and thyroid hormone signaling. **Heart Failure Reviews**, v. 15, n. 2, p. 125–132, mar. 2010.
- DONG, Y.-M. et al. High dietary intake of medium-chain fatty acids during pregnancy in rats prevents later-life obesity in their offspring. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 8, p. 791–797, ago. 2011.
- DORRAJI, E. et al. Development of a High-Affinity Antibody against the Tumor-Specific and Hyperactive 611-p95HER2 Isoform. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4859, 5 out. 2022.
- DUMOLT, J. H. et al. Malprogramming of Hepatic Lipid Metabolism due to Excessive Early Cholesterol Exposure in Adult Progeny. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 63, n. 2, p. 1800563, jan. 2019.
- 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, maio 2008.
- DUNTAS, L. H.; BRENTA, G. A Renewed Focus on the Association Between Thyroid Hormones and Lipid Metabolism. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 511, 3 set. 2018.
- EATON, S. B. The ancestral human diet: what was it and should it be a paradigm for contemporary nutrition? **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, n. 1, p. 1–6, fev. 2006.
- 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, 31 jan. 1985.
- EKEROT, P. et al. Systems pharmacology modeling of drug-induced modulation of thyroid hormones in dogs and translation to human. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 6, p. 1513–1524, jun. 2013.
- ESPÍRITO-SANTO, D. A. et al. Exposure to a high-fat diet during intrauterine life and post-birth causes cardiac histomorphometric changes in rats: A systematic review. **Life Sciences**, v. 303, p. 120658, ago. 2022.
- FAIVRE-SARRAILH, C.; RABIÉ, A. A lower proportion of filamentous to monomeric actin in the developing cerebellum of thyroid-deficient rats. **Developmental Brain Research**, v. 41, n. 1–2, p. 293–297, jun. 1988.
- FENG, J. et al. BAIBA Involves in Hypoxic Training Induced Browning of White Adipose Tissue in Obese Rats. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 882151, 23 jun. 2022.
- FESKENS, E. J. M. et al. Women's health: optimal nutrition throughout the lifecycle. **European Journal of Nutrition**, v. 61, n. S1, p. 1–23, jun. 2022.
- FRANCO, J. G. et al. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning: Maternal high fat diet programmes adrenal and thyroid function. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 21, p. 5503–5518, nov. 2012.
- FRANCO, M. et al. Decreased activity of lecithin:cholesterol acyltransferase and hepatic lipase in chronic hypothyroid rats: Implications for reverse cholesterol transport. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 246, n. 1, p. 51–56, 1 abr. 2003.

- FRANKO, D. L.; WALTON, B. E. Pregnancy and eating disorders: A review and clinical implications. **International Journal of Eating Disorders**, v. 13, n. 1, p. 41–47, jan. 1993.
- FUKUCHI, M. et al. Evidence for a deficient pancreatic β -cell response in a rat model of hyperthyroidism. **Life Sciences**, v. 71, n. 9, p. 1059–1070, jul. 2002.
- FUOCHI, S. et al. Puberty onset curve in CD (Sprague Dawley) and Long Evans outbred male rats. **Laboratory Animals**, v. 56, n. 5, p. 471–475, out. 2022.
- GALVÃO, T. F.; PEREIRA, M. G. Revisões sistemáticas da literatura: passos para sua elaboração. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 1, p. 183–184, mar. 2014.
- GAO, C. et al. Endothelial Functioning and Hemodynamic Parameters in Rats with Subclinical Hypothyroid and the Effects of Thyroxine Replacement. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, p. e0131776, 9 jul. 2015.
- GARN, S. M.; LEONARD, W. R. What Did Our Ancestors Eat? **Nutrition Reviews**, v. 47, n. 11, p. 337–345, 27 abr. 2009.
- GAWLIŃSKA, K. et al. A Maternal High-Fat Diet during Early Development Provokes Molecular Changes Related to Autism Spectrum Disorder in the Rat Offspring Brain. **Nutrients**, v. 13, n. 9, p. 3212, 16 set. 2021.
- GEREBEN, B. et al. The Human, but Not Rat, *dio2* Gene Is Stimulated by Thyroid Transcription Factor-1 (TTF-1). **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 112–124, 1 jan. 2001.
- GEREBEN, B. et al. Activation and inactivation of thyroid hormone by deiodinases: Local action with general consequences. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 570–590, fev. 2008a.
- GEREBEN, B. et al. Cellular and Molecular Basis of Deiodinase-Regulated Thyroid Hormone Signaling1. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 898–938, 1 dez. 2008b.
- GHASEMI, A.; JEDDI, S.; KASHFI, K. The laboratory rat: age and body weight matter. **EXCLI Journal**; **20:Doc1431**; ISSN 1611-2156, 2021.
- GILETA, A. F. et al. Genetic characterization of outbred Sprague Dawley rats and utility for genome-wide association studies. **PLOS Genetics**, v. 18, n. 5, p. e1010234, 31 maio 2022.
- GILMORE, L. A.; KLEMPPEL-DONCHENKO, M.; REDMAN, L. M. Pregnancy as a window to future health: Excessive gestational weight gain and obesity. **Seminars in Perinatology**, v. 39, n. 4, p. 296–303, jun. 2015.
- GIORGI SILVEIRA, R. et al. MicroRNAs expressed in neuronal differentiation and their associated pathways: Systematic review and bioinformatics analysis. **Brain Research Bulletin**, v. 157, p. 140–148, abr. 2020.
- GIRIKO, C. Á. 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. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 31, n. 8, p. 731–739, dez. 2013.
- GOMES, C. DE B. et al. Práticas alimentares de gestantes e mulheres não grávidas: há diferenças? **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 37, n. 7, p. 325–332, jul. 2015.

- GONG, N. et al. Adipokine expression and endothelial function in subclinical hypothyroidism rats. **Endocrine Connections**, v. 7, n. 2, p. 295–304, fev. 2018.
- HAPON, M. B. et al. Effects of hypothyroidism on mammary and liver lipid metabolism in virgin and late-pregnant rats. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 6, p. 1320–1330, jun. 2005.
- HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, n. 2, p. 270–299, dez. 2010.
- HE, Y. et al. Dietary patterns as compared with physical activity in relation to metabolic syndrome among Chinese adults. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 10, p. 920–928, out. 2013.
- HEEMSTRA, K. A. et al. Thr92Ala polymorphism in the type 2 deiodinase is not associated with T4 dose in athyroid patients or patients with Hashimoto thyroiditis. **Clinical Endocrinology**, v. 71, n. 2, p. 279–283, ago. 2009.
- HELMAN, C. G. **Cultura, saúde e doença**. Porto Alegre: Artmed, 5. ed., 2009.
- HENDERSON-SMART, D. J.; CROWTHER, C. A. The cochrane databases of randomized controlled trials and systematic reviews in pregnancy, childbirth and neonatal care. **Seminars in Neonatology**, v. 2, n. 3, p. 211–219, ago. 1997.
- HILSDORF, A. W.; KRIEGER, J. E. Characterization of six rat strains (*Rattus norvegicus*) by mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 3, p. 267–273, mar. 1999.
- HINTZE, K. J. et al. Modeling the Western Diet for Preclinical Investigations. **Advances in Nutrition**, v. 9, n. 3, p. 263–271, 1 maio 2018.
- HORAN, M. et al. Maternal Nutrition and Glycaemic Index during Pregnancy Impacts on Offspring Adiposity at 6 Months of Age—Analysis from the ROLO Randomised Controlled Trial. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 7, 4 jan. 2016.
- HU, Z. et al. S-Nitrosylation-Mediated Reduction of Ca^v1.2 Surface Expression and Open Probability Underlies Attenuated Vasoconstriction Induced by Nitric Oxide. **Hypertension**, v. 79, n. 12, p. 2854–2866, dez. 2022.
- HUESCA-GÓMEZ, C. et al. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. **Metabolism**, v. 51, n. 4, p. 443–450, abr. 2002.
- HWANG, J. et al. Therapeutic effects of acupuncture with MOK, a polyherbal medicine, on PTU-induced hypothyroidism in rats. **Experimental and Therapeutic Medicine**, 18 maio 2018.
- IORDANIDOU, A.; HADZOPOULOU-CLADARAS, M.; LAZOU, A. Non-genomic effects of thyroid hormone in adult cardiac myocytes: relevance to gene expression and cell growth. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 340, n. 1–2, p. 291–300, jul. 2010.
- ISMAIL, B. S. et al. Cinnamaldehyde Mitigates Atherosclerosis Induced by High-Fat Diet via Modulation of Hyperlipidemia, Oxidative Stress, and Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1–15, 21 jun. 2022.

- JACOB, H. J. Functional Genomics and Rat Models. **Genome Research**, v. 9, n. 11, p. 1013–1016, 1 nov. 1999.
- JEONG, C. et al. Acceleration of bone formation by octacalcium phosphate composite in a rat tibia critical-sized defect. **Journal of Orthopaedic Translation**, v. 37, p. 100–112, nov. 2022.
- JIANG, L.-Q. et al. Dronedarone and Amiodarone Induce Dyslipidemia and Thyroid Dysfunction in Rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 6, p. 2311–2322, 2016.
- KANAREK, R. B.; MARKS-KAUFMAN, R. Developmental aspects of sucrose-induced obesity in rats. **Physiology & Behavior**, v. 23, n. 5, p. 881–885, nov. 1979.
- KEAY, J.; THORNTON, J. W. Hormone-Activated Estrogen Receptors in Annelid Invertebrates: Implications for Evolution and Endocrine Disruption. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1731–1738, 1 abr. 2009.
- KELLEY, M. W.; TURNER, J. K.; REH, T. A. Ligands of steroid/thyroid receptors induce cone photoreceptors in vertebrate retina. **Development**, v. 121, n. 11, p. 3777–3785, 1 nov. 1995.
- KHAN, K. S. et al. Five Steps to Conducting a Systematic Review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 96, n. 3, p. 118–121, mar. 2003.
- KING, J. C. Maternal Obesity, Metabolism, and Pregnancy Outcomes. **Annual Review of Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 271–291, 1 ago. 2006.
- KLEIN, I.; OJAMAA, K. Thyroid Hormone and the Cardiovascular System. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 7, p. 501–509, 15 fev. 2001.
- KOPP, W. How Western Diet And Lifestyle Drive The Pandemic Of Obesity And Civilization Diseases. **Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy**, v. 12, p. 2221–2236, 2019.
- KRUSIUS, F. E.; PELTOLA, P. The effect of prolonged treatment with mercazole (1-methyl-2-mercapto-imizadole) on the thyroid in rats. **Annales Medicinæ Experimentalis Et Biologiæ Fenniae**, v. 41, p. 266–277, 1963.
- KUEHN, M. R. et al. A potential animal model for Lesch–Nyhan syndrome through introduction of HPRT mutations into mice. **Nature**, v. 326, n. 6110, p. 295–298, mar. 1987.
- KUMAR, H.; DIWAN, V.; SHARMA, B. Protective Effect of Nimodipine Against Valproic-acid Induced Biochemical and Behavioral Phenotypes of Autism. **Clinical Psychopharmacology and Neuroscience**, v. 20, n. 4, p. 725–736, 30 nov. 2022.
- KUSHWAHA, P. et al. Maternal High-Fat Diet Induces Long-Lasting Defects in Bone Structure in Rat Offspring Through Enhanced Osteoclastogenesis. **Calcified Tissue International**, v. 108, n. 5, p. 680–692, maio 2021.
- LASKER, S. et al. High-fat diet-induced metabolic syndrome and oxidative stress in obese rats are ameliorated by yogurt supplementation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 20026, dez. 2019.
- LEE, M. O. Determination of the surface area of the white rat with its application to the expression of metabolic results. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 89, n. 1, p. 24–33, 1 jun. 1929.

- LEE, R. C.; FEINBAUM, R. L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 843–854, dez. 1993.
- LEWITT, M. S.; BAKER, J. S. Relationship between abdominal adiposity, cardiovascular fitness, and biomarkers of cardiovascular risk in British adolescents. **Journal of Sport and Health Science**, v. 9, n. 6, p. 634–644, dez. 2020.
- LI, M. et al. The leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuate brain aging in D-galactose-induced rats via regulating glutamate metabolism and Nrf2 signaling pathway. **Experimental Gerontology**, v. 170, p. 111978, dez. 2022.
- LIAO, Z. et al. Effects of high-fat diet on thyroid autoimmunity in the female rat. **BMC Endocrine Disorders**, v. 22, n. 1, p. 179, 16 jul. 2022.
- LIU, F. et al. Abnormal prostate microbiota composition is associated with experimental autoimmune prostatitis complicated with depression in rats. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 966004, 30 set. 2022.
- LOWENSOHN, R. I.; STADLER, D. D.; NAZE, C. Current Concepts of Maternal Nutrition. **Obstetrical & Gynecological Survey**, v. 71, n. 7, p. 413–426, jul. 2016.
- MADALENA, I. R. et al. Evaluation of tooth eruption rate of incisor teeth in rats with estrogen deficiency. **Clinical Oral Investigations**, 19 out. 2022.
- MADANAT, H. N. et al. Young urban women and the nutrition transition in China: a familiar pattern emerges. **Global Health Promotion**, v. 17, n. 4, p. 43–51, dez. 2010.
- MAHESHWARI, R. et al. Guiding Principles for Human and Animal Research During Pharmaceutical Product Development. Em: **Dosage Form Design Parameters**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 621–664.
- MAHL, C. R. W. et al. Avaliação radiográfica e histomorfométrica da mandíbula de ratas medicadas com corticóide e bifosfonato. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, v. 50, n. 1, p. 16–19, 23 jan. 2009.
- MARQUES, C. et al. High-fat diet-induced obesity Rat model: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley Rat. **Adipocyte**, v. 5, n. 1, p. 11–21, 3 fev. 2016.
- MASIC, I.; MIOKOVIC, M.; MUHAMEDAGIC, B. Evidence Based Medicine - New Approaches and Challenges. **Acta Informatica Medica**, v. 16, n. 4, p. 219, 2008.
- MATIAS, A. et al. Differential Effects of High Sugar, High Lard or a Combination of Both on Nutritional, Hormonal and Cardiovascular Metabolic Profiles of Rodents. **Nutrients**, v. 10, n. 8, p. 1071, 11 ago. 2018.
- MAYER, C. et al. The Potential of the Marine Microalga *Diacronema lutheri* in the Prevention of Obesity and Metabolic Syndrome in High-Fat-Fed Wistar Rats. **Molecules**, v. 27, n. 13, p. 4246, 30 jun. 2022.
- MAYNARD, R. L.; DOWNES, N. The Skull. Em: **Anatomy and Histology of the Laboratory Rat in Toxicology and Biomedical Research**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 41–56.

- MCCORMICK, D. L. Preclinical Evaluation of Carcinogenicity Using Standard-Bred and Genetically Engineered Rodent Models. Em: **A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 273–292.
- MCFALLS, A. J. et al. An RNA-seq study of the mPFC of rats with different addiction phenotypes. **Brain Research Bulletin**, v. 191, p. 107–120, dez. 2022.
- MEENAKSHI, J. V. Trends and patterns in the triple burden of malnutrition in India. **Agricultural Economics**, v. 47, n. S1, p. 115–134, nov. 2016.
- MENTE, A. et al. A Systematic Review of the Evidence Supporting a Causal Link Between Dietary Factors and Coronary Heart Disease. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, n. 7, p. 659, 13 abr. 2009.
- MILNE, C. Cases of Hypo-Thyroidism. **The Indian Medical Gazette**, v. 49, n. 6, p. 221–223, jun. 1914.
- MIOTTO, P. et al. Maternal High Fat Feeding Does Not Have Long-Lasting Effects on Body Composition and Bone Health in Female and Male Wistar Rat Offspring at Young Adulthood. **Molecules**, v. 18, n. 12, p. 15094–15109, 6 dez. 2013.
- MIOTTO, P. M. et al. High Saturated Fat Diet Alters the Lipid Composition of Triacylglycerol and Polar Lipids in the Femur of Dam and Offspring Rats. **Lipids**, v. 50, n. 6, p. 605–610, jun. 2015.
- MIRANDA, J. et al. Lipid metabolism in adipose tissue and liver from diet-induced obese rats: a comparison between Wistar and Sprague-Dawley strains. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 74, n. 4, p. 655–666, nov. 2018.
- MODLINSKA, K.; PISULA, W. The Norway rat, from an obnoxious pest to a laboratory pet. **eLife**, v. 9, p. e50651, 17 jan. 2020.
- MOHAMMADI, M. M.; SAEB, M.; NAZIFI, S. Experimental hypothyroidism in adult male rats: the effects of *Artemisia dracunculoides* aqueous extract on serum thyroid hormones, lipid profile, leptin, adiponectin, and antioxidant factors. **Comparative Clinical Pathology**, v. 29, n. 2, p. 485–494, abr. 2020.
- MONTEIRO, C. A. et al. The nutrition transition in Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 105–113, fev. 1995.
- MORENO-SOSA, T. et al. Desmoglein-4 Deficiency Exacerbates Psoriasiform Dermatitis in Rats While Psoriasis Patients Displayed a Decreased Gene Expression of DSG4. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 625617, 29 abr. 2021.
- MOTAWEE, M. E. et al. An electron microscopic and biochemical study of the potential protective effect of ginger against Cadmium-induced testicular pathology in rats. **Frontiers in Physiology**, v. 13, p. 996020, 3 out. 2022.
- MULLUR, R.; LIU, Y.-Y.; BRENT, G. A. Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 355–382, abr. 2014.
- NDREPEPA, G.; KASTRATI, A. Gamma-glutamyl transferase and cardiovascular disease. **Annals of Translational Medicine**, v. 4, n. 24, p. 481–481, dez. 2016.

- NESS, G. C.; LOPEZ, D. Transcriptional Regulation of Rat Hepatic Low-Density Lipoprotein Receptor and Cholesterol 7 α Hydroxylase by Thyroid Hormone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 323, n. 2, p. 404–408, nov. 1995.
- NG, S. W.; POPKIN, B. M. Time use and physical activity: a shift away from movement across the globe: Declines in movement across the globe. **Obesity Reviews**, v. 13, n. 8, p. 659–680, ago. 2012.
- NICULESCU, M. D.; LUPU, D. S. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 27, n. 7, p. 627–633, nov. 2009.
- NNORUKA, U. C. et al. Impact of polystyrene microplastic exposure on lipid profile and oxidative stress status of male and female Wistar rats. **Environmental Analysis Health and Toxicology**, v. 37, n. 3, p. e2022024, 7 set. 2022.
- NOVELLI, E. L. B. et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. **Laboratory Animals**, v. 41, n. 1, p. 111–119, 1 jan. 2007.
- OKTAY, S.; USLU, L.; EMEKLI, N. Effects of altered thyroid states on oxidative stress parameters in rats. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 28, n. 2, 1 jan. 2017.
- OLIVEIRA, T. W. S. et al. A Perinatal Palatable High-Fat Diet Increases Food Intake and Promotes Hypercholesterolemia in Adult Rats. **Lipids**, v. 46, n. 11, p. 1071–1074, nov. 2011.
- ORTIGA-CARVALHO, T. M. et al. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. Em: TERJUNG, R. (Ed.). **Comprehensive Physiology**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2016. p. 1387–1428.
- 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: Paleolithic Diet in Type 2 Diabetes. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 33, n. 1, p. e2828, jan. 2017.
- PAGE, M. J. et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. **BMJ**, p. n71, 29 mar. 2021.
- PAN, W. et al. Food-derived bioactive oligopeptide iron complexes ameliorate iron deficiency anemia and offspring development in pregnant rats. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 997006, 7 set. 2022.
- PANDA, S. et al. Syringic acid, a novel thyroid hormone receptor- β agonist, ameliorates propylthiouracil-induced thyroid toxicity in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 35, n. 8, ago. 2021.
- PARENTE, L. B.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. **Clinical Nutrition**, v. 27, n. 4, p. 623–634, ago. 2008.
- 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. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 67, n. 2, p. 196–201, fev. 2013.

