

UNICAMP

LUIZ FERNANDO POSSIGNOLO

EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA NO METABOLISMO DE RATAS, E SOBRE A EXPRESSÃO DE SR-BI E ABCA1 NA PLACENTA, INTESTINO DELGADO, FÍGADO E RINS DA PROLE DESTES ANIMAIS

EFFECT OF HIGH FAT DIET CHRONIC INGESTION ON THE METABOLISM OF FEMALE RATS, AND ON THE SR-BI AND ABCA1 EXPRESSION IN THE PLACENTA, SMALL INTESTINE, LIVER AND KIDNEY OF THE OFFSPRING

Campinas
2012



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LUIZ FERNANDO POSSIGNOLO

**EFEITO DA INGESTÃO CRÔNICA DE DIETA HIPERLIPÍDICA
NO METABOLISMO DE RATAS, E SOBRE A EXPRESSÃO DE
SR-BI E ABCA1 NA PLACENTA, INTESTINO DELGADO,
FÍGADO E RINS DA PROLE DESTES ANIMAIS**

Orientador: Prof. Dr. Jose Antonio Rocha Gontijo

***EFFECT OF HIGH FAT DIET CHRONIC INGESTION ON THE
METABOLISM OF FEMALE RATS, AND ON THE SR-BI AND
ABCA1 EXPRESSION IN THE PLACENTA, SMALL INTESTINE,
LIVER AND KIDNEY OF THE OFFSPRING***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em Fisiopatologia Médica.

Master Dissertation presented to the Medical Pathophysiology Postgraduation Programm of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Campinas to obtain the Ms.C. grade in Medical Pathophysiology.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO LUIZ FERNANDO POSSIGNOLO PELO PROF. DR. JOSE ANTONIO ROCHA GONTIJO

Assinatura do Orientador

Campinas
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

P844e Possignolo, Luiz Fernando, 1987-
Efeito da ingestão crônica de dieta hiperlipídica no metabolismo de ratas, e sobre a expressão de SR-BI e ABCA1 na placenta, intestino delgado, fígado e rins da prole destes animais / Luiz Fernando Possignolo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Jose Antonio Rocha Gontijo.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Desenvolvimento fetal. 2. Colesterol. 3. Absorção intestinal. 4. Resistência à insulina. 5. Imunoistoquímica. I. Gontijo, Jose Antonio Rocha, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Effect of high fat diet chronic ingestion on the metabolism of female rats, and on the SR-BI and ABCA1 expression in the placenta, small intestine, liver and kidney of the offspring.

Palavras-chave em inglês:

Fetal development

Cholesterol

Intestinal absorption

Insulin resistance

Immunohistochemistry

Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

Titulação: Mestre em Fisiopatologia Médica

Banca examinadora:

Jose Antonio Rocha Gontijo [Orientador]

John Campbell McNamara

Eliana Cotta de Faria

Data da defesa: 24-08-2012

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

Banca Examinadora de Dissertação de Mestrado

Luiz Fernando Possignolo

Orientador(a): Prof. Dr. Jose Antonio Rocha Gontijo

Membros:

Professor (a) Doutor (a) John Campbell McNamara

Professor (a) Doutor (a) Eliana Cotta de Faria

Professor (a) Doutor (a) Jose Antonio Rocha Gontijo

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/08/2012

Dedico este trabalho ao meu pai Luiz e à minha mãe Maria:

“Os nossos pais amam-nos porque somos seus filhos, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, oferecem um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar.”

Bertrand Russell

Agradecimentos

À Deus, pela obra mais perfeita já criada: a vida,

Aos meus pais Luiz Antônio Possignolo e Maria Sônia Valério Possignolo pelos esforços feitos para me possibilitar uma boa educação, pelos valores ensinados, e apoio nas minhas decisões,

À minha irmã Nádia Valério Possignolo pelos conselhos e ajuda que só um “irmão mais velho” sabe,

Ao meu orientador Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo por ter acreditado no meu trabalho, pela orientação, e por ser um modelo de profissional a ser seguido,

À Prof.^a Dr.^a Adrienne Christine Palanch primeiramente por ter me recebido de braços abertos quando eu bati à sua porta, pela confiança em mim depositada e principalmente pela amizade e bom humor contagiante,

Aos amigos e amigas do laboratório de Metabolismo Hidro-salino, Noemi, Flávia, Amanda, Sônia, Carmem, Virgínia, Bárbara, Vinícius Rodrigues, Augusto, Vinícius Canale, Marcelo, Eduardo, Nelson e Daniel pelo apoio e momentos de descontração que tanto nos ajudam a aliviar a tensão do dia-a-dia,

Aos biólogos do laboratório Ize Penhas e Rafael Rosseto Holanda pela grande ajuda nas rotinas laboratoriais, bem como a amizade,

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado. Processo número 2010/06771-0,

Aos funcionários Adriana Zapparoli, “Seu Zé”, Sr. Antônio, Sr. Marino e Gustavo pela grande colaboração,

Aos animais que involuntariamente doaram suas vidas para a realização deste, sem os quais, seria impossível, até mesmo os “outliers”,

Aos amigos Alex e Tatiany pela paciência e compreensão pelas muitas das minhas faltas, e pela companhia,

Aos laboratórios de patologia molecular do Prof. Dr. José Vassallo e ao técnico responsável Paulo Latuf Filho; e de Programação fetal da Prof^a. Dr^a Patrícia Aline Boer, e as alunas Daniele e Agnes, pela ajuda com a imunoistoquímica e oferecimento do espaço físico.

À UNICAMP por ter sido minha segunda casa e ter me recebido muito bem, e principalmente a Faculdade de Ciências Médicas por acreditar na minha pesquisa.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”

Chico Xavier

RESUMO



RESUMO

Devido ao maior consumo de alimentos ricos em gordura e um estilo de vida mais sedentário, houve um aumento na incidência de desordens metabólicas relacionadas ao metabolismo lipídico como a resistência à insulina, dislipidemias, e sua associação com doenças cardiovasculares. A alimentação materna desequilibrada, durante a gestação e lactação, pode predispor a prole à doenças durante a vida adulta. Alguns transportadores como o Scavenger Receptor class B type I (SR-BI) e ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) são descritos como responsáveis pela captação de colesterol e transporte deste a partir de lipoproteínas, principalmente no transporte reverso de colesterol, sendo denominados receptores antiaterogênicos podendo modificar seu padrão de expressão frente a uma dieta hiperlipídica. Ratas Wistar receberam dieta hiperlipídica (DHL) ou dieta padrão (CTL) desde o desmame, até a lactação. Após o desmame a prole de machos recebeu a dieta padrão até a 16ª semana de vida. Nas mães quanto e na prole foram analisados os seguintes parâmetros: ingestão alimentar, ganho ponderal, perfil lipídico e glicídico. Na prole foi estudada a expressão e localização de ABCA1 e SR-BI na placenta, no rim, fígado, e intestino delgado em animais com 17 dias pré-natal (E17), 12 dias pós-natal (PN12d) com 8 e 16 semanas pós-natal (PN8s e PN16s). As mães DHL apresentaram: 1) maior ingestão calórica com menor ganho ponderal; 2) aumento glicêmico associado à menor produção de insulina nos três períodos estudados e, 3) aumento nos níveis séricos de triglicérides em M8s. A prole de mães DHL apresentaram menor massa corporal desde E17 até PN8s, sem que tenha havido diferenças ponderais e na ingestão de ração. PN8s e PN16S apresentaram menor captação tissular de glicose associada à hiperinsulinemia, e aumento nos níveis séricos de triglicérides com PN16S. Não houve alterações nos níveis de colesterol e HDL-colesterol. Não foi observada alteração na expressão de SR-BI e ABCA1 no intestino delgado, placenta enquanto no fígado houve uma queda tempo-dependente para ambos transportadores. No rim da prole DHL aos PN12d e PN16s observou-se maior expressão de ABCA1. Este estudo mostrou que o consumo materno crônico de uma dieta hiperlipídica causa alterações metabólicas nas mães e predispõe a prole, a modificações no metabolismo lipídico e glicídico, além de elevação da expressão de ABCA1 no rim.

Palavras-chave: Desenvolvimento fetal, colesterol, absorção intestinal, resistência à insulina, imunoistoquímica.

ABSTRACT



ABSTRACT

Due to the abundance and accessibility to foods high in fat and a more sedentary lifestyle, there is an increased incidence of metabolic disorders related to lipid metabolism such as insulin resistance, dyslipidemia, and a high correlation with cardiovascular disease. The unbalanced maternal diet during pregnancy and lactation predisposes the offspring to diseases during adult life. Some carriers such as scavenger receptor class B type I (SR-BI) and ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) are described as responsible for raising cholesterol and transporting it to and from lipoproteins, due the participation in the reverse cholesterol transport, these receptors are called antiatherogenic and are subject to change its pattern of expression when exposed to a high fat diet. Female Wistar rats were fed a diet (HFD) or a standard chow (CTL) from weaning, during pregnancy and lactation. After weaning the male offspring was exposed to a standard chow until the 16th week of life. Both the dams and the offsprings food intake were monitored, weight gain, lipid profile and glucose level. It was analyzed in the offspring the expression and localization of ABCA1 and SR-BI in the placenta, kidney, liver, and small intestine in animals at 17^o prenatal day (E17), 12 days post-natal (PN12d), 8 and 16 postnatal weeks (PN8s PN16s respectively). DHL dams had a higher intake of calories in the diet, but the weight was smaller, they had higher blood glucose due to decreased production of insulin in the pre-pregnancy (m8s), during pregnancy (M17g) and lactation (M15l) and a higher triglyceride level in m8s. The offspring of dam fed a high fat diet had lower weight since E17 until PN8s, with no differences in weight gain and food intake. PN8s and PN16s had lower glucose uptake and hyperinsulinemia, and high triglycerides with PN16s, no changes were observed in cholesterol and HDL-cholesterol levels. There were no changes in the expression of SR-BI and ABCA1 in the small intestine, placenta and liver, however there was a decrease over the age for both receptors, and kidney of the offspring and DHL PN12d PN16s showed higher expression of ABCA1. The present study showed that chronic consumption of high fat diet causes metabolic changes in dams and predisposes offspring to changes in lipid and glucose metabolism of the offspring, increasing the expression of ABCA1 in the kidney.

Keywords: Fetal development, cholesterol, intestinal absorption, insulin resistance, immunohistochemistry.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG5	ATP-binding cassette sub-family G member 5
ABCG8	ATP-binding cassette sub-family G member 8
AIN-93	American Institute of Nutrition – 1993
AHA	Associação Americana do Coração
ASC	Área sobre a curva
ApoA1	Apolipoproteína A-I
ApoB	Apolipoproteína B
CD36	Cluster of Differentiation 36
CTL	Grupo dieta controle
CTT	Composição Corporal Total
DHL	Grupo dieta hiperlipídica
DPM	Desvio Padrão da Média
E17	Prole com 17 dias fetais
GTT	Teste de tolerância à glicose

HDL	Lipoproteína de alta densidade (High density-lipoprotein)
IAS	Sociedade Internacional de Arteriosclerose
IASO	Associação dos Estudos da Obesidade
IDF	Federação internacional de Diabetes
KDa	Kilodalton
Kcal	Quilocaloria
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (Low density-lipoprotein)
M8s	Mães após 8 semanas de tratamento
M17g	Mães durante o 17º dia de gestação
M15l	Mães durante o 15º dia de lactação
Md	Mães após o desmame da prole
OMS	Organização Mundial da Saúde
NHLBI	Instituto do coração, pulmão e sangue dos Estados Unidos
NPC1L1	Niemann-Pick C1 Like 1
PN8s	Prole com 8 semanas pós-natal

PN16s	Prole com 16 semanas pós-natal
PN12d	Prole com 12 dias pós-natal
SM	Síndrome Metabólica
SR-BI	Scavenger receptor class B type I
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa (Very Low Density-lipoprotein)
WHF	Federação Mundial do Coração

LISTA DE FIGURAS

Páginas

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Transporte reverso do colesterol.....	43
Figura 2. Efeitos da programação fetal causados por alterações metabólicas e nutricionais materna.....	47

CAPÍTULO I

Figura 1. Ingestão diária de ração (g)/100g de peso corporal de fêmeas M8s (figura 1a), M17g (figura 1b) e M15l (figura 1c).....	62
Figura 2. Ingestão diária de ração (kcal)/100g de peso corporal de fêmeas M8s, (figura 1a), M17g (figura 1b) e M15l (figura 1c).....	64
Figura 3. Evolução da massa corporal e ganho de peso de fêmeas M8s (Figuras 3a e 3b), M17g (Figuras 3c e 3d) e M15l (Figuras 3e e 3f).....	66
Figura 4. Ingestão diária de água (mL)/100g de peso corporal de fêmeas M8s, (figura 1a), M17g (figura 1b) e M15l (figura 1c).....	68
Figura 5. Teste de tolerância à glicose, resposta insulínica e área sobre a curva de fêmeas M8s (Figuras 5a, 5b, 5c e 5d).....	70
Figura 6. Teste de tolerância à glicose, resposta insulínica e área sobre a curva de fêmeas M17g (Figuras 6a, 6b, 6c e 6d).....	71
Figura 7. Teste de tolerância à glicose, resposta insulínica e área sobre a curva de fêmeas M15l (Figuras 7a, 7b, 7c e 7d).....	71

Figura 8. Peso relativo do fígado em M8s, M17g, M15l e Md.....	75
Figura 9. Peso relativo do coração em M8s, M17g, M15l e Md	75
Figura 10. Comprimento relativo do intestino delgado em M8s, M17g, M15l e Md.....	76
Figura 11. Comprimento relativo do intestino grosso em M8s, M17g, M15l e Md.....	76
Figura 12. Peso relativo dos rins direito e esquerdo em M8s, M17g, M15l e Md.....	77
Figura 13. Número de filhotes vivos nascidos em cada ninhada.....	77
Figura 14. Peso dos fetos (Figura 14a) e placenta (Figura 14b) em E17.....	78

CAPÍTULO II

Figura 1. Peso da prole de machos no nascimento.....	102
Figura 2. Evolução da massa corporal da prole de machos a partir do desmame até a 16 ^a semana de vida.....	102
Figura 3. Ganho de peso da prole de machos a partir do desmame até a 16 ^a semana de vida.....	103
Figura 4. Ingestão diária de ração (g)/100g de peso corporal da prole de machos a partir do desmame até a 16 ^a semana de vida.....	104

Figura 5. Ingestão diária de ração (kcal)/100g de peso corporal da prole de machos a partir do desmame até a 16 ^a semana de vida.....	104
Figura 6. Ingestão diária de água (mL)/100g de peso corporal da prole de machos a partir do desmame até a 16 ^a semana de vida.....	105
Figura 7. Teste de tolerância à glicose, resposta insulínica e área sobre a curva em machos PN8s (Figuras 7a, 7b, 7c e 7d).....	106
Figura 8. Teste de tolerância à glicose, resposta insulínica e área sobre a curva em machos PN16s (Figuras 7a, 7b, 7c e 7d).....	107
Figura 9. Peso relativo do fígado em machos PN8s (Figura 9a) e PN16s (Figura 9b).....	109
Figura 10. Peso relativo do coração em machos PN8s (Figura 10a) e PN16s (Figura 10b).....	109
Figura 11. Peso relativo dos rins direito e esquerdo em machos PN8s (Figura 11a) e PN16s (Figura 11b).....	110
Figura 12. Comprimento relativo do intestino delgado em machos PN8s (Figura 12a) e PN16s (Figura 12b).....	110
Figura 13. Comprimento relativo do intestino grosso em machos PN8s (Figura 13a) e PN13s (Figura 12b).....	111
Figura 14. Nível da proteína SR-BI (%) na placenta de ratas no 17 ^o dia de gestação.....	112

Figura 15. Imunolocalização de SR-BI na placenta de ratas E17.....	113
Figura 16. Imunolocalização de ABCA1 na placenta de ratas E17.....	114
Figura 17. Nível da proteína SR-BI (%) no intestino de ratos com 17 dias de vida pré-natal.....	115
Figura 18. Imunolocalização de SR-BI no intestino de ratos E17.....	116
Figura 19. Nível da proteína ABCA1 (%) no intestino de ratos com 17 dias de vida pré-natal.....	117
Figura 20. Imuno-localização de ABCA1 no intestino de ratos E17.....	118
Figura 21. Imuno-localização de SR-BI no duodeno de machos PN12d, PN8s e PN16s	121
Figura 22. Imuno-localização de SR-BI no jejuno de machos de machos PN12d, PN8s e PN16s	122
Figura 23. Imuno-localização de SR-BI no íleo de machos de machos PN8s e PN16s	123
Figura 24. Imuno-localização de ABCA1 no duodeno de machos PN8s e PN16s....	124
Figura 25. Imuno-localização de ABCA1 no duodeno de machos PN8s e PN16s.....	125
Figura 26. Imuno-localização de ABCA1 no íleo de machos PN8s e PN16s.....	126
Figura 27. Nível da proteína SR-BI (%) no fígado de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s.....	127

Figura 28. Nível da proteína ABCA1 (%) no fígado de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s.....	128
Figura 29. Imuno-localização de SR-BI no fígado de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s.....	129
Figura 30. Imuno-localização de ABCA1 no fígado de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s.....	130
Figura 31. Nível da proteína SR-BI (%) no rim da prole de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s.....	131
Figura 32. Imuno-localização de SR-B1 no rim de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s.....	132
Figura 33. Nível da proteína ABCA1 (%) no rim da prole de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s.....	133
Figura 34. Nível da proteína ABCA1 (%) no rim da prole de machos PN8s.....	134
Figura 35. Nível da proteína ABCA1 (%) no rim da prole machos PN16S.....	134
Figura 36. Imuno-localização de ABCA1 no rim de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s	135
Figura 37. Resumo esquemático dos principais resultados obtidos no presente trabalho.....	150

LISTAS DE TABELAS

Páginas

Tabela 1 - Comparação da composição e do total de calorias da dieta AIN 93M modificada para hiperlipídica com a dieta convencional Nuvilab CR-1.....	57
Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos de fêmeas M8s, M17g e M15l.....	74
Tabela 3 – Concentrações dos anticorpos primários utilizados para imunistoquímica e western blot.....	99
Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos de machos PN12D, PN8s e PN16s.....	108

SUMÁRIO

Página

1. Revisão de literatura	33
2. Capítulo I: Efeito da ingestão crônica de uma dieta hiperlipídica sobre o metabolismo glicídico e lipídico de ratas Wistar nos períodos pré-gestacional, na gestação e na lactação.....	51
2. 1 Objetivos.....	53
2.1.1. Objetivos gerais.....	54
2.1.2. Objetivos específicos	54
2.2 Materiais e métodos.....	55
2.2.1. Animais	56
2.2.2. Análise das variáveis.....	57
2.2.3. Acompanhamento da massa corporal.....	57
2.2.4. Acompanhamento da ingestão de água e ração	57
2.2.5. Teste de tolerância à glicose	58
2.2.6. Dosagens bioquímicas.....	58
2.2.7. Coleta e medidas de órgãos	59
2.2.8. Análise estatística dos resultados	59
2.3 Resultados	61
2.4 Discussão	79
2.5 Conclusão	85
3. Capítulo II: Efeito da ingestão crônica de uma dieta hiperlipídica e sua repercussão na expressão de SR-BI e ABCA1 na placenta, fígado, intestino delgado e no rim da prole de machos.....	87
3. 1 Objetivos.....	89
3.1.1. Objetivos gerais.....	90
3.1.2. Objetivos específicos.....	90
3.2 Materiais e métodos.....	91

3.2.1. Animais	92
3.2.2. Análise das variáveis.....	93
3.2.3. Acompanhamento da massa corporal.....	93
3.2.4. Acompanhamento da ingestão de água e ração.....	93
3.2.5. Teste de tolerância à glicose.....	93
3.2.6. Dosagens bioquímicas.....	94
3.2.7. Coleta e medidas de órgãos	94
3.2.8. Western Blot	95
3.2.9. Imunoistoquímica	97
3.2.10. Análise estatística dos resultados	99
3.3 Resultados	101
3.4 Discussão	137
3.5 Conclusão	145
4. Discussão geral.....	147
5. Conclusão geral	151
6. Referências bibliográficas	153

REVISÃO DE LITERATURA



A dieta hiperlipídica e o colesterol

Os lipídeos representam cerca de 20% da composição corporal total (CCT) de um indivíduo saudável. Para que os valores desta CCT permaneçam adequados, é necessário que haja um equilíbrio entre a ingestão de nutrientes e o consumo destes durante o metabolismo diário. Embora controverso, considera-se que os lipídeos devam representar ao redor de 20 a 25% das calorias totais ingeridas durante uma dieta saudável (DOUGLAS, 2006). Porém, nas últimas décadas tem se observado uma mudança do hábito alimentar da população mundial, principalmente ocidental, onde tem ocorrido um aumento no consumo de alimentos ricos em gordura, carboidratos e sal. No Brasil 60% da população consome mais açúcar do que o recomendado e 82% dos brasileiros consomem alimentos ricos em gordura saturada (IBGE 2011). Esse consumo desequilibrado de nutrientes tem impacto direto na saúde da população, segundo o relatório da VIGITEL (2012) quase metade da população brasileira apresenta-se com sobrepeso, sendo 52,6% homens e 44,7% de mulheres. Comparados à dados de 2006, observa-se um aumento de 6% no número de indivíduos com sobrepeso, sendo este mais significativo entre as mulheres do que em homens.

Nas últimas décadas o termo Síndrome Metabólica (SM) tem sido amplamente utilizado na área clínica, porém, a definição e diagnóstico desta foi tema de grande debate. Em 2009 após um consenso entre a IDF (Federação Internacional de Diabetes), o NHLBI (Instituto do Coração, Pulmão e Sangue dos Estados Unidos), a AHA (Associação Americana do Coração), a WHF (Federação Mundial do Coração), a IAS (Sociedade Internacional de Arteriosclerose) e a IASO (Associação dos Estudos de Obesidade) definiu-se síndrome metabólica como um conjunto de fatores associados que aumentam o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes tipo II. Dentre estes fatores estão incluídos obesidade (principalmente a central), dislipidemia (níveis elevados de triglicérides e níveis reduzidos de HDL-colesterol), hiperglicemia, resistência à insulina e hipertensão. A diretriz brasileira para diagnóstico e tratamento da SM, define esta como fatores de risco cardiovasculares usualmente relacionados com à deposição central de gordura e à resistência à insulina (BRANDÃO ET al., 2005). Em relação ao diagnóstico clínico considera-se portador da síndrome metabólica o indivíduo que apresente ao menos 3 fatores de risco. É importante ressaltar que os valores de referência podem variar para cada população,

devendo-se levar em consideração a etnia, nacionalidade e regionalidade. Devido aos diferentes critérios de diagnósticos utilizados para identificar a síndrome metabólica, torna-se difícil estimar a real prevalência desta síndrome na população em geral (ALBERTI et al., 2009).