- PARRY, S. A. et al. Intrahepatic Fat and Postprandial Glycemia Increase After Consumption of a Diet Enriched in Saturated Fat Compared With Free Sugars. **Diabetes Care**, v. 43, n. 5, p. 1134–1141, 1 maio 2020.
- PATEL, M. et al. Evaluation of acute physiological and molecular alterations in surgically developed hypothyroid Wistar rats. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 4, n. 2, p. 110–115, jun. 2013.
- PEETERS, R. P.; VISSER, T. J. Metabolism of Thyroid Hormone. Em: FEINGOLD, K. R. et al. (Eds.). **Endotext**. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc., 2000.
- PERIC KACAREVIC, Z. et al. High-fat diet induced changes in lumbar vertebra of the male rat offsprings. **Acta Histochemica**, v. 118, n. 7, p. 711–721, set. 2016.
- PINGALI, P. Westernization of Asian diets and the transformation of food systems: Implications for research and policy. **Food Policy**, v. 32, n. 3, p. 281–298, jun. 2007.
- PINHAS-HAMIEL, O. et al. Increased incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus among adolescents. **The Journal of Pediatrics**, v. 128, n. 5, p. 608–615, maio 1996.
- POPKIN, B. M. et al. The nutrition transition in China: a cross-sectional analysis. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 47, n. 5, p. 333–346, maio 1993.
- POPKIN, B. M.; CORVALAN, C.; GRUMMER-STRAWN, L. M. Dynamics of the double burden of malnutrition and the changing nutrition reality. **The Lancet**, v. 395, n. 10217, p. 65–74, jan. 2020.
- POPKIN, B. M.; NG, S. W. The nutrition transition to a stage of high obesity and noncommunicable disease prevalence dominated by ultra-processed foods is not inevitable. **Obesity Reviews**, v. 23, n. 1, jan. 2022.
- Cureau, F. V. et al. Estudo de riscos cardiovasculares em adolescentes (ERICA): resultados principais e perspectivas. **Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo**, v. 29, n. 1, p. 28–33, 1 mar. 2019.
- RASMUSSEN, K. M.; YAKTINE, A. L.; INSTITUTE OF MEDICINE (U.S.) (EDS.). **Weight gain during pregnancy: reexamining the guidelines**. Washington, DC: National Academies Press, 2009.
- RAUCHOVÁ, H. et al. N-3 Polyunsaturated Fatty Acids Supplementation Does not Affect Changes of Lipid Metabolism Induced in Rats by Altered Thyroid Status. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 07, p. 507–512, jul. 2013.
- RAUCHOVÁ, H. et al. Red Palm Oil Supplementation Does Not Increase Blood Glucose or Serum Lipids Levels in Wistar Rats With Different Thyroid Status. **Physiological Research**, p. 307–315, 30 abr. 2018.
- REARDON, T. et al. The processed food revolution in African food systems and the double burden of malnutrition. **Global Food Security**, v. 28, p. 100466, mar. 2021.
- REDMOND, O.; TUFFERY, A. R. Mitotic rate of the rat's thyroid gland during hypertrophy induced by an antithyroid agent (carbimazole). **Journal of Anatomy**, v. 127, n. Pt 2, p. 353–362, out. 1978.

- PEARSON, K. Report on Certain Enteric Fever Inoculation Statistics. **BMJ**, v. 2, n. 2288, p. 1243–1246, 5 nov. 1904.
- RIBAROFF, G. A. et al. Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis: Maternal HFD and offspring metabolism. **Obesity Reviews**, v. 18, n. 6, p. 673–686, jun. 2017.
- RITTER, K. et al. Hypoparathyroidism after total thyroidectomy: incidence and resolution. **Journal of Surgical Research**, v. 197, n. 2, p. 348–353, ago. 2015.
- ROBSON, H. et al. Thyroid Hormone Acts Directly on Growth Plate Chondrocytes to Promote Hypertrophic Differentiation and Inhibit Clonal Expansion and Cell Proliferation ¹. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3887–3897, out. 2000.
- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L. et al. Maternal obesity accelerates rat offspring metabolic ageing in a sex-dependent manner. **The Journal of Physiology**, v. 597, n. 23, p. 5549–5563, dez. 2019.
- SABURI, M. et al. Maternal High-Fat Diet Promotes Abdominal Aortic Aneurysm Expansion in Adult Offspring by Epigenetic Regulation of IRF8-Mediated Osteoclast-like Macrophage Differentiation. **Cells**, v. 10, n. 9, p. 2224, 27 ago. 2021.
- SACKETT, D. L. et al. Evidence based medicine: what it is and what it isn't. **BMJ : British Medical Journal**, v. 312, n. 7023, p. 71, 1 jan. 1996.
- SAHIN, E. et al. Magnesium Picolinate Improves Bone Formation by Regulation of RANK/RANKL/OPG and BMP-2/Runx2 Signaling Pathways in High-Fat Fed Rats. **Nutrients**, v. 13, n. 10, p. 3353, 24 set. 2021.
- SANTINI, F. et al. Thyromimetic effects of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate in hypothyroid rats. **Endocrinology**, v. 133, n. 1, p. 105–110, jul. 1993.
- SANTINI, F. et al. Treatment of Hypothyroid Patients With L-Thyroxine (L-T4) Plus Triiodothyronine Sulfate (T3S). A Phase II, Open-Label, Single Center, Parallel Groups Study on Therapeutic Efficacy and Tolerability. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 826, 29 nov. 2019.
- SAVETSKY, I. L. et al. Lymphatic Function Regulates Contact Hypersensitivity Dermatitis in Obesity. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 11, p. 2742–2752, nov. 2015.
- SCHULZE, M. B. et al. Dietary pattern, inflammation, and incidence of type 2 diabetes in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 82, n. 3, p. 675–684, 1 set. 2005.
- SENGUPTA, P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 4, n. 6, p. 624–630, jun. 2013.
- SHAO, S. et al. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, n. 11, p. 1411–1420, nov. 2014.
- 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, out. 2014.

SIDDAWAY, A. P.; WOOD, A. M.; HEDGES, L. V. How to Do a Systematic Review: A Best Practice Guide for Conducting and Reporting Narrative Reviews, Meta-Analyses, and Meta-Syntheses. **Annual Review of Psychology**, v. 70, n. 1, p. 747–770, 4 jan. 2019.

SIDDEEK, B. et al. Long-term impact of maternal high-fat diet on offspring cardiac health: role of micro-RNA biogenesis. **Cell Death Discovery**, v. 5, n. 1, p. 71, dez. 2019.

SIEGRIST-KAISER, C. A. et al. Thyroxine-dependent modulation of actin polymerization in cultured astrocytes. A novel, extranuclear action of thyroid hormone. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 9, p. 5296–5302, mar. 1990.

SILVA, J. E. The Thermogenic Effect of Thyroid Hormone and Its Clinical Implications. **Annals of Internal Medicine**, v. 139, n. 3, p. 205, 5 ago. 2003.

SIMSON, E.; GOLD, R. The lee obesity index vindicated? ☆. **Physiology & Behavior**, v. 29, n. 2, p. 371–376, ago. 1982.

SINGH, S. et al. Protective effect of a polyherbal bioactive fraction in propylthiouracil-induced thyroid toxicity in rats by modulation of the hypothalamic–pituitary–thyroid and hypothalamic–pituitary–adrenal axes. **Toxicology Reports**, v. 7, p. 730–742, 2020.

SMITHIES, O. et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. **Nature**, v. 317, n. 6034, p. 230–234, set. 1985.

SOARES, R. M. et al. Inappropriate eating behaviors during pregnancy: Prevalence and associated factors among pregnant women attending primary care in southern Brazil. **International Journal of Eating Disorders**, v. 42, n. 5, p. 387–393, jul. 2009.

SOUZA, A. F. P. et al. Fish oil supplementation during adolescence attenuates metabolic programming of perinatal maternal high-fat diet in adult offspring. **British Journal of Nutrition**, v. 121, n. 12, p. 1345–1356, 28 jun. 2019.

ST. GERMAIN, D. L.; GALTON, V. A.; HERNANDEZ, A. Defining the Roles of the Iodothyronine Deiodinases: Current Concepts and Challenges. **Endocrinology**, v. 150, n. 3, p. 1097–1107, 1 mar. 2009.

STAEL, B. et al. Alterations in Thyroid Status Modulate Apolipoprotein, Hepatic Triglyceride Lipase, and Low Density Lipoprotein Receptor in Rats*. **Endocrinology**, v. 127, n. 3, p. 1144–1152, set. 1990.

STEWART, W. B.; RIZZOLO, L. J. Embryology and Surgical Anatomy of the Thyroid and Parathyroid Glands. Em: OERTLI, D.; UDELSMAN, R. (Eds.). **Surgery of the Thyroid and Parathyroid Glands**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 15–23.

STOLC, V.; KNOPP, J. Divergent phases of responsiveness of thyroid hormone biosynthesis to exogenous thyroid-stimulating hormone in the postnatal rat. **Journal of Endocrinology**, v. 92, n. 2, p. 251–260, fev. 1982.

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, 11 fev. 2009.

- SULLIVAN, E. L.; NOUSEN, E. K.; CHAMLOU, K. A. Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. **Physiology & Behavior**, v. 123, p. 236–242, jan. 2014.
- SULISTYOWATI, E. et al. A high-fat and high-fructose diet lowers the cecal digesta's weight and short-chain fatty acid level of a Sprague-Dawley rat model. **Turkish Journal of Medical Science**, v. 52, n. 1, p. 268-275, fev. 2022.
- SUMMA, M. E. L. et al. Desempenho reprodutivo de ratos Wistar mantidos em dois sistemas de criação na colônia convencional do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 27, n. 2, p. 255, 2 dez. 1990.
- SUTER, M. A. et al. Maternal High-Fat Diet Modulates the Fetal Thyroid Axis and Thyroid Gene Expression in a Nonhuman Primate Model. **Molecular Endocrinology**, v. 26, n. 12, p. 2071–2080, 1 dez. 2012.
- SZPIRER, C. Rat models of human diseases and related phenotypes: a systematic inventory of the causative genes. **Journal of Biomedical Science**, v. 27, n. 1, p. 84, dez. 2020.
- TAKASHIMA, M. et al. Maternal Quercetin Consumption during Pregnancy May Help Regulate Total Cholesterol/HDL-Cholesterol Ratio without Effect on Cholesterol Levels in Male Progeny Consuming High-Fat Diet. **Nutrients**, v. 13, n. 4, p. 1242, 9 abr. 2021.
- TANA, C. et al. Cardiovascular Risk in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: Mechanisms and Therapeutic Implications. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 17, p. 3104, 26 ago. 2019.
- TAPIA-MARTÍNEZ, J. et al. Maternal Thyroid Hormone Deficiency During Gestation and Lactation Alters Metabolic and Thyroid Programming of the Offspring in the Adult Stage. **Hormone and Metabolic Research**, v. 51, n. 06, p. 381–388, jun. 2019.
- TEKUS, E. et al. Body fat of rats of different age groups and nutritional states: assessment by micro-CT and skinfold thickness. **Journal of Applied Physiology**, v. 124, n. 2, p. 268–275, 1 fev. 2018.
- TELLECHEA, M. L.; MENSEGUE, M. F.; PIROLA, C. J. The Association between High Fat Diet around Gestation and Metabolic Syndrome-related Phenotypes in Rats: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5086, dez. 2017.
- THOMAS, K. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. **Cell**, v. 44, n. 3, p. 419–428, fev. 1986.
- THVILUM, M. et al. Excess Mortality in Patients Diagnosed With Hypothyroidism: A Nationwide Cohort Study of Singletons and Twins. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 3, p. 1069–1075, 1 mar. 2013.
- TIAN, P. et al. TangNaiKang, herbal formulation, alleviates obesity in diabetic SHR/cp rats through modulation of gut microbiota and related metabolic functions. **Pharmaceutical Biology**, v. 60, n. 1, p. 2002–2010, 31 dez. 2022.
- 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. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 6, p. 1920–1934, jun. 2009.

- TRANDAFIR, L. M. et al. Tackling Dyslipidemia in Obesity from a Nanotechnology Perspective. **Nutrients**, v. 14, n. 18, p. 3774, 13 set. 2022.
- URBONAITE, G. et al. The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment. **Frontiers in Neuroscience**, v. 16, p. 909762, 22 jul. 2022.
- UMEZU, M. et al. Evaluation and characterization of congenital hypothyroidism in rdw dwarf rats. **Laboratory Animal Science**, v. 48, n. 5, p. 496–501, out. 1998.
- VARGA, F.; SPITZER, S.; KLAUSHOFER, K. Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25D₃) Inversely Regulate OPG Gene Expression in Dependence of the Osteoblastic Phenotype. **Calcified Tissue International**, v. 74, n. 4, p. 382–387, 1 abr. 2004.
- VARLEY, I. et al. One week of high-fat overfeeding alters bone metabolism in healthy males: A pilot study. **Nutrition**, v. 96, p. 111589, abr. 2022.
- VERGA FALZACAPPA, C. et al. Thyroid Hormone T3 Counteracts STZ Induced Diabetes in Mouse. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19839, 27 maio 2011.
- VICENTE, G. C. et al. Perinatal consumption of flaxseed oil and flaxseed flour has beneficial effects on cardiac fibrosis of male offspring from rat dams with experimental diabetes. **Food Research International**, v. 83, p. 162–168, maio 2016.
- VICENTE, G. C. et al. Sexual dimorphism on aortic remodelling in rats offspring from diabetic mothers and the role of flaxseed oil in this effect. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 10, n. 3, p. 338–344, jun. 2019.
- VILLANUEVA, B. et al. Abdominal obesity is a common finding in normal and overweight subjects of Chile and is associated with increased frequency of cardiometabolic risk factors. **PLOS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0194644, 26 mar. 2018.
- WAKANA, N. et al. Maternal High-Fat Diet Exaggerates Atherosclerosis in Adult Offspring by Augmenting Periaortic Adipose Tissue-Specific Proinflammatory Response. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 35, n. 3, p. 558–569, mar. 2015.
- WALLING, B. E.; PICUT, C. A.; REMICK, A. K. The Endocrine System. Em: **Atlas of Histology of the Juvenile Rat**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 257–291.
- WANKHADE, U. D. et al. Maternal High-Fat Diet Programs Offspring Liver Steatosis in a Sexually Dimorphic Manner in Association with Changes in Gut Microbial Ecology in Mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 16502, dez. 2018.
- WAUNG, J. A.; BASSETT, J. H. D.; WILLIAMS, G. R. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 4, p. 155–162, abr. 2012.
- WEI, H. et al. Reduced mechanical hypersensitivity by inhibition of the amygdala in experimental neuropathy: Sexually dimorphic contribution of spinal neurotransmitter receptors. **Brain Research**, v. 1797, p. 148128, dez. 2022.
- WEISS, R. E.; REFETOFF, S. EFFECT OF THYROID HORMONE ON GROWTH. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 25, n. 3, p. 719–730, set. 1996.

- WEXLER, J. A.; SHARRETT, J. Thyroid and Bone. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 36, n. 3, p. 673–705, set. 2007.
- WIESNER, P. et al. Low Doses of Lipopolysaccharide and Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein Cooperatively Activate Macrophages via Nuclear Factor κ B and Activator Protein-1: Possible Mechanism for Acceleration of Atherosclerosis by Subclinical Endotoxemia. **Circulation Research**, v. 107, n. 1, p. 56–65, 9 jul. 2010.
- WILLIAMS, G. R. Cloning and Characterization of Two Novel Thyroid Hormone Receptor β Isoforms. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 22, p. 8329–8342, 15 nov. 2000.
- WILLIAMS, G. R. Neurodevelopmental and Neurophysiological Actions of Thyroid Hormone. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 784–794, jun. 2008.
- WU, Y. et al. Type 2 diabetes mellitus induces congenital heart defects in murine embryos by increasing oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 215, n. 3, p. 366.e1-366.e10, set. 2016.
- XIE, L. J. et al. Hypothyroidism Modeling in Wistar Rats: Comparison of Two Surgical Methods. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 173, n. 6, p. 794–800, 1 out. 2022.
- XIE, R. et al. Maternal High Fat Diet Alters Gut Microbiota of Offspring and Exacerbates DSS-Induced Colitis in Adulthood. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2608, 13 nov. 2018.
- XU, S. et al. The 14th Ile residue is essential for Leptin function in regulating energy homeostasis in rat. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 28508, set. 2016.
- XUE, Q. et al. Maternal high-fat diet alters angiotensin II receptors and causes changes in fetal and neonatal rats†. **Biology of Reproduction**, v. 100, n. 5, p. 1193–1203, 1 maio 2019.
- YAMAKAWA, E. K. et al. Comparativo dos softwares de gerenciamento de referências bibliográficas: Mendeley, EndNote e Zotero. **Transinformação**, v. 26, n. 2, p. 167–176, ago. 2014.
- YANG, J. et al. Generation and characterization of a hypothyroidism rat model with truncated thyroid stimulating hormone receptor. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4004, dez. 2018.
- YOSHIDA, K. et al. Changes in thyroxine monodeiodination in rat liver, kidney and placenta during pregnancy. **Acta Endocrinologica**, v. 107, n. 4, p. 495–499, dez. 1984.
- YOUNESS, R. A. et al. Fat-soluble vitamins: updated review of their role and orchestration in human nutrition throughout life cycle with sex differences. **Nutrition & Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 60, 5 set. 2022.
- ZAN, Y. et al. Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 6, p. 645–651, jun. 2003.
- ZHAO, L. et al. Lactobacillus plantarum S9 alleviates lipid profile, insulin resistance, and inflammation in high-fat diet-induced metabolic syndrome rats. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 15490, 15 set. 2022.
- ZHU, L. et al. Lipoprotein ratios are better than conventional lipid parameters in predicting coronary heart disease in Chinese Han people. **Kardiologia Polska**, v. 73, n. 10, p. 931–938, 28 out. 2015.

ARTIGO 1

Under review na revista Molecular and Cellular Endocrinology

Title page**Nutritional programming of thyroid hormones deficiency and metabolic state disruption in adolescent offspring by a maternal high-fat diet**

Roberta Giorgi^a, Cainá Corrêa do Amaral^a, Geovanna Peter Corrêa^a, Bruna Godinho Corrêa^a, Renata Leivas de Oliveira^b, Karline da Costa Rodrigues^b, Aline Longoni^c, Adriano Martimbianco de Assis^c, Ana Carolina Uchoa Vasconcelos^d, Anelize de Oliveira Campello Félix^e, Rodrigo Proto-Siqueira^f, Cristiane Luchese^b, Fernanda Nedel^{a*}

^a Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GPCell), Post-graduation in Health and Behavior Program, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^b Research Laboratory in Biochemical Pharmacology (LaFarBio), Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, RS, Brazil

^c Post-graduate Program in Health and Behavior, Center of Health Sciences, Catholic University of Pelotas - UCPel, Pelotas, RS, Brazil

^d Diagnostic Center for Oral Diseases, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

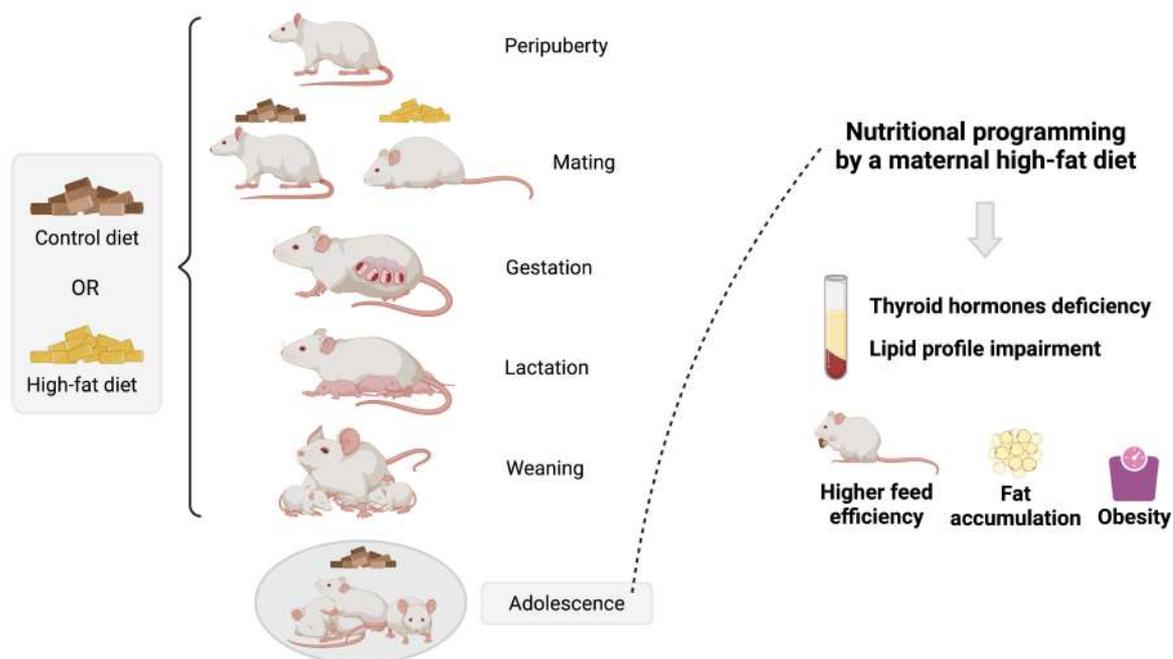
^e Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, Pelotas, RS, Brazil

^f Laboratório Antonello, Dasa Laboratórios, Pelotas, RS, Brazil

*Corresponding author: Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GPCell), Post-graduation in Health and Behavior Program, Catholic University of Pelotas, Gonçalves Chaves st., 373, room 411, building C, ZIP code 96010-901, Pelotas, RS, Brazil, phone +55 53 2128 8408.

E-mail address: fernanda.nedel@gmail.com (Fernanda Nedel)*

Graphical abstract



Highlights

- Maternal high-fat diet (HFD) alters thyroid hormones and lipid profile of adolescent offspring
- Offspring consumption of control diet after weaning did not avoid endocrinometabolic disturbance
- The offspring of the maternal HFD group were obese and showed abdominal fat accumulation
- Despite consuming less food, the offspring of the maternal HFD group gained more body mass

Abstract

Nutritional programming of offspring phenotype by a maternal high-fat diet (HFD) is a consensus. However, many gaps remain unclear and the influence on the offspring's endocrine system is minimally known. Aiming to clarify this issue, we evaluate the impact of maternal HFD (from peripuberty through weaning) and preconception obesity in adolescent offspring's thyroid hormones, lipid profile, body measurements, and nutritional parameters. The maternal HFD offspring group (OHFD) showed deficiency in thyroid hormones (thyroxine and triiodothyronine) with disbalance in the related molar ratios, disturbed lipid profile, obesity, fat tissue accumulation, increased energy intake by body weight, elevated proportional body mass gain, and higher feed efficiency when compared to the control diet group. Moreover, we observed significant correlations between total cholesterol and biomarkers of thyroid health on the OHFD. These findings suggest that long-lasting maternal HFD led to abnormal thyroid gland activity and widely alteration of the metabolic state of the adolescent offspring.

Keywords: maternal high-fat diet, nutritional programming, adolescent offspring, thyroid hormones, lipid profile, obesity.

1. Introduction

The effects of exposure to an unhealthy uterus environment were established by the “Barker hypothesis” around the end of the 20th century, which signaled the origin of some diseases in later life, such as coronary heart disease, stroke, and diabetes, due to fetal undernutrition (Barker, 1998). Subsequently, the idea established by Barker was extended to include the postnatal stage in the concept called “developmental origins of health and disease”, directing the focus to several fetal and neonatal permanent changes due to physiological, epigenetic, and metabolic mechanisms (Hoffman et al., 2017). So, events of stimulus or insults occurring in critical phases of development can program long-lasting consequences in the offspring, leading to (1) fetal programming from triggers in the intrauterine environment, (2) lactational programming when the exposition happens in early postnatal life, and (3) developmental programming if the trigger is presented from fetal life to weaning (Cerf, 2018). The programming of development by nutrition, or nutritional programming, is triggered by exposure to a modified diet (low/high fat, low/high protein, and low/high carbohydrate) during these developmental windows (Cerf, 2018).

Considering the power of maternal diet and nutrition status in determining the offspring's developmental programming (Barker et al., 2017), the food pattern characteristics of contemporary society have drawn attention to the consequences of maternal overfeeding, especially saturated fat, on the offspring's health (Sullivan et al., 2014). The excessive consumption of saturated fat causes increased lipotoxic lipids body levels, which are metabolically more dangerous than a high intake of polyunsaturated fats and carbohydrates (Castro-Alves et al., 2022), conducting to obesity, diabetes, hypertension, and cancer

(Popkin and Ng, 2022). Unfortunately, western nations have witnessed a progressive increase in the number of youngsters born after maternal high-fat diet (HFD) consumption during pregnancy and lactation (Sullivan et al., 2014), and the prevalence of maternal obesity in pre-pregnancy has increased as well in recent decades (Heslehurst et al., 2022).

In clinical studies, maternal HFD consumption during pregnancy predisposes offspring to develop obesity and other non-communicable diseases in adulthood, including metabolic syndrome, diabetes mellitus type 2, hypertension, and cardiovascular disease (Warner and Ozanne, 2010). In addition, both in humans and in animal models, maternal obesity and the resultant metabolic imbalance during pregnancy are associated with the metabolic programming of the offspring (Urbonaite et al., 2022). More than nutritional programming of the metabolism, recent evidence from rodent experiments demonstrated the association between maternal consumption of HFD produces negative consequences for various offspring tissues and organs, leading to different adverse outcomes, such as increased elasticity in the supraspinatus tendon (Bolam et al., 2021), molecular changes related to autism spectrum disorder (Gawlińska et al., 2021), increased anhedonic behavior (Curi et al., 2021), and liver steatosis (Wankhade et al., 2018).

The influence of maternal HFD on offspring metabolic health in animal models is fairly studied up to now, however, most preclinical research has focused on body composition, absolute food consumption, diabetes markers, cholesterol and triglycerides serum levels, and appetite-related hormones at birth, weaning, or adult age (Ribaroff et al., 2017; Tellechea et al., 2017). Therefore, the offspring metabolism after maternal HFD between weaning and adulthood has not yet been sufficiently explored, especially in adolescence. Moreover, there is a huge gap in terms of the endocrine system, which needs to be investigated, whereas

thyroid hormones (TH) are essential for growth, neuronal development, reproduction, and regulation of energy and lipid metabolism (Taylor et al., 2018).

At this point, important to highlight that maternal HFD consumption can affect offspring development due to inflammatory activation of the maternal gut, adipose tissue, and placenta, increasing levels of pro-inflammatory cytokines in fetal circulation (Urbonaite et al., 2022), and its already known that direct exposition to HFD can provoke inflammatory infiltration in thyroid gland inflammation with an increase in serum thyroid autoantibodies serum levels (Liao et al., 2022). In this sense, we hypothesized that a maternal HFD from peripubertal age to the end of the nursing period may generate disturbances in the thyroid function and metabolic health of offspring, even consuming a balanced diet after weaning. To confirm this hypothesis, our investigation aimed to compare the parameters of body composition, eating behavior, lipid profile, and TH among adolescent offspring submitted to control and high-fat maternal diet.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Virgin female and male albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (37 days old) were taken from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas (Campus Capão do Leão). The animals were maintained in pairs in open, wire-top, polypropylene cages (34 x 41 x 18 cm) in a room at 22 ± 1 °C with lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m. and free access to

water. Animals were handled at least once a week. Furthermore, weekly home cages were cleaned and equipped with new bedding by a professional animal keeper. Our power analysis suggested that six offspring rats per group were appropriate to allow uncovering the effect sizes and standard deviations between experimental groups at a significance level of $P < .05$; 5% using two-sided t -tests. 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.

2.2 Experimental protocol

At peripubertal age (postnatal day 37, average 130 g), dams were divided into two randomized groups: control group (control diet - CD) ($n = 3$) and experimental group (high-fat diet - HFD) ($n = 3$), which was exposed to a laboratory standard chow and fat-enriched diet, respectively, from this time until the weaning. Males (average 349 g, maintained in a control diet) and dams (CD: average 249 g, HFD: average 203 g) were mated for five consecutive days approximately six weeks after the beginning of HFD exposition. The day of parturition was considered postnatal day 1 (PD1) and from this moment to weaning (3 weeks after birth) all offspring remained with dams. A litter was formed of a mean of 8 ± 2 pups (5 ± 2 male pups per litter). The litter size was not significantly different between groups. Male pups represented 57% of the total offspring. Tails of each pup was marked for individual

identification. Pups were counted, sexed according anogenital distance at postnatal day 5, to limit possible early-life maternal separation stressor. The offspring was indirectly submitted to the maternal diet during conception, gestation and suckling until the weaning, in which the litter were divided in males and females identified according to maternal diet (offspring from CD group: OCD; offspring from HFD group: OHFD) with both groups consuming laboratory standard chow (Fig. 1). Aiming to avoid undesirable confounding factors such as estrous cycles and the effect of female hormones on physiological functions, only male pups were studied. After weaning for the dams and at puberty for the offspring (postnatal day 54 - PD54) the animals were anesthetized with isoflurane inhalation (5%, 0.25 mL of liquid isoflurane per liter of chamber volume) followed by cardiac puncture after confirmed blockade of pain sensation. The adipose tissue of the retroperitoneal and epididymal regions was assessed by a median xifopubic incision and resected. The whole blood was collected, centrifuged at 3000 g (RCF) at 4° C for 5 minutes (Eppendorf™ Centrifuge 5427R), aliquoted and stored at - 80° C for further analysis.

2.3 Diet composition

The CD group received a normocaloric and normolipidic Nuvilab CR-1 irradiated feed produced by Quimtia® (Curitiba, Brazil) composed by 12% of energy from fat in 3,5 kcal/g. Meanwhile, the HFD group was fed by an hypercaloric and hyperlipidic diet manufactured with powdered standard chow enriched with lard, resulting in 52% of energy from fat in 4,9 kcal/g (Table 1). The offspring of both groups received the standard laboratory chow.

2.4 Data collection

Food consumption (FC) was monitored and calculated daily by diminishing the residual (dirty waste + clean waste) from the amount of food offered. The body measurements were made for each pup or dam. The animal's body weight (BW) was collected once a week with an electronic scale (Geom, model BEL-00052 with graduation of 1 gram (g)). The body length was measured using a plastic, nonextensible measuring tape with an accuracy of 0.1 centimeters. Lee index (LI) was used to evaluate the growth performance of rats using the formula $[\sqrt[3]{\text{body weight (g)}/\text{naso-anal length (cm)}}]$, for which a value more than 0.320 at weaning and more than 0.300 at adult or adolescent was classified as obese in case of significantly statistical difference between groups (Bernardis and Patterson, 1968). Body weight gain (BWG) was calculated weekly diminishing the initial BW from the final BW of each week. Specific rate of body mass gain (g/g) was calculated by the division of the BWG between times 1 and 2 by the BW at time 1 (SRBMG: $\text{BWt2} - \text{BWt1} / \text{BWt1}$) (adapted from Novelli et al., 2007). Energy intake was represented by FC multiplied by dietary metabolizable energy in kilocalorie (kcal) and divided by the BW (EI: kcal/g BW). Feed efficiency (%) mean BWG multiplied by 100 and divided by caloric value of the diet ingested (FE: $\text{g BWG} \times 100/\text{kcal}$) [31]. The adipose tissues were weighed on an analytical balance (Bel, model MARK M 214Ai with graduation of 0,0001 g) to calculate the percentage corresponding to BW (g of adipose tissue/100 g of BW) and the abdominal adipose tissue was calculated by the sum of retroperitoneal and epididymal adipose tissues.

2.5 Biological analysis

Serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and HDL-cholesterol (high-density lipoprotein, HDL) were analyzed by enzymatic colorimetric method using the systems CHOL2 COBAS (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, USA; catalog number 03039773), TRIGL COBAS (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, USA; catalog number 20767107) and HDLC3 (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, USA; catalog number 04399803), respectively, and assay kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). Serum total triiodothyronine (TT3) and total thyroxine (TT4) were analyzed by electrochemiluminescence immunoassay method using the systems ELECSYS T3 (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, USA; catalog number 11731360) and ELECSYS T4 (Cobas, Roche, Indianapolis, IN, USA; catalog number 12017709), respectively, and assay kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics). Non-HDL cholesterol (non-HDL) was calculated as the difference between TC and HDL. Including, to produce a more sensitive measure of TH state, T4 (thyroxine)/T3 (triiodothyronine) and T3/T4 molar ratios was calculated.

2.6 Statistical analysis

All measurement, determinations, biological analysis and calculations were made from each animal. The variables were entered, double-checked and the database was analyzed in R 3.1.2 software. For statistical analysis, Student's t-tests were used. Pearson's linear correlation was used to analyze associations between thyroid function markers and the TC serum levels. Data were expressed as mean \pm SD, and a significance level of $P < .05$ was considered statistically significant for all variables.

3. Results

The body composition parameters in dams showed lower BW for the HFD group when compared to CD group at mating (CD: 239 ± 1.73 g, HFD: 203 ± 11.69 g; $P = .004$) and at weaning (CD: 271.33 ± 17.04 g, HFD: 207.67 ± 11.93 g; $P = .006$) (Fig. 2A). However, the Lee index was statistically higher in the HFD group when compares to the CD group at mating (CD: 0.295 ± 0.008 , HFD: 0.308 ± 0.003 ; $P = .028$), revealing obesity in the dams exposed to the HFD in prenatal period (LI > 0.300 at adult age) (Fig. 2B). The TH analysis and T3/T4 and T4/T3 molar ratios of the maternal serum showed no statistically difference between HFD group and CD group (Fig. 2C).

The body weight of the OHFD was lower at the weaning (OCD: 55.7 ± 3.4 g, OHFD: 31.1 ± 6.65 g; $P < .001$) and in the first (OCD: 107.4 ± 13.48 g, OHFD: 70.3 ± 12.89 g; $P < .001$), second (OCD: 160.6 ± 10.04 g, OHFD: 110.5 ± 16.32 , $P < .001$), third (OCD: 192.1 ± 9.43 g, OHFD: 139.2 ± 15.128 g, $P < .001$) and fourth (OCD: 249.5 ± 13.46 g, OHFD: 196.2 ± 24.84 g; $P < .001$) weeks after weaning than in the OCD group (Fig. 3A). Although the body weight results showed lower values for OHFD in all the evaluated weeks, the LI was higher at weaning (OCD: 0.309 ± 0.009 , OHFD: 0.328 ± 0.008 ; $P < .001$) and in third (OCD: 0.298 ± 0.008 , OHFD: 0.306 ± 0.004 ; $P = .017$) and fourth (OCD: 0.298 ± 0.007 , OHFD: 0.310 ± 0.008 ; $P = .002$) weeks after weaning when compared to the OCD group, revealing obesity in the OHFD group at weaning (LI > 0.320) and in the third and fourth weeks (LI > 0.300 at adolescence) (Fig. 3B).

In relation to the body weight gain, it was found that the OHFD showed a significantly lower gain in the second (OCD: 53.3 ± 5.17 g, OHFD: 40.2 ± 4.22 g; $P < .001$) and third

(OCD: 31.4 ± 2.22 g, OHFD: 28.7 ± 3.13 g, $P = .04$) week after weaning when compared to the OCD group (Fig. 3C). In addition, the OHFD group showed a higher specific rate of body mass gain in the first (OCD: 0.994 ± 0.321 g/g, OHFD: 1.731 ± 0.234 g/g; $P < .001$), third (OCD: 0.196 ± 0.022 g/g, OHFD: 0.267 ± 0.06 g/g; $P = .003$) and fourth (OCD: 0.299 ± 0.04 g/g, OHFD: 0.41 ± 0.034 g/g; $P < .001$) weeks after weaning when compared to the OCD group (Fig. 3D).

Concerning the nutritional variables the OHFD consumed lower quantity of food in grams a week in the first (OCD: 89.76 ± 2 g/week, OHFD: 57 ± 12.73 g/day; $P < .001$), second (OCD: 112.09 ± 13.44 g/week, OHFD: 80.05 ± 17.6 g/week; $P < .001$), third (OCD: 141.22 ± 4.5 g/week, OHFD: 110.47 ± 13.02 g/week; $P = .006$) and fourth (OCD: 202.05 ± 5.46 g/week, OHFD: 168.56 ± 12.74 g/week, $P < .001$) weeks after weaning when compared to the OCD group (Fig. 4A). Notwithstanding, when we consider the energy ingest per gram of body weight, remembering that both offspring consumed a control diet, after the first week we observed that the opposite happens the OHFD group showed a higher energy intake in the fourth week after weaning (OCD: 2.758 ± 0.13 kcal/g BW/week, OHFD: 2.934 ± 0.183 kcal/g BW/week, $P = .024$) when compared to the OCD group (Fig. 4B).

Aiming to evaluate the food metabolism of the offspring after the weaning, we calculate the feed efficiency to comprehend the conversion of energy intake in body weight gain and found that the OHFD group showed higher feed efficiency in the first (OCD: $16.88 \pm 4.82\%$, OHFD: $23.18 \pm 2.55\%$; $P = .002$), third (OCD: $6.55 \pm 0.62\%$, OHFD: $7.74 \pm 1.25\%$; $P = .01$) and fourth (OCD: $8.36 \pm 1.17\%$, OHFD: $9.96 \pm 1.1\%$; $P = .006$) weeks after weaning when compared to the OCD group (Fig. 4C).

The biological analysis of the OHFD group demonstrated higher levels of TC, non-HDL, TG and T3/T4 molar ratio, and lower levels of HDL, TT4, TT3 and T4/T3 molar ratio when compared to the OCD group. Regarding fat accumulation, the OHFD group showed a higher amount of epididymal and abdominal adipose tissues when compared to the OCD group. Moreover, we observed in the OHFD group a strong negative correlation between TC and TT4 (Fig. 5A), a moderate negative correlation between TC and T4/T3 molar ratio (Fig. 5B), and a moderate positive correlation between TC and T3/T4 molar ratio (Fig. 5C).

4. Discussion

Our study identified the impact of maternal HFD on the imbalance of critical aspects of the endocrine and metabolic health of offspring. We showed that maternal consumption of HFD induced thyroid hormones deficiency, altered lipid profile, fat accumulation, obesity, higher specific rate of body mass gain, increase energy intake proportionally to body weight and elevated feed efficiency in adolescent offspring. The only difference in exposure was the maternal diet, which was high-fat or control, once both offspring groups ingested a control diet after the weaning and no intervention was performed. Startlingly, the maternal HFD (from peripubertal age to weaning) altered the thyroxine and triiodothyronine serum levels of the adolescent offspring, leading to hypothyroxinemia and reduction in triiodothyronine serum levels. Although maternal TH did not vary between HFD and control groups, the male OHFD evidenced a hypothyroid condition (revealed by decrease of TT4 and TT3). Thus, our study is the first to show that maternal HFD from peripubertal age to weaning, can cause thyroid hormones deficiency in adolescent offspring.

TH are essential for the differentiation, growth, and energy metabolism of almost all cells and tissue (Luongo et al., 2019). Thyroid gland releases in the circulatory system T4, a prohormone, and T3, the considered biological active hormone due to the high-affinity interaction with intracellular TH receptors (Luongo et al., 2019). While about 20% of circulating levels of T3 in humans are derived from the thyroid gland, in rats this percentual is at least 55%, indicating more pronounced participation of this endocrine organ in the circulating level of T3 in rodents than in humans (Chanoine et al., 1993). T3 can be provided from the *de novo* synthesis in the thyroid, or phenolic or tyrosyl deiodination of T4 at the tissue level (Chanoine et al., 1993). T4 is converted into T3 by the action of the iodothyronine deiodinases DIO1 (in rats is predominantly expressed in thyroid gland, brain, liver, and kidney) and DIO2 (expressed in rats in a few tissues, including brain, pituitary, and brown adipose tissue) (Bianco et al., 2002). DIO3 (highly expressed in the central nervous system, placenta, fetal and neonatal tissues in rats) also participates in the control of TH in the cells, however, their action inactivates T4 and T3 (Bianco et al., 2002). Thereby, the proportion of circulating T3 in rats makes the analysis of these serum levels as useful for predicting thyroid health as the assessment of T4 (Chanoine et al., 1993). Furthermore, the T4/T3 molar ratio in serum supports the estimation of extrathyroidal activity, once the abnormal function of the endocrine gland in rats can alter this molar ratio due to T3 production via the DIO2 pathway (De Castro et al., 2015).