Dentre os principais fatores envolvidos no aparecimento de SM estão: alimentação desequilibrada, estilo de vida sedentário e tabagismo. O excesso no consumo de alimentos ricos em gorduras, principalmente as saturadas, tem sido apontado como um dos principais fatores no desenvolvimento de SM (OLIVEIRA et al., 2012).

O consumo de dieta hiperlipídica é amplamente utilizado em modelos animais para se observar os efeitos causados por esta no organismo. Em revisão de Buettner et al., (2007) observou-se que o excesso de lipídios na dieta causa alterações principalmente na massa corporal, nos níveis glicêmicos, insulínicos e lipídicos, porém as discrepâncias entre os diversos estudos é bastante grande, uma vez que deve-se levar em consideração a composição da dieta, o tempo de exposição à esta, o modelo animal como a espécie e linhagem, e até mesmo o gênero.

O excesso de lipídios na alimentação pode levar também à modificações morfológicas e fisiológicas em determinados órgãos envolvidos com o metabolismo lipídico. No fígado, por exemplo, a principal alteração observada é o acúmulo de lipídios causando esteatose hepática (MCDONALD et al., 2011) e o aumento na expressão de fatores inflamatórios (HA & CHAE, 2010).

No intestino a dieta hiperlipídica é capaz de modificar a microbiota intestinal mesmo na ausência de obesidade (HILDEBRANDT et al., 2009). Além disso, a interação entre a microbiota intestinal e a dieta está associada a uma inflamação do intestino que precede o aumento de peso e a resistência à insulina (DING et al., 2010). Observa-se também aumento na permeabilidade intestinal (SUZUKI & HARA, 2010) e na expressão de genes relacionados com o metabolismo lipídico (WIT et al., 2008). Em um estudo prospectivo realizado com humanos foi observado também uma relação entre a ingestão de gorduras saturadas e neoplasias no intestino delgado (CROSS et al., 2008).

Nos rins a dieta hiperlipídica pode levar a um acúmulo de lipídios causando dilatação e disfunção tubular, inflamação, espessamento do tecido conjuntivo, podendo acelerar o processo de glomeruloesclerose (ALTUNKAYNAK et al., 2008; DEJI et al., 2009; KUME et al., 2007; JOHNSON et al., 2003). O acúmulo de colesterol parece também ter um potencial patogênico na progressão de doenças renais (JOHNSON et al., 2003). Várias doenças como a síndrome nefrótica e insuficiência renal crônica estão associadas à um acúmulo de lipídeos em células tubulares renais e à modificação do metabolismo lipoproteico renal (KIM & VAZIRI, 2009, KIM et al., 2010).

O colesterol é um constituinte das membranas celulares, permitindo a formação de uma barreira semipermeável resistente e ao mesmo tempo flexível, separando o meio intra do extracelular. Além disto, são precursores de hormônios esteroides (cortisol, aldosterona, testosterona, progesterona, estradiol), vitamina D e sais biliares, participa de várias reações metabólicas e fisiológicas e, são essenciais para a proliferação celular. As células também utilizam as propriedades estrutural e sinalizadora dos lipídios para controlar o transporte através da membrana (SPRONG et al., 2001). A influência da composição dietética nos níveis plasmáticos de colesterol e LDL é heterogênea dentro de uma mesma população, sugerindo a existência de fatores ambientais e genéticos neste processo (HUI et al., 2008). A homeostase celular do colesterol pode ser mantida por três possíveis mecanismos: pela síntese, captação e efluxo de colesterol, discutido adiante.

A captação de colesterol via SR-BI e ABCA1

No final da década de 1970 Goldstein et al., (1979) descreveu um receptor que era expresso na parede de macrófagos e tinha a capacidade de reconhecer a LDL-modificada, seja esta por oxidação ou acetilação, e contribuir para a formação das células esponjosas (do inglês: *foam cells*) (BROWN et al., 1980). A partir desses estudos, novos receptores com função semelhante foram identificados e passaram a integrar uma mesma família que recebeu a denominação de receptores *scavengers*. Embora esses receptores possuam funções semelhantes, apresentam algumas características estruturais diferentes que permitiu classificá-los em três classes distintas: A, B e C (YAMADA et al., 1998).

O receptor *scavenger* classe B tipo I (do inglês: *SR-BI - Scavenger receptor class B type I*), é um receptor de superfície celular com peso molecular de 85Kda (CALVO et al., 1997) constituído por um grande domínio extracelular ancorado na membrana plasmática pelas caudas N- e C- terminal com uma curta projeção para o citoplasma. (BABITT et al., 1997; GU et al., 1998). Foi inicialmente identificado como um ligante de LDL-nativa em macrófagos por Acton et al., (1994). Mais tarde descobriu-se a capacidade deste em se ligar também à HDL, e passou a ser amplamente estudado a fim de se entender seu papel no metabolismo lipoproteico (ACTON et al., 1996). O SR-BI é responsável por mediar o transporte bidirecional de colesterol (JI et al., 1997), ou seja, esse receptor pode tanto mediar a captação seletiva (influxo) de ésteres de colesterol ou colesterol livre de HDL, LDL e VLDL, como promover o efluxo de colesterol livre para as lipoproteínas (CALVO et al., 1997; WANG et al., 1998). Diferentemente dos mecanismos envolvidos como receptor de LDL, onde ocorre a endocitose, o transporte do colesterol proveniente da HDL não envolve a internalização da partícula, ou seja, após a liberação do colesterol, a partícula pode voltar a corrente sanguínea (PITTMAN & STEINBERG, 1994). Estudos *in vitro* demonstraram que esse processo pode ser mediado por apolipoproteínas como apoAI, apoAII, e apoCIII (XU et al., 1997), porém, no intestino esse processo parece ser independente de apolipoproteínas. (CAI et al., 2004).

O fígado e as glândulas adrenais apresentam a maior expressão de SR-BI, devido ao elevado *clearance* de colesterol e a utilização deste para produção de hormônios, respectivamente (ACTON et al., 1996; OUT et al., 2004). SR-BI é expresso também em macrófagos e células endoteliais (ZHANG et al., 2003; CHINETTI et al., 2000), nos ovários e testículos (LI et al., 1998; REAVEN et al., 2000; REAVEN et al., 1998). Durante o desenvolvimento embrionário está presente no saco vitelino e na placenta favorecendo o transporte de colesterol para o desenvolvimento do embrião (HATZOPOULOS et al., 1998; WADSACK et al., 2003). Além disso, desempenha papel importante na absorção de colesterol, fosfolipídios e vitamina E, proveniente da dieta, nas células intestinais ao longo do intestino delgado (ALTMANN et al., 2002; BIETRIX et al., 2006; REBOUL et al., 2006). O SR-BI está predominantemente localizado na membrana plasmática, porém de acordo com o tecido e a função da célula pode haver mudanças no seu padrão de expressão. Assim, em hepatócitos este se apresenta principalmente expresso no domínio basolateral dos

hepatócitos voltado para os capilares sinusoidais (YESILALTAY et al., 2006), enquanto que no intestino a expressão é predominantemente na superfície apical dos enterócitos, e até mesmo translocação para o meio intracelular (LOBO et al., 2001; CAI et al., 2001; HAYASHI et al., 2011).

A ABCA1 pertence a uma grande família de proteínas integrais de membranas denominadas de proteínas cassete ATP-ligantes (do inglês: *ATP-binding cassette*), a qual utiliza ATP como fonte de energia para transportar moléculas através das membranas celulares, de forma bidirecional, ou seja, tanto do meio extracelular para o citoplasma, quanto exportando moléculas das células (LOCHER, 2009). Essa grande família de transportadores está dividida em classes que vão atualmente de A até G, além de divisões em subclasses (ORAM & HEINECKE, 2005). Estruturalmente, a ABCA1 possui 2 domínios transmembranas com 2 grandes voltas, um citoplasmático contendo uma região hidrofóbica e dois domínios ligantes de nucleotídeos ligados covalentemente (TANAKA et al., 2001; ARAKAWA et al., 2002).

A ABCA1 está expressa de forma ubíqua nos tecidos, porém apresenta maior expressão em órgãos que atuam no metabolismo de lipídeos como fígado e intestino ou, em órgãos que utilizem estes como substratos para formação de hormônios esteroides como glândulas adrenais, gônadas e placenta (WELLINGTON et al., 2002; BHATTACHARJEE, 2010). Sua localização ainda não está bem definida pela literatura, devido a dificuldades de se obter anticorpos específicos e resultados discrepantes estão presentes em vários estudos. Em geral, acredita-se que seja expressa na membrana plasmática e em vesículas intracelulares, provavelmente, pela sua habilidade de translocar os lipídios para o meio extracelular (NEUFELD et al., 2001; NEUFELD et al., 2004; BOADU & FRANCIS, 2006).

No fígado a ABCA1 está localizada tanto na membrana quanto no citoplasma dos hepatócitos com níveis diferentes de expressão entre as células. Também é expressa nas células de Kupffer e não está presente no endotélio de vasos intra-hepáticas. No intestino delgado aparece expressa principalmente nos enterócitos e em menor intensidade em alguns tipos celulares da lâmina própria. Nos rins está expressa principalmente nos túbulos contorcidos proximais e em menor quantidade nas células glomerulares e nos túbulos contornados distais (WELLINGTON et al., 2002).

Estudos tem demonstrado que a ABCA1 é capaz de fazer o efluxo de colesterol e fosfolipídios das células para apolipoproteínas como apoA1, apoC1, apoE dentre outras (FITZGERALD et al., 2004; REMALEY et al., 2001). Entretanto, ainda necessita-se de mais estudos para se compreender a maneira pela qual esse transporte ocorre. Wang e colaboradores (2001) sugerem que primeiramente há o efluxo de fosfolipídios para uma apolipoproteína via ABCA1 e, posteriormente, ocorre o transporte de colesterol livre para essa molécula recém-formada. O transporte de lipídios para apoA1 tem sido amplamente estudado com a formação da HDL nascente decorrente da interação entre a ABCA1 e apoA1 (HASSAN et al., 2007; BRUNHAM et al., 2006). Atualmente, há duas hipóteses sobre a maneira de formação da HDL. A primeira conhecida como mecanismo de exocitose ocorre quando fosfolipídios associados ao colesterol livre são transportados em forma de vesículas provenientes do complexo de Golgi do interior das células para a ABCA1 onde são transportadas na membrana para apoA1 (ORAM & LAWN, 2001). Em outro modelo proposto, conhecido por retro-endocitose, primeiramente, ocorre a interação entre a apoA1 circulante e a ABCA1, em seguida esse complexo move-se para o interior das células onde a ABCA1 irá mediar a passagem de lipídios para a apoA1 formando a partícula de HDL-nascente, depois esse complexo se move novamente para a membrana celular onde ocorre a exocitose da partícula recém-formada (NEUFELD et al., 2004). Ao contrário do SR-BI, a ABCA1 parece ter um afinidade maior por ApoA1 livre ou pobre em lipídios e pouco afinidade pela partícula de HDL madura. (WANG et al., 2000). Devido sua expressão principalmente em macrófagos e no fígado, a ABCA1 participa amplamente no transporte reverso de colesterol, sendo considerada uma importante proteína anti-aterogênica, uma vez que é responsável pela produção de HDL e auxilia na remoção do acúmulo de lipídios nos tecidos periféricos, principalmente, em macrófagos responsáveis pela formação da placa de ateroma (WANG et al., 2007).

A absorção gastrintestinal e a síntese endógena de colesterol são responsáveis pela concentração de colesterol no plasma, sendo que mais de 60% é derivado da dieta, o que regula a biossíntese endógena no fígado (HUI et al., 2008). Após serem digeridos no estômago pela lipase ácida, os lipídios presentes no quimo chegam à primeira porção do intestino delgado, o duodeno, onde os tri-acil-glicerídeos serão hidrolisados a di-acil-glicerol, ácidos graxos e fosfolipídios pela ação da lipase pancreática e o colesterol esterificado será

quebrado até sua forma livre através da enzima colesterol-esterase produzida pelo pâncreas e pelos sais biliares, constituindo micelas. Cerca de 50% do colesterol da dieta é captado na forma de colesterol livre pelo intestino, o restante é excretado nas fezes (CLEARFIELD, 2003). Acredita-se que a captação do colesterol pelos enterócitos é mediada por proteínas, embora ainda não se compreenda exatamente como esse processo ocorra, algumas proteínas são apontadas, como: Niemann-Pick C1 Like 1 protein (ALTMANN et al., 2004), CD36 (NAULI et al., 2006) e SR-BI (REBOUL et al., 2011).

O SR-BI está localizado principalmente na membrana apical dos enterócitos de murinos, e apresenta sua maior expressão no duodeno e jejuno proximal diminuindo ao longo do intestino delgado com pouca expressão no íleo. Em relação às vilosidades, observa-se uma maior expressão no ápice desta diminuindo até chegar a base (CAI et al., 2004; CAI et al., 2001, VOSHOL et al., 2001).

Apesar do SR-BI contribuir para a captação de colesterol, Mardones et al., (2001) mostraram que camundongos *knockout* para SR-BI não apresentam uma redução na captação de colesterol, indicando que este não é essencial, e que há outros transportadores envolvidos nesse processo. Porém, em camundongos com superexpressando SR-BI é observado um aumento na captação de colesterol, mostrando que este possa agir como um coadjuvante nesse processo (BIETRIX et al., 2006). É importante lembrar que além de colesterol o SR-BI também é capaz de captar triglicérides, fosfolipídios e vitamina E (BIETRIX et al., 2006; RIGOTTI et al., 1995; REBOUL et al., 2006). Uma vez que o SR-BI é capaz de realizar um transporte bidirecional de colesterol, ou seja, de partículas (HDL, LDL) para dentro da célula e da célula para partículas, não se sabe se as micelas poderiam receber colesterol do enterócito via SR-BI, sendo este também responsável por um efluxo do excesso de colesterol no intestino (CAI et al., 2004) assim como fazem os transportadores ABCG5 e ABCG8 (TACHIBANA et al., 2007; YU et al., 2002).

Após o colesterol livre entrar na célula, este é conjugado com ácidos graxos pela enzima ACAT-2 formando assim o colesterol esterificado (CASES et al., 1998). A partir desse ponto, o colesterol é empacotado no complexo de Golgi com lipoproteínas, principalmente a apoB48 formando os quilomícrons, que será secretado nos vasos linfáticos da vilosidade (HAYASHI et al., 2011). Uma vez que o quilomícron chega na corrente sanguínea, irá

fornecer lipídios, principalmente, triglicérides para os tecidos periféricos, como tecido adiposo e músculo através da ativação da lipase lipoproteica. Após a entrega do seu conteúdo, este passa a ser chamado de quilomícron remanescente e será endocitado pelo fígado através de receptores de apoB (BROWN & GOLDSTEIN, 1993). Outra maneira do colesterol deixar o enterócito e ser transportado para o sangue é via ABCA1, onde essa proteína irá mediar o transporte desse colesterol para apoA1 formando assim HDL-nascente que é secretada na corrente sanguínea, onde passará a remover o excesso de colesterol dos tecidos e transportando-o para o fígado. A ABCA1 localiza-se principalmente na membrana basolateral do enterócito onde irá secretar a HDL-nascente. Através de estudos com o bloqueio de ABCA1 no intestino delgado, verificou-se um acúmulo de colesterol nessas células, mostrando sua importante função no efluxo, enquanto que não houve alteração na absorção de colesterol proveniente do lúmen intestinal, indicando que neste tipo celular esse transportador não esteja relacionado com absorção intestinal a partir da luz. Estima-se que o intestino é responsável pela formação de 30% da HDL circulante (MULLIGAN et al., 2003; BRUNHAM et al., 2006).

Transporte reverso do colesterol

O transporte reverso do colesterol descrito primeiramente por Glomsett (1968) é atualmente definido como a remoção do excesso de colesterol dos tecidos extra-hepáticos, principalmente de macrófagos, por lipoproteínas que o transporta de volta para o fígado onde será metabolizado em ácidos biliares ou excretado nas fezes. A principal lipoproteína envolvida nesse processo é a HDL secretada pelo fígado e pelo intestino, e que apresenta a apoA1 em maior quantidade em sua superfície. Como dito anteriormente, a partícula de apoA1 pobre em lipídios dará origem à HDL-nascente, que percorre a circulação sanguínea onde irá remover o colesterol das células através da ligação com receptores específicos para ApoA1 (VAUGHAN & ORAM, 2006). Camundongos superexpressando apoA1 mostraram um aumento de 63% na excreção de colesterol nas fezes tanto na sua forma livre quanto em bile (ZHANG et al., 2003). A ABCA1 e o SR-BI tem sido descritos como os principais receptores envolvidos no processo do transporte reverso do colesterol, além destes, outro receptor da família ABC, o ABCG1, parece ter importância nesse processo e são considerados anti-aterogênicos (ZHANG et al., 2005; ATTIE et al., 2001; KENNEDY et al., 2005).

Os macrófagos presentes na parede dos vasos sanguíneos, principalmente de artérias, são capazes de fagocitar lipoproteínas oxidadas contendo colesterol, o qual passa a se acumular em vesículas no seu interior levando à inflamação, que através de uma cascata de eventos, pode levar à formação da placa de ateroma. Tanto o ABCA1 quanto o SR-BI são expressos na membrana plasmática de macrófagos, e a ausência destas proteínas aumenta o acúmulo de colesterol em macrófagos (ZHAO et al., 2010). A apoA1 pobre em lipídios interage principalmente com a ABCA1, onde esta irá mediar o transporte do colesterol não esterificado presente nos macrófagos. Conforme a HDL vai acumulando mais colesterol em seu interior, este torna-se mais esférica e passa a ter uma menor afinidade pela ABCA1, em contraste, passa a se ligar a SR-BI que também realiza esse processo de efluxo de colesterol (ASZTALOS et al., 2005). Uma vez que a HDL está carregada de lipídios, passa a ser chamada de HDL-madura, e volta ao fígado onde irá entregar seu conteúdo para os hepatócitos. No fígado a partícula de HDL pode ser internalizada pela ABCA1 ou apenas entregar seu conteúdo para os hepatócitos via SR-BI sem haver a endocitose da partícula, podendo esta voltar para circulação e recomeçar o ciclo (NIELAND et al., 2005; PAGLER et al., 2006). Em camundongos o colesterol proveniente da HDL via SR-BI pode ser utilizado para a produção de VLDL e resecretado na corrente sanguínea (WIERSMA et al., 2010).

O rim possui um papel importante no transporte reverso do colesterol, um experimento realizado com aves da linhagem WHAM, que não expressam ABCA1, mostrou que a apoA1 livre de lipídios é rapidamente degradada nesse órgão, impedindo a formação de HDL e consequentemente auxiliando para o acúmulo de colesterol nos tecidos periféricos (SCHREYER et al., 1994). Nos rins a presença de SR-BI está associada a captação de colesterol proveniente de lipoproteínas para o interior da células dos túbulos, enquanto que a ABCA1 faz o transporte inverso, removendo o excesso de colesterol dessas células para as lipoproteínas (KIM et al., 2009; JOHNSON et al., 2003). A **Figura 1** ilustra o mecanismo do transporte reverso do colesterol.

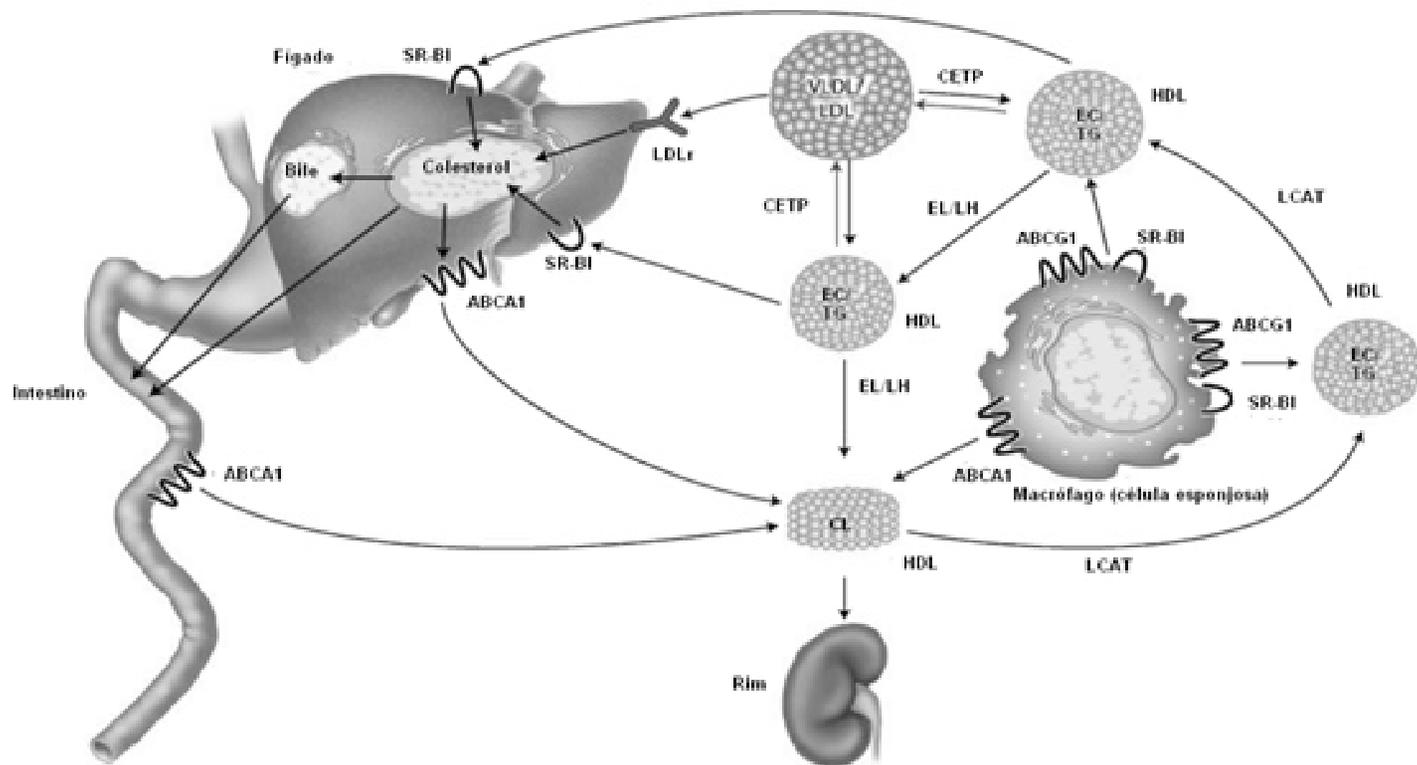


Figura 1. Transporte reverso do colesterol. Adaptado de Annema & Tietge (2011). As partículas de HDL são formadas pelo fígado (70%) e intestino (30%) e lançadas na circulação, onde passará a receber o efluxo do colesterol livre provenientes dos tecidos periféricos, principalmente das células esponjosas via SR-BI, ABCA1 e ABCG1. A lipase hepática (LH) e a lipase endotelial (EL) hidrolisam fosfolipídios e fosfolipídios/triglicérides (TG) da HDL, desestabilizando a partícula e tornando-a mais susceptível a degradação pelos rins. O colesterol chega ao fígado através da HDL via SR-BI e ABCA1 para produção de ácidos biliares, ser excretado nas fezes, ou re-secretado como VLDL. A Proteína transferidora de éster de

Dieta materna e programação fetal

Todos os organismos vivos, desde o mais basal até o mais derivado, interagem com o ambiente ao seu redor e são capazes de responder aos estímulos impostos por este, aqueles indivíduos que não forem capazes de responder adequadamente as mudanças e aos diferentes estímulos, podem comprometer o futuro de sua espécie. O termo plasticidade fenotípica foi definido por West-Eberhard (1989) como: a capacidade de um genótipo responder as diferentes condições ambientais alterando morfológica e fisiologicamente o indivíduo para se adequar ao ambiente. Esta plasticidade fenotípica pode começar a ocorrer durante os primeiros estágios de desenvolvimento na vida intrauterina, onde o feto se desenvolve de acordo ao ambiente que ele está sendo exposto, porém sem alterar seu genótipo, desse modo o feto em desenvolvimento tem uma “ideia prévia” do ambiente em que poderá passar sua vida. Um dos primeiros trabalhos importantes nessa linha de raciocínio foi feito por Stein e colaboradores (1975) onde foi avaliado o estado de saúde de indivíduos que foram gestados durante a fome holandesa (Dutch famine), um período crítico ocorrido durante a segunda guerra mundial, onde a ingestão calórica não passava de 500 kcal por dia. Nesse estudo foi observado que as pessoas expostas à privação alimentar durante a vida intrauterina, apresentaram obesidade em dobro em relação às pessoas que foram geradas em condições normais de alimentação. A partir da década de 90, Barker e colaboradores publicaram uma série de trabalhos relacionando o baixo peso ao nascimento com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta, e que esses fatores de risco poderiam ser consequência do estado nutricional materno, propondo então o termo programação fetal, que também ficou conhecido como a hipótese de Barker. Em outras palavras, significa que devido à sua adaptabilidade, o feto é capaz de ajustar seu metabolismo de acordo aos estímulos recebidos durante a vida fetal, porém esses ajustes ao longo do tempo, podem ser desfavoráveis frente à novos estímulos impostos pelo ambiente pós-natal, resultando em alterações metabólicas e cardiovasculares.