Suter and colleagues reported fetal thyroid dysfunction in a nonhuman primate model of maternal HFD, by the decrease in T4 serum level and in the transcription of necessary genes to produce T3 and T4, altered histone code in the promoter of TH receptors, and disruption in deiodinases expression, such as the increase in DIO2 and DIO3 in the thyroid gland and decrease in DIO2 and DIO3 in liver and DIO3 in the hypothalamus (Suter et al.,

2012). Therefore, the authors demonstrated that exposure to maternal HFD negatively impacts the fetal thyroid axis through transcriptional and epigenetic alterations in mammals (Suter et al., 2012). Interestingly, we found a decrease in serum TH levels, more specifically TT3 and TT4, in adolescent rats indirectly exposed to a maternal high-fat diet even after five weeks fed with a control diet. Suggesting an extended effect of nutritional programming *in utero* and during lactation, which may be derived from a so significant modification in fetus and nursling, such as the epigenetic change describe in nonhuman primate, that it cannot be reversed until near early adulthood.

One way to predict deiodinase activity and conversion efficiency in thyroid gland is to measure the T3/T4 molar ratio in the serum (Dietrich et al., 2016). The increase in this biological parameter, as found in our study, indicates hyperdeiodination in thyroid gland abnormality (Celi et al., 2008; Dietrich et al., 2016), which is in line with the observation of Sutter et al. in nonhuman primate fetus exposed to maternal HFD in concern to rising of deiodinases (Suter et al., 2012). Moreover, two similar models of nutritional programming by maternal HFD, both using Wistar rats, evaluated TH in the serum at weaning (Franco et al., 2012) and adult age (Souza et al., 2019) of the offspring. However, at weaning the serum levels of TT3 and FT4 were increased in offspring of the maternal HFD [39] and at adult age no statistical differences were found in TT3 and TT4 (Souza et al., 2019). This discrepancy between our results and these studies, may be caused by the content of fat (all studies used lard as the main source of fat), calories in the diets and dams age at the beginning of the dietary manipulation. In our study, the maternal diet was hypercaloric and contained 52% energy from fat and the dams are 37 days old when the HFD exposure started, different from both mentioned studies, which used isocaloric maternal diets with 28.6% of fat and the dams were 60 days old at the begging of diet exposition (Franco et al., 2012; Souza et al., 2019).

Although the effects of indirect exposure to HFD on endocrine health have been sparsely studied until now, the consumption of HFD by rats have shown to cause hypothyroxinemia and abnormal morphology after 18 and 24 weeks of direct exposition to HFD, respectively (Shao et al., 2014; Zhang et al., 2019, 2018). In addition, a recently published article revealed inflammatory infiltration in the thyroid, increased serum thyroid antibody levels, thyroid fibrosis and apoptosis and hypothyroidism (decreased in TT4 and TT3 circulating levels) also after 24 weeks of direct HFD exposition in rats (Liao et al., 2022). Thus, an abnormal thyroid gland structure in rats can alter both TT4 and TT3 serum levels, as seen in animals exposed to HFD for 24 weeks (Liao et al., 2022). The extended exposition time to HFD (18 to 24 weeks) for the onset of hypothyroidism is probably the reason why we did not find differences in the thyroid hormone levels in dams serum, once the consumption was limited to approximately 14 weeks.

Therefore, the alterations in thyroid function observed in the OHFD (in approximately the seventh week postnatal) may indicate a diverse modulation mechanism of the endocrine system, however, possibly also promoted by inflammation, but at this time due to the fetal circulation of pro-inflammation cytokines from maternal and placental inflammation activity (Urbonaite et al., 2022). Moreover, in rats, the thyroid gland develops until the 21st postnatal day (the time of weaning), with increased colloid deposition, follicular cell proliferation, and progressive follicular maturation from the center to the periphery; and becomes endocrinologically complete in the 28th postnatal day (Walling et al., 2016). So, the gland could be susceptible to the influence of diet components in nursling, which helps to explain the thyroid hormone dysregulation that we observed in the OHFD group. Maternal HFD during pregnancy and lactation elevates milk lipid concentration, especially fatty acid composition (Tellechea et al., 2017), which was associated to interaction with cell death

programming signaling proteins involved in immune regulation of thyroiditis autoimmunity (Liao et al., 2022).

In our study, apart from the thyroid hormones deficiency, OHFD showed abnormalities in the serum levels of lipids, more precisely higher TC, non-HDL and TG, and lower HDL. Maternal exposure to HFD can cause disturbance in lipid profile in offspring rats, especially increasing triglycerides and total cholesterol levels after exposure beyond gestation into lactation (Ribaroff et al., 2017). Regarding non-HDL previous studies describe an increase in serum levels of this lipidic status marker in rodent offspring exposed to maternal HFD (Dumolt et al., 2019; Takashima et al., 2021). However, changes in HDL serum levels after maternal HFD in rats is not a scientific consensus, as both increase (Oliveira et al., 2011) and decrease (Dong et al., 2011) were reported. Tellechea, Mensegue and Pirola conducted a systematic review and meta-analysis on the association between maternal HFD and offspring metabolic syndrome phenotype (Tellechea et al., 2017). In this review they reported that few authors evaluated HDL and suggest three hypotheses for way: the small effect in offspring, that the early-life programming would not occur in rats and the potential reverse of the effect by offspring access to standard chow after weaning (Tellechea et al., 2017). Although, the review also detailed that the circumstances of maternal age (young adult), maternal diet in gestation and lactation, and the animal source of fat influences in the decrease in HDL levels (Dong et al., 2011; Ghosh et al., 2001; Tellechea et al., 2017). Hence, the OHFD in our study manifested a more pronounced disruption in lipid metabolism considering the scientific literature to date on maternal HFD (Tellechea et al., 2017).

Modification of lipid parameters in thyroid dysfunction has been studied for many decades, and it has been widely known that the cholesterol absorption increases in

hypothyroid rats, which can be normalized by TH administration (Gälman et al., 2008). Hypercholesterolemia is an important characteristic of hypothyroidism, occurring in humans (Duntas and Brenta, 2018) and rats (Gong et al., 2018), even in subclinical hypothyroidism. In addition, in overt hypothyroidism in humans the presence of hypertriglyceridemia and reduced HDL levels is common (Duntas and Brenta, 2018). It is worth mentioning that rats are species deficient on cholesteryl ester transfer protein (CETP) (Oschry and Eisenberg, 1982), a plasma factor that catalyzes a hetero-exchange of cholesteryl esters and triglycerides between the lipoproteins contained in HDL (Bruce et al., 1998), and are characterized by low levels of plasma HDL-C and HDL-apolipoprotein A-I (apo A-I) (Apostolopoulos et al., 1990). Thus, the presence of CETP in humans implies some differences in HDL metabolism in relation to rats (Oschry and Eisenberg, 1982). However, in both species TH regulates lipoprotein metabolism up-regulating synthesis of apo A-I, with direct impact on HDL synthesis (Huesca-Gómez et al., 2002; Yang et al., 2016). Chronic hypothyroidism in rat induces catabolism of apo A-I, lowering its levels to 22.6% when compared to controls, and decreasing HDL levels in 25.9% due to structural abnormalities (larger HDL) and changes in apolipoproteins content (enrichment in apolipoprotein E and phospholipids, and decrease of apolipoprotein A-IV quantity) (Huesca-Gómez et al., 2002). Therefore, despite these fundamental differences between rats and humans, low levels of HDL in hypothyroidism occurs in both species.

In regard to TG, a prolonged induction of hypothyroidism by methimazole, a pharmaceutical compound known to reduce TT4 and TT3 levels in rats (Cooper et al., 1984) to simulate a long time exposure to low levels of TH, induces a hypertriglyceridemic state (Oktay et al., 2017; Oschry and Eisenberg, 1982). This model of hypothyroidism induction leads to a lipid profile alteration quite similar to the results that we found (increased levels of

TG and TC) (Gong et al., 2018; Oktay et al., 2017). Liao et al. reported an increase in TG and TC serum levels and abnormal biosynthesis of the unsaturated fatty acid in serum detected by lipidomics in rats exposed to an HFD that presented reduced circulating levels of TT4 and TT3 (Liao et al., 2022). Given these considerations and the amplitude of the lipid profile changes of the OHFD group, we postulate that the hyperlipemia (increased levels of TG, TC, and non-HDL) in addition to decreased HDL levels, evidence a condition comparable to dyslipidemia in humans possibly caused by the synergic consequences of the nutritional programming of lipid metabolism impairment and thyroid hormones deficiency. Furthermore, in relation to the increase in serum levels of total cholesterol, we found a strong/moderate and statistically significant association with three of the four thyroid function markers evaluated, indicating an association between those variables.

Moreover, OHFD showed metabolic disturbance of the following features: elevated energy intake and feed efficiency, fat accumulation, higher specific rate of body mass gain and obesity. The data collection of the nutritional determination in our work occurred at the early stages of development starting right after the weaning. This allowed us to evaluate the consequences of growth on the nutritional behavior and food metabolism through the observation of the gradual increase in food consumption in both groups, despite the fluctuation of feed efficiency and the relative maintenance of the energy intake along the weeks after weaning until the adolescence. The energy intake per body weight and feed efficiency of offspring after maternal HFD have not yet been reported in the literature. Such as the lipid profile, the thyroid hormones dysfunction can help to understand our results. The increase in calorie intake induces the TH to favor energy expenditure, promoting energy homeostasis during different nutritional conditions (Sinha et al., 2018). Thus, studies concerning hypothyroidism in animals when evaluating the energy or food intake per body

weight (Herwig et al., 2014) and feed efficiency (Santana-Farré et al., 2012), described an increase in both nutritional determinants, indicating a possible reason for our results.

A simple observation of this context permits to hypothesis that although the offspring from maternal HFD consumed in grams a lower quantity of food compared to controls, they intake a higher amount of energy per body weight and transformed the ingested energy into a body mass gain with more efficiency (Meyer and Nelson, 1963) in the adolescence, probably due to the changes in lipid metabolism, leading to fat accumulation, and consequently to obesity. Despite having lower body weight at all times evaluated, the OHFD group at the weaning and from the beginning of adolescence onwards was obese. Furthermore, in these periods the OHFD showed higher SRBMG, evidencing more facility in accumulate mass proportionally to their body weight. The results of LI (Ekeleme-Egedigwe et al., 2018) and SRBMG (Cadena-Burbano et al., 2019; Oliveira et al., 2018) are in according to previous studies that evaluated Wistar rats offspring exposed to a maternal HFD at similar age. Lastly, the increased body fat, such as the higher epididymal and abdominal adipose tissue found in OHFD, has been frequently associated to offspring phenotypes of long-term metabolic effects after maternal HFD (Tellechea et al., 2017) and in male offspring independent of the method used to determine adiposity, including adiposity tissue weight (Ribaroff et al., 2017).

In relation to our study, it is important to comment some particularities of the chosen methodology. (1) The literature has extensively showed that animal models that intend to reproduce the high-fat dietary habits of humans in the western diet need to use a long-term HFD regimen, which was the basis of our choice to start the manipulation diet around dams puberty. (2) The literature has shown that in order to observe the developmental

programming of offspring metabolism after maternal HFD exposition, it is recommended lard-based diet with fat sources representing 40 to 60% of total energy, in our study we used lard-based diet with 52% of energy from fat source. (3) Studies have shown that maternal HFD that promoted dams obesity and are extended from the prenatal period to weaning are more influential for programming metabolic offspring alteration, justifying the duration of the maternal dietary manipulation in our study. (4) Additionally, in rats, maternal HFD at suckling and preexisting obesity at mating affect breast milk lipid composition (increased long-chain fatty acid content at the expense of medium-chain fatty acids), leading to a modified pup ingestive behavior and probably contributing to the long-term metabolic changes in offspring (Tellechea et al., 2017).

In conclusion, we showed that a maternal HFD (diet regimen that simulates the current western human diet pattern) consumed since peripuberty to suckling can induce thyroid hormones deficiency in adolescent offspring, which can possibly lead to an altered lipid profile, fat accumulation, obesity, higher specific rate of body mass gain, increased energy intake and elevated feed efficiency. Based on our findings we point out the need for further studies including female offspring, to observe the effect of nutritional programming on both sexes. Moreover, future investigations should evaluate other thyroid biochemical markers and conduct morphological, transcriptomic and proteomic analysis of the thyroid gland in different phases of the animal development to elucidate the signaling pathways involved in the process that led to the dysfunction of this important endocrine organ in the adolescent offspring.

References

- Apostolopoulos, J.J., MARSHALL, J.F., HOWLETT, G.J., 1990. Triiodothyronine increases rat apolipoprotein A-I synthesis and alters high-density lipoprotein composition in vivo. *Eur. J. Biochem.* 194, 147–154. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19438.x>
- Barker, D.J.P., 1998. In utero programming of chronic disease. *Clin. Sci.* 95, 115. <https://doi.org/10.1042/cs19980019>
- Barker, M., Baird, J., Tinati, T., Vogel, C., Strömmer, S., Rose, T., Begum, R., Jarman, M., Davies, J., Thompson, S., Taylor, L., Inskip, H., Cooper, C., Nutbeam, D., Lawrence, W., 2017. Translating developmental origins: Improving the health of women and their children using a sustainable approach to behaviour change. *Healthc.* 5. <https://doi.org/10.3390/healthcare5010017>
- Bernardis, L.L., Patterson, B.D., 1968. Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *J. Endocrinol.* 40, 527–528. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0400527>
- Bianco, A.C., Salvatore, D., Gereben, B., Berry, M.J., Larsen, P.R., 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* 23, 38–89. <https://doi.org/10.1210/edrv.23.1.0455>
- Bolam, S.M., Satokar, V. V., Konar, S., Coleman, B., Monk, A.P., Cornish, J., Munro, J.T., Vickers, M.H., Albert, B.B., Musson, D.S., 2021. A Maternal High Fat Diet Leads to Sex-Specific Programming of Mechanical Properties in Supraspinatus Tendons of Adult Rat Offspring. *Front. Nutr.* 8, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.729427>
- Bruce, C., Chouinard, R.A., Tall, A.R., 1998. Plasma lipid transfer proteins, high-density lipoproteins, and reverse cholesterol transport. *Annu. Rev. Nutr.* 18, 297–330. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.18.1.297>
- Cadena-Burbano, E.V., Cavalcanti, C.C.L., Lago, A.B., Benjamim, R. de A.C., Oliveira, T.R. dos P., Silva, J.M., Manhães-De-Castro, R., Da Silva Aragão, R., 2019. A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats. *Nutr. Neurosci.* 22, 98–109. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1354958>
- Castro-Alves, V., Orešič, M., Hyötyläinen, T., 2022. Lipidomics in nutrition research. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 25, 311–318. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000852>
- Celi, F.S., Coppotelli, G., Chidakel, A., Kelly, M., Brillante, B.A., Shawker, T., Cherman, N., Feuille, P.P., Collins, M.T., 2008. The role of type 1 and type 2 5'-deiodinase in the pathophysiology of the 3,5,3'-triiodothyronine toxicosis of McCune-Albright syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 2383–2389. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2237>
- Cerf, M.E., 2018. High fat programming and cardiovascular disease. *Med.* 54, 1–13. <https://doi.org/10.3390/medicina54050086>
- Chanoine, J.P., Braverman, L.E., Farwell, A.P., Safran, M., Alex, S., Dubord, S., Leonard, J.L., 1993. The thyroid gland is a major source of circulating T3 in the rat. *J. Clin. Invest.* 91, 2709–2713. <https://doi.org/10.1172/JCI116510>
- Cooper, D.S., Bode, H.H., Nath, B., Saxe, V., Maloof, F., Ridgway, E.C., 1984. Methimazole pharmacology in man: Studies using a newly developed radioimmunoassay for methimazole. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58, 473–479. <https://doi.org/10.1210/jcem-58-3-473>
- Curi, H.T., Dias, C.T., da Luz Camargo, M.L.M., dos Santos Gomez, P., Gomes, M.F.P., Beserra-Filho, J.I.A., Medeiros, A., Ribeiro, A.M., Simabuco, F.M., Lambertucci, R.H., Mendes-da-Silva, C., 2021. Maternal high-fat diet increases anhedonic behavior and modulates hippocampal Mash1 and BDNF expression in adult offspring. *Neurosci. Lett.* 764, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2021.136239>
- De Castro, J.P.W., Fonseca, T.L., Ueta, C.B., McAninch, E.A., Abdalla, S., Wittmann, G., Lechan, R.M., Gereben, B., Bianco, A.C., 2015. Differences in hypothalamic type 2

- deiodinase ubiquitination explain localized sensitivity to thyroxine. *J. Clin. Invest.* 125, 769–781. <https://doi.org/10.1172/JCI77588>
- Dietrich, J.W., Landgrafe-Mende, G., Wiora, E., Chatzitomaris, A., Klein, H.H., Midgley, J.E.M., Hoermann, R., 2016. Calculated parameters of thyroid homeostasis: Emerging tools for differential diagnosis and clinical research. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 7, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fendo.2016.00057>
- Dong, Y.M., Li, Y., Ning, H., Wang, C., Liu, J.R., Sun, C.H., 2011. High dietary intake of medium-chain fatty acids during pregnancy in rats prevents later-life obesity in their offspring. *J. Nutr. Biochem.* 22, 791–797. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.07.006>
- Dumolt, J.H., Browne, R.W., Patel, M.S., Rideout, T.C., 2019. Malprogramming of Hepatic Lipid Metabolism due to Excessive Early Cholesterol Exposure in Adult Progeny. *Mol. Nutr. Food Res.* 63, 1800563. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201800563>
- Duntas, L.H., Brenta, G., 2018. A renewed focus on the association between thyroid hormones and lipid metabolism. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00511>
- Ekeleme-Egedigwe, C.A., Ijeh, I.I., Okafor, P.N., 2018. Modulatory effects of dietary supplementation by *Vernonia amygdalina* on high-fat-diet-induced obesity in Wistar rats [pdf]. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* 16, 431–442. <https://doi.org/10.17306/j.afs.2017.0504>
- Franco, J.G., Fernandes, T.P., Rocha, C.P.D., Calviño, C., Pazos-Moura, C.C., Lisboa, P.C., Moura, E.G., Trevenzoli, I.H., 2012. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. *J. Physiol.* 590, 5503–5518. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.240655>
- Gälman, C., Bonde, Y., Matasconi, M., Angelin, B., Rudling, M., 2008. Dramatically Increased Intestinal Absorption of Cholesterol Following Hypophysectomy Is Normalized by Thyroid Hormone. *Gastroenterology* 134, 1127–1136. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.01.032>
- Gawlińska, K., Gawliński, D., Borczyk, M., Korostyński, M., Przegaliński, E., Filip, M., 2021. A maternal high-fat diet during early development provokes molecular changes related to autism spectrum disorder in the rat offspring brain. *Nutrients* 13. <https://doi.org/10.3390/nu13093212>
- Ghosh, P., Bitsanis, D., Ghebremeskel, K., Crawford, M.A., Poston, L., 2001. Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. *J. Physiol.* 533, 815–822. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.00815.x>
- Gong, N., Gao, C., Chen, X., Wang, Y., Tian, L., 2018. Adipokine expression and endothelial function in subclinical hypothyroidism rats. *Endocr. Connect.* 7, 295–304. <https://doi.org/10.1530/EC-18-0007>
- Herwig, A., Campbell, G., Mayer, C.D., Boelen, A., Anderson, R.A., Ross, A.W., Mercer, J.G., Barrett, P., 2014. A thyroid hormone challenge in hypothyroid rats identifies T3 regulated genes in the hypothalamus and in models with altered energy balance and glucose homeostasis. *Thyroid* 24, 1575–1593. <https://doi.org/10.1089/thy.2014.0169>
- Heslehurst, N., Ngongalah, L., Bigirumurame, T., Nguyen, G., Odeniyi, A., Flynn, A., Smith, V., Crowe, L., Skidmore, B., Gaudet, L., Simon, A., Hayes, L., 2022. Association between maternal adiposity measures and adverse maternal outcomes of pregnancy: Systematic review and meta-analysis. *Obes. Rev.* 23, 1–14. <https://doi.org/10.1111/obr.13449>
- Hoffman, D.J., Reynolds, R.M., Hardy, D.B., 2017. Developmental origins of health and disease: Current knowledge and potential mechanisms. *Nutr. Rev.* 75, 951–970. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nux053>
- Huesca-Gómez, C., Franco, M., Luc, G., Montañó, L.F., Massó, F., Posadas-Romero, C., Pérez-Méndez, O., 2002. Chronic hypothyroidism induces abnormal structure of high-