A partir de então, uma série de modelos tem sido utilizados nas pesquisas para tentar compreender os mecanismos envolvidos por trás da programação fetal, diferentes tipos de dietas tem sido oferecidas para as mães durante os períodos críticos de desenvolvimento como a gestação e a lactação. Dentre as principais dietas estão aquelas onde ocorre uma restrição proteica ou de vitaminas, excesso de nutrientes com dietas

hipercalóricas e/ou hiperlipídicas e até mesmo exposição a substâncias químicas como a nicotina (MESQUITA et al., 2010; BRUIN et al., 2010; FÉRÉZOU-VIALA et al., 2007).

Com a mudança no perfil alimentar da população atual onde observa-se um grande consumo de gorduras, a alimentação materna durante a gestação e a lactação tem se tornado motivo de preocupação em relação a saúde pública. Uma dieta hiperlipídica consumida pela mãe tanto durante a gestação quanto na lactação pode predispor esta à um aumento na ingestão de alimentos, hiperlipidemia e aumento do peso corporal (CHANG et al., 2008), dentre as principais alterações decorrentes dessa nutrição inadequada estão uma maior susceptibilidade em apresentar obesidade, resistência à insulina, hipertensão, dislipidemias, resistência hipotalâmica à leptina e até mesmo mudanças comportamentais como ansiedade (SULLIVAN et al., 2010; SRINIVASAN et al., 2006; KHAN et al., 2004; FÉRÉZOU-VIALA et al., 2007). Zambrano e colaboradores (2010) mostraram que esses efeitos causados pela programação fetal podem ser revertidos caso seja feita uma intervenção no padrão alimentar antes da gestação. Neste experimento, ratas receberam uma dieta hiperlipídica até desenvolverem obesidade; um mês antes do acasalamento, um grupo de ratas passou a receber a dieta padrão, e observaram que a prole dessas ratas apresentou níveis normais de glicose, triglicérides, insulina e leptina, e menor tamanho dos adipócitos. Mesmo na ausência da obesidade a dieta hiperlipídica por si é capaz de causar alterações no metabolismo da prole (HOWIE et al., 2009). Como dito anteriormente, acredita-se que há uma estreita relação entre a microbiota intestinal e a obesidade, num estudo realizado por Fåk et al., (2012) foi possível constatar que a microbiota intestinal materna também pode predispor a prole à um maior ganho de peso levando a obesidade na vida adulta.

É importante ressaltar que além dos efeitos causados pela dieta materna durante a gestação e lactação, a alimentação após o desmame pode exacerbar os efeitos da programação fetal, mostrando a importância de uma alimentação equilibrada em todas as fases da vida (MITRA et al, 2008). Entretanto, Teegarden e colaboradores (2009) mostraram que camundongos expostos a uma dieta hiperlipídica em fases iniciais de desenvolvimento possui uma maior preferência por comidas gordurosas.

A placenta é um anexo embrionário responsável pela interface entre a mãe e o feto, é através dela que os nutrientes, o oxigênio, a água e outras substâncias chegam para o

embrião assegurando um desenvolvimento adequado, além de servir como um órgão endócrino. A placenta, assim como qualquer outro órgão, responde aos estímulos impostos pelo meio, assim uma alimentação inadequada pode causar alterações fisiológicas e morfológicas nesse órgão (MAO et al., 2010). O consumo de uma dieta hiperlipídica por ratas durante a gestação pode levar a um desenvolvimento alterado na vascularização da placenta, resultando numa oxigenação diminuída para o feto (HAYES et al., 2012). Em um estudo realizado com primatas não-humanos foi observada uma diminuição no fluxo sanguíneo, podendo este ser piorado na presença de obesidade e resistência à insulina. (FRIAS et al., 2011). Em placenta de camundongos foi observado um grande aumento no transporte de glicose e aminoácidos para o feto, devido um aumento na expressão de transportadores específicos, podendo levar o feto a um maior ganho de peso (JONES et al., 2009). O processo de transporte de colesterol materno através da placenta ainda não está totalmente elucidado, entretanto, vários trabalhos demonstram que a ABCA1, SR-BI e LDL-r tem participação nesse processo (BHATTACHARJEE et al., 2010; WOOLLETT, 2005). A **Figura 2** traz um resumo dos principais efeitos da programação fetal causados por alterações metabólicas e nutricionais materna.

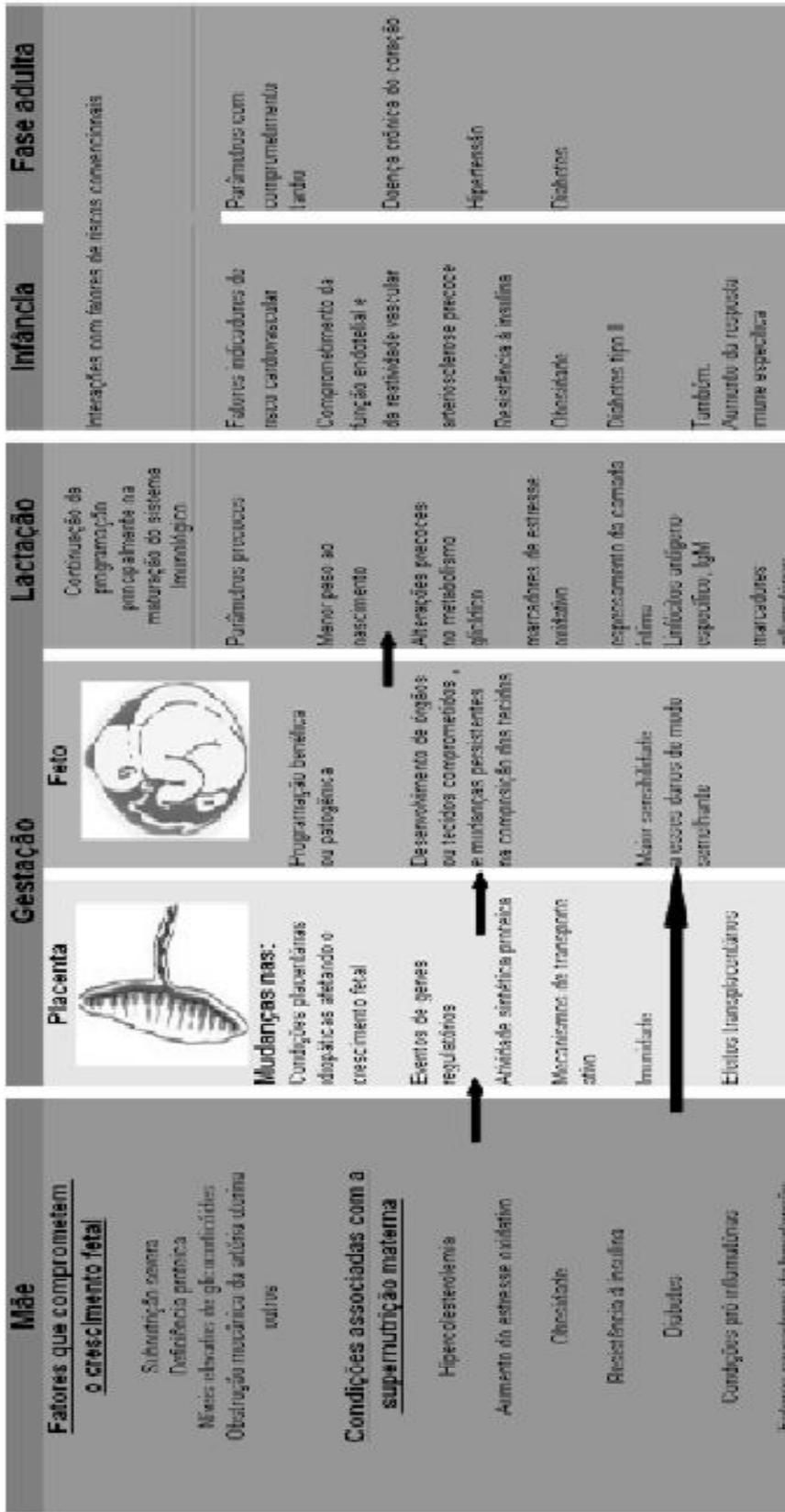


Figura 2. Efeitos da programação fetal causados por alterações metabólicas e nutricionais materna. Adaptado de Palisnki et al., 2009.

O desenvolvimento do fígado, intestino e rins.

A gestação do rato leva em torno de 21 dias para se completar, nessas três semanas o zigoto deve crescer, se diferenciar e se organizar nas centenas de tipos celulares, formando os órgãos e sistemas para que no nascimento os filhotes estejam prontos para uma vida extrauterina. O desenvolvimento do fígado fetal em camundongo divide-se em duas partes: uma principalmente endodérmica que ocorre até E14, e a outra fase endodérmica-mesenquimal, que ocorre após E15, no qual observa-se principalmente a maturação dos hepatócitos e uma melhor definição do parênquima do fígado (AYRES-SILVA et al., 2011). O volume do fígado fetal aumenta 84 vezes entre E13 e E20, e dos hepatócitos em 1,5 vezes além de alterar seu formato (VASSY et al., 1988). A função hematopoiética do fígado diminui em resposta à maturação dos hepatócitos em camundongos (Ayres-SILVA et al., 2011) Em contraste, foi observado em ratos que no final do período fetal a produção de bile começa a aumentar (MASSIMI et al., 1998) assim como a expressão de fatores nucleares reguladores do metabolismo lipídico como RXR, FXR, LXR a partir do nascimento (BALASUBRAMANIYAN et al., 2005). Em primatas foi observado que o consumo de dieta hiperlipídica materna aumenta a apoptose no fígado do feto (GRANT et al., 2011) já, o consumo desta por ratas, leva à alterações na expressão de genes relacionado com o controle do ciclo celular, que em consequência levou a uma maturação reduzida do hepatócitos durante o desenvolvimento do fígado (DUDLEY et al., 2011).

O intestino possui células embrionárias de origem endodérmica e mesenquimal. Acredita-se que a invaginação do mesenquima no endoderma inicia a formação da vilosidade que se inicia em camundongos em E15 de gestação (BEAULIEU JF & CALVERT, 1980). Nesta fase o epitélio ainda encontra-se estratificado, obstruindo a luz do órgão, e a partir de intensa apoptose das células epiteliais inicia-se a modelagem da mucosa intestinal. Ainda em E16 as células do ápice da vilosidade param de proliferar, mantendo a capacidade proliferativa das células da base da vilosidade (HIRANO & KATAOKA, 1986). Até o nascimento algumas vilosidades chegarão ao tamanho adulto, porém a maioria crescerá durante a lactação, após 21 dias de vida pós-natal as células mostram sua morfologia absorptiva típica. A formação da cripta é observada após o nascimento em roedores, principalmente próximo ao período de desmame (CUMMINS et al., 2006). Devido

ao pouco tempo de gestação dos roedores, após o nascimento o intestino ainda precisa completar sua formação, já em humanos, o intestino de recém-nascidos já está morfológica e bioquimicamente mais maduro devido ao longo período de gestacional (DROZDOWSKI et al., 2010).

O rim é formado em mamíferos a partir do mesoderma intermediário. No início do desenvolvimento são observados 3 pares de órgãos excretores rudimentares denominados, pronefro e mesonefro, que são órgãos transitórios, porém necessários para a formação do rim permanente, o metanefro. Em camundongos o estágio pronefro se inicia em E8 (E21-E22 em humanos), seguido pelo mesonefro em E9 (E25 em humanos) e o metanefro em E10 (E30 em humanos). A vascularização renal começa a se formar em E13 em camundongos (8-10 semanas de gestação em humanos) ao redor dos corpos em forma-S. Em ratos o desenvolvimento renal completa-se após 12 dias de vida pós-natal (MORITZ et al., 2008). Brenner e colaboradores (1988) demonstraram que o baixo peso ao nascer pode ter uma associação com um número reduzido de néfrons, predispondo o indivíduo ao desenvolvimento de hipertensão arterial na vida adulta. Em experimentos realizados com fêmeas submetidas à uma restrição proteica durante a gestação, observou-se uma redução de 30% no número de nefros do prole, e desenvolvimento de hipertensão arterial na vida adulta (VEHASKARI et al., 2001; MESQUITA et al., 2010).

Capítulo I

Efeito da ingestão crônica de uma dieta hiperlipídica sobre o metabolismo glicídico e lipídico de ratas Wistar nos períodos pré-gestacional, na gestação e na lactação.

OBJETIVOS



2.1.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar as alterações ocorridas no metabolismo lipídico e glicídico de ratas após o consumo crônico de uma dieta hiperlipídica nos períodos pré-gestacional, gestacional e na lactação.

2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a ingestão de dieta hiperlipídica, água e a evolução da massa corporal de ratas nos períodos pré-gestacional, gestacional e na lactação;
2. Avaliar em ratas, a influência do consumo crônico de dieta hiperlipídica sobre a resposta glicêmica e insulinêmica à sobrecarga de glicose bem como, o perfil lipídico plasmático em fêmeas nos períodos pré-gestacional, gestacional e na lactação;
3. Avaliar as alterações ponderais relativas do rim, fígado, intestino delgado e placenta, em ratas, após a ingestão crônica de dieta hiperlipídica;

MATERIAIS E MÉTODOS



2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mammalia*) recém desmamados com 21 dias de vida, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB da UNICAMP, Campinas, SP e mantidos em ambiente fechado com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminação artificial com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. As fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais e divididas em dois grupos: 1) controle (CTL): que recebeu dieta sólida padronizada para roedores (CR-1 irradiada NUVILAB, Brasil) e, 2) experimental (DHL): alimentadas com a dieta hiperlipídica contendo 60% de quilocalorias provenientes de lipídeos durante oito semanas, confeccionada de acordo com a AIN 93 (REEVES et al., 1993) (**Tabela 1**). Já os machos permaneceram em gaiolas coletivas recebendo ração padrão até a 11^a semana de vida. Após esse período as fêmeas foram colocadas em gaiolas com machos durante 15 horas para o acasalamento e então foi realizado o esfregaço vaginal, considerando-se como dia 1 de gestação quando constatada a presença de espermatozoides. As fêmeas prenhes continuaram recebendo a dieta durante o acasalamento, gestação e lactação. Após o nascimento dos filhotes a ninhada foi ajustada para um total de 10 filhotes, mantendo a proporção de macho e fêmea 1:1 quando possível, os animais excedentes foram sacrificados por decapitação no primeiro dia de vida. Quando os filhotes completaram 21 dias realizou-se o desmame.

Nas mães, foram feitas análises em 3 fases distintas: 1) Após 8 semanas de consumo de ração ou dieta hiperlipídica (M8s); 2) durante o 17^o dia de gestação (M17g) e 3) durante o 15^o dia de lactação (M15l).

Todos os procedimentos experimentais com os animais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, sendo a pesquisa submetida e aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP, protocolo nº 1697-1(A).

Tabela 1. Comparação da composição e do total de calorias da dieta AIN 93M modificada para hiperlipídica com a dieta convencional Nuvilab CR-1.

Ingredientes	Dieta Padrão (g/kg)	Dieta 60% (g/kg)
Amido	397,5	52
Amido dextrinizado	132	143
Sacarose	100	66
Carboidratos totais	629,5	261
Óleo de soja	70	34
Banha de porco	--	333
Gorduras totais	70	367
Caseína	200	271,5
L-cistina	3	3
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Proteínas totais	205,5	276,5
Celulose	50	50
Mix Mineral	35	35
Mix Vitamínico	10	10
Total de calorias	2,93 calorias/g	5,44 calorias/g

2.2.2. Análise das variáveis

As variáveis analisadas nas mães foram: 1) evolução da massa corporal a partir da 3ª semana de vida até o desmame; 2) medidas da ingestão diária de água e ração; 3) resposta glicêmica frente ao teste de tolerância à glicose (GTT); 4) determinação das concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides, HDL-colesterol, insulina e glicose; 5) medidas do peso relativo do fígado, rim, coração e intestinos delgado e grosso e placenta.

2.2.3. Acompanhamento da massa corporal

As fêmeas foram pesadas semanalmente a partir do 21º dia de vida até o desmame no 21º dia de lactação. A massa corporal total foi aferida em balança digital semi-analítica (AL 500 Denver Instruments- USA) no período matutino.

2.2.4. Acompanhamento da ingestão de água e ração

A ingestão de ração e de água foi acompanhada diariamente no período matutino. A ração foi pesada em balança digital semi-analítica (AL 500 Denver Instruments- USA). Para medir a ingestão hídrica, colocava-se 250 ml de água diariamente e media-se no dia seguinte

em proveta de plástico a quantidade de água restante.

2.2.5. Teste de tolerância à glicose

O GTT foi realizado nas mães nas fases M8s, M17g e M15l. Os animais foram postos em jejum por 12 horas durante o fotoperíodo noturno com água *ad libitum*. Em seguida foram colocados em uma caixa de contenção aquecida por 8 minutos, a fim de causar uma vasodilatação e facilitar a coleta de sangue. Com um bisturi fez-se um corte na região mais distal da cauda dos animais de cerca de 3 mm, após o descarte da primeira gota de sangue, a glicemia plasmática basal de jejum foi medida em um glicosímetro MediSense/Optium, Abbott Laboratories Diabetes Care e tiras-teste (Abbott). Em seguida, foi coletado aproximadamente 800 µL de sangue para dosagens bioquímicas e injetou-se intraperitonealmente uma solução de glicose 50% (1g/Kg de peso do animal). A partir desse momento, os animais foram submetidos a um período experimental de 120 minutos, com medidas da glicemia e coletas de sangue caudal nos tempos: 15, 30, 60 e 120 minutos. O sangue coletado foi centrifugado duas vezes à 4° C por 10 minutos à 3500 rpm, o plasma em alíquota foi armazenado sob refrigeração (-80°C) para posterior dosagem de insulina.

2.2.6. Dosagens bioquímicas

Para determinação das concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides, HDL-colesterol, utilizou-se o plasma dos animais coletados no tempo zero do GTT quando todos os animais estavam em jejum por 12 horas e sem terem recebido a sobrecarga de glicose. Para dosagem de triglicérides, colesterol e HDL-colesterol, foram utilizadas os Kits enzimáticos específicos (LABTEST) seguindo-se as especificações do fabricante com posterior leitura em espectrofotômetro (Micronal). Sendo a dosagem de HDL-colesterol pelo método de precipitação.

A insulina foi dosada utilizando-se o Kit Elisa Rat/Mouse Insulin (Millipore, EZRMI-13K) e lido posteriormente em espectrofotômetro.

2.2.7. Coleta e medidas de órgãos

Após o GTT, as fêmeas M8s, M17g e M15l foram anestesiadas (Cetamina 75mg/kg e Xilazina 10mg/kg) e o coração, o fígado e os rins direito e esquerdo (após retirada da cápsula), foram pesados em balança de precisão (210 x 0,0001g). O intestino foi completamente removido e esticado sem estiramento sobre uma fita métrica, onde mediu-se o comprimento do intestino delgado (da válvula piloro até o válvula ileocecal, e o intestino grosso a partir do ceco até o ânus. Para normalizar as medidas dos órgãos segundo o peso do animal, a seguinte cálculo foi utilizado:

$$massa\ relativa = \frac{massa\ do\ órgão}{massa\ do\ animal}$$

2.2.8. Análise estatística dos resultados.

A análise estatística empregada foi o Test-*t* Student. Para duas ou mais variáveis utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com *Post-hoc* Bonferroni. Os Resultados foram expressos como média ± Desvio Padrão da Média (DPM). Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$). Os softwares utilizados em todos os testes estatísticos foram GraphPad InStat version 3.05, GraphPad Software, San Diego, California USA e GraphPad Prism 3, Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc.

RESULTADOS



2.3. RESULTADOS

Avaliação ponderal e da ingestão de água nos grupos estudados

Para compreender melhor os efeitos causados pela dieta materna rica em lipídios em seus filhotes, é interessante entender primeiramente como o metabolismo dessas fêmeas se comporta, e suas mudanças durante os períodos pré-gestacional, na gestação e lactação. Nas **Figuras 1a, 1b e 1c** é mostrada a ingestão diária de ração ou dieta hiperlipídica em gramas durante as semanas experimentais. É possível observar que a quantidade de ração ingerida pelas fêmeas DHL é menor em todas as fases (M8s, M17g, M15d e Md).