- density lipoproteins and impaired kinetics of apolipoprotein A-I in the rat. *Metabolism*. 51, 443–450. <https://doi.org/10.1053/meta.2002.31323>
- Liao, Z., Kong, Y., Zeng, L., Wan, Q., Hu, J., Cai, Y., 2022. Effects of high-fat diet on thyroid autoimmunity in the female rat. *BMC Endocr. Disord.* 22, 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12902-022-01093-5>
- Luongo, C., Dentice, M., Salvatore, D., 2019. Deiodinases and their intricate role in thyroid hormone homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* 15, 479–488. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0218-2>
- Meyer, J.H., Nelson, A.O., 1963. Efficiency of Feed Utilization By Various Animal Species Fed Similar Rations. *J. Nutr.* 80, 343–349. <https://doi.org/10.1093/jn/80.4.343>
- Novelli, E.L.B., Diniz, Y.S., Galhardi, C.M., Ebaid, G.M.X., Rodrigues, H.G., Mani, F., Fernandes, A.A.H., Cicogna, A.C., Novelli Filho, J.L.V.B., 2007. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab. Anim.* 41, 111–119. <https://doi.org/10.1258/002367707779399518>
- Oktay, S., Uslu, L., Emekli, N., 2017. Effects of altered thyroid states on oxidative stress parameters in rats. *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.* 28, 159–165. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0113>
- Oliveira, T.R. dos P., Manhães-de-Castro, R., Silva, J.M., Cadena-Burbano, E.V., Cavalcanti, C.C.L., Benjamim, R.A.C., Lago, A.B., Tourneur, Y., Antonio-Santos, J., da Silva Aragão, R., 2018. Differential effects of maternal high-fat/high-caloric or isocaloric diet on offspring's skeletal muscle phenotype. *Life Sci.* 215, 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.011>
- Oliveira, T.W.S., Leandro, C.G., De Jesus Deiró, T.C.B., Dos Santos Perez, G., Da França Silva, D., Druzian, J.I., Couto, R.D., Barreto-Medeiros, J.M., 2011. A perinatal palatable high-fat diet increases food intake and promotes hypercholesterolemia in adult rats. *Lipids* 46, 1071–1074. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3604-7>
- Oschry, Y., Eisenberg, S., 1982. Rat plasma lipoproteins: re-evaluation of a lipoprotein system in an animal devoid of cholesteryl ester transfer activity. *J. Lipid Res.* 23, 1099–1106. [https://doi.org/10.1016/s0022-2275\(20\)38046-9](https://doi.org/10.1016/s0022-2275(20)38046-9)
- Popkin, B.M., Ng, S.W., 2022. The nutrition transition to a stage of high obesity and noncommunicable disease prevalence dominated by ultra-processed foods is not inevitable. *Obes. Rev.* 23, 1–18. <https://doi.org/10.1111/obr.13366>
- Ribaroff, G.A., Wastnedge, E., Drake, A.J., Sharpe, R.M., Chambers, T.J.G., 2017. Animal models of maternal high fat diet exposure and effects on metabolism in offspring: a meta-regression analysis. *Obes. Rev.* 18, 673–686. <https://doi.org/10.1111/obr.12524>
- Santana-Farré, R., Mirecki-Garrido, M., Bocos, C., Henríquez-Hernández, L.A., Kahlon, N., Herrera, E., Norstedt, G., Parini, P., Flores-Morales, A., Fernández-Pérez, L., 2012. Influence of neonatal hypothyroidism on hepatic gene expression and lipid metabolism in adulthood. *PLoS One* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037386>
- Shao, S.-S., Zhao, Y.-F., Song, Y.-F., Xu, C., Yang, J.-M., Xuan, S.-M., Yan, H.-L., Yu, C.-X., Zhao, M., Xu, J., Zhao, J.-J., 2014. Dietary high-fat lard intake induces thyroid dysfunction and abnormal morphology in rats. *Acta Pharmacol. Sin.* 35, 1411–1420. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.82>
- Sinha, R.A., Singh, B.K., Yen, P.M., 2018. Direct effects of thyroid hormones on hepatic lipid metabolism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.10>
- Souza, A.F.P., Souza, L.L., Oliveira, L.S., Cordeiro, A., Souza, E., Kluck, G.E.G., Atella, G.C., Trevenzoli, I.H., Pazos-Moura, C.C., 2019. Fish oil supplementation during adolescence attenuates metabolic programming of perinatal maternal high-fat diet in adult offspring. *Br. J. Nutr.* 121, 1345–1356. <https://doi.org/10.1017/S0007114519000771>

- Sullivan, E.L., Nousen, E.K., Chamlou, K.A., 2014. Maternal high fat diet consumption during the perinatal period programs offspring behavior. *Physiol. Behav.* 123, 236–242. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.07.014>
- Suter, M.A., Sangi-Haghpeykar, H., Showalter, L., Shope, C., Hu, M., Brown, K., Williams, S., Alan Harris, R., Grove, K.L., Lane, R.H., Aagaard, K.M., 2012. Maternal high-fat diet modulates the fetal thyroid axis and thyroid gene expression in a nonhuman primate model. *Mol. Endocrinol.* 26, 2071–2080. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1214>
- Takashima, M., Tanaka, W., Matsuyama, H., Tajiri, H., Sakakibara, H., 2021. Maternal quercetin consumption during pregnancy may help regulate total cholesterol/hdl-cholesterol ratio without effect on cholesterol levels in male progeny consuming high-fat diet. *Nutrients* 13. <https://doi.org/10.3390/nu13041242>
- Taylor, P.N., Albrecht, D., Scholz, A., Gutierrez-Buey, G., Lazarus, J.H., Dayan, C.M., Okosieme, O.E., 2018. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nat. Rev. Endocrinol.* 14, 301–316. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2018.18>
- Tellechea, M.L., Mensegue, M.F., Pirola, C.J., 2017. The Association between High Fat Diet around Gestation and Metabolic Syndrome-related Phenotypes in Rats: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci. Rep.* 7, 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05344-7>
- Urbonaite, G., Knyzeliene, A., Bunn, F.S., Smalskys, A., Neniskyte, U., 2022. The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment. *Front. Neurosci.* 16, 1–24. <https://doi.org/10.3389/fnins.2022.909762>
- Walling, B.E., Picut, C.A., Remick, A.K., 2016. The Endocrine System, in: *Atlas of Histology of the Juvenile Rat*. Elsevier, pp. 257–291. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802682-3.00009-4>
- Wankhade, U.D., Zhong, Y., Kang, P., Alfaro, M., Chintapalli, S. V., Piccolo, B.D., Mercer, K.E., Andres, A., Thakali, K.M., Shankar, K., 2018. Maternal High-Fat Diet Programs Offspring Liver Steatosis in a Sexually Dimorphic Manner in Association with Changes in Gut Microbial Ecology in Mice. *Sci. Rep.* 8, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34453-0>
- Warner, M.J., Ozanne, S.E., 2010. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem. J.* 427, 333–347. <https://doi.org/10.1042/BJ20091861>
- Yang, N., Yao, Z., Miao, L., Liu, J., Gao, X., Xu, Y., Wang, G., 2016. Homocysteine diminishes apolipoprotein A-I function and expression in patients with hypothyroidism: A cross-sectional study. *Lipids Health Dis.* 15, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12944-016-0293-5>
- Zhang, X., Chen, W., Shao, S., Xu, G., Song, Y., Xu, C., Gao, L., Hu, C., Zhao, J., 2018. A High-Fat Diet Rich in Saturated and Mono-Unsaturated Fatty Acids Induces Disturbance of Thyroid Lipid Profile and Hypothyroxinemia in Male Rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 62, 1–28. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700599>
- Zhang, X., Shao, S., Zhao, L., Yang, R., Zhao, M., Fang, L., Li, M., Chen, W., Song, Y., Xu, C., Zhou, X., Zhao, J., Gao, L., 2019. ER stress contributes to high-fat diet-induced decrease of thyroglobulin and hypothyroidism. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 316, E510–E518. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00194.2018>

Figure 1 – Experimental research design.

Figure 2 – Body measurements and thyroid hormones profile of the dams. A) Body weight. **B)** Lee index. **C)** Thyroid hormones profile. Data represent mean \pm standard deviation, n CD = 3; n HFD = 3. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison between groups by Student's t-test. c: centimeters; g: grams; nmol/L: nanomoles per liter.

Figure 3 – Body measurements of the offspring in weeks after weaning. A) Body weight. **B)** Lee index. **C)** Body weight gain. **D)** Specific rate of body mass gain. Data represent mean \pm standard deviation, n OCD = 10; n OHFD = 10. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison between groups by Student's t-test. g: grams; c: centimeters.

Figure 4 – Nutritional determinations of the offspring in weeks after weaning. A) Food consumption. **B)** Energy intake. **C)** Feed efficiency. Data represent mean \pm standard deviation, n OCD = 10; n OHFD = 10. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison groups by Student's t-test. g: grams; kcal: kilocalories; BW: body weight; %: percentage.

Figure 5 – Correlation between thyroid function markers and the total cholesterol serum levels. A) Total thyroxine serum levels showed a strong negative correlation with total cholesterol in the OHFD group. **B)** T4/T3 molar ratio showed a moderate negative correlation with total cholesterol in the OHFD group. **C)** T3/T4 molar ratio showed a moderate positive correlation with total cholesterol in the OHFD group. mmol/L: millimoles per liter; nmol/L: nanomoles per liter; r: Pearson correlation coefficient; R²: coefficient of determination.

Table 1 - Nutritional composition of control diet (3.5 kcal/g) and high-fat and hypercaloric diet (4.9 kcal/g).

	Control diet ¹		High-fat diet	
	g/100g	% kcal	g/100g	% kcal
Carbohydrate	55	63	41.7	34
Protein	22.5	25	17.2	14
Fat	4.5	12	28.3	52
Other components	18	-	12.8	-

¹NUVILAB CR-1, Quimtia, Paraná, Brazil (whole corn, soybean bran, wheat bran, soy oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, sodium chloride, vitamin/mineral premix, amino acids, and antioxidant). g: grams, kcal%: percent of total energy, kcal/g: kilocalorie per gram.

Table 2 - Biological analysis of OCD and OHFD. Data represent mean \pm standard deviation (SD). *P*-values marked with bold indicate statistically significant differences between the groups.

Variable	OCD (n = 10)		OHFD (n = 10)		<i>P</i> value
	Mean	SD	Mean	SD	
Total thyroxine (TT4) (nmol/L)	77.49	\pm 7.15	64.75	\pm 2.19	< .001
Total triiodothyronine (TT3) (nmol/L)	1.46	\pm 0.09	1.36	\pm 0.10	.03
T4/T3 molar ratio	53.06	\pm 3.88	47.88	\pm 4.76	.02
T3/T4 molar ratio	0.019	\pm 0.001	0.021	\pm 0.002	.01
Total cholesterol (mmol/L)	1.71	\pm 0.11	1.92	\pm 0.12	< .001
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.37	\pm 0.17	1.20	\pm 0.10	.01
Non HDL-cholesterol (mmol/L)	0.35	\pm 0.09	0.72	\pm 0.15	< .001
Triglycerides (mmol/L)	2.00	\pm 0.27	2.30	\pm 0.23	.04
Perigonadal adipose tissue (g/100g BW)	0.77	\pm 0.13	1.06	\pm 0.17	< .001
Retroperitoneal adipose tissue (g/100g BW)	0.69	\pm 0.16	0.79	\pm 0.23	.29
Abdominal adipose tissue (g/100g BW)	1.46	\pm 0.27	1.85	\pm 0.38	.02

OCD: offspring of control diet group; OHFD: offspring of high-fat diet group; HDL-cholesterol: high-density lipoprotein cholesterol; non HDL-cholesterol: non high-density lipoprotein cholesterol; mmol/L: millimoles per litre; nmol/L: nanomoles per liter; g/100 g BW: grams per 100 gram of body weight.

Figure 1

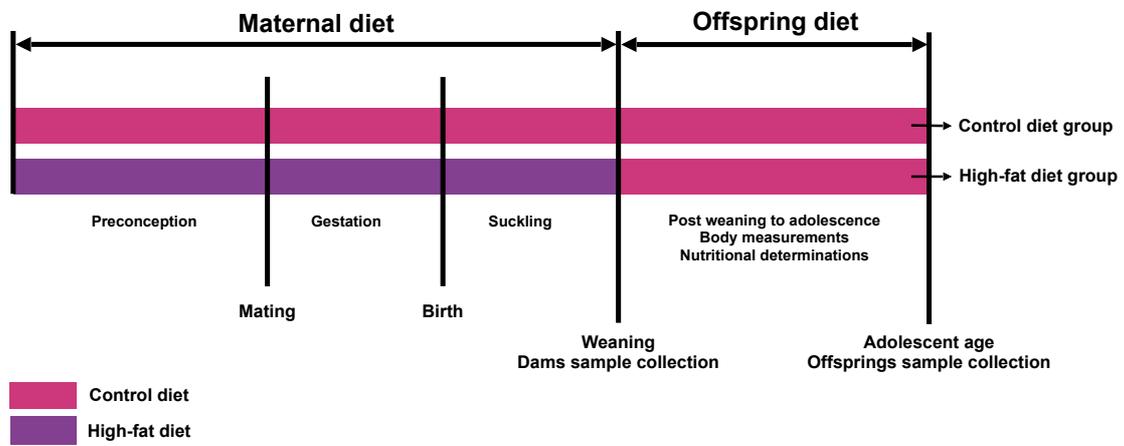


Figure 2

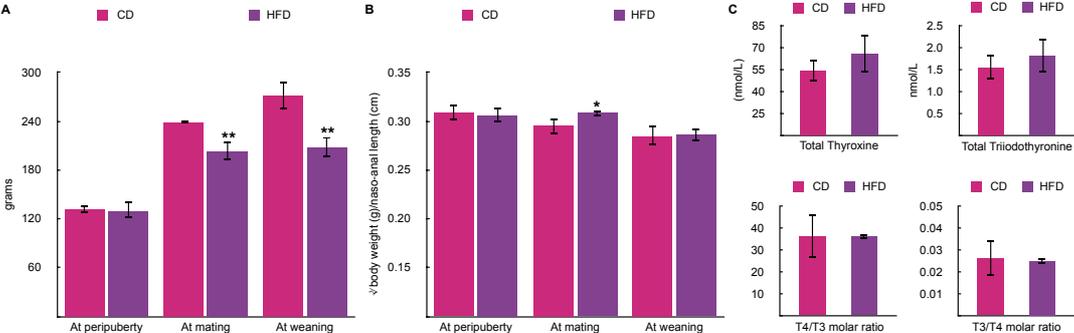


Figure 3

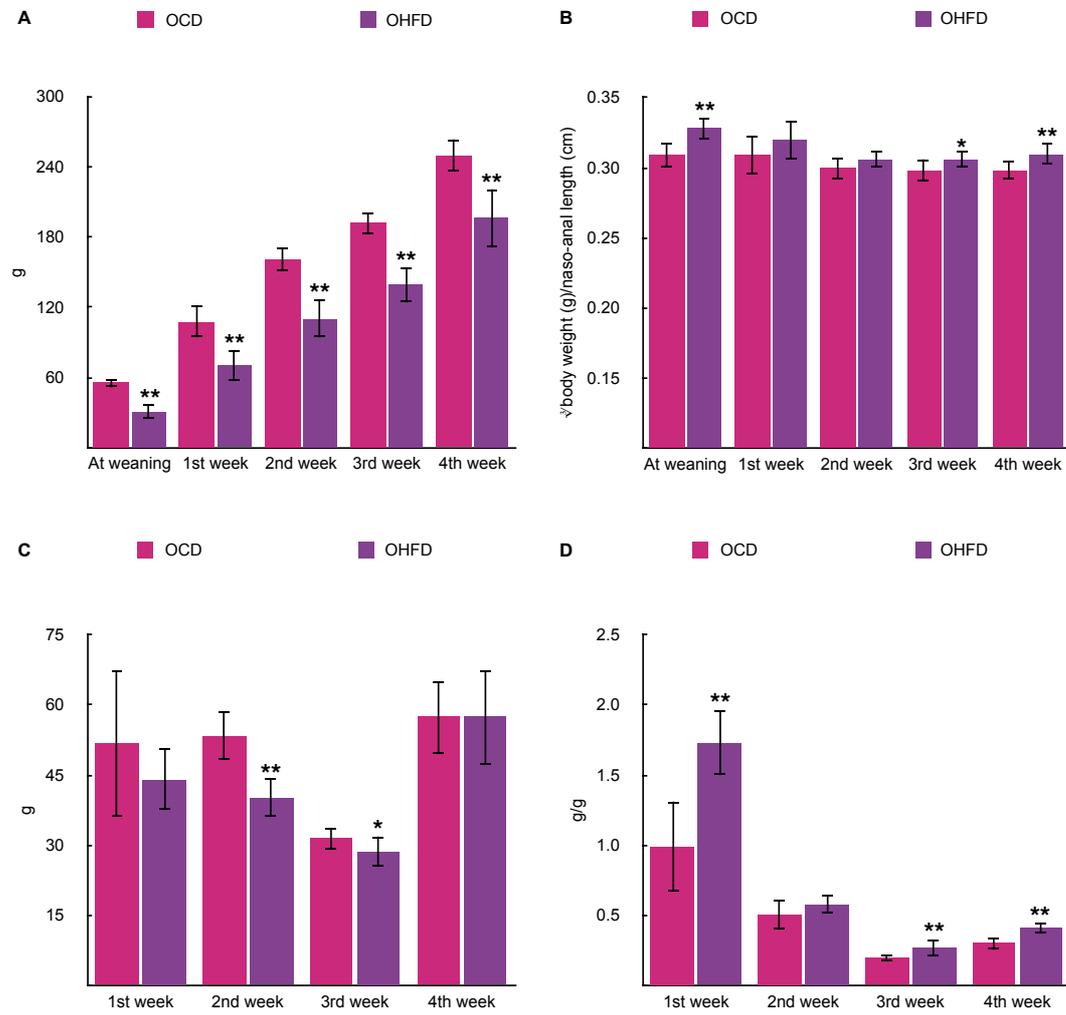


Figure 4

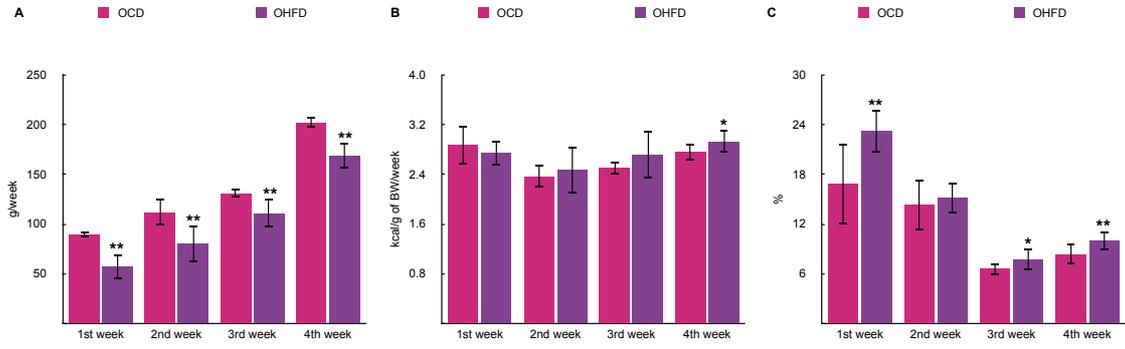
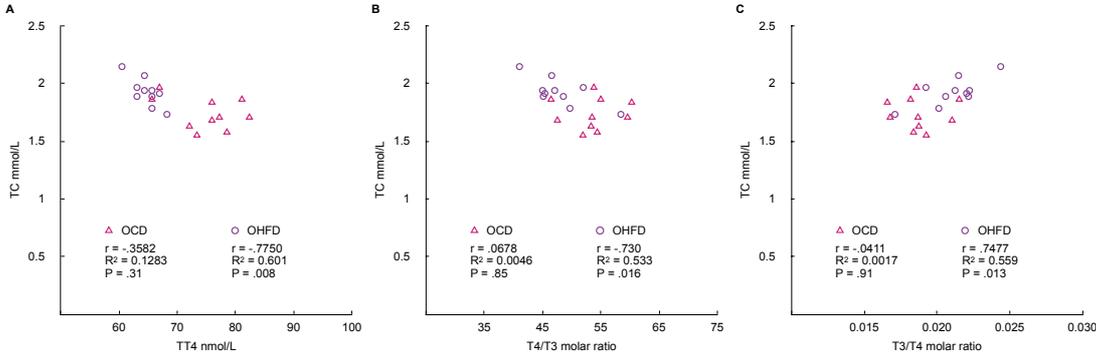


Figure 5



ARTIGO 2

Formatado para submissão na revista *Physiology & Behavior*

Title page**Nutritional programming of physical development and bone growth of offspring by a maternal high-fat diet**

Roberta Giorgi^a, Cainá Corrêa do Amaral^a, Geovanna Peter Corrêa^a, Renata Leivas de Oliveira^b, Karline da Costa Rodrigues^b, Ana Carolina Uchoa Vasconcelos^c, Anelize de Oliveira Campello Félix^d, Cristiane Luchese^b, Fernanda Nedel^{a*}

^a Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GPCell), Post-graduation in Health and Behavior Program, Catholic University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

^b Research Laboratory in Biochemical Pharmacology (LaFarBio), Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, RS, Brazil

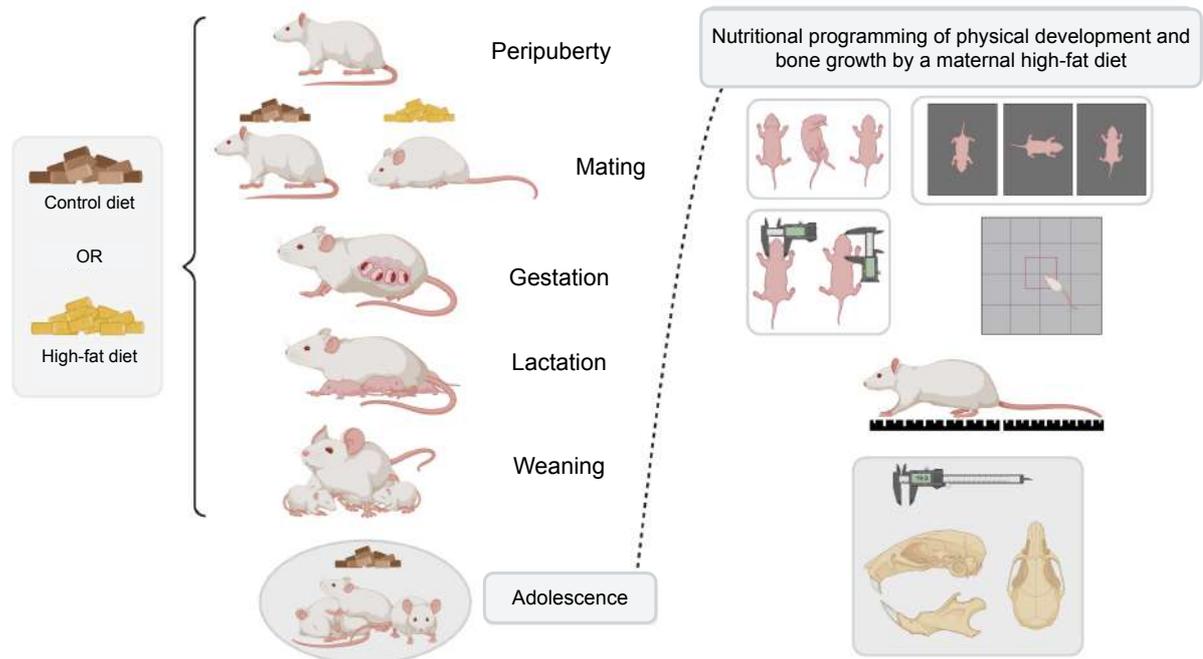
^c Diagnostic Center for Oral Diseases, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

^d Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, Pelotas, RS, Brazil

*Corresponding author: Research Group on Cellular and Molecular Biotechnology Applied to Health (GPCell), Post-graduation in Health and Behavior Program, Catholic University of Pelotas, Gonçalves Chaves st., 373, room 411, building C, ZIP code 96010-901, Pelotas, RS, Brazil, phone +55 53 2128 8408.

E-mail address: fernanda.nedel@gmail.com (Fernanda Nedel)*

Graphical abstract



Highlights

- Maternal high-fat diet (HFD) delays offspring craniofacial bone growth
- Maintenance of maternal HFD aggravates physical development impairment
- Offspring consumption of control diet after weaning did not avoid growth retardation
- Maternal HFD disturbs offspring'd mandibular growth
- Maternal HFD did not influence locomotor activity and exploratory behavior

Abstract

The nutritional programming of offspring development in animal model due to maternal high-fat diet (HFD) simulating human consumption of western diet is constantly being studied. This is important since it is urgent to comprehend the mammal phenotype modulation after unhealthy nutrition at prenatal, gestation, and lactation. However, many gaps remain unclear, especially regarding physical development and bone growth. Therefore, we aimed to investigate the influence of a maternal HFD (52% energy from fat - mostly lard) from 37 days of female Wistar rats' life across mating (6 weeks after the beginning of high-fat diet exposition), gestation and lactation until weaning in physical development and bone growth compared to offspring from dams exposed to a control diet (12% energy from fat). The dams of HFD group were obese at mating and all pups were exposed to control diet after weaning. The offspring were evaluated concerning somatic growth (body, tail and cranial axes lengths), maturation of physical feature (day of the mandibular incisive eruption), neurobehavioral assessment (righting and negative geotaxis reflexes), locomotor performance (open field test), and linear cephalometric measurements of the mandible (anteroposterior and alveolar lengths) and the skull (diastema and alveolar lengths). The statistical analyses by Student's *t*-test revealed that the offspring exposed to a maternal HFD were significantly different from offspring control showing an increase in the latency of the negative geotaxis reflex, lateness of mandibular incisive eruption, and widely reduction of somatic growth and all linear cephalometric measurements. Thus, a maternal HFD in long exposure leads to delayed physical development and bone growth.

Keywords: maternal high-fat diet, nutritional programming, adolescence, craniofacial bones, somatic growth.

1. Introduction

The “Western diet”, high in meat, processed food, and saturated fat, is a reality in most countries, leading to severe consequences of human health, such as obesity, type 2 diabetes mellitus (T2DM), cardiovascular disease, metabolic syndrome, and osteoarthritis [1,2]. Women of childbearing age, pregnant and lactating are exposed to the obesogenic environment promoted by this hyperlipidic diet pattern, increasing their susceptibility to develop overweight/obesity, insulin resistance, gestational diabetes, and higher cholesterol serum levels [3,4]. Maternal diet and nutritional status are powerful factors to program offspring development, and thus should be brought to attention in unhealthy nutritional behavior at the moments of a closed mother-baby relationship, i.e., preconception, gestation, and breastfeeding [5,6]. According to the theory of “developmental origins of health and disease” stimuli and insults from prenatal to early postnatal can permanently alter offspring physiology, metabolism, and epigenetics, even in later life [5,7].

Maternal obesity or maternal high-fat diet (HFD) during pregnancy predispose offspring to develop obesity and other non-communicable diseases in adulthood, including metabolic syndrome, T2DM, hypertension, and cardiovascular disease [8]. Moreover, the offspring bone health is highlighted in recent years, with a growing number of publications on the subject. Longitudinal studies demonstrate that a “Western diet” during pregnancy gives rise to children with lower whole-body bone area, bone mineral content, and bone mineral density and increased risk of fracture when compared with children born from mothers who consumed a low-fat diet at the gestational period [9]. Although there is a need for studies in human in this area, there is a lack of scientific research either for ethical reasons or the difficulty of isolating dietary characteristics and/or pathological conditions in

clinical studies [10]. Therefore, preclinical studies represent an option to simulate human “Western diet” consumption and provide an enlightening of the phenotypes develop by offsprings after maternal HFD exposition.

To observe in rodents the similar consequences produced by the food consumption of modern society is necessary to expose the animal to an HFD with 35 - 60% energy from fat for at least three weeks [11]. In a maternal HFD model it is also relevant to provide mostly energy fat from lard and preferably maintain the HFD from preconception through lactation until weaning [12]. The offspring development after maternal HFD manipulation according to these conditions lead to alterations in different organs and tissue, such as the liver [13], kidney [14], pancreas [15], brain [16], heart [17], and skeletal muscle [18], which are extensively studied. Considering the importance of maternal nutrition to offspring bone development in the utero and during suckling, critical and rapid periods of developmental, the influence of maternal HFD in bone structure has also been studied [19]. One of the most affected offspring systems by a maternal HFD is the metabolism [12], whose deregulation can lead to hormonal disorders related to bone health [20]. In response to environmental factors and metabolic diseases related to nutritional status or hormonal conditions the osseous architecture and structure of the flat and irregular bones, which included the skull development, can be affected [20].

Preclinical research on bone growth after maternal HFD from preconception to gestation identified delays in skeletal formation even in the fetal stage [21,22], including shorter craniofacial lengths at the end of the gestational period [23]. Furthermore, a delay in somatic growth after maternal HDF during lactation [24] and decreased in femur length at adult age post maternal HFD during gestation and lactation [25], has also been described in the literature. It is important to emphasize that the formation of long bones, such as a femur,

begins due to endochondral ossification, a process different from the one developed to originate the flat craniofacial bones, which is the intramembranous ossification [26]. The nutritional programming of the flat and irregular bone growth, such as skull and mandible, in the offspring exposed to a maternal HFD has not been explored until now, and the physical development between birth and adolescence needs further investigation. In this sense, we hypothesized that a maternal HFD with 40-60% energy from fat, mostly lard, and manipulated from peripubertal age to the end of the nursing period may generate a large influence on physical development and bone growth, despite the consumption of a balanced diet after weaning. To confirm this hypothesis, our investigation aimed to compare the parameters of neurobehavioral, morphometric measurements, locomotor performance, and linear cephalometric measurements of the mandible and the skull among late adolescent offspring submitted to a control and high-fat maternal diet.

2. Materials and methods

2.1 Animals

Virgin female and male albino Wistar rats (*Rattus norvegicus*) (37 days old) were taken from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas (Campus Capão do Leão). The animals were maintained in pairs in open, wire-top, polypropylene cages (34 x 41 x 18 cm) in a room at 22 ± 1 °C with lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m. and free access to water. Animals were handled at least once a week. Furthermore, weekly home cages were cleaned and equipped with new bedding by a professional animal keeper. The method of determining sample size was based in the tradition or common sense, considering the low number of animals to allow discovering the effect sizes in different equations according to

one of the main outcomes (cephalometric measurements of the mandible) [27]. 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.

2.2 Experimental protocol

At peripubertal age (postnatal day 37, average 130 g), dams were divided into two randomized groups: control group (control diet - CD) (n = 3) and experimental group (high-fat diet - HFD) (n = 3), which was exposed to a laboratory standard chow and fat-enriched diet, respectively, from this time until the weaning. Lee index [$\sqrt[3]{\text{body weight (g)}/\text{naso-anal length (cm)}}$] was used as body mass index to assess dams obesity, classifying the animal as obese when the value was more than 0.300 plus a statistical difference between groups [28]. Males (average 349 g, maintained in a control diet) and dams (CD: average 249 g, HFD: average 203 g) were mated for five consecutive days approximately six weeks after the beginning of HFD exposition. The day of parturition was considered postnatal day 1 (P1) and from this moment to weaning (3 weeks after birth) all offspring remained with dams. A litter was formed of a mean of 8 ± 2 pups (5 ± 2 male pups per litter). The litter size was not significantly different between groups. Male pups represented 57% of the total offspring. Tails of each pup was marked for individual identification. Pups were counted, sexed according anogenital distance at P5, to limit possible early-life maternal separation stressor.

The offspring was indirectly submitted to the maternal diet during conception, gestation and suckling until the weaning (P21), in which the litter were divided in males and females identified according to maternal diet (offspring from CD group: OCD; offspring from HFD group: OHFD) with both groups consuming laboratory standard chow (Fig. 1). During the lactation, the physical feature of mandibular incisive eruption (the first visible and palpable cresting of the lower incisor) was observed to evaluate the offspring's maturation. Aiming to avoid undesirable confounding factors such as estrous cycles and the effect of female hormones on physiological functions, only male pups were studied. Furthermore, in our study, we did not study the incidence of these diets on dams but rather specifically focused on their offspring which all were under control diet. At offspring's late adolescence (P54) [29], the bones of craniomandibular structures were accessed after anesthesia with isoflurane inhalation (5%, 0.25 mL of liquid isoflurane per liter of chamber volume) followed by cardiac puncture when confirmed blockade of pain sensation.

2.3 Diet composition

The CD group received a normocaloric and normolipidic Nuvilab CR-1 irradiated feed produced by Quimtia® (Curitiba, Brazil) composed by 12% of energy from fat in 3,5 kcal/g. Meanwhile, the HFD group was fed by an hypercaloric and hyperlipidic diet manufactured with powdered standard chow enriched with lard, resulting in 52% of energy from fat in 4,9 kcal/g (Table 1). The offspring of both groups received Nuvilab CR-1.

2.4 Neurobehavioral assessment

The righting reflex test was carried in 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 [30]. 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 [31].

2.5 Somatic growth

The animals were gently immobilized through traction application and the body length (distance between the snout and the base of the tail) and the tail length (distance between the base and the end of the tail) were made using a plastic, nonextensible measuring tape, with an accuracy of 0.1 cm. The measures of mediolateral cranial axis (MLCA) (distance between the ear holes) and anteroposterior cranial axis (APCA) (distance between the snout and the head-neck articulation) were performed with digital caliper with a precision of 0.01 millimeters [24]. The ratio between tail length and body length was calculated from the respectively morphometric measurements.

2.6 Linear cephalometric measurements

Nine cephalometric landmarks were selected for the linear measurements with digital caliper with a precision of 0.01 millimeters (Table 1). The right side of the mandible and the right alveolus were used in the measurements. The fixed landmarks are the most posterior-

superior point on the mandibular condyle (Co), the most posterior-superior point of the coronoid process of the mandible (Cor), the most posterior point of the angular process of the mandible (Go), the most inferior and anterior point on the alveolar process of the mandible (Id), the prominent point between incisal edges of upper incisors (Iu), from the anterior edge of the first molar alveolus to posterior edge of the last molar alveolus of the mandible (lower molar alveoli - LMA), from the anterior edge of the first molar alveolus to posterior edge of the last molar alveolus of the maxilla (upper molar alveoli - UMA), the highest point of the nasal bone (H), and the larger gap between the upper incisor and upper molar (diastema - Dia) (Figure 2) (Table 2). The linear measurements of choice were fourth different lengths of the mandible and anterior height and two different lengths of the skull (Table 3). Moreover, the ratio of Co-Id/Cor-Id and Co-Id/Go-Id were estimated to predict the proportionality of the mandible growth [32,33].

2.7 Assessment of open field locomotor activity and exploratory behavior

The open field test assay used to test locomotor activity and exploratory behavior of the offspring at P47 (late adolescence) [28]. The open-field apparatus was made of plywood and surrounded by 30 cm high walls. The floor of the apparatus (40 x 40 cm) was divided into 9 quadrants (3 x 3 cm). The animals were transferred to the testing room in their home cages and allowed to acclimatize to this room prior to testing. Each animal was gently placed in the center of the open field arena and left freely to explore for 5 minutes. After the apparatus was cleaned and disinfected with 70% ethyl alcohol after each trial. The sum of segments crossed with the four paws and the number of rears were recorded to measure for locomotor and exploratory activities [34].

2.8 Statistical analysis

All measurement, determinations and calculations were made from each animal. The variables were entered, double-checked and the database was analyzed in R 3.1.2 software. For statistical analysis, Student's t-tests were used. Data were expressed as mean \pm SD, and a significance level of $P < .05$ was considered statistically significant for all variables.

3. Results

Dams of HFD group showed a Lee index statistically higher when compared to the CD group at mating (CD: 0.295 ± 0.008 , HFD: 0.308 ± 0.49 ; $P = .028$), revealing obesity in six weeks after the beginning of diet manipulation. The body length of the OHFD was smaller from the first to the seventh weeks after birth when compared to the OCD group (Fig. 3A). Moreover, tail length was also smaller from the first to the seventh weeks after birth when compared to the OCD group (Fig. 3B). However, the ratio between tail length and body length was only significantly different at first and second weeks after birth when compared to the OCD group (Fig. 3C). The physical feature of maturation regarding to mandibular incisive eruption was delayed in pups of the OHFD when compared to OCD (OCD: 11 ± 0 days, OHFD: 12.3 ± 0.58 days; $P < .02$).

The cranial axes were reduced at all times evaluated. The MLCA was smaller from the first to third weeks after birth when compared to the OCD group (Fig. 4A). The APCA was smaller from the first to third weeks after birth when compared to the OCD group (Fig. 4B). There was no statistical difference between the OHFD and OCD groups regarding righting reflex test, however, the OHFD showed a delay in latency of negative geotaxis reflex test (Fig. 4C). The locomotor activity and exploratory behavior evaluated by the open field test did

not show statistical differences between offspring groups concerning both analyzed parameters, crossing and rearing (Fig. 4C).

All the linear cephalometric measurements of the skull and mandible of the OHFD group were smaller when compared to the OCD group (Table 4). Moreover, to promote a wide view of this broad reduction of bone growth in the OHFD group we demonstrated in percentages how much smaller the offspring was at different evaluated times (Table 5). We identified similar reductions in the first week of life and late adolescence and a more pronounced reduction at weaning, which indicates intense effect of indirect exposition to HFD during lactation.

4. Discussion

Our study identified the impact of maternal HFD on the imbalance of critical aspects of physical development and bone growth of the offspring. We showed that maternal consumption of HFD from preconception to weaning induced a marked reduction of all morphometric measurements, which were the lengths of the body, tail, cranial axes, linear cephalometry of mandible and skull, and the height of the rostrum with teeth. Furthermore, the lateness of mandibular incisor eruption and the negative geotaxis reflex was also observed in the offspring from the maternal HFD group, indicating a delay in physical maturation. The only difference in exposure was the maternal diet, high-fat or control, once both offspring groups ingested a control diet after the weaning and no intervention was performed. Therefore, our results indicate that the growth dysfunction could not be restored after normalization of the diet, and the hypothesis proposed by us it was accepted. Interestingly, a long-lasting maternal HFD promoted a wide range of physical and bone

phenotype changes related to the variables evaluated from the beginning of life to adolescence.

Regarding the skeletal effects of a maternal high-fat diet on offspring phenotypes, the time of diet manipulation is fundamental to determine which cell population may be affected, once different maternal metabolic disorders are present if exposure occurs during preconception, gestation, lactation, or more than one of these periods combined [25]. The long-term diet exposition promotes insults that can trigger programming in all developmentally sensitive times for the offspring, in other words, the germ cell, early embryo, fetus, and neonate [25]. Moreover, maternal obesity at preconception also contributed to outcomes variability due to metabolic derangement of dams body and oocyte metabolism, morphology, and maturation alteration [35].

Additionally, studies of maternal HFD have shown that the effect sizes on offspring health were likely to be bigger when dams were younger [12]. Thus, conditions related to maternal age of HFD exposition, duration of maternal dietary manipulation, and maternal age and metabolic state at conception, could disturb the offspring's skeletal formation through different pathways, such as differentiation of precursor cells, cellular senescence, and longitudinal growth, depending on the specific exposure windows [25,36]. For these reasons, it is not surprising that the consumption of a maternal high-fat diet from peripuberty, a conception approximately six weeks after the beginning of dietary manipulation (younger age) when dams exposed to the HFD group were obese, and the maintenance of maternal HFD until weaning causes intense consequences on offspring's physical development and bone growth as we observed in the OHFD group.