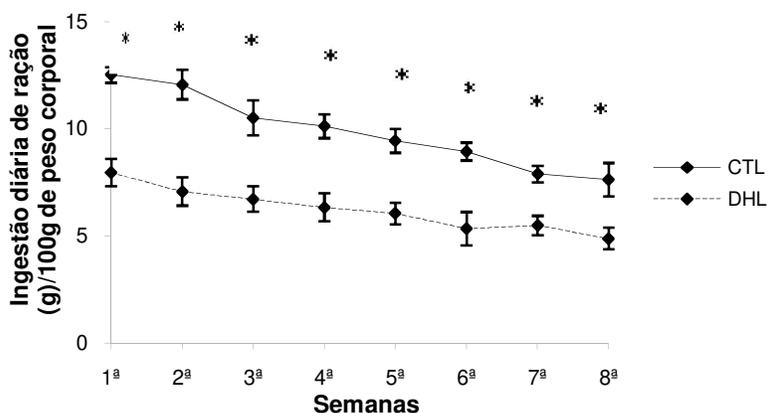


Figura 1a. Ingestão diária de ração (g)/100g de massa corporal de fêmeas durante 8 semanas do período pré-gestacional. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 9, DHL n=8). ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

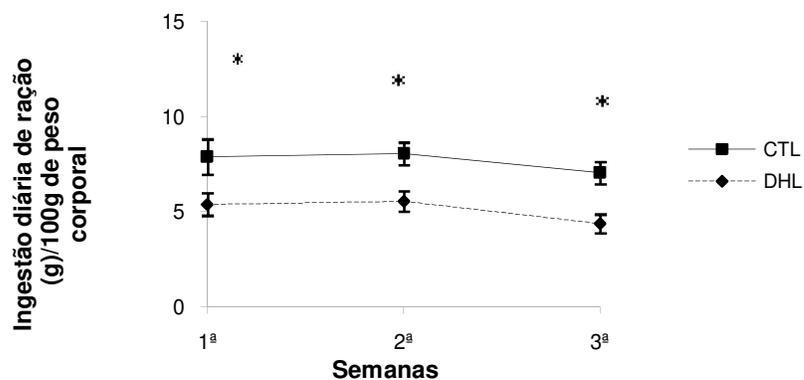


Figura 1b. Ingestão diária de ração (g)/100g de massa corporal de fêmeas durante a gestação. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 11, DHL n=12). ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

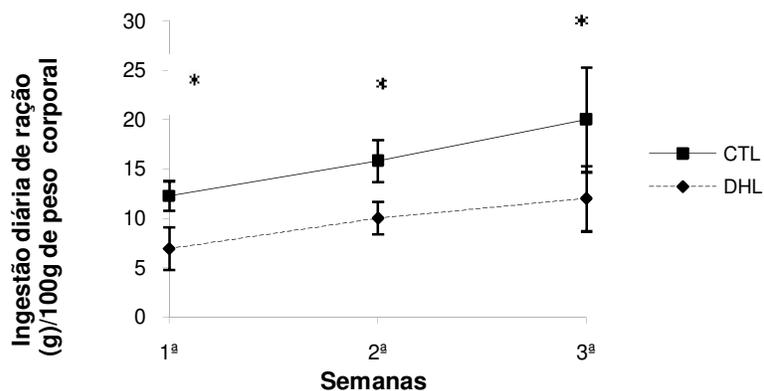


Figura 1c. Ingestão diária calórica (g)/100g de massa corporal de fêmeas durante a lactação. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 4 DHL n=5). ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

Porém, uma vez que a dieta hiperlipídica contém 5,35 kcal/g contra 2,98 kcal/g da ração padrão (ver **Tabela 1**), quando se leva em consideração a quantidade de quilocalorias ingeridas, o consumo pelo grupo DHL é maior (**Figura 2a e 2b**), exceto durante a lactação, onde não houve diferença estatística em relação o grupo controle (**Figura 2c**).

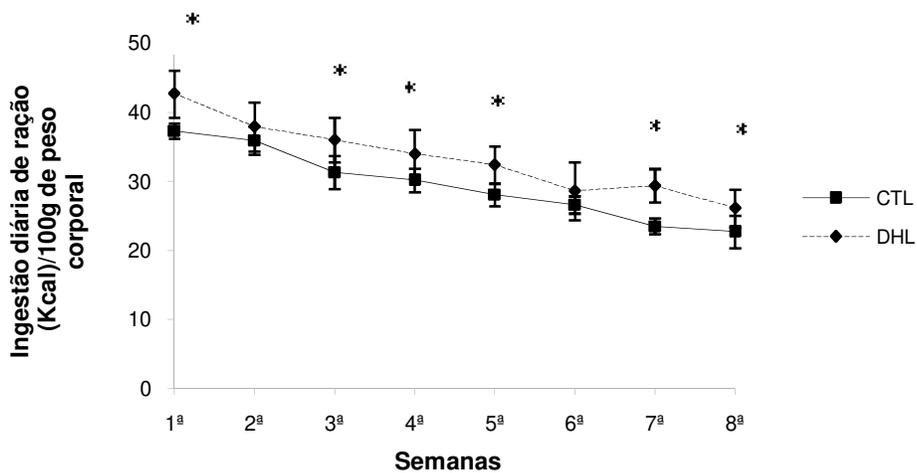


Figura 2a. Ingestão diária calórica (kcal)/100g de massa corporal de fêmeas durante 8 semanas do período pré-gestacional. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 9 DHL n=8). ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

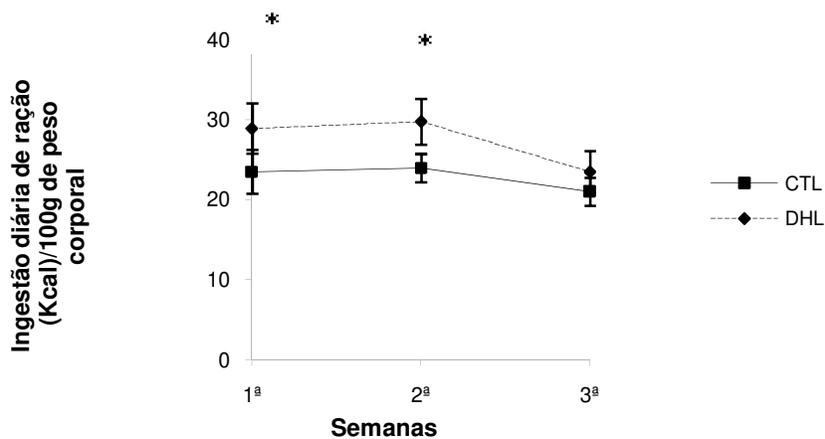


Figura 2b. Ingestão diária calórica (kcal)/100g de massa corporal de fêmeas durante a gestação. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 11, DHL n=12). ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

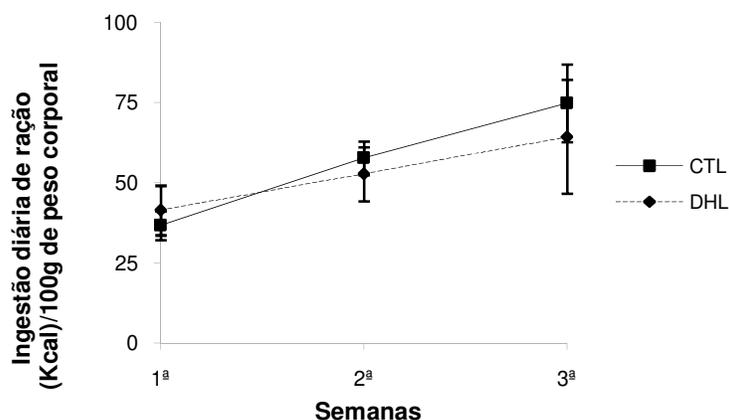


Figura 2c. Ingestão diária de ração (kcal)/100g de massa corporal de fêmeas durante a lactação. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 4, DHL n=5). ANOVA *post-hoc* Bonferroni.

Embora o grupo DHL tenha ingerido mais calorias, a massa corporal destes animais foi menor desde a primeira semana do tratamento devido a um reduzido ganho de massa nas duas primeiras semanas. Esta diferença começa a não ser significativa quando comparada ao grupo controle a partir da 3ª semana, proporcionando que as massas de DHL e CTL se igualem a partir da 7ª semana (**Figuras 3a e 3b**). Já durante a gestação, o ganho ponderal começa a ser mais evidente no grupo CTL a partir da segunda quinzena de gestação, sendo o ganho ponderal no grupo DHL é bem maior no final do período (**Figuras 3c e 3d**). Durante a lactação, as mães que receberam dieta hiperlipídica pesaram bem menos que as controles, em parte como decorrência da perda ponderal acentuada desde no pós-parto. Por outro lado, as ratas que receberam a dieta padrão para roedores, só apresentaram uma perda ponderal expressiva na última semana de acompanhamento (**Figuras 3e e 3f**).

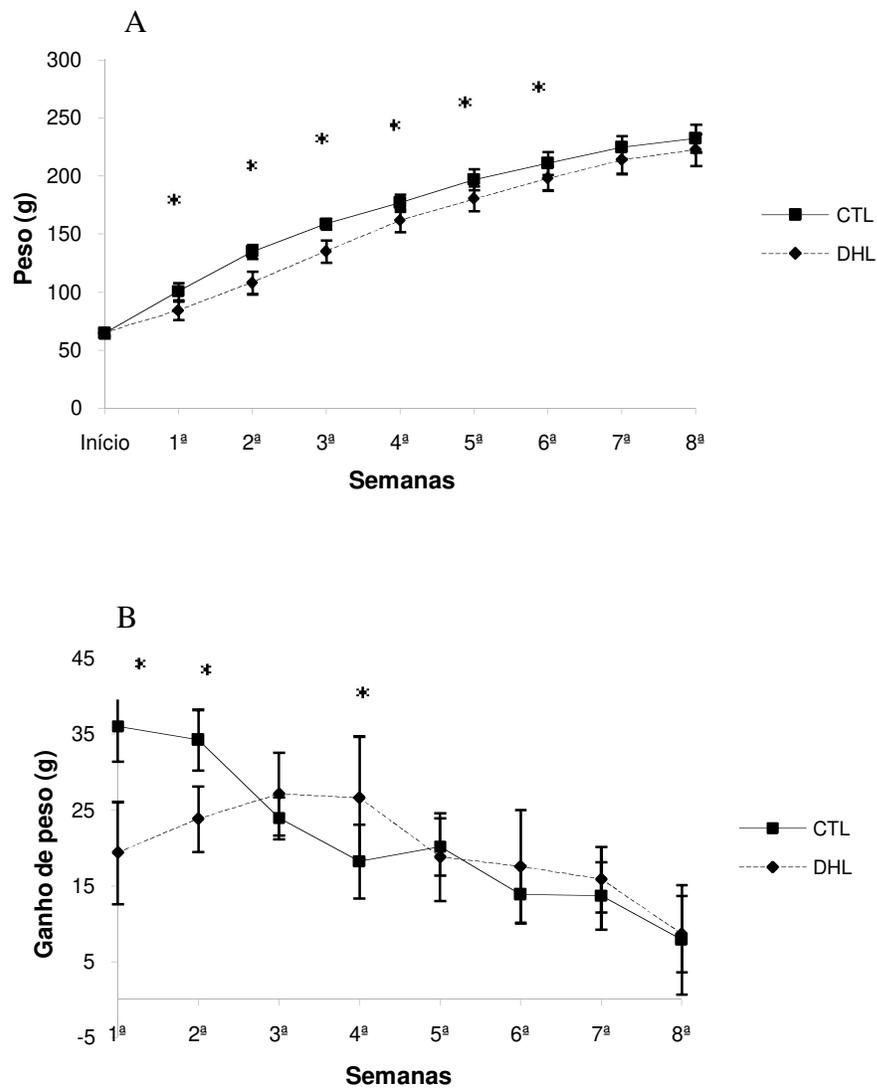


Figura 3. a) Evolução da massa corporal das fêmeas durante 8 semanas do período pré-gestacional. **b)** Ganho de peso. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. $n=9$. ANOVA *post-hoc* Bonferroni $*p<0,05$.

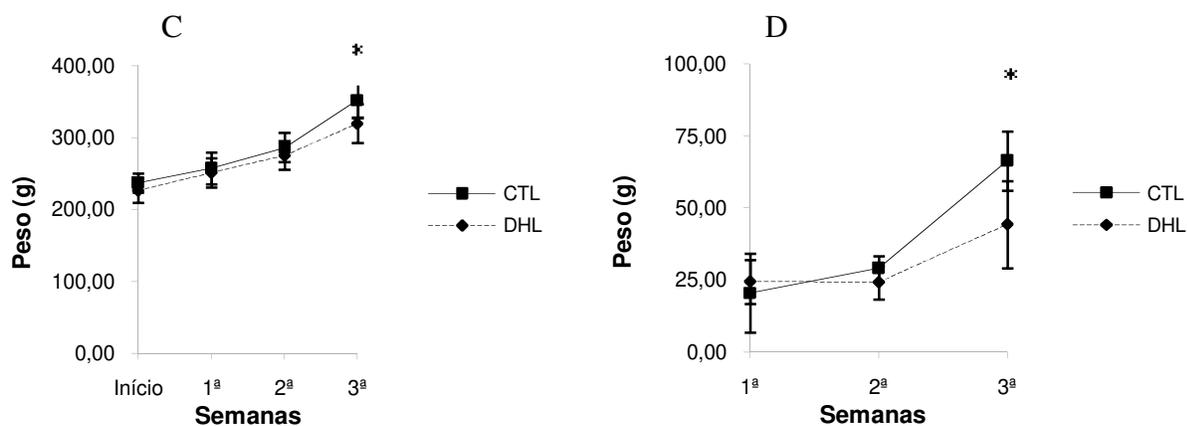


Figura 3. c) Evolução da massa corporal das mães durante a gestação. **d)** Ganho de peso. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. n=12. ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

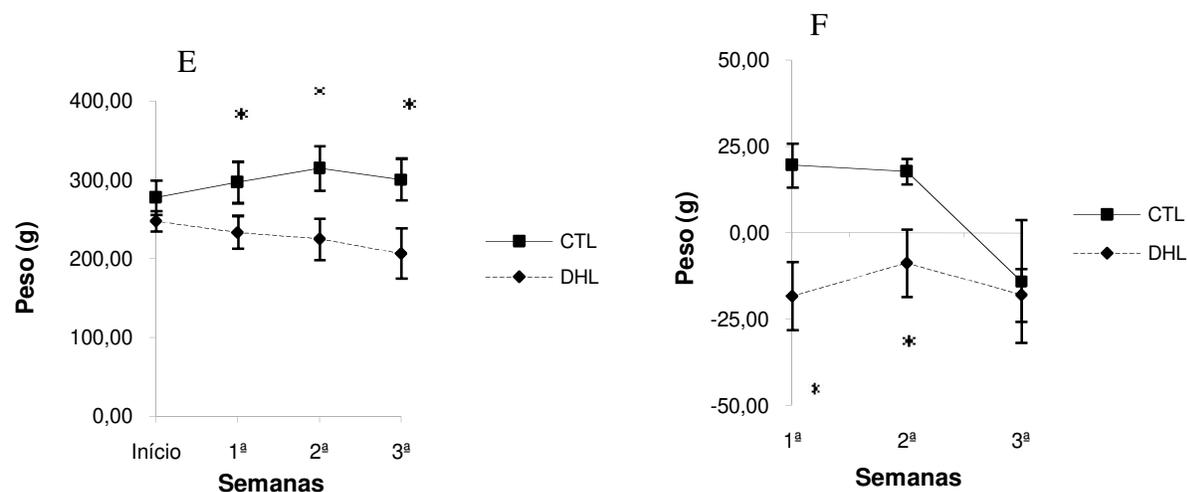


Figura 3. e) Evolução da massa corporal das mães durante a lactação. **f)** Ganho de peso. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. n=4. ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

Ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas no consumo diário de água durante as oito semanas experimentais ou durante a gestação (**Figuras 4a e 4b**). Porém, durante a lactação houve um aumento progressivo na ingestão de água no grupo DHL que foi maior em 38,9% em relação ao controle, com aumento progressivo semanal (**Figura 4c**).

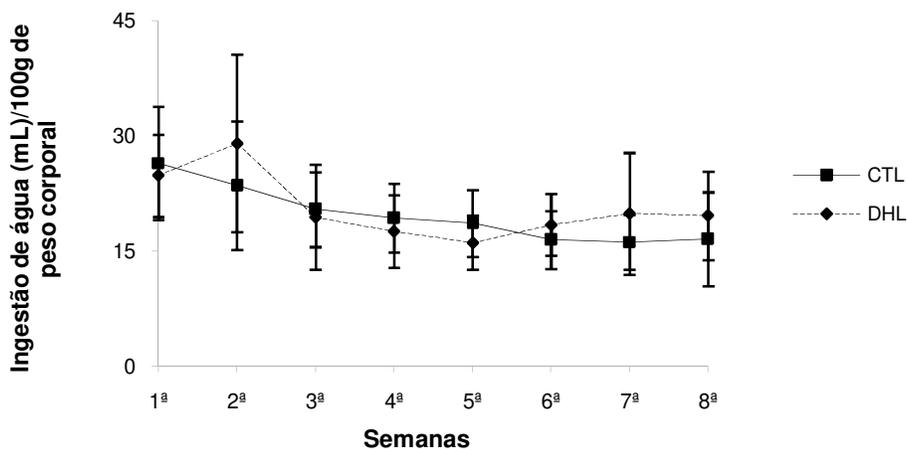


Figura 4a. Ingestão diária de água (mL)/100g de massa corporal de fêmeas M8s. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. n=8. ANOVA *post-hoc* Bonferroni.

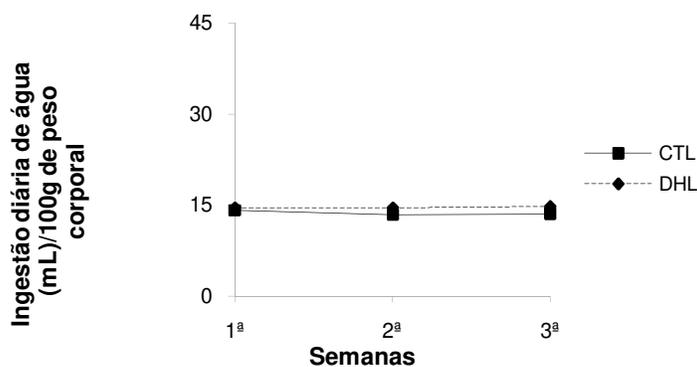


Figura 4b. Ingestão diária de água (mL)/100g de peso corporal de fêmeas M17g. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 9, HFD n=12). ANOVA *post-hoc* Bonferroni.

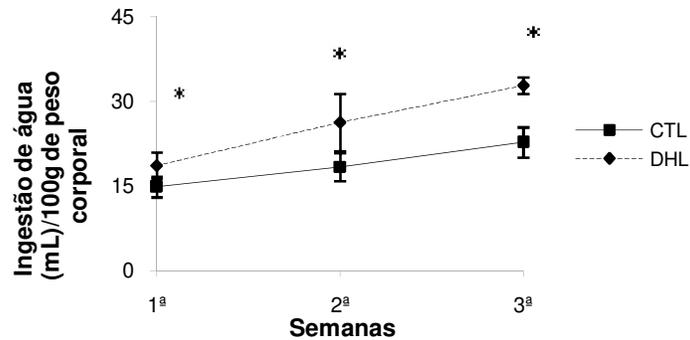


Figura 4c. Ingestão diária de água (mL)/100g de peso corporal de fêmeas M15l. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 4, DHL n=5). ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

Teste de tolerância à glicose e insulinemia nos diferentes grupos estudados

O teste de tolerância à glicose não apresentou diferenças significativas entre os grupos CTL e DHL para M8s, avaliada pela análise da área sobre a curva glicêmica (ASC) (**Figura 5a e 5b**). Porém para este grupo, a resposta insulinêmica foi significativamente menor nas ratas DHL, após a mesma sobrecarga de glicose (**Figuras 5c e 5d**). Durante a gestação, entretanto, não foi observado qualquer diferença entre os grupos, seja para glicemia quando comparada ao controle (**Figuras 6a e 6b**), ou para resposta insulinêmica (**Figuras 6c e 6d**). Durante a lactação (**Figura 7a**) observa-se um significativo aumento da glicemia aferida pela ASC, após a sobrecarga de glicose intraperitoneal em relação ao grupo controle, associada a uma menor elevação plasmática de insulina no grupo de animais submetidos à ingestão crônica de dieta hiperlipídica (**Figuras 7c e 7d**).

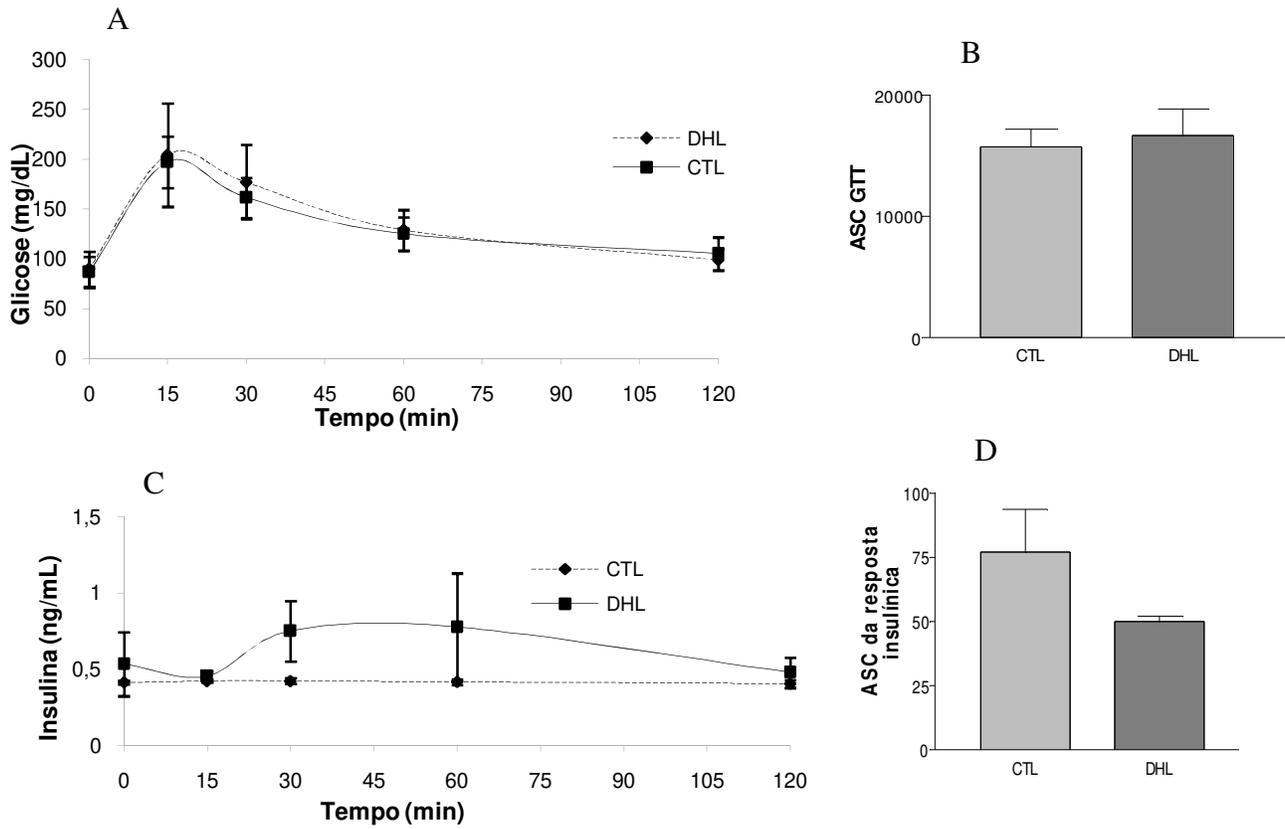


Figura 5. a) Teste de tolerância à glicose em fêmeas M8s (pré-gestacional). **b)** ASC do GTT. **c)** Resposta insulínica. **d)** ASC da resposta insulínica. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 13 DHL n=16). Dosagem insulínica n=3. Teste *t* de student.

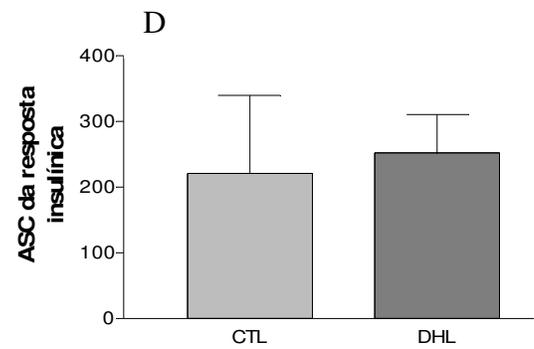
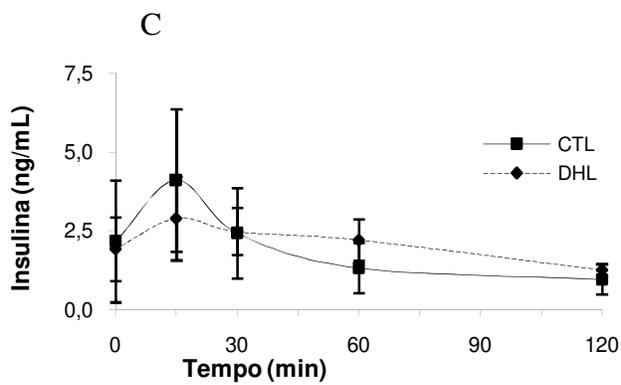
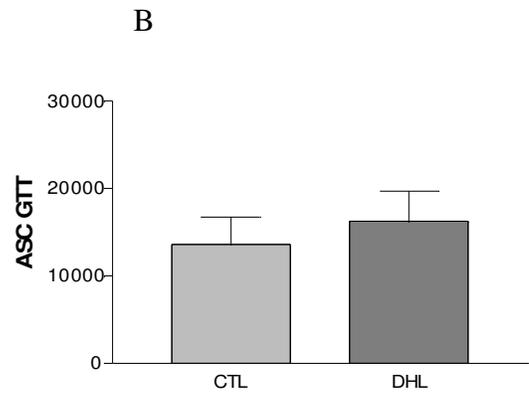
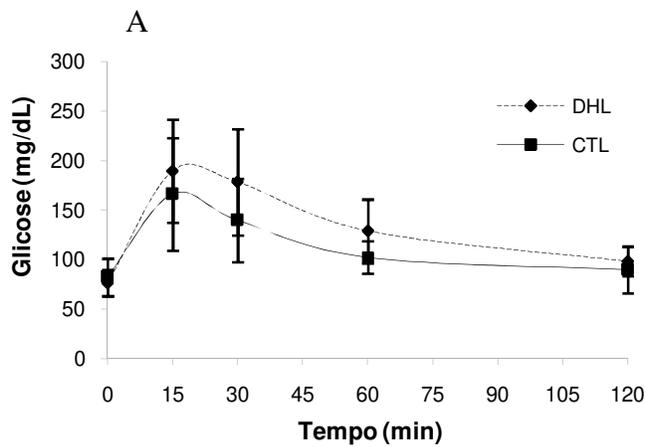


Figura 6. a) Teste de tolerância à glicose em fêmeas M17g (durante a gestação). **b)** ASC. **c)** Resposta insulínica. **d)** ASC da resposta insulínica. Os resultados estão expressos como média \pm DPM ($n=6$). Dosagem insulínica ($n=4$). Teste *t* de student.

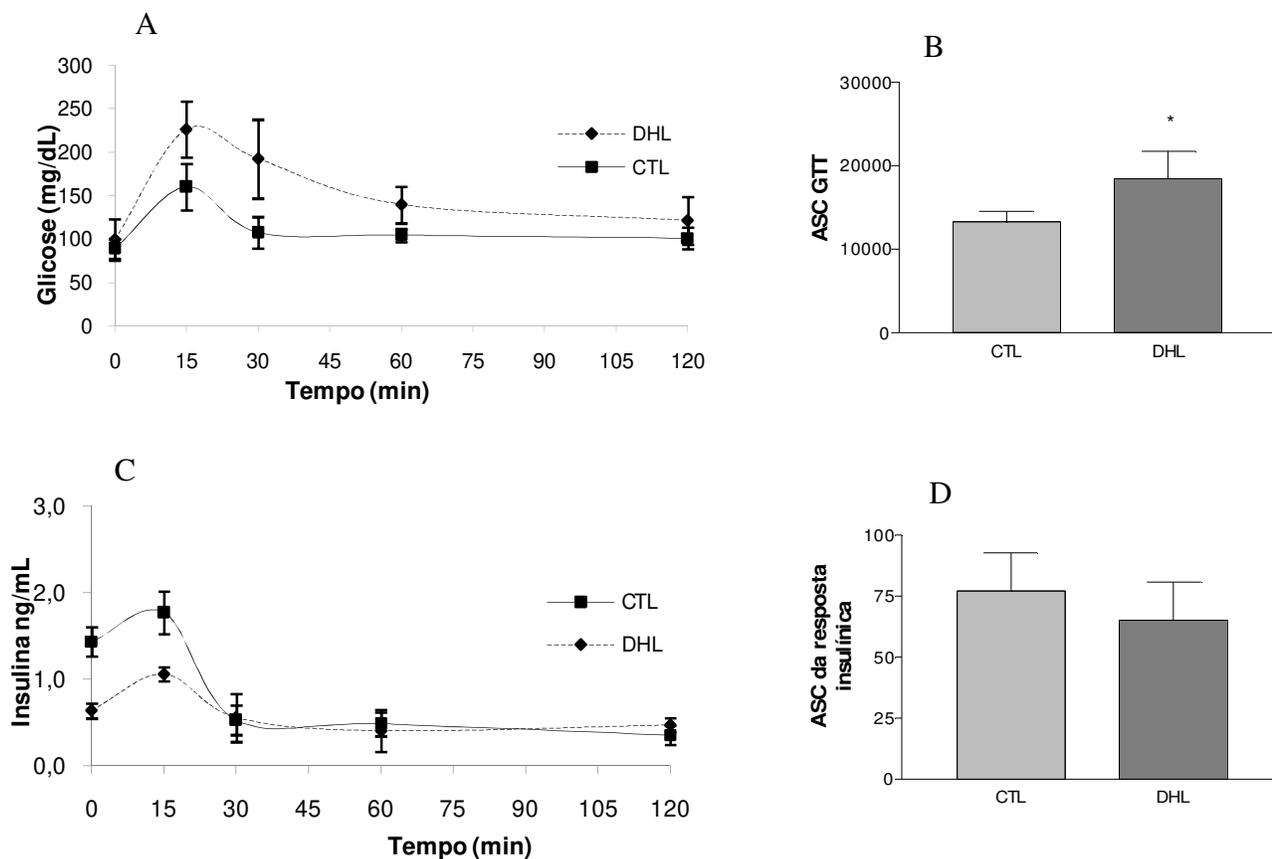


Figura 7. a) Teste de tolerância à glicose em fêmeas M15I (durante a lactação). **b)** ASC. **c)** Resposta insulínica. **d)** ASC da resposta insulínica. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (CTL n= 7 DHL n=8). Dosagem insulínica (n=3). Teste *t* de student * $p < 0,05$.

A **Tabela 2** mostra os parâmetros bioquímicos nas fêmeas nas três fases estudadas. É possível verificar que não há diferença significativa entre as glicemias de jejum nos grupos DHL e CTL em quaisquer das fases estudadas. Em relação aos níveis plasmáticos de triglicérides (TG) observa-se que as fêmeas DHL, após 8 semanas de tratamento, apresentam níveis plasmáticos mais elevado relação ao grupo CTL, embora não significativo. Durante a prenhez, observa-se em ambos os grupos, uma elevação nos níveis de triglicerídeos sem, entretanto, diferença significativa entre ambos. Durante a lactação há redução nos níveis séricos de TG no grupo DHL para valores próximos ao pré-gestacional. Com relação aos níveis séricos de colesterol (COL), não foi observada qualquer diferença entre os grupos estudados, porém há uma expressiva queda dos níveis de COL durante a gestação no grupo DHL, que volta a valores pré-gestacionais na lactação. Não foram

observadas diferenças significativas entre os valores de HDL-colesterol nos diferentes grupos e fases estudadas.

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos de fêmeas M8s, M17g e M15l

	M8s			M17g			M15l		
	CTL	DHL		CTL	DHL		CTL	DHL	
Glicose mg/dL	83,79 ± 18,28 (14)	89,88 ± 17,75 (16)		82,71 ± 18,78 (7)	76,43 ± 13,43 (7)		89,17 ± 11,51 (6)	96,25 ± 23,12 (8)	
Insulina nd/ml	0,53 ± 0,21 (3)	0,42 ± 0,01 (3)		2,17 ± 1,94 (4)	1,92 ± 1,01 (4)		1,44 ± 0,17 (4)	0,64 ± 0,09 (4)	
Triglicérides mg/dL	24,28 ± 18,33 (7) ab	42,84 ± 13,26 (8) c		90,07 ± 32,24 (5) ad	76,55 ± 11,71 (5) c		66,64 ± 16,51 (6) bd	47,39 ± 10,72 (6)	
Colesterol mg/dL	67,97 ± 15,08 (8)	62,32 ± 14,07 (8)		62,45 ± 4,28 (5)	45,67 ± 13,92 (5) a		77,85 ± 10,73 (6)	73,44 ± 21,23 (6) a	
HDL-col mg/dL	39,79 ± 9,28 (8)	33,3 ± 7,81 (8)		32,66 ± 4,08 (5)	29,58 ± 3,93 (5)		41,1 ± 11,02 (6)	34,97 ± 5,99 (6)	

abcd: P < 0,05 – ANOVA – post test Bonferroni. Comparação entre CTL e DHL e entre os períodos M8s, M17g e M15l do mesmo tratamento

A massa relativa do fígado foi menor no grupo DHL durante a lactação comparados ao grupo controle (**Figura 8**). A massa do coração não apresentou diferença estatística comparando as idades ou grupos experimentais (**Figura 9**). Em relação ao comprimento relativo do intestino delgado e grosso, não houve diferença entre os grupos e idades estudadas (**Figura 10 e 11** respectivamente). Por outro lado, durante toda a lactação, inclusive imediatamente ao desmame, os rins do grupo DHL apresentaram uma maior massa ponderal quando comparada ao grupo controle. Esta elevação ocorreu prioritariamente no rim direito (**Figura 12**).

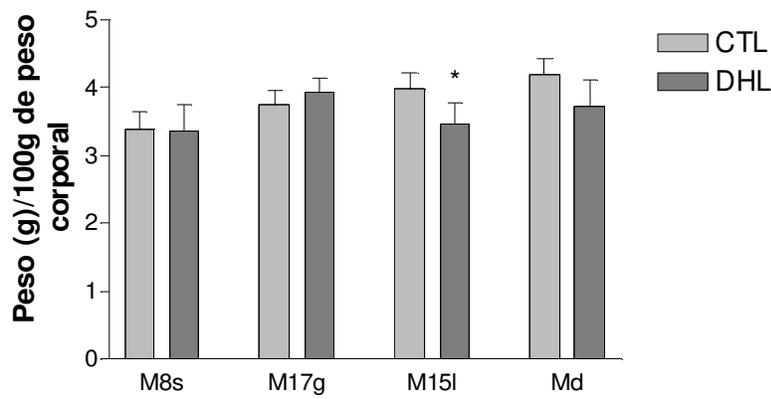


Figura 8. Massa relativa do fígado em M8s, M17g, M15l e Md. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (n=5-8). ANOVA *post-hoc* Bonferroni * $p < 0,05$.

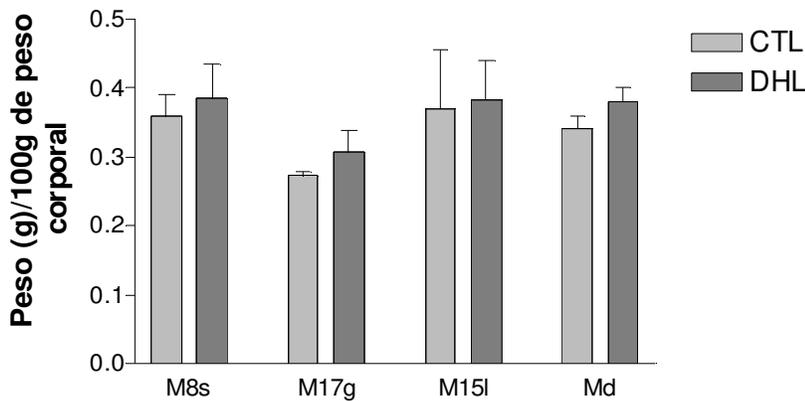


Figura 9. Massa relativa do coração em M8s, M17g, M15l e Md. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (n=5-8). ANOVA *post-hoc* Bonferroni.

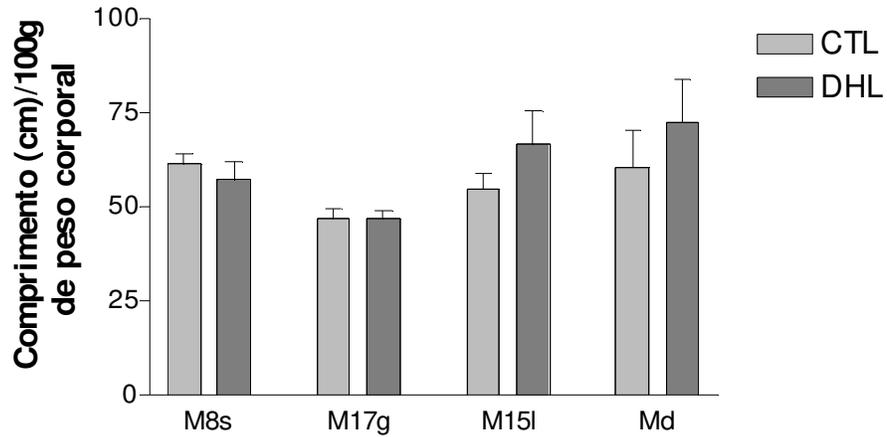


Figura 10. Comprimento relativo do intestino delgado em M8s, M17g, M15l e Md. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (n=5-8). ANOVA *post-hoc* Bonferroni.

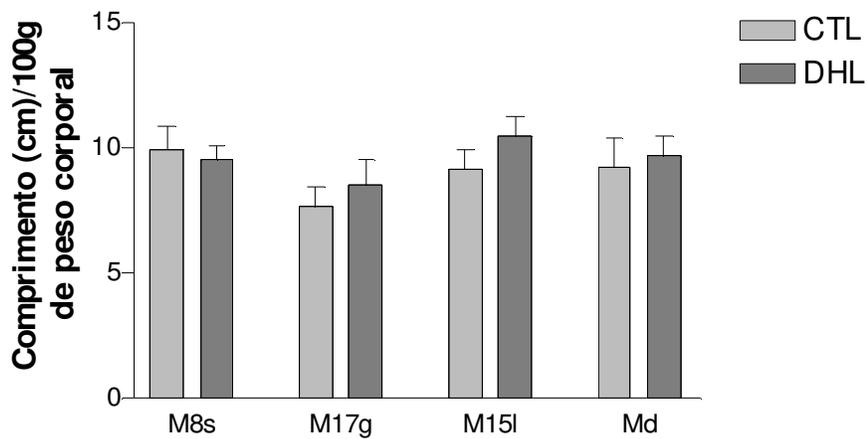


Figura 11. Comprimento relativo do intestino grosso em M8s, M17g, M15l e Md. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (n=5-8). ANOVA *post-hoc* Bonferroni.

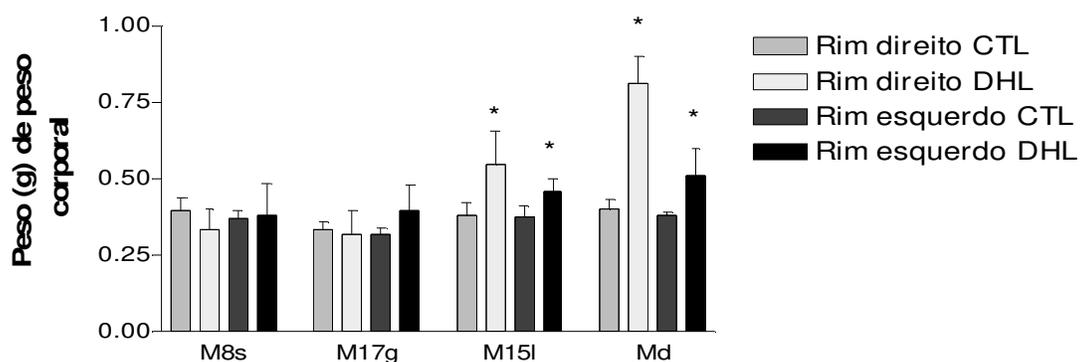


Figura 12. Massa relativa dos rins direito e esquerdo durante M8s, M17g, M15l e Md. Os resultados estão expressos como média \pm DPM ($n=5-8$). ANOVA *post-hoc* Bonferroni $*p<0,05$.

Como mostrado na **Figura 3c**, as fêmeas M17g do grupo controle apresentaram um maior ganho ponderal ao final da gestação. No entanto, não foi observada qualquer diferença significativa entre o número de filhotes vivos nascidos por ninhada (**Figura 13**). Por outro lado, as massas ponderais dos fetos e das placentas foram significativamente menor no grupo DHL comparado aos controles como mostra as (**Figuras 14a e b**, respectivamente).

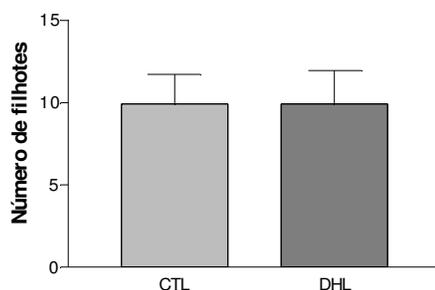


Figura 13. Número de filhotes vivos nascidos em cada ninhada. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL $n= 10$ HFD $n=12$).

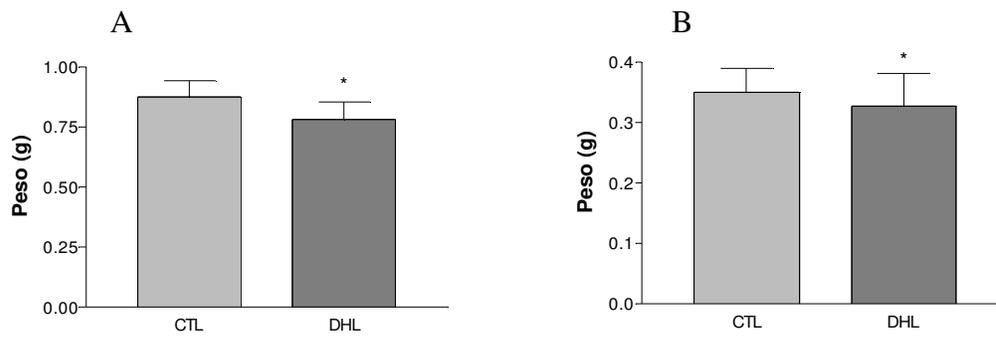


Figura 14. a) Peso dos fetos machos e fêmeas em E17. b) Peso das placentas em E17. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 32 DHL n=42). Teste *t* de student * $P < 0,05$.

DISCUSSÃO



4. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas tem se observado uma mudança nos hábitos alimentares da população mundial, principalmente ocidental, onde a oferta e acessibilidade à comidas ricas em gorduras, principalmente saturadas, e carboidratos tem aumentado ano-a-ano. Devido às novas necessidades impostas pelo atual estilo de vida, onde o trabalho exige cada vez mais da população, o tempo tem se tornado um desafio para as pessoas, assim a procura por alimentos de preparação rápida, como as industrializadas e a falta de atividade física, associadas à hábitos como consumo de cigarro e bebidas alcoólicas, tem levado a população a uma série de doenças metabólicas e cardiovasculares como obesidade, resistência à insulina e hipertensão arterial. Como que em um círculo vicioso, essas doenças tendem a levar a outras alterações causando então a síndrome metabólica. Quando esse estilo de vida desequilibrado ocorre durante a gestação, a prole pode ser predisposta a ter essas mesmas alterações durante o decorrer da vida. A partir da década de 90, Barker e colaboradores publicaram uma série de trabalhos relacionando o baixo peso ao nascimento com o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta, e que esses fatores de risco poderiam ser consequência do estado nutricional materno, propondo então o termo programação fetal, que também ficou conhecido como a hipótese de Barker. Em outras palavras, significa que devido sua adaptabilidade, o feto é capaz de ajustar seu metabolismo de acordo aos estímulos recebidos durante a vida fetal, porém essas adaptações ao longo do tempo podem ser desfavoráveis frente a novos estímulos impostos pelo ambiente pós-natal, resultando em alterações metabólicas e cardiovasculares.

Entender a resposta frente a dieta hiperlipídica sobre o funcionamento metabólico materno faz-se necessário para se compreender os mecanismos envolvidos por trás da programação fetal.