Our study provides a longitudinal view of the effect of maternal HFD across offspring's physical development with a special focus on craniofacial growth. Studies in

rodents that evaluated the effect of maternal HFD in a range from 45 to 60% of calories from fat in the dietary intervention period from 4 to 8 weeks before mating and during pregnancy in fetal skeletal phenotype showed a decrease in total bone volume [22], mineralization [22], bone formation [21], ossification [21], and body and long bone lengths [23]. These findings indicate that within the ideal percentage of fat to simulate maternal consumption of a western diet [12] and the manipulation begin a few weeks before conception, there is impairment of bone growth even in the intrauterine phase.

In this sense, Liang et al. investigated a maternal HFD from 4 weeks before conception to gestational day 19 in dams pregnant at 8 weeks of life, and identify in the offspring indirectly exposed to HFD a shorter length of crown-rump, a general indicator for fetal axial skeletal development [23]. Besides, this study also demonstrated significant shortness of mandibular and maxillary lengths in the fetus of dams of the HFD group when compared to control and noteworthy retardation of intramembranous and endochondral ossification [23], indicating unquestionable nutritional programming of craniofacial development by maternal HFD.

Specifically, in concern to rat mandible development, it is important to mention that in the early postnatal a growth center formed by a cartilaginous bar in the symphyseal region showed intimate relation with the alveolar incisive development, being determinate for the incisor eruption [37]. Therefore, the delay of mandibular incisive eruption observed in the OHFD group in our study is probably a reflex of retarded mandible formation due to nutritional programming by maternal HFD. Considering the mandibular incisive eruption approximately in the middle of the suckling period, it is possible to hypothesize that the fetal programming of mandible growth is also incremented by the influence of lactation under maternal HFD, contributing to the retardation of craniofacial growth. This enhancement in the

delay of craniofacial growth promoted by the maintenance of the maternal HFD during lactation can be partially observed by the analysis of cranial axes of the OHFD group, once it is possible to see an increase in retardation from 3% of MLHA and 5% of APHA at 1st week of life to 12% and 15%, respectively, at weaning when compared the measurements of OHFD group with OCD group. The somatic growth of both offspring's cranial axes under maternal HFD, independent of the time of dietary manipulation, is reported by the literature as smaller, in which the lactational programming has a marked effect on MLCA [24,38].

The magnification of the effects of indirect exposure to HFD through suckling is likewise perceived from the increase in latency of the negative geotaxis reflex, also performed around the middle of lactation, which was not detected in the other neurobehavioral assessment, i.e., righting reflex tested on the 5th day of life. A similar observation is valid for the body and tail lengths, which showed more pronounced shortness at weaning, with both lengths of OHFD reaching more than a 25% (Table 5). Following the same logic, the evaluation of the body and tail lengths at adolescence, with 10% reduction in both lengths (Table 5), allows one to hypothesize that the exposition of the offspring from maternal HFD to a control diet after weaning diminished the deleterious effect of developmental programming, without, however, prevent the groups from being statistically different. It should be noted that despite this significant difference in morphometric measurements at adolescent age, the locomotory and exploratory behaviors demonstrated similar activity for both groups, indicating a probable non-loss of function by the OHFD group.

In agreement to our study, Cadena-Burbano et al., showed that the dams exposition to HFD (52% energy from fat) from gestation to weaning did not confer differences in offspring's locomotory activity at late adolescence [39]. Concerning body and tail lengths, the literature is scarce, however, the evaluation of these morphometric parameters during

suckling by different authors demonstrated a downsizing of offspring exposed to HFD [38, 40, 41]. Notwithstanding we found a reduction in body and tail lengths, the examination of the growth curve and tail length/body length ratio from 1st to 7th weeks before birth revealed a proportionality development of OHFD when compared to the ODC group. Thus, despite the animals from the HFD group being minor, they presented a constant growth and, except in the first and second weeks, there was no statistical difference between groups regarding tail length/body length ratio.

Lastly, our study is the first to show that maternal HFD from peripubertal age to weaning can cause bone growth retardation of the skull and mandible in late adolescent offspring. The delay in craniofacial growth in our study can be identified from early perinatal to late adolescence due to changes in physical maturation and bone growth, corroborating with several studies that revealed bone formation changes at fetal or postnatal stages [21, 23, 25, 40]. Nonetheless, at least until now, the research into the mechanisms of action related to the bone phenotype modifications promoted by a maternal HFD is still unclear.

Concerning maxillary and mandibular formation, such as intramembranous and endochondral ossification, it was proposed that oxidative stress induced by excessive reactive oxygen species due to maternal HFD causes placental labyrinthine vascular damage and impaired fetal signaling pathway associated with osteogenesis, leading to skeletal pathogenesis [23]. The other theories, more focused on the total bone formation or long bone fetal or adult growth, also reflect alterations in the bone cell population, such as (1) decreased osteoblast proliferation and differentiation [21], (2) increased potential for osteoclastogenesis [25], (3) increased inflammatory cytokine production in fetal calvarial osteoblasts [22], and (4) increased adipocyte number and adipocyte size in the bone marrow

cavity [42]. However, not all studies on the subject are consistent and so many times they are controversy [36].

Moreover, we demonstrate that the ratio between the mandibular lengths and the percentual reduction of the skull and mandibular measurements of the OHFD group was disproportional when compared to the OCD group and deviant from age-appropriate (Table 4) [32]. Surprisingly, some linear cephalometric measurements of OHFD showed proportional reductions in comparison to OCD, as those related to teeth (LMAL, UMAL, and H-Iu), and others were more substantial, as DiaL. The mandible is essential to the masticatory function and facial morphology, being an important factor in total facial development [32]. Thereby, a difference in the ratios of their length is an alert for further research, since there is a possibility of the maternal HFD consumption and inadequate craniofacial formation. On the hand, the diastema separates spatially and functionally the incisors from the molar, which may also cause damage to skull growth if it doesn't develop properly [43].

The current study had a few limitations that should be taken into consideration. Firstly, although we observed changes in dams body composition at mating that can alter gestational conditions, we did not examine the composition of the mother's milk. Knowing the nutrient content in terms of macronutrients, vitamins, and minerals may have helped to understand the more severe underlying changes observed at the time of weaning. Second, the microarchitecture and morphological changes in the mandible and skull were not examined. These could help determine if the craniofacial bones are just shorter or have ossification and mineralization alterations. Additionally, the females are not evaluated, precluding sex-specific analysis.

In conclusion, we showed that a maternal HFD (diet regimen that simulates the current western human diet pattern) consumed from peripuberty to suckling can induce a delay of physical development and retard bone growth, which is not reversed with the diet normalization after weaning due to the persistence of the altered phenotype until late adolescence. Based on our findings we point out the need for further studies including female offspring, to observe the effect of developmental programming on both sexes. Moreover, future investigations should evaluate other bone health markers and conduct morphological and micro-tomography analyses of mandibular and skull bones to elucidate the signaling pathways involved in the process that led to the dysfunction of these important skeletal structures.

References

- [1] B.M. Popkin, S.W. Ng, The nutrition transition to a stage of high obesity and noncommunicable disease prevalence dominated by ultra-processed foods is not inevitable, *Obes. Rev.* 23 (2022) 1–18. <https://doi.org/10.1111/obr.13366>.
- [2] J. Zeng, D.K. Franklin, A. Das, V. Hirani, The effects of dietary patterns and food groups on symptomatic osteoarthritis: A systematic review, *Nutr. Diet.* (2022) 1–23. <https://doi.org/10.1111/1747-0080.12781>.
- [3] K. Bowers, D.K. Tobias, E. Yeung, F.B. Hu, C. Zhang, A prospective study of prepregnancy dietary fat intake and risk of gestational diabetes, *Am. J. Clin. Nutr.* 95 (2012) 446–453. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.026294>.
- [4] S. Park, M.Y. Kim, S.H. Baik, J.T. Woo, Y.J. Kwon, J.W. Daily, Y.M. Park, J.H. Yang, S.H. Kim, 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.* 67 (2013) 196–201. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.207>.
- [5] M. Barker, J. Baird, T. Tinati, C. Vogel, S. Strömmer, T. Rose, R. Begum, M. Jarman, J. Davies, S. Thompson, L. Taylor, H. Inskip, C. Cooper, D. Nutbeam, W. Lawrence, Translating developmental origins: Improving the health of women and their children using a sustainable approach to behaviour change, *Healthc.* 5 (2017). <https://doi.org/10.3390/healthcare5010017>.
- [6] M.E. Cerf, High fat programming and cardiovascular disease, *Med.* 54 (2018) 1–13. <https://doi.org/10.3390/medicina54050086>.
- [7] E.F. Sutton, L.A. Gilmore, D.B. Dunger, B.T. Heijmans, M.F. Hivert, C. Ling, J.A. Martinez, S.E. Ozanne, R.A. Simmons, M. Szyf, R.A. Waterland, L.M. Redman, E. Ravussin, Developmental programming: State-of-the-science and future directions-Summary from a Pennington Biomedical symposium, *Obesity.* 24 (2016) 1018–1026. <https://doi.org/10.1002/oby.21487>.
- [8] M.J. Warner, S.E. Ozanne, Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease, *Biochem. J.* 427 (2010) 333–347. <https://doi.org/10.1042/BJ20091861>.
- [9] K.H. Jensen, K.R. Riis, B. Abrahamsen, M.N. Händel, Nutrients, diet, and other factors in prenatal life and bone health in young adults: A systematic review of longitudinal studies, *Nutrients.* 12 (2020) 1–19. <https://doi.org/10.3390/nu12092866>.
- [10] T. Grøfte, T. Wolthers, D.S. Jensen, N. Møller, J.O. Jørgensen, H. Orskov, H. Vilstrup, Hepatic amino nitrogen conversion and organ N-contents in hypothyroidism, with thyroxine replacement, and in hyperthyroid rats., *J. Hepatol.* 26 (1997) 409–416. [https://doi.org/10.1016/s0168-8278\(97\)80059-1](https://doi.org/10.1016/s0168-8278(97)80059-1).
- [11] K.J. Hintze, A.D. Benninghoff, C.E. Cho, R. Eward, Modeling the western diet for preclinical investigations, *Adv. Nutr.* 9 (2018) 263–271. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy002>.
- [12] M.L. Tellechea, M.F. Mensegue, C.J. Pirola, The Association between High Fat Diet around Gestation and Metabolic Syndrome-related Phenotypes in Rats: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05344-7>.

- [13] U.D. Wankhade, Y. Zhong, P. Kang, M. Alfaro, S. V. Chintapalli, B.D. Piccolo, K.E. Mercer, A. Andres, K.M. Thakali, K. Shankar, Maternal High-Fat Diet Programs Offspring Liver Steatosis in a Sexually Dimorphic Manner in Association with Changes in Gut Microbial Ecology in Mice, *Sci. Rep.* 8 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34453-0>.
- [14] P. Zhou, H. Guan, Y. Guo, L. Zhu, X. Liu, Maternal high-fat diet programs renal peroxisomes and activates NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in the rat fetus, *J. Inflamm. Res.* 14 (2021) 5095–5110. <https://doi.org/10.2147/JIR.S329972>.
- [15] Z. Liu, Z. Ding, E.C. Lynch, N. McCauley, Y. Zhou, K.K. Zhang, L. Xie, Pregestational diet transition to normal-fat diet avoids the deterioration of pancreatic β -cell function in male offspring induced by maternal high-fat diet, *J. Nutr. Biochem.* 86 (2020) 108495. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108495>.
- [16] K. Gawlińska, D. Gawliński, M. Borczyk, M. Korostyński, E. Przegaliński, M. Filip, A maternal high-fat diet during early development provokes molecular changes related to autism spectrum disorder in the rat offspring brain, *Nutrients.* 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/nu13093212>.
- [17] L. Tian, Y. Song, M. Xing, W. Zhang, G. Ning, X. Li, C. Yu, C. Qin, J. Liu, X. Tian, X. Sun, R. Fu, L. Zhang, X. Zhang, Y. Lu, J. Zou, L. Wang, Q. Guan, L. Gao, J. Zhao, A novel role for thyroid-stimulating hormone: up-regulation of hepatic 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase expression through the cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A/cyclic adenosine monophosphate-responsive element binding prot, *Hepatology.* 52 (2010) 1401–1409. <https://doi.org/10.1002/hep.23800>.
- [18] J. Woyames, A.F.P. Souza, R.A. Miranda, L.S. Oliveira, B. Caetano, C.B.V. Andrade, R.S. Fortunato, G.C. Atella, I.H. Trevenzoli, L.L. Souza, C.C. Pazos-Moura, Maternal high-fat diet aggravates fructose-induced mitochondrial damage in skeletal muscles and causes differentiated adaptive responses on lipid metabolism in adult male offspring, *J. Nutr. Biochem.* 104 (2022) 108976. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2022.108976>.
- [19] J. Zheng, Q. Feng, S. Zheng, X. Xiao, Maternal nutrition and the developmental origins of osteoporosis in offspring: Potential mechanisms and clinical implications, *Exp. Biol. Med.* 243 (2018) 836–842. <https://doi.org/10.1177/1535370218779024>.
- [20] V.C. Andreu-Arasa, M.N. Chapman, H. Kuno, A. Fujita, O. Sakai, Craniofacial manifestations of systemic disorders: CT and MR imaging findings and imaging approach, *Radiographics.* 38 (2018) 890–911. <https://doi.org/10.1148/rg.2018170145>.
- [21] J. Chen, J. Zhang, O.P. Lazarenko, P. Kang, M.L. Blackburn, M.J.J. Ronis, T.M. Badger, K. Shankar, Inhibition of fetal bone development through epigenetic down-regulation of HoxA10 in obese rats fed high-fat diet, *FASEB J.* 26 (2012) 1131–1141. <https://doi.org/10.1096/fj.11-197822>.
- [22] J.R. Chen, O.P. Lazarenko, H. Zhao, A.W. Alund, K. Shankar, Maternal obesity impairs skeletal development in adult offspring, *J. Endocrinol.* 239 (2018) 33–47. <https://doi.org/10.1530/JOE-18-0244>.
- [23] C. Liang, M.E. Oest, J.C. Jones, M.R. Prater, Gestational high saturated fat diet alters C57BL/6 mouse perinatal skeletal formation, *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* 86 (2009) 362–369. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20204>.
- [24] C.Á. Giriko, C.A. Andreoli, L.V. Mennitti, L.F. Hosoume, T.D.S. Souto, A.V. Da Silva, C. Mendes-da-Silva, 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.* 31 (2013) 731–739. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2013.09.001>.
- [25] P. Kushwaha, S.G. Khambadkone, M. Li, E.J. Goodman, N. Aravindan, R.C. Riddle, K.L.K. Tamashiro, Maternal High-Fat Diet Induces Long-Lasting Defects in Bone Structure in Rat Offspring Through Enhanced Osteoclastogenesis, *Calcif. Tissue Int.* 108 (2021) 680–692. <https://doi.org/10.1007/s00223-020-00801-4>.
- [26] P. Aghajanian, S. Mohan, The art of building bone: Emerging role of chondrocyte-to-osteoblast transdifferentiation in endochondral ossification, *Bone Res.* 6 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0021-z>.
- [27] M.F.W. Festing, On determining sample size in experiments involving laboratory animals, *Lab. Anim.* 52 (2018) 341–350. <https://doi.org/10.1177/0023677217738268>.
- [28] L.L. Bernardis, B.D. Patterson, Correlation between “Lee index” and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions., *J. Endocrinol.* 40 (1968) 527–528. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0400527>.
- [29] D.K. Cass, E. Flores-Barrera, D.R. Thomases, W.F. Vital, A. Caballero, K.Y. Tseng, CB1 cannabinoid receptor stimulation during adolescence impairs the maturation of GABA function in the adult rat prefrontal cortex, *Mol. Psychiatry.* 19 (2014) 536–543. <https://doi.org/10.1038/mp.2014.14>.
- [30] F. Karalis, V. Soubasi, T. Georgiou, C.T. Nakas, C. Simeonidou, O. Guiba-Tziampiri, E. Spandou, Resveratrol ameliorates hypoxia/ischemia-induced behavioral deficits and brain injury in the neonatal rat brain, *Brain Res.* 1425 (2011) 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.09.044>.
- [31] R.K. Ruhela, S. Soni, P. Sarma, A. Prakash, B. Medhi, Negative geotaxis: An early age behavioral hallmark to VPA rat model of autism, *Ann. Neurosci.* 26 (2019) 25–31. <https://doi.org/10.5214/ans.0972.7531.260106>.
- [32] H.J. Kim, K.M. Park, H.J. Tak, J.W. Choi, S.H. Kang, W. Park, S.H. Lee, Three-dimensional growth pattern of the rat mandible revealed by periodic live micro-computed tomography, *Arch. Oral Biol.* 87 (2018) 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.12.012>.
- [33] A.E. Odigie, K.O. Ekeolu, D.O. Asemota, E.A. Uwagie-Ero, I.T. Aighewi, S.U. Ighedosa, S.F. Usifoh, B.O. Olugasa, O. Asemota, T.E. Fagboya, Comparative non-metric and morphometric analyses of rats at residential halls of the University of Benin campus, Nigeria, *J. Infect. Public Health.* 11 (2018) 412–417. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.09.003>.
- [34] R.N. Walsh, R.A. Cummins, The open-field test: A critical review, *Psychol. Bull.* 83 (1976) 482–504. <https://doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>.
- [35] K.A. Reynolds, A.L. Boudoures, M.M.Y. Chi, Q. Wang, K.H. Moley, Adverse effects of obesity and/or high-fat diet on oocyte quality and metabolism are not reversible with resumption of regular diet in mice, *Reprod. Fertil. Dev.* 27 (2015) 716–724. <https://doi.org/10.1071/RD14251>.
- [36] E.J. Buckels, S.M. Bolam, M.L. Tay, B.G. Matthews, The Impact of Maternal High-Fat Diet on Bone Microarchitecture in Offspring, *Front. Nutr.* 8 (2021) 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.730037>.
- [37] S. Bernick, P.Q. Patek, Postnatal Development of the Rat Mandible, *J. Dent. Res.* 48 (1969) 1258–1263. <https://doi.org/10.1177/00220345690480062901>.

- [38] C. Mendes-da-Silva, C.Á. Giriko, L.V. Mennitti, L.F. Hosoume, T. dos S. Souto, A.V. da Silva, Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring, *Arq. Neuropsiquiatr.* 72 (2014) 136–144. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20130220>.
- [39] E.V. Cadena-Burbano, C.C.L. Cavalcanti, A.B. Lago, R. de A.C. Benjamim, T.R. dos P. Oliveira, J.M. Silva, R. Manhães-De-Castro, R. Da Silva Aragão, A maternal high-fat/high-caloric diet delays reflex ontogeny during lactation but enhances locomotor performance during late adolescence in rats, *Nutr. Neurosci.* 22 (2019) 98–109. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1354958>.
- [40] M.E. Santillán, L.M. Vincenti, A.C. Martini, M. Fiol de Cuneo, R.D. Ruiz, A. Mangeaud, G. Stutz, Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different ω -6: ω -3 ratios in mice, *Nutrition.* 26 (2010) 423–431. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2009.06.005>.
- [41] T.R. dos P. Oliveira, R. Manhães-de-Castro, J.M. Silva, E.V. Cadena-Burbano, C.C.L. Cavalcanti, R.A.C. Benjamim, A.B. Lago, Y. Tourneur, J. Antonio-Santos, R. da Silva Aragão, Differential effects of maternal high-fat/high-caloric or isocaloric diet on offspring's skeletal muscle phenotype, *Life Sci.* 215 (2018) 136–144. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.11.011>.
- [42] H. Hafner, E. Chang, Z. Carlson, A. Zhu, M. Varghese, J. Clemente, S. Abrishami, D.P. Bagchi, O.A. Mac Dougald, K. Singer, B. Gregg, Lactational High-Fat diet exposure programs metabolic inflammation and bone marrow adiposity in male Offspring, *Nutrients.* 11 (2019). <https://doi.org/10.3390/nu11061393>.
- [43] J.A. Esselstyn, A.S. Achmadi, K.C. Rowe, Evolutionary novelty in a rat with no molars, *Biol. Lett.* 8 (2012) 990–993. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0574>.

Figure 1 – Experimental research design.