Como apresentado nas **figuras 1a, 1b e 1c** o consumo de dieta hiperlipídica por ratas durante o período pré-gestacional, na gestação e na lactação é menor quando levado em consideração a quantidade de gramas ingeridas. O motivo dessa menor ingestão se deve, provavelmente, a saciedade mais rápida causada pela elevada ingestão lipídica, comparado aos outros nutrientes. Estes levam a um esvaziamento gástrico mais lento, necessário para a digestão de gorduras e produção de quilomícrons (RAYBOULD et al.,

1998). Além disso, algumas linhagens de animais podem ajustar sua ingestão diária de comida para fornecer a mesma quantidade calórica presente em uma dieta padrão (FÉRÉZOU-VIALA, et al., 2007). Como mostrado na **tabela 1**, a dieta hiperlipídica possui 85% a mais de calorias que a dieta padrão. Assim, quando se leva em consideração a ingestão calórica, as fêmeas DHL apresentam um maior aporte de calorias (**Figuras 2a e 2b**). Durante a lactação não se observou diferença nesta ingestão calórica (**Figura 2c**). Nessa fase as fêmeas aumentam seu consumo alimentar para fornecer nutrientes para a prole, porém, nas fêmeas DHL, provavelmente, devido à limitação imposta pela dieta rica em lipídeos, este aumento não ocorre como se observa nos animais do grupo CTL, motivo pelo qual, o consumo nesta fase de ambos os grupos se aproximam.

Surpreendentemente, durante o período de estudo de 16 semanas de acompanhamento, as fêmeas ingerindo dieta hiperlipídica não se tornaram obesas e nem mesmo apresentaram aumento de adiposidade. Este fato é evidenciado pelo menor ganho ponderal nessas fêmeas durante o período de adaptação à dieta até a 8ª semana (**Figura 3a e 3b**), ao final da gestação (**Figuras 3c e 3d**), apresentando inclusive, uma rápida perda de peso durante a lactação (**Figuras 3e e 3f**). Algumas linhagens de animais, submetidas à dieta rica em lipídeos, desenvolvem resistência à obesidade, e passam a utilizar os lipídios como sua principal fonte de energia, evitando assim o estoque destes (JACKMAN et al., 2010). Neste caso, podem ajustar a ingestão diária de alimento com o objetivo de fornecer a mesma quantidade diária de calorias de uma dieta padrão (FÉRÉZOU-VIALA et al., 2007). Esse processo pode ocorrer poucos dias após a introdução de dieta hiperlipídica (JACKMAN et al., 2010). A heterogênea resposta à dietas hiperlipídicas, causa grande dificuldade na comparação dos resultados do presente estudo e de estudos que já constituem a publicação nesta área. Isto provavelmente ocorre em decorrência de protocolos experimentais diversos, dos diferentes tipos de dietas utilizadas, da composição não similar e dos tipos diversos de lipídios utilizados, bem como o percentual destes na composição dietética. Interferem ainda; a linhagem do modelo experimental utilizado e o tempo de exposição à dieta (BUETTNER et al., 2007).

Em função da elevada demanda energética exigida para o desenvolvimento da prole durante a gestação e lactação, principalmente provenientes de carboidratos, o presente estudo evidenciou um menor ganho ponderal das mães DHL durante a última semana

gestacional associada a pronunciada e rápida perda massa durante a lactação. Esse fato pode ter ocorrido pela menor oferta de carboidratos na composição da dieta hiperlipídica, ou, como discutido acima, pelo fato do seu metabolismo estar adaptado à utilização de lipídeos como fonte de energia, ao invés de estocá-los. Enquanto as fêmeas CTL acumulam energia durante a lactação, observando o ganho de massa ponderal nas duas primeiras semanas desse período, as fêmeas DHL parecem dispor desta reserva energética para a lactação. Podemos aventar a possibilidade de que o leite produzido pelas fêmeas DHL contenha uma menor quantidade de nutrientes necessários, levando a prole a consumir mais, e conseqüentemente, induzindo a mãe produzir cada vez mais leite, criando assim um círculo vicioso com extrema espoliação nutricional desta fêmea. Hernandez e colaboradores (2012) observaram que ratas suplementadas com dieta hiperlipídica apresentaram menor número de alvéolos nas glândulas mamárias, aumento na expressão de genes responsável pela involução das glândulas, maior quantidade de fatores inflamatórios, como interleucina-6 e TNF-alfa, associada a diminuição nos níveis de glicose no leite.

Por outro lado, avaliando o consumo de água entre as fêmeas acompanhadas, os animais DHL durante a lactação apresentaram uma maior ingestão de água, quando comparadas à M8s e M17g em ambos os grupos experimentais (**Figuras 4a, 4b e 4c**). Estas alterações podem estar relacionadas a modificações na expressão de componentes do sistema renina-angiotensina-aldosterona central modificando a resposta a sede nestes animais. Ou ainda, esta resposta dipsogênica pode estar relacionada como mecanismos compensatórios, a maior produção de leite e conseqüentemente ao maior consumo de líquido nas DHL.

Após 8 semanas de ingestão hiperlipídica as fêmeas não demonstraram diferenças na captação periférica de glicose, mas uma tendência a diminuição nos níveis de insulina plasmática (**Figura 5c e Tabela 2**). Durante a gestação a captação da glicose nestes animais é menor, possivelmente, e pelo menos em parte como de uma menor secreção pancreática de insulina, porém, sem diferença estatística em relação ao controle (**Figuras 6a-d**). Por outro lado, como mostrado na **Figura 7a**, as fêmeas DHL durante a lactação apresentam uma menor secreção de insulina e conseqüentemente, menor captação periférica de glicose, sugerindo que esses animais apresentam-se em estado pré-diabético (**Figuras 7a-d**). Como previamente descrito, este fenômeno pode estar associado a um

declínio na função pancreática como decorrência de uma persistente estimulação pelo aumento dos níveis de lipídeos circulantes (SONE & KAGAWA, 2005; EBATO et al., 2008).

Entretanto, conforme mostrado na **Tabela 2**, os parâmetros bioquímicos séricos das fêmeas de ambos os grupos não apresentaram diferenças significativas, quando analisados pelo teste de variância. Enquanto muitos estudos mostram que o consumo de uma dieta hiperlipídica eleva os níveis de triglicérides, colesterol, glicemia e insulina (BUETTNER et al., 2007), isto não foi confirmado no presente trabalho. Em relação aos níveis plasmáticos de triglicérides, observa-se apenas uma tendência a elevação no grupo DHL M8s. Mais uma vez deve-se considerar a heterogeneidade dos protocolos e da linhagem de animais utilizados nos diferentes estudos. No presente estudo, as fêmeas apresentam-se resistentes a obesidade, sugerindo que os animais utilizados neste estudo possam estar metabolicamente adaptados utilizando fontes energéticas distintas, de modo a minimizar o acúmulo destes no sangue. A análise do HDL-plasmático, nenhuma alteração foi encontrada entre os grupos e as idades estudadas, provavelmente pelo fato de que nestes animais os níveis séricos de colesterol também não se alteraram, concordando com os resultados de AUBIN et al., (2008). Adicionalmente, a maioria dos estudos utilizam machos como modelo experimental, sendo que tem sido demonstrado que fêmeas respondem a dieta hiperlipídica de maneira diferenciada em relação aos machos (PRIEGO et al., 2008).

O estudo da massa hepática não mostrou diferenças significativas entre os grupos CTL e DHL em M8s e M17g, porém para M15l e Md, observou-se uma diminuição desta massa nas fêmeas DHL, efeito que poderia ser explicado pela maciça utilização dos estoques de glicogênio, lipídeos e proteínas durante a produção do leite (LINDSAY, 1971; BAUMAN & CURRIE, 1980). Pode-se observar também que enquanto o peso do fígado das fêmeas CTL aumenta progressivamente nas fases estudadas possivelmente devido ao estoque de nutrientes, nas fêmeas que receberam a dieta hiperlipídica, esta elevação é observada apenas durante a gestação, enquanto em M15l e Md ocorre uma queda.

O estudo também mostra um pronunciado aumento da massa renal relativa a massa corporal no grupo DHL durante a lactação comparados ao grupo controle. Provavelmente, essas alterações renais estejam relacionadas a modificações estruturais (dados não apresentados) e a sensível redução da massa renal durante esta fase do estudo. As alterações estruturais será motivo de estudo futuro e decorrem do processo patológico

relacionado à dilatação pielocalicial associada a nefrocalcinose e nefrolitíase observadas neste modelo experimental. Não podemos também excluir que modificações funcionais relacionadas a elevação na reabsorção de solutos e água já descritas em estudo prévio em nosso laboratório (ROZA et al., 2011) possam estar envolvidos neste crescimento em um momento em que os animais apresentam alta demanda, pela lactação.

Em relação aos aspectos ponderais do coração, o estudo não evidenciou mudanças significativas quando compara-se as duas dietas utilizadas, exceto durante M17g, quando foi verificada uma redução significativa da massa cardíaca normalizada pela massa corporal. Este resultado possivelmente foi decorrente ao viés metodológico, quando utilizamos a normalização ponderal do órgão pela massa corporal dos animais. Como nessa fase as fêmeas apresentam uma massa significativamente mais elevada e não há grandes alterações na massa cardíaca, a ponderação desta pelo peso do animal resultou em um valor menor. Aubin e colaboradores (2008) também não observaram alteração no peso do coração de fêmeas resistentes a obesidade que ingeriram dieta hiperlipídica, entretanto, tanto a pressão sistólica e diastólica elevaram-se. Assim como em nossos resultados, neste estudo, os níveis plasmáticos de colesterol, triglicérides e HDL não se alteraram. Estudo realizado com machos ingerindo dieta hiperlipídica, além do aumento do peso, foi observado um maior acúmulo de triglicérides no coração e resistência a insulina miocárdica. Se por analogia, estes resultados são aplicados a seres humanos, pode-se inferir que nesta situação ocorra um significativo aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardíacas (OUWENS et al., 2005),

O comprimento dos intestinos delgado e grosso não apresentaram diferenças significativas em ambos os grupos estudados. Durante a gestação, como observado para o coração, observou-se uma diminuição relativa no comprimento dos intestinos, também como consequência da normalização desta medida pela massa ponderal do animal.

CONCLUSÃO



2.5. CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados pode-se concluir que a ingestão crônica de dieta hiperlipídica promove em ratas Wistar uma significativa redução no ganho ponderal ao longo de sua vida, bem como durante a gestação e a lactação. O estudo mostrou também que em animais DHL ocorre uma não resposta insulinêmica a administração de glicose, sugerindo uma falência progressiva do pâncreas em produzir e/ou secretar insulina. O estudo mostra também que os animais tratados cronicamente com dieta hiperlipídica apresentam discretas variações plasmáticas do perfil lipídico quando comparados a controle pareado pela idade. Neste aspecto se sobressaem modificações discretas nos níveis séricos de triglicérides que se acentuam na gestação e lactação. A repercussão da dieta sobre os parâmetros morfológicos do fígado, coração, rins e intestino delgado, foram discretos e não significativos entre os grupos experimentais avaliados. Assim, a ingestão crônica de dieta hiperlipídica promove uma redução no crescimento ponderal destes animais desde a tenra idade. Aparentemente, as repercussões sobre o peso corporal são determinadas no período intrauterino com amplo comprometimento que se estende a placenta, também reduzida de peso, e possivelmente de sua área de troca, nos animais DHL. Esta alteração pelo menos em parte, pode explicar as alterações fetais e na idade adulta que serão descritas no próximo capítulo desta dissertação.

Capítulo II

Efeito da ingestão crônica de dieta hiperlipídica durante a gestação e sua repercussão sobre a expressão de SR-BI e ABCA1 na placenta, fígado, intestino delgado e rim da prole de machos.

OBJETIVOS



3.1.1. Objetivos gerais

Tendo em conta as possíveis repercussões da ingestão crônica de dieta hiperlipídica, inclusive durante a gestação, sobre a vida pós-natal, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o consumo de dieta hiperlipídica materna induz modificações no perfil lipídico e glicídico e, na expressão de transportadores de colesterol SR-BI e ABCA1 na prole de ratos machos comparando os resultados a controles apropriados.

3.1.2. Objetivos específicos

4. Avaliar a ingestão diária de ração padrão para roedores, água e a evolução ponderal da prole de ratos machos com 12 dias, 8 e 16 semanas de vida, cujas mães receberam uma dieta hiperlipídica;

5. Avaliar o perfil lipídico sérico e a resposta glicêmica e insulinêmica após sobrecarga oral de glicose em ratos machos da prole DHL com 12 dias, 8 e 16 semanas de vida;

6. Avaliar as alterações morfológicas no rim, fígado e no intestino de ratos machos da prole DHL com 8 e 16 semanas de vida;

7. Estudar a imunolocalização e expressão de ABCA1 e SR-B1 na placenta, rim, fígado, duodeno, jejuno e íleo de ratos machos da prole DHL durante várias fases de desenvolvimento: período fetal com 17 dias pré-natal (E17), durante a lactação, com 12 dias de vida e, na vida adulta com 8 e 16 semanas.

MATERIAIS E MÉTODOS



3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus var, albinus, Rodentia, Mammalia*) recém-desmamados com 21 dias de vida, provenientes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na área de Ciência em Animais de Laboratório - CEMIB da UNICAMP, Campinas, SP e mantidos em ambiente fechado com temperatura controlada de $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e iluminação artificial com ciclo claro/escuro de 12/12 horas. As fêmeas foram colocadas em gaiolas individuais e divididas em dois grupos: 1) controle (CTL): que recebeu dieta sólida padronizada para roedores (CR-1 irradiada NUVILAB, Brasil) e, 2) experimental (DHL): alimentadas com a dieta hiperlipídica contendo 60% de quilocalorias provenientes de lipídeos (**Tabela 1**) durante oito semanas. Já os ratos machos, permaneceram em gaiolas coletivas recebendo ração padrão para roedores até a 11^a semana de vida. Após esse período as fêmeas foram colocadas em gaiolas com machos durante 15 horas para o acasalamento. A fertilização foi presumida a partir da observação da presença de espermatozoides do esfregaço vaginal, considerando-se como este 1^o dia de gestação. As fêmeas prenhes continuaram recebendo suas respectivas dietas (CTL ou DHL) durante o acasalamento, gestação e lactação. Após o nascimento dos filhotes a ninhada foi ajustada para um total de 10 filhotes, mantendo a proporção de macho e fêmea 1:1 quando possível, os animais excedentes foram sacrificados por decapitação no primeiro dia de vida. O desmame dos filhotes foi realizada aos 21 dias de vida, sendo que a partir de então, apenas a prole de ratos machos foi utilizada. Os animais oriundos de mães CTL e DHL foram colocados em gaiolas individuais, recebendo a partir de então dieta padrão para roedores (CR-1 irradiada NUVILAB, Brasil) até a 16^a semana de vida.

Foram estudados 4 estágios distintos de desenvolvimento: 1) Período fetal (E17): fetos com 17,5 dias, a fim de se verificar possíveis alterações ocorrida *in uteri* (nessa fase coletou-se tecidos tanto machos como fêmeas); 2) período lactente (PN12d): animais com 12 dias de vida, ainda sob a influência da dieta materna e coincidente com o término do desenvolvimento renal; 3) início da fase reprodutiva (PN8s): 8 semanas de vida; 4) fase

adulta (PN16s): 16 semanas de vida.

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em consonância com os princípios éticos na experimentação animal, sendo a pesquisa submetida e aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal CEEA/UNICAMP, protocolo nº 1697-1(A).

3.2.2. Análise das Variáveis

Foram analisadas as seguintes variáveis na prole de machos: 1) evolução da massa corporal; 2) ingestão diária de água e ração; 3) resposta glicêmica frente ao teste de tolerância à glicose (GTT); 4) determinação das concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides, HDL-colesterol, insulina e glicose; 5) Medidas morfométricas do fígado, rim, coração e intestinos delgado e grosso; 6) Expressão e imunolocalização de SR-BI e ABCA1 no rim, fígado, duodeno, jejuno, íleo e placenta, respectivamente pela técnica de western blot e imunoistoquímica.

3.2.3. Acompanhamento da massa corporal

A prole foi pesada no 17º dia de vida pré-natal e após o nascimento acompanhou-se semanalmente a partir do nascimento a evolução da massa corporal dos filhotes machos até a 16ª semana de vida. A massa corporal total foi aferida em balança digital semi-analítica (AL 500 Denver Instruments- USA) no período matutino.

3.2.4. Acompanhamento da ingestão de água e ração

A ingestão de ração e de água foi acompanhada diariamente a partir do desmame no período matutino. A ração foi pesada em balança digital semi-analítica (AL 500 Denver Instruments- USA). Para medir a ingestão hídrica, colocava-se 250 ml de água diariamente e media-se no dia seguinte em proveta de plástico a quantidade restante de água.

3.2.5. Teste de Tolerância a Glicose

O GTT foi realizado na prole de machos 8s e 16s. Os animais foram postos em jejum

por 12 horas durante o período noturno com água *ad libitum*. Em seguida foram colocados em uma caixa de contenção aquecida por 8 minutos, a fim de causar uma vasodilatação e facilitar a coleta de sangue. Com um bisturi fez-se um corte na região na ponta da cauda dos animais de cerca de 3 mm, após o descarte da primeira gota de sangue, a glicemia plasmática basal de jejum foi medida em um glicosímetro MediSense/Optium, Abbott Laboratories Diabetes Care e tiras-teste (Abbott). Em seguida, foi coletado aproximadamente 800 µL de sangue para dosagens bioquímicas e injetou-se intraperitonealmente uma solução de glicose 50% (1g/Kg de peso do animal). A partir desse momento, os animais foram submetidos a um período experimental de 120 minutos, com medidas da glicemia e coletas de sangue caudal nos tempos: 15, 30, 60 e 120 minutos. O sangue coletado foi centrifugado duas vezes à 4º C por 10 minutos a 3500 rpm, o plasma aliquoteado foi armazenado sob refrigeração (-80°C) para posterior dosagem de insulina.

3.2.6. Dosagens bioquímicas

Para determinação das concentrações plasmáticas de colesterol, triglicérides, HDL-colesterol, utilizou-se o plasma dos animais coletados no tempo zero do GTT quando todos os animais estavam em jejum por 12 horas e sem terem recebido a sobrecarga de glicose. Para dosagem de triglicérides, colesterol e HDL-colesterol, foram utilizadas os Kits enzimáticos específicos (LABTEST) seguindo-se as especificações do fabricante com posterior leitura em espectrofotômetro (Micronal). Sendo a dosagem de HDL-colesterol pelo método de precipitação.

A insulina foi dosada utilizando-se o Kit Elisa Rat/Mouse Insulin (Millipore, EZRMI-13K) e lido posteriormente em espectrofotômetro.

3.2.7. Coleta e medidas de órgãos

Para a coleta dos órgãos dos animais E17, a mãe foi anestesiada com (cetamina/xilasina) e em seguida fez-se uma incisão abdominal de cerca de 3 cm a fim de expor o útero contendo os filhotes. Com o auxílio de uma lupa (LEICA Wild M690) a placenta e os fetos foram removidos e pesados em balança de precisão, e posteriormente mortos por

decapitação, utilizando-se de pinças, o abdômen dos fetos foi aberto longitudinalmente onde coletou-se o fígado, o intestino em toda sua extensão e os rins, sem fazer distinção entre machos e fêmeas. Os órgãos coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido para posterior extração para análises por western blot ou fixados em paraformaldeído 4% para análise por imunistoquímica. Após 4 horas de jejum para animais PN12d, e 12 horas de jejum para PN8s e PN16s fez-se o sacrifício destes através de decapitação. Durante a coleta de PN8s, PN16s o coração, os rins direito e esquerdo (após desencapsulamento), o fígado foram removidos e pesados em balança analítica de precisão. O intestino foi completamente removido e esticado sem estiramento sobre uma fita métrica, onde mediu-se o comprimento do intestino delgado (da válvula piloro até o válvula ileocecal, e o intestino grosso do ceco até o ânus). Coletou-se 2 cm de cada região do intestino delgado, padronizando-se a coleta de seguinte maneira: o duodeno a partir do esfíncter pilórico, no jejuno 15 cm a partir do esfíncter pilórico e no íleo 10 cm a partir da válvula ileocecal no sentido proximal. Para normatizar os as medidas dos órgãos segundo o peso do animal, a seguinte cálculo foi utilizado:

$$massa\ relativa = \frac{massa\ do\ órgão}{massa\ do\ animal}$$

3.2.8. Western blot

Durante a extração de proteína dos órgãos de animais E17 fez-se um pool devido à pequena quantidade de proteínas, assim para o fígado e o intestino utilizou-se por amostra 2 fígados ou intestinos de dois fetos irmãos, e para os rins utilizou-se 5 rins de três animais irmãos. Em seguida, para todas as idades, os órgãos foram colocados em solução tampão (10 mM de EDTA, 100 mM de Trisma base, 10 mM de pirofosfato de sódio, 100 mM de fluoreto de sódio, 10 mM de ortovanato de sódio, 2mM de Persulfato de amônio, 0,1mg/mL de aprotinina) e homogeneizados em Polytron (modelo PT 10/35, *Brinkmann Instruments*) operando em velocidade máxima por 15 segundos. Terminada a extração, foi acrescentado Triton 10% a cada amostra (10 % do volume total) por 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 40 minutos a 12000 RPM a 4°C. A quantificação proteica foi realizada através da reação por biureto, adicionando-se 3µl do extrato em 200 µl

de biureto e lidas em espectrofotômetro (Micronal 342 II). Em seguida 400 µl do sobrenadante foi coletado e adicionado 100 µl do tampão de Laemmli (azul de bromofenol 0,1%, fosfato de sódio 1M pH 7,0, glicerol 50%, SDS 10% e 0,015mg de DTT). Devido especificações do fabricante do anticorpo, separou-se as amostras com já com o tampão Laemmli em dois tubos plástico diferentes de modo que para a análise para SR-BI as amostras foram fervidas por 5 minutos e conservadas em freezer -80°C, enquanto que as outras amostras para análise de ABCA1 foram congelados sem a necessidade de fervê-las.

O extrato total foi novamente fervido por 5 minutos em banho-maria e 250 µg de proteína total foi aplicada no gel (SDS-PAGE) de dois mm de espessura. No mesmo gel foi aplicada uma amostra padrão de proteínas para a marcação do peso molecular. Este padrão era composto por proteínas com pesos moleculares conhecidos: miosina (205 kDa). Beta galactosidase (116 kDa), albumina sérica bovina (80 kDa) e ovalbumina (49 kDa). As proteínas apareceram sob coloração azul no gel de eletroforese e na membrana de nitrocelulose, permitindo a orientação quando ao peso molecular das bandas a serem observadas.

A eletroforese foi realizada em cuba de mini gel da BioRad (Mini-Protean), com solução tampão para eletroforese diluída para uso 1:4 (trisma base 200 mM, glicina 1,52 M, EDTA 7,18 mM e SDS 0,4%). O SDS-PAGE foi submetido a 40 volts, inicialmente, até a passagem da linha demarcada pela fase de empilhamento (*stacking*) e aumentando a voltagem a cada 20 minutos chegando a 120 Volts até o final do gel de resolução (*resolving*). As proteínas separadas no SDS-PAGE, foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, utilizando-se o equipamento de eletrotransferência de mini gel da BioRad, e a solução tampão para a transferência (trisma base 25 mM. Glicina 192 mM, metanol 20% e SDS 0,02%) foi mantida em voltagem constante de 120 volts por duas horas, sob refrigeração contínuo no gelo.

Posteriormente à transferência das proteínas, realizou-se o bloqueio com leite em pó desnatado Molico® a 5% diluído em solução basal (cloreto de sódio 150 mM, trisma base 10mM, Tween 20 0,02%) em agitação constante por duas horas, seguida de 3 lavagens de 10 minutos com solução basal. As membranas de nitrocelulose foram incubadas com a solução de anticorpo primário (solução basal, BSA 5% e azida sódica 0,02%) à 4º C overnight. Para controle endógeno incubou-se β-actina (anti-rabbit Cell signaling #4967) ou

α -tubulina (anti-rabbit Cell signaling #2144) (**Tabela 3**).. No dia seguinte as membranas foram lavadas 3 vezes com solução basal em agitação por 10 minutos ,e incubadas com anticorpo secundário anti-rabbit ligado a peroxidase (Thermo scientific, #31460) diluído (1:10000) em leite em pó desnatado Molico® a 3% por duas horas. Por último, as amostras foram novamente lavadas com solução basal por 3 vezes durante 10 minutos.

Para revelação das membranas foi empregado um kit de quimiluminescência (Pierce). Sendo o filme revelado em solução reveladora e fixadora (Brafox).

Os filmes foram scaneados e através do software UN-SCAN-IT gel 6.1 tm as bandas foram quantificadas em pixels. Posteriormente dividiu-se o valor dos pixels de SR-BI ou ABCA1 pelo valor dos pixels do controle endógeno utilizado para cada membrana.

3.2.9. Imunoistoquímica

Após a coleta dos órgãos dos animais E17, estes foram mantidos em paraformaldeído 4% por 10 minutos, lavado em água corrente por 1 hora, a placenta também foi coletada e mantida em paraformaldeído 4% por 1 hora, lavada em água corrente por 2 horas, todas as amostras foram armazenadas em etanol 70%. Os animais das demais idades foram anestesiados e perfundidos inicialmente por uma solução de salina heparinizada 15% por 5 minutos (PN12) e por 15 minutos (PN8s e PN16s). Para a fixação dos tecidos, perfundi-se uma solução de paraformaldeído 4% por 30 minutos para PN8s e PN16S e 10 minutos para PN12d, em seguida, as amostras foram mantidas por 12 horas no paraformaldeído a 4^o C, e após lavagem em água corrente por 5 horas, foram armazenadas em álcool 70%. Dessas 3 idades coletaram-se os rins, o fígado, e o intestino delgado, sendo este dividindo em 3 porções: duodeno a partir do esfíncter pilórico; jejuno 15 cm a partir do esfíncter pilórico; íleo 10 cm a partir da válvula ileocecal.

O material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool e embebido em parafina (SYNTH). Os blocos foram seccionados na espessura de 5 μ m e aderidos a uma lâmina de vidro silanizada secos em estufa à 37^o C por 12 horas. As lâminas, contendo os cortes, foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em soluções decrescentes de etanol. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com 3 lavagens de 5 minutos com peróxido de hidrogênio a 3% e lavado em água corrente por 5 minutos. Para a recuperação antigênica

utilizou-se tampão EDTA 0,01M pH 6,0 em panela à vapor por 30 minutos, após essa etapa as lâminas foram deixadas resfriando na cuba com o tampão EDTA por 20 minutos e lavadas por 10 minutos em água corrente. O bloqueio deu-se pela incubação com leite em pó desnatado a 3% Molico® por 30 minutos em temperatura ambiente. Incubou-se com anticorpo primário (**Tabela 3**) diluído em diluente específico (Novacastra™) *overnight* em câmara úmida à 4º C. No dia seguinte os cortes foram lavados com PBS 0,1 M pH 7,4 e incubados com anticorpo secundário (Vector ImmPRESS Anti-Rabbit MP-7401) 30 minutos em estufa 37º C. Após três lavagens de 5 minutos lavagens com PBS para a remoção do excesso de anticorpo a revelação foi desenvolvida com diaminobezidina (DAKO K3467) à temperatura ambiente variando o tempo conforme o tecido e o anticorpo. Os cortes foram lavados em água corrente e contra corados com hematoxilina de Harris, novamente desidratados em soluções alcoólicas crescentes, diafanizados em xilol e montados com entellan para adesão das lamínulas. As imagens foram analisadas em microscópio (OLYMPUS BX51) através do software Image-Pro ® Express 6.0, utilizando-se o controle negativo como referência para padronização da iluminação e contraste.

Tabela 3. Concentrações dos anticorpos primários utilizados para imunistoquímica e western blot.

Tecidos	Imunistoquímica		Western Blot	
	anti-SR-BI anti-rabbit (Abcam ab52629)	anti-ABCA1 anti-rabbit (Abcam ab14146)	anti-SR-BI anti-rabbit (Abcam ab52629)	anti-ABCA1 anti-mouse (Abcam ab18180)
Fígado	1:500	1:250	1:1000	1:1000
Rim	1:50	1:250	1:1000	1:1000
Intestino delgado	1:100	1:250	-----	-----
Intestino fetal	1:100	1:250	1:1000	1:1000
Placenta	1:60	1:250	1:1000	1:1000

3.2.10. Análise estatística dos resultados

A análise estatística empregada foi o Test-*t* Student para testes paramétricos e Mann-Whitney para testes não paramétricos. Para duas ou mais variáveis utilizou-se a análise de variância (ANOVA) com Post-hoc de Bonferroni. Os Resultados foram expressos como média ± Desvio Padrão da Média (DPM). Em todos os cálculos foi fixado um nível crítico de 5% ($p < 0,05$). Os softwares utilizados em todos os testes estatísticos foram GraphPad InStat version 3.05, GraphPad Software, San Diego California USA e GraphPad Prism 3, Copyright 1992-1998 GraphPad Software Inc.

RESULTADOS



3.3. Resultados

Na **Figura 1** representa a expressão média da massa ponderal dos filhotes machos com 1 dia de vida. Observa-se que a prole das mães DHL apresenta uma significativa menor massa ponderal, resultado também observado no período fetal (E17). Ao longo das semanas de acompanhamento, a massa corporal destes animais foi menor da 4^a até a 8^a semana de vida, igualando-se após esse período (**Figura 2**). Embora não tenha havido diferenças significativas no ganho de massa ponderal entre os grupos CTL e DHL durante o período estudado (**Figura 3**).

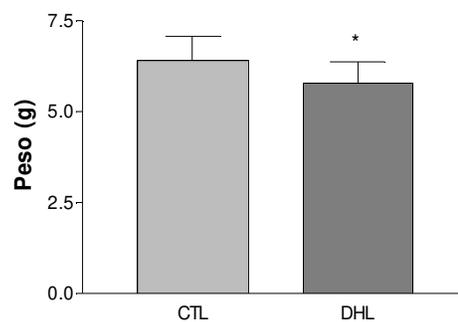


Figura 1. Massa ponderal da prole de machos no nascimento. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 35 DHL n=37) Test *t* Student * $p < 0,05$.

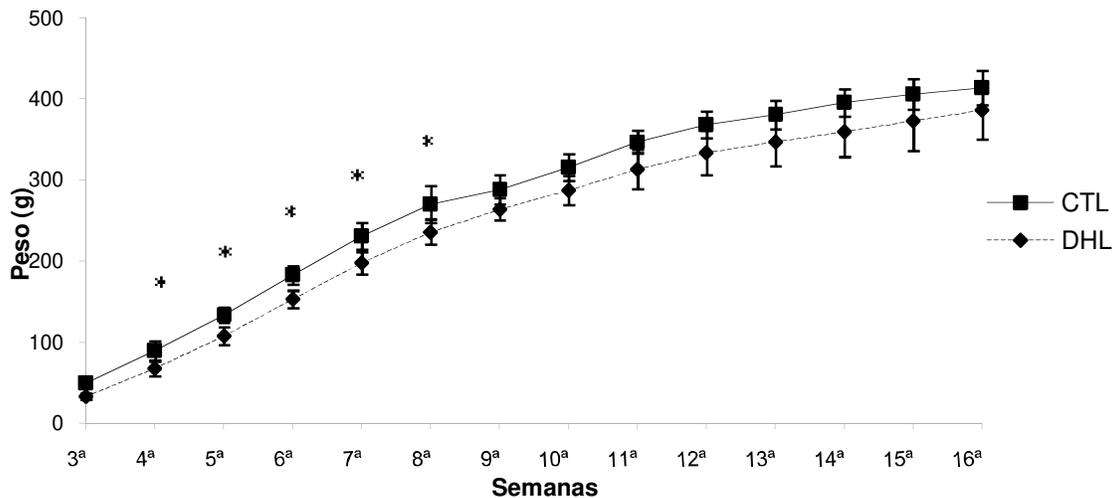


Figura 2. Evolução da massa corporal da prole de machos à partir do desmame até a 16^a semana de vida. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n=6 DHL n=9). ANOVA post-hoc Bonferroni * $p < 0,05$.

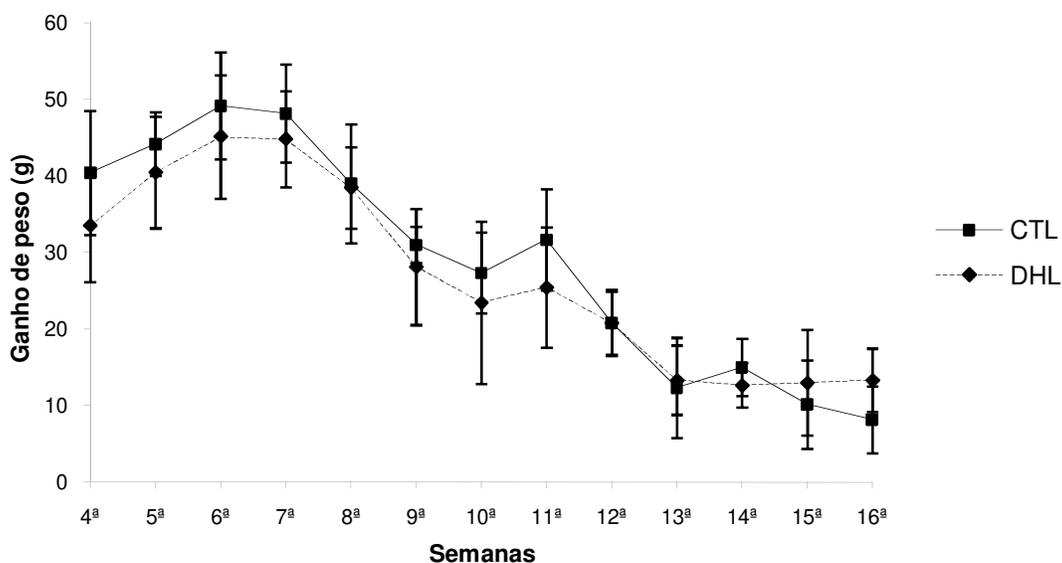


Figura 3. Ganho de massa ponderal da prole de machos a partir do desmame até a 16ª semana de vida. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n=6 DHL n=9) ANOVA post-hoc Bonferroni.

A ingestão diária de ração e calórica não mostrou diferenças significativas, entre o grupo CTL e DHL (**Figuras 4 e 5**). O consumo de água foi maior na prole de mães DHL nas duas primeiras semanas após o desmame, não apresentando, a partir de então, diferenças significativas entre os grupos estudados (**Figura 6**).

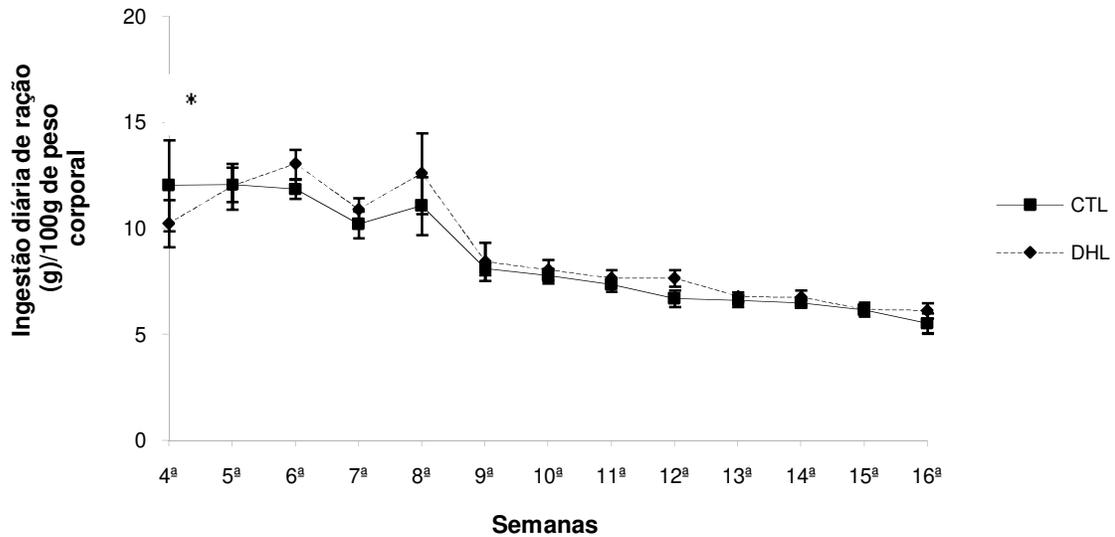


Figura 4. Ingestão diária de ração (g) por 100g de massa corporal da prole de machos a partir do desmame até a 16ª semana de vida. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n=6 DHL n=9). ANOVA post-hoc Bonferroni * $p < 0,05$.

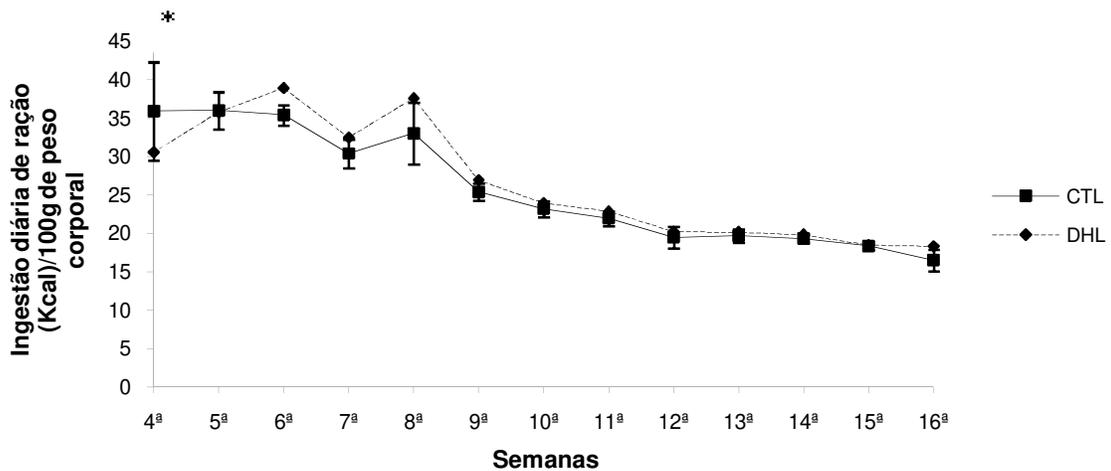


Figura 5. Ingestão diária calórica (kcal)/100g de massa corporal da prole de machos a partir do desmame até a 16ª semana de vida. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n=6 DHL n=9). ANOVA post-hoc Bonferroni * $p < 0,05$.

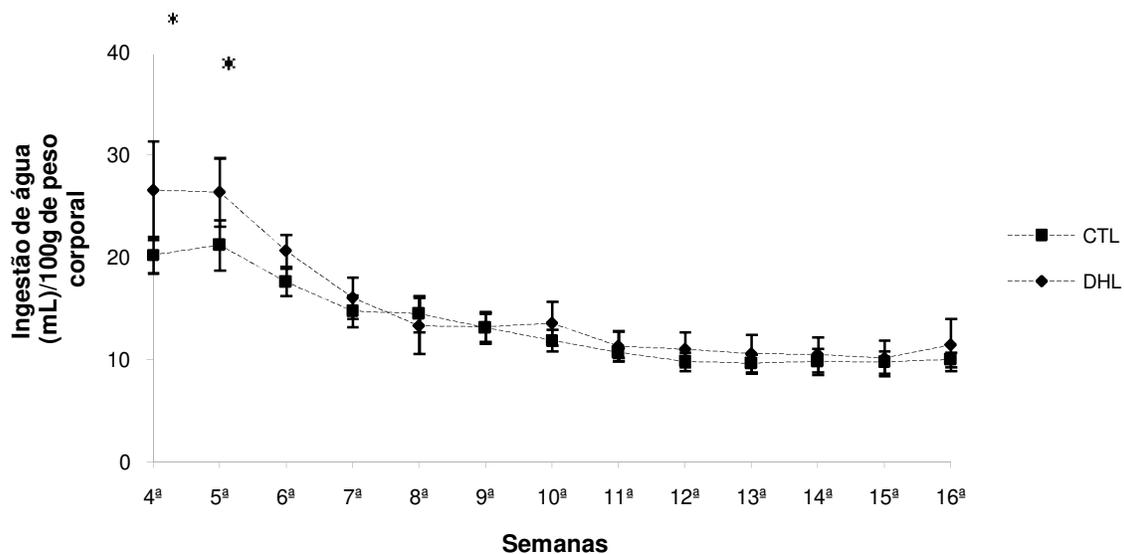


Figura 6. Ingestão diária de água (mL)/100g de massa corporal da prole de machos a partir do desmame até a 16ª semana de vida. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n=6 DHL n=9). ANOVA post-hoc Bonferroni * $p < 0,05$.

O teste de tolerância à glicose realizado na prole, na 8ª semana de vida, não evidenciou diferença significativa na área sob a curva glicêmica em 120 minutos (**Figura 7a e 7b**), bem como da insulinêmica, embora tenha havido tendência a maior secreção de insulina no grupo DHL (**Figura 7c e 7d**). Na 16ª de vida, o GTT não apresentou qualquer diferença entre os grupos estudados (**Figuras 8a-d**).

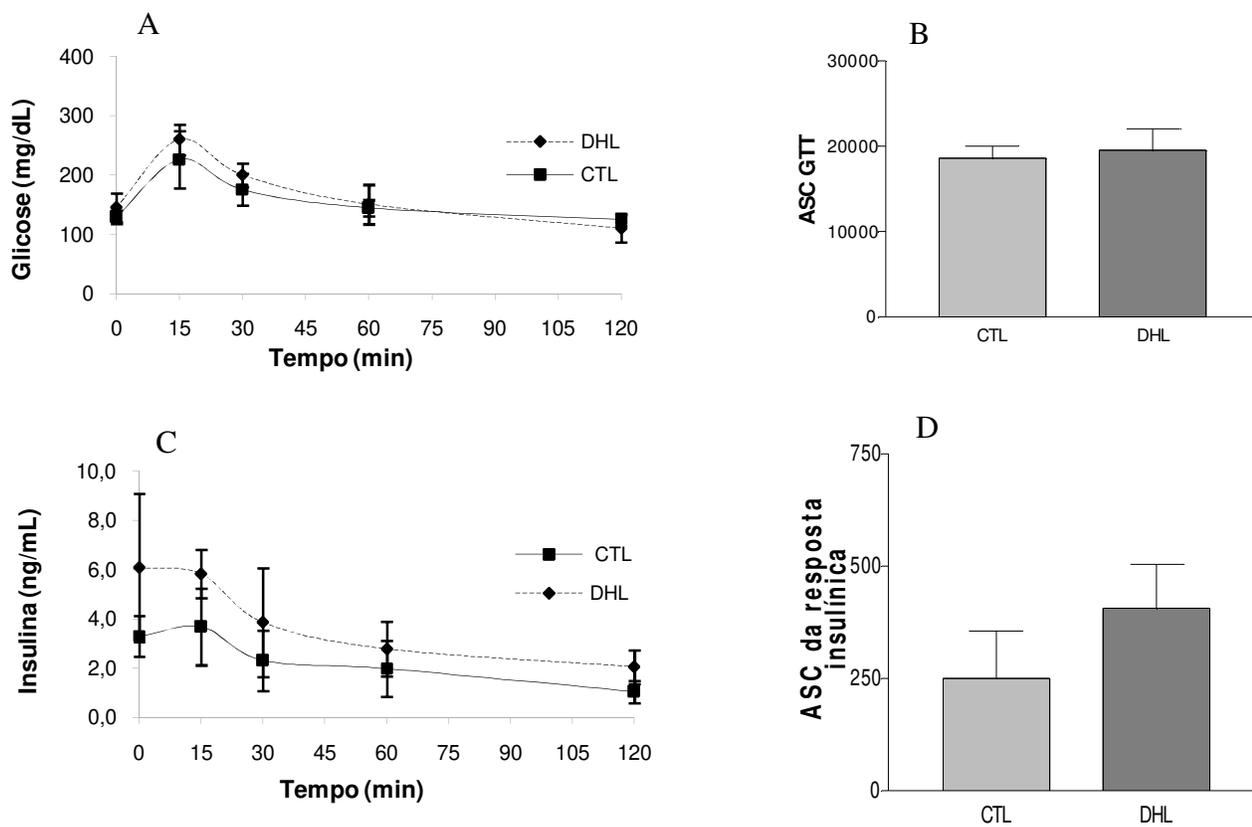


Figura 7. a) Teste de tolerância à glicose em machos PN8s. **b)** ASC. (CTL n=7 e DHL n=6). **c)** Resposta insulínica. **d)** ASC da resposta insulínica. Os resultados estão expressos como média \pm DPM (n=4). Teste *t* de Student.