Figure 2 – Traced for linear cephalometric measurement. The landmarks we used are the highest point of the nasal bone (H), the most prominent point between incisal edges of upper incisors (Iu), the larger gap between the upper incisor and upper molar (Dia), upper molar alveoli (UMA), the most posterior-superior point of the coronoid process (Cor), the most posterior-superior point on the mandibular condyle (Co), the most posterior point of the angular process (Go), lower molar alveoli (LMA), the most inferior and anterior point on the alveolar process (Id).

Figure 3 – Morphometric measurements of the offspring in weeks after birth. A) Body length. **B)** Tail length. **C)** Tail/body length ratio. Data represent mean \pm standard deviation, n OCD = 12; n OHFD = 12. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison between groups by Student's t-test. mm: millimeters.

Figure 4 – Cranial axes of the offspring in weeks after birth, neurobehavioral assessment and open filed test. A) Mediolateral cranial axis. **B)** Anteroposterior cranial axis. **C)** Latency in righting and negative geotaxis reflex. **D)** Number of counts of crossing and rearing of the open filed test. Data represent mean \pm standard deviation, n OCD = 12; n OHFD = 12. (*) $P \leq .05$ and (**) $P \leq .01$ in the comparison groups by Student's t-test. mm: millimeters.

Table 1 - Nutritional composition of control diet (3.5 kcal/g) and high-fat and hypercaloric diet (4.9 kcal/g).

	Control diet ¹		High-fat diet	
	g/100g	% kcal	g/100g	% kcal
Carbohydrate	55	63	41.7	34
Protein	22.5	25	17.2	14
Fat	4.5	12	28.3	52
Other components	18	-	12.8	-

¹NUVILAB CR-1, Quimtia, Paraná, Brazil (whole corn, soybean bran, wheat bran, soy oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, sodium chloride, vitamin/mineral premix, amino acids, and antioxidant). g: grams, kcal%: percent of total energy, kcal/g: kilocalorie per gram.

Table 2 - Cephalometric landmarks uses for linear measurements.

Cephalometric landmarks	Definition
Mandible	
Co	Most posterior-superior point on the condyle
Cor	Most posterior-superior point of the coronoid process
Go	Most posterior point of the angular process
Id	Most inferior and anterior point on the alveolar process
LMA	Lower molar alveoli
Skull	
UMA	Upper molar alveoli
H	Highest point of the nasal bone
Iu	Most prominent point between incisal edges of upper incisors
Dia (diastema)	Larger gap between the upper incisor and upper molar

Table 3 - Linear cephalometric measurements corresponding to mandibular length and skull length and height.

Structures	Cephalometric measurements
Mandible length	Cor-Id
	Co-Id
	Go-Id
	LMAL
Skull length	UMAL
	DiaL
Skull height	H-lu

Table 4 - Linear cephalometric measurements of skull and mandible of the OCD and OHFD groups. Data represent mean \pm standard deviation (SD). *P*-values marked with bold indicate statistically significant differences between the groups.

Variable	OCD (n = 12)		OHFD (n = 12)		<i>P</i> value
	Mean	SD	Mean	SD	
H-Iu (mm)	12.29	\pm 0.20	11.43	\pm 0.38	< .001
Cor-Id (mm)	22.41	\pm 0.26	20.77	\pm 0.71	< .001
Co-Id (mm)*	18.90	\pm 0.13	17.04	\pm 0.51	< .001
Go-Id (mm)	21.59	\pm 0.28	20.25	\pm 0.69	< .001
Cor-Id/Co-Id ratio*	1.18	\pm 0.01	1.22	\pm 0.04	.02
Cor-Id/Go-Id ratio	1.04	\pm 0.01	1.03	\pm 0.01	.02
DiaL (mm)	10.49	\pm 0.19	8.90	\pm 0.16	< .001
UMAL (mm)	7.47	\pm 0.22	6.96	\pm 0.19	< .001
LMAL (mm)	7.27	\pm 0.14	6.76	\pm 0.21	< .001

OCD: offspring of control diet group; OHFD: offspring of high-fat diet group; mm: millimeters, *: n = 10.

Table 5 - Percentage of morphometric and linear cephalometric measurements reduction of the OHFD in comparison with OCD group.

Variable	1st week	Weaning	Adolescence
BL	10%	26%	10%
TL	11%	26%	10%
MLHA	3%	15%	-
APHA	5%	12%	-
Cor-Id	-	-	10%
Co-Id	-	-	7%
Go-Id	-	-	6%
DiaL	-	-	15%
LMAL	-	-	7%
UMAL	-	-	7%
H-lu	-	-	7%

OCD: offspring of control diet group; OHFD: offspring of high-fat diet group; %: percent; -: measurement not evaluated.

Figure 1

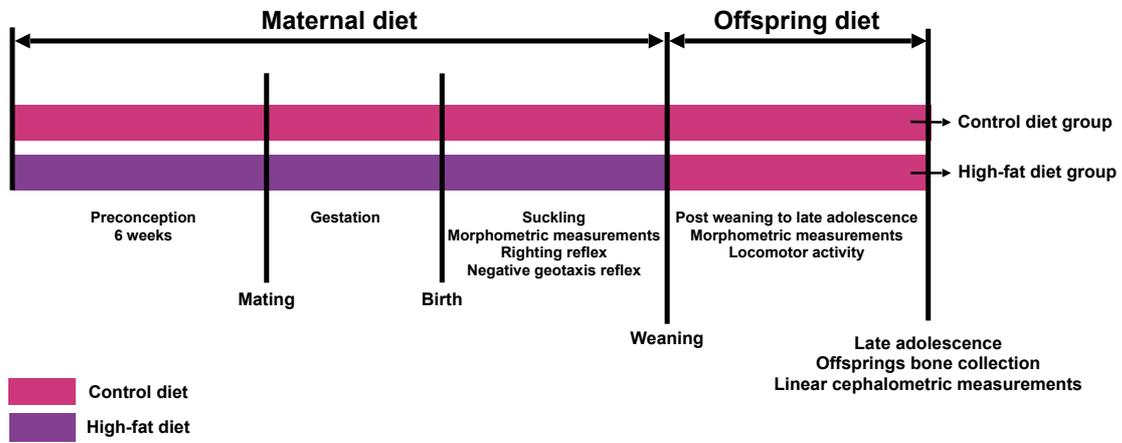


Figure 2

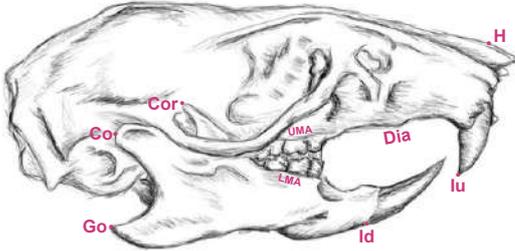


Figure 3

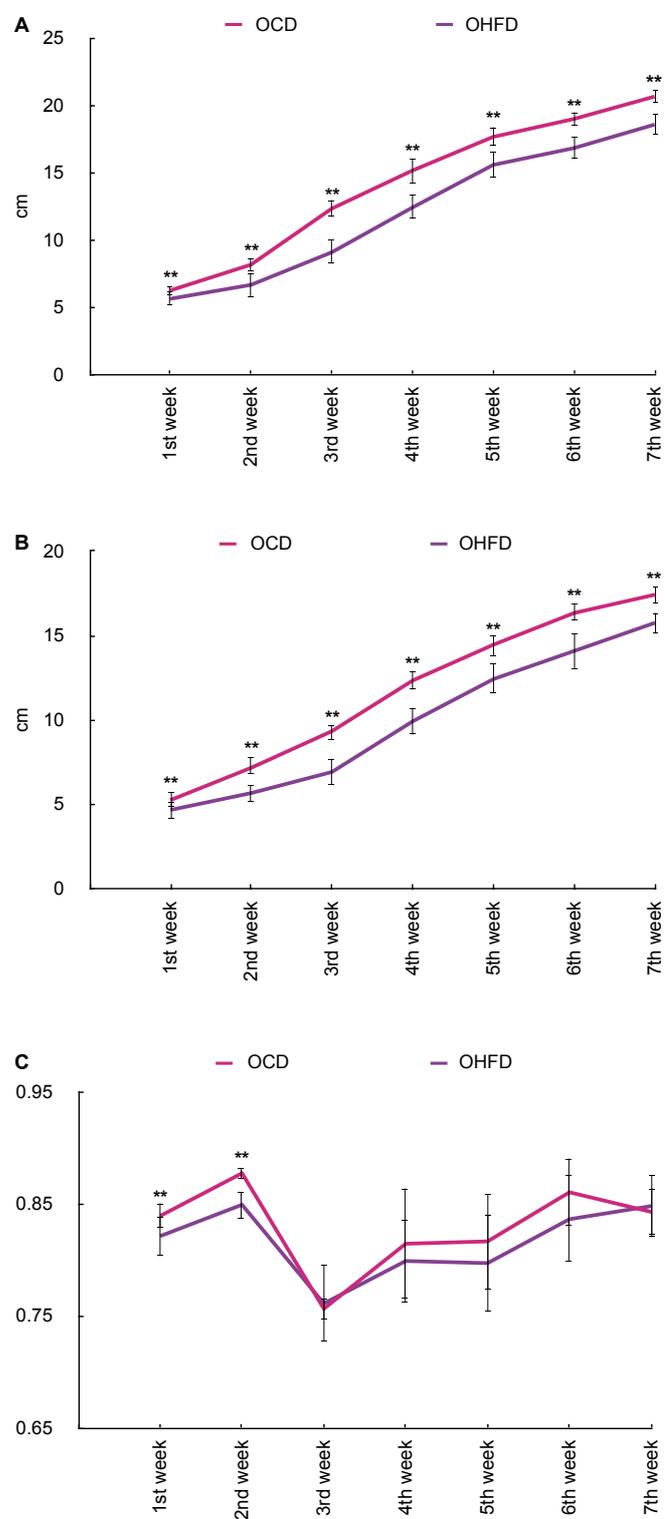
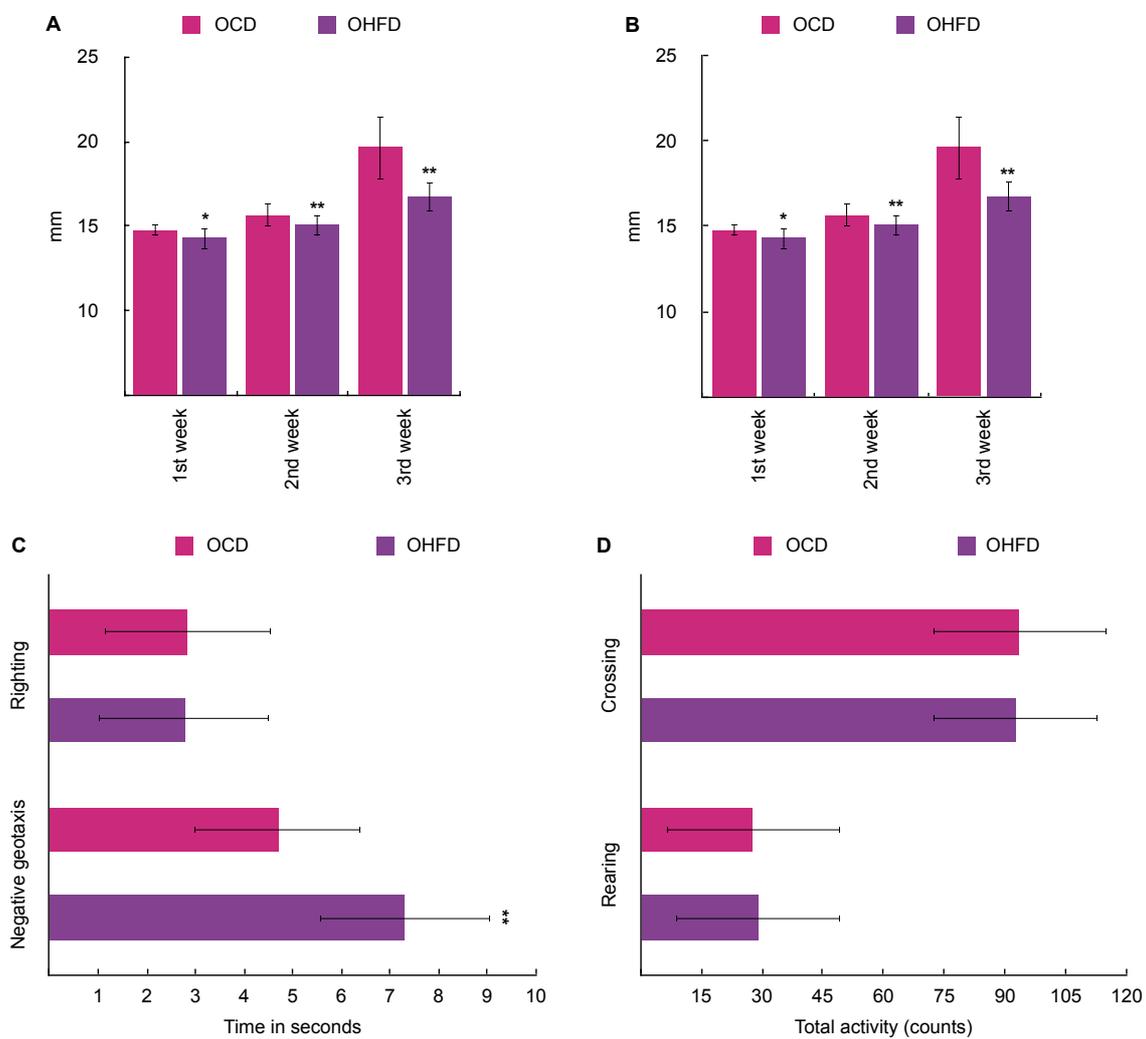


Figure 4



CONSIDERAÇÕES FINAIS

A programação nutricional do desenvolvimento da prole mediante a dieta consumida pela mãe vem sendo estudada há algumas décadas em virtude das constantes transições de padrão de consumo alimentar praticadas pelo ser humano, sendo que atualmente o estilo dietético conhecido como ocidental predomina na pesquisa científica, sobretudo no que diz respeito a estudos pré-clínicos. Neste volume, foram utilizadas abordagens diversas para avaliar em modelo animal de simulação de consumo de dieta ocidental a programação nutricional do desenvolvimento endocrino-metabólico e ósseo da prole, em especial durante a adolescência, após exposição à dieta materna hiperlipídica de longo período. Os resultados obtidos demonstram que o início precoce da manipulação dietética materna (ainda na peripuberdade) quando combinada com obesidade na pré-concepção, acasalamento em idade jovem da mãe e manutenção do consumo excessivo de lipídios também durante a lactação conduz a prole à deficiência de hormônios da tireoide, desregulação do metabolismo e prejuízo ao desenvolvimento físico e ao crescimento ósseo (Figura 1).

Na primeira abordagem, trazida pelo artigo 1, reporta-se a problemática endocrino-metabólica da programação nutricional, uma vez que a prole do grupo de mães submetidas à alteração dietética demonstrou níveis séricos diminuídos nos hormônios tireoideos tiroxina e triiodotironina com desordem de suas razões molares e desregulação do metabolismo frente ao desequilíbrio do perfil lipídico, obesidade, acúmulo de gordura e elevação da eficiência energética. O estudo contribui à comunidade científica no sentido de elucidar a influência da dieta materna hiperlipídica no funcionamento da glândula tireoide e uma possível interferência das reduzidas concentrações circulantes de hormônios tireoideos no controle metabólico, eis que é amplamente conhecida a íntima relação entre ambos. Inclusive, no

grupo exposto à dieta materna hiperlipídica o fato restou evidenciado pela correlação entre marcadores da função tireoideia com os níveis de colesterol total, sinalizando provável participação hormonal no controle endógeno de lipídios.

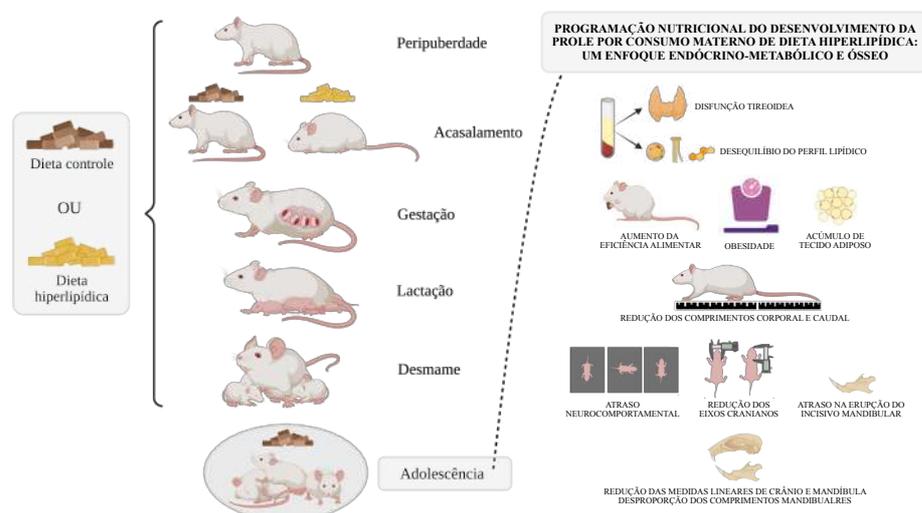


Figura 1 - Apresentação dos principais resultados referentes aos artigos incluídos no volume.

A segunda abordagem foi apresentada no artigo 2, o qual assevera que desde o período perinatal até à adolescência tardia a prole exposta à dieta materna hiperlipídica manifestou atrasos tanto em relação ao desenvolvimento físico quanto ao crescimento ósseo em muitas das variáveis analisadas e que persistiram no decorrer do tempo, mostrando-se intensificadas ao fim do período de lactação. A contribuição do estudo ao conhecimento científico dá-se em função da elucidação de que a longa permanência da dieta materna hiperlipídica indutora de obesidade na pré-concepção implica em redução de tamanho corporal, caudal e craniofacial, sem, contudo, aparentemente afetar a habilidade locomotora e exploratória em animais. Além disso, a manutenção da dieta materna hiperlipídica durante a lactação acentua de modo importante a diferença de crescimento entre a prole do grupo de exposição e a prole controle, sendo que, no entanto, o consumo de dieta padrão após o desmame retorna a diferença a percentuais próximos aqueles vislumbrados no primeiro momento perinatal avaliado. Por fim,

a cefalometria linear dos ossos da mandíbula e do crânio da revelou redução significativas entre grupos controle e experimental e, mais relevante, alterações de proporção ao serem consideradas as razões entre as medidas de comprimentos mandibulares, indicando provável crescimento ósseo anormal da prole exposta à dieta materna hiperlipídica e sinalizando a necessidade de estudos que visem avaliar a funcionalidade dos processos de mastigação e outras atividades envolvidas no conjunto formado entre a mandíbula e o crânio.

A insuficiência de hormônios da tireoide durante o desenvolvimento e o crescimento em mamíferos relaciona-se de modo íntimo com a desregulação do metabolismo, levando ao acúmulo de colesterol e triglicerídios em razão da redução da atividade metabólico, e atrasos no amadurecimento ósseo, ocasionando parada no crescimento, maturação atrasada da cartilagem e atraso na idade óssea. *Ex positis*, diante da amplitude dos efeitos endócrino-metabólicos ósseos encontrados nos animais cujas mães receberam dieta hiperlipídica pode apontar que a influência da exposição alimentar materna possivelmente foi exarcebada pelo estado hipotireoideo da prole. Ademais, soma dos resultados da presente tese agrega aos demais estudos existentes sobre a programação nutricional do desenvolvimento da prole ao ampliar o conhecimento acerca das mudanças nos sistemas endócrino, metabólico e ósseo e estimular a construção de novas pesquisas para aprofundar o que foi descoberto, compreendendo melhor as vias pelas quais tais alterações ocorrem.

Como perspectivas futuras pretende-se ampliar o conhecimento sobre a estrutura óssea das amostras avaliadas por medidas morfométricas mediante uso de microtomografia computadorizada e realizar as análises bioquímicas e de histologia faltantes, as quais, embora programadas, foram prejudicadas pelo acontecimento da pandemia de COVID-19, bem como finalizar a revisão sistemática proposta no projeto de pesquisa que ainda está em processo de construção devido a considerável quantidade de artigos incluídos para leitura completa.