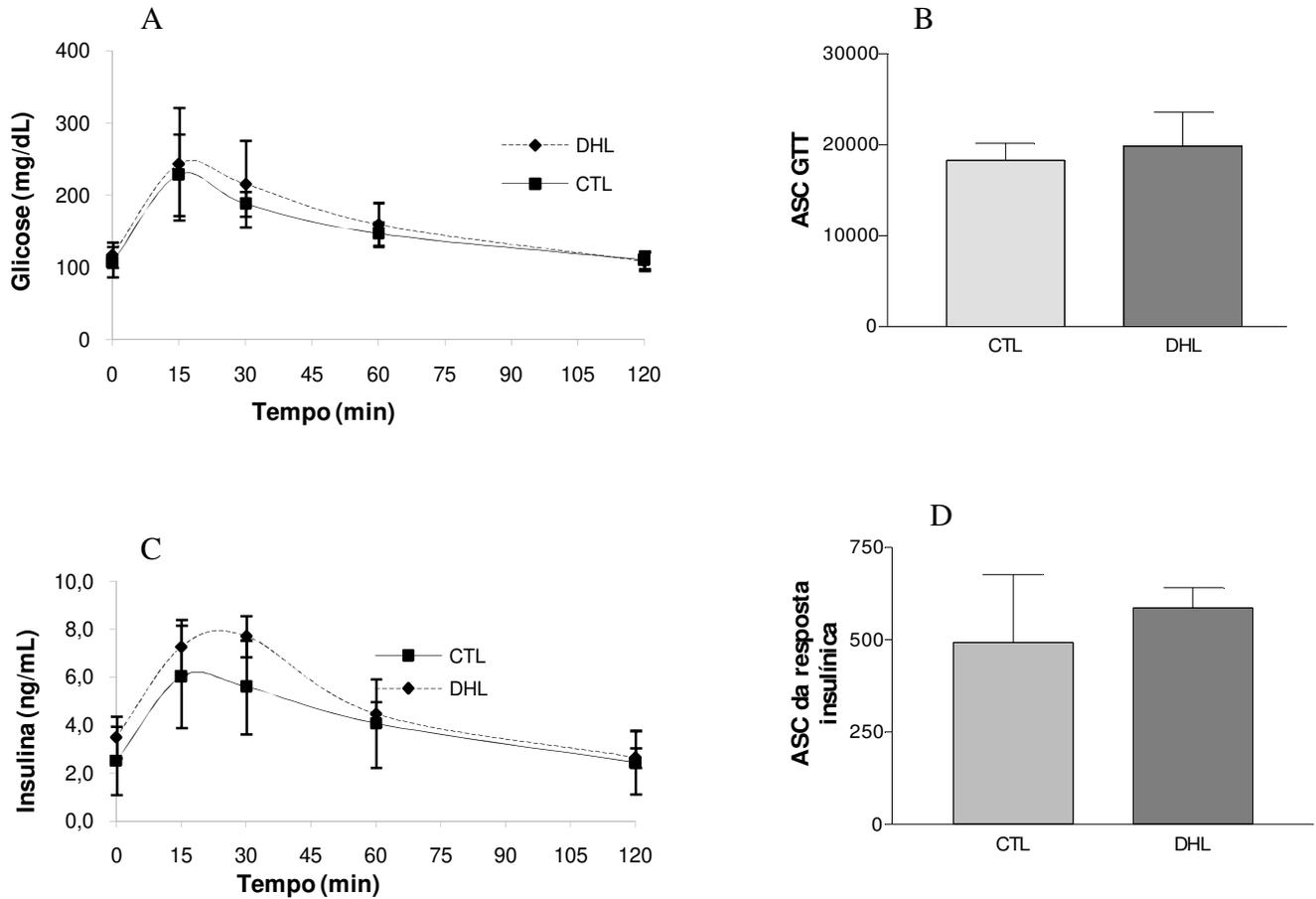


Figura 8. **a)** Teste de tolerância à glicose em machos PN16s. **b)** ASC. (CTL n=7 e DHL n=10). **c)** Resposta insulínica. **d)** ASC da resposta insulínica. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (CTL n=4 e DHL n=3). Teste *t* de Student.

Na **Tabela 4** mostra o perfil bioquímico plasmático dos ratos machos nos períodos pós-natais PN12d, PN8s e PN16s. Não foram observadas diferenças significativas para a glicemia de jejum, colesterol e HDL entre CTL e DHL, porém os níveis de triglicérides plasmáticos mostram-se maiores em PN16s no grupo DHL. Observa-se também que, independentemente do tratamento, os níveis de colesterol, triglicérides, insulina e a glicemia mudam com o passar da idade.

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos de machos PN12d, PN8s e PN16s

	PN12d			PN8s			PN16s		
	CTL	DHL	CTL	DHL	CTL	DHL	CTL	DHL	
Glicose mg/dL	105,33 ± 8,06 (12) ab	92 ± 6,1 (9)	83,79 ± 18,28 (14) a	89,88 ± 17,75 (16)	82,71 ± 18,78 (7) b	76,43 ± 13,43 (7)			
Insulina nd/ml	0,46 ± 0,38 (4)	0,83 ± 0,60 (4) a	3,29 ± 0,82 (4)	6,07 ± 2,99 (4) a	2,52 ± 1,4 (4)	3,49 ± 0,86 (3)			
Triglicérides mg/dL	111,15 ± 30,19 (6)	147,53 ± 41,93 (5) a	70,39 ± 24,91 (7)	76,32 ± 12,27 (7) ab	78,13 ± 11,83 (4)	133,18 ± 25,19 (7) ab*			
Colesterol mg/dL	150,32 ± 11,24 (8) ab	136,38 ± 13,48 (5) de	63,04 ± 5,29 (7) ac	67,77 ± 10,13 (7) d	92,67 ± 25 (4) bc	73,99 ± 16,46 (7) e			
HDL-col mg/dL	-----	-----	38,8 ± 4,38 (7)	38,32 ± 4,83 (7)	41,03 ± 8,44 (4)	34,76 ± 5,99 (7)			

* P < 0,05: Comparação entre CTL e DHL. abcde P < 0,05: Comparação entre idades PN12d, PN8s e PN16s do mesmo tratamento. ANOVA – post test Bonferroni.

A **Figura 9** apresenta massa relativa do fígado (por 100g massa corporal) dos machos com 8 e 16 semanas de vida. Observa-se que não houve diferença entre os grupos estudados. Em PN16s o coração da prole DHL apresentou uma maior massa relativa (**Figura 10**) assim como o rim esquerdo dos machos PN8s em relação aos respectivos controles (**Figura 11**). O comprimento relativo do intestino delgado foi maior nos machos PN8s da prole DHL, porém o intestino grosso não apresentou qualquer diferença de tamanho entre os grupos CTL e DHL. (**Figura 12 e 13**).

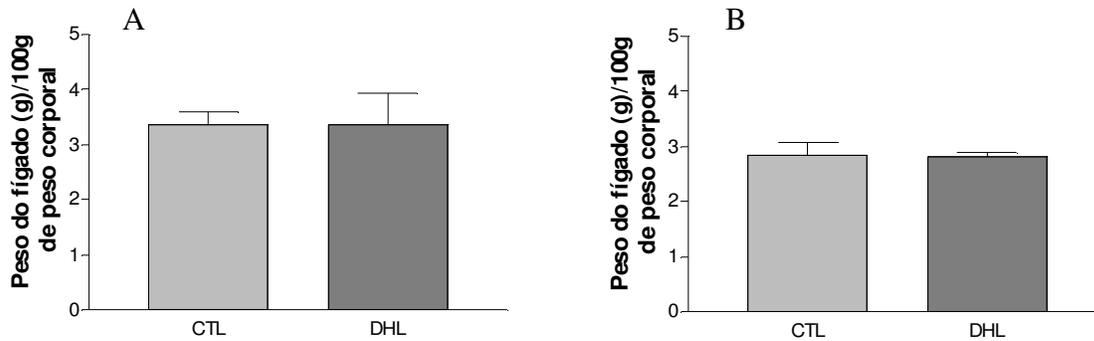


Figura 9. Peso relativo do fígado em machos PN8s e PN16s (A e B respectivamente). Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 7 DHL n=5). Teste *t* de Student.

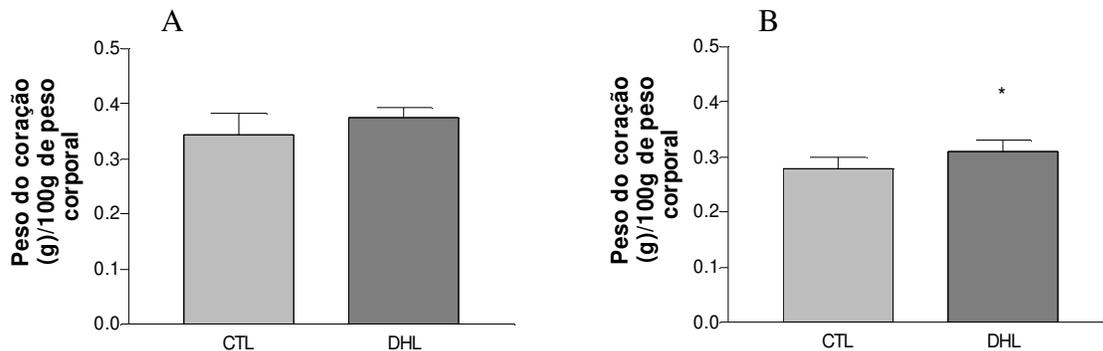


Figura 10. Peso relativo do coração em machos PN8s e PN16s (A e B respectivamente). Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n=7 DHL n=5) Teste *t* de Student. * $p < 0,05$.

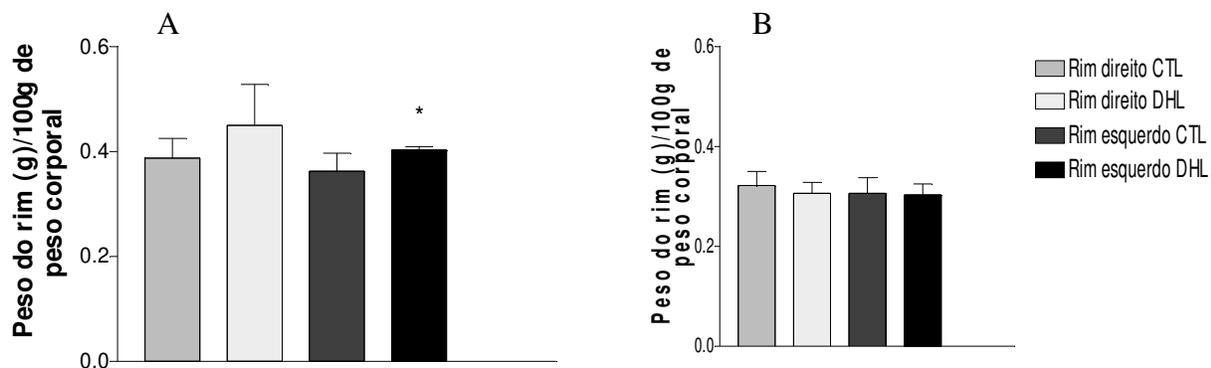


Figura 11. Massa relativa (por 100g massa corporal) dos rins direito e esquerdo em machos PN8s e PN16s (A e B respectivamente). Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 7 DHL n=5) Teste *t* de Student * $p < 0,05$.

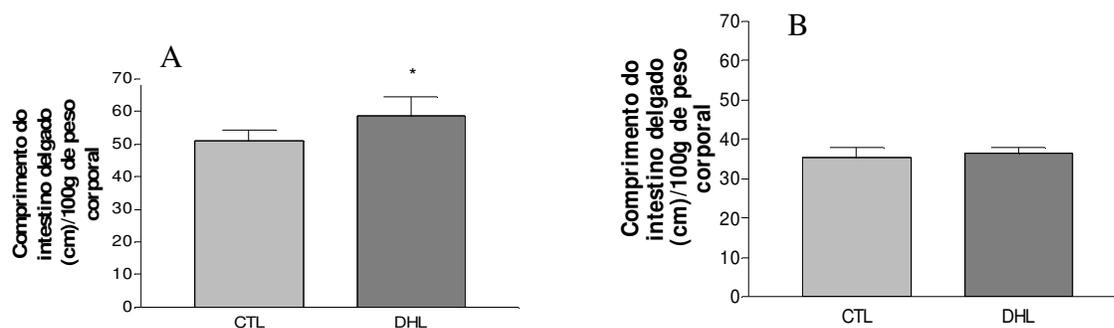


Figura 12. Comprimento relativo (cm/100g massa corporal) do intestino delgado em machos PN8s e PN16s. (A e B respectivamente). Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 7 DHL n=5). Teste *t* de Student * $p < 0,05$.

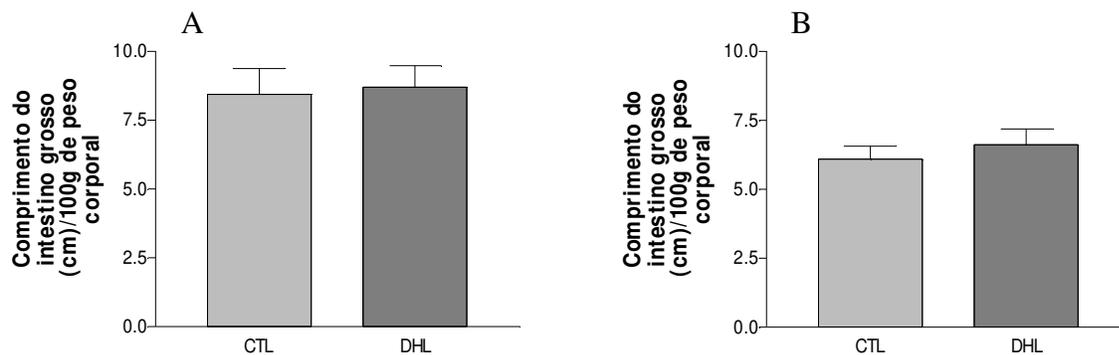


Figura 13. Comprimento relativo (cm/100g massa corporal) do intestino grosso em machos PN8s e PN16s. (A e B respectivamente). Os resultados estão expressos como média \pm DPM (CTL n= 7 DHL n=5). Teste *t* de Student.

A **figura 14** mostra a expressão de SR-BI na placenta de ratas no 17^o dia de gestação. Não houve diferença significativa entre os grupos CTL x DHL. Esta observação foi também confirmada por imunistoquímica. Verificamos que SR-BI está localizado nas células endoteliais do labirinto da placenta, nas células da zona juncional e nas células trofoblásticas gigantes (**Figura 15**). A localização de ABCA1, por imunistoquímica, observa-se principalmente nas células gigantes e na zona juncional, com pouca marcação nas células do labirinto. Em animais DHL observamos aumento na expressão deste receptor nas células trofoblásticas do labirinto e não nas endoteliais. Observamos ainda redução na imunolocalização de ABCA1 nas células trofoblásticas gigante (**Figura 16**).

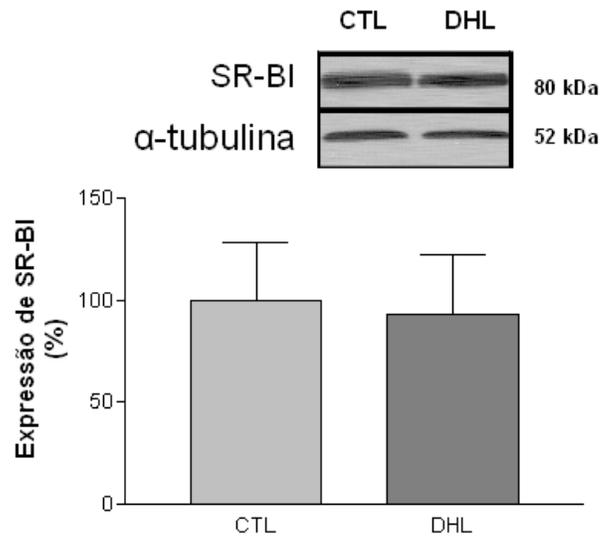


Figura 14. Expressão da proteína SR-BI (%) na placenta de ratas no 17^o dia de gestação. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (n=8) Test *t* de Student.

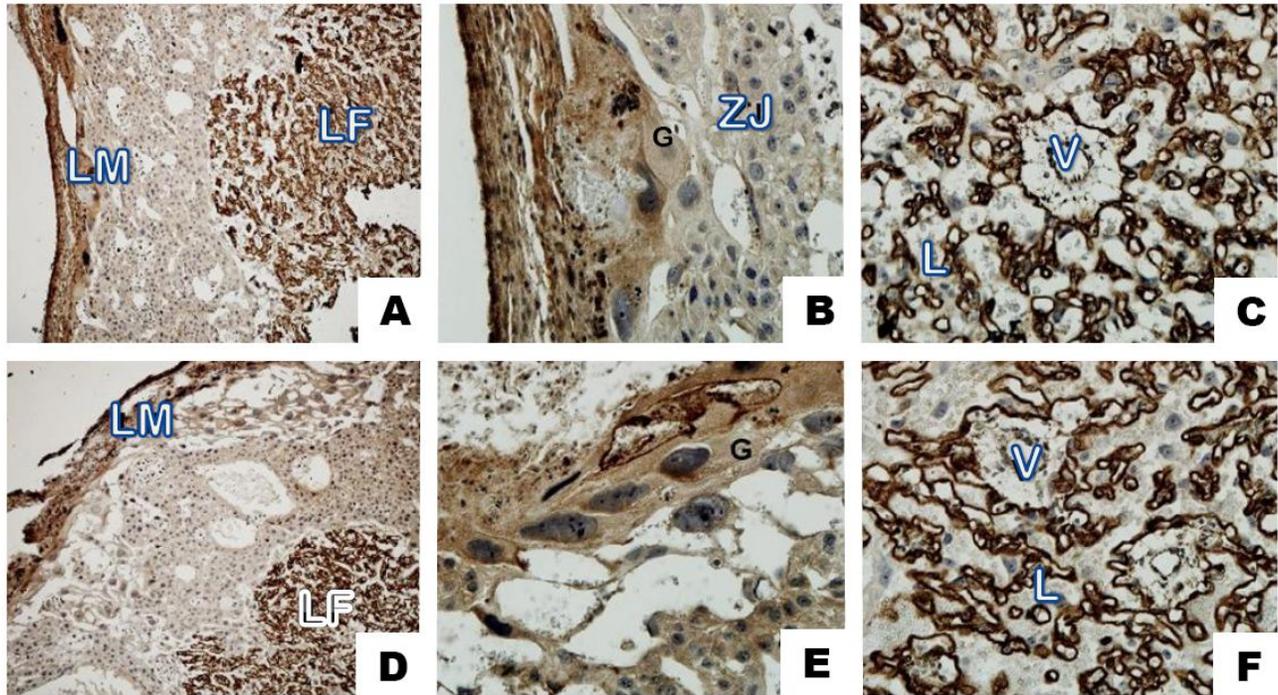


Figura 15. Imuno-localização de SR-BI na placenta de ratas E17. **A-C)** Grupo CTL. **D-F)** Grupo DHL. Em A e D temos uma visão do lado materno (**LM**) e do lado fetal (**LF**). Em **B** e **E** observamos as células trofoblásticas gigante (**G**). Em **C** e **F** temos a região do labirinto. Repare que este receptor ocorre nas células endoteliais delimitando o percurso vascular. **V**: vaso; **L**: labirinto. Aumento 100x **A** e **D** e 400x **B**, **C**, **E** e **F**.

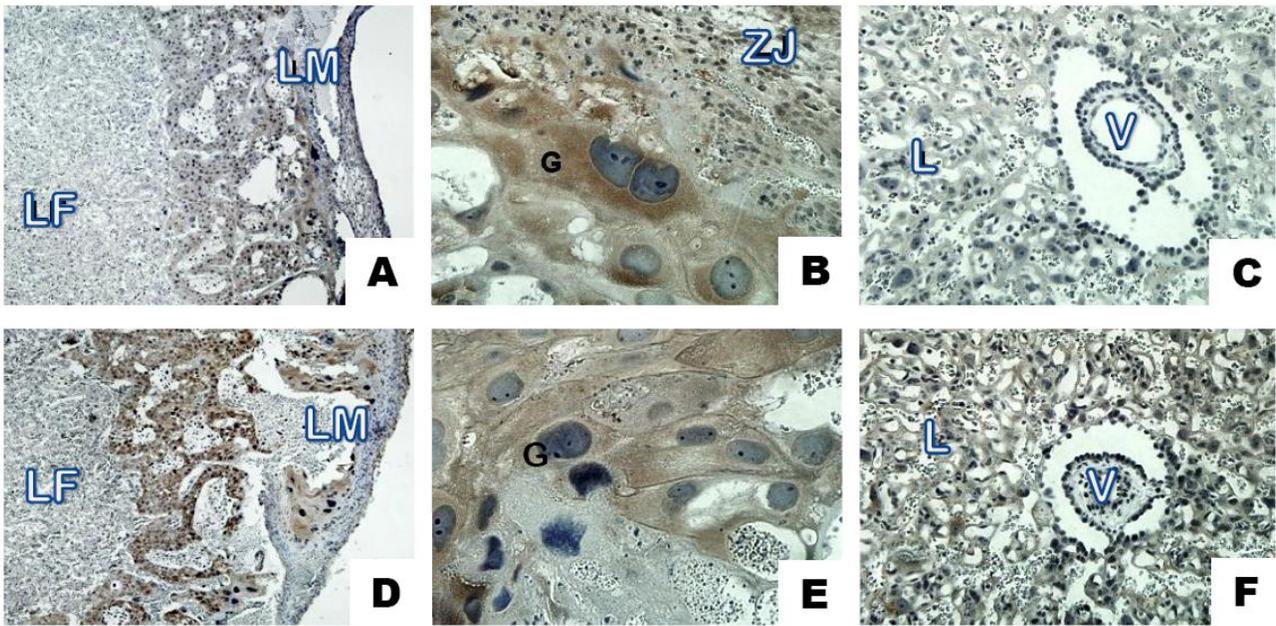


Figura 16. Imuno-localização de ABCA1 na placenta de ratas E17. **A-C)** Grupo controle. **D-F)** Grupo dieta. Em **A** e **D** temos uma visão do lado materno (**LM**) e do lado fetal (**LF**). Observe que a imunomarcção é mais forte em **D**. Em **B** e **E** observamos que a marcação é menor nas células trofoblásticas gigante (**G**) dos animais DHL. Em **C** e **F** temos a região do labirinto. Repare que o padrão de localização deste receptor é diferente daquele observado para SR-BI e a marcação é maior em animais DHL. **V**: vaso; **L**: labirinto. Aumento 100x **A** e **D** e 400x **B**, **C**, **E** e **F**.

Embora o epitélio do intestino ainda estivesse em desenvolvimento (com limitada capacidade absorptiva nessa idade), pode-se observar já nessa idade, a presença dos receptores SR-BI e ABCA1. A ingestão materna de dieta hiperlipídica causou redução de 21,33% na expressão de SR-BI, embora não significativa (**Figura 17**). A análise por imunoistoquímica mostra a localização deste receptor nos enterócitos, em células presentes na porção que originará a lâmina própria, a submucosa e na muscular externa (**Figuras 18 A, C e E**). Nos animais do grupo DHL observamos redução na expressão e alteração na localização dos receptores nos enterócitos. Assim, no controle ele se apresenta disperso em todo o citosol dos enterócitos bem como na membrana e nos animais HDL está restrito às membranas basolaterais e, mais concentrado, nas microvilosidades apicais (**Figuras 18 C e D**). Quanto ao receptor ABCA1 sua expressão intestinal foi reduzida, embora a diferença não tenha significancia estatística, em 49% (**Figura 19**). Pela imuno-localização observamos que

em ambos os grupos este receptor se localiza nas microvilosidades apicais dos enterócitos, em células da submucosa e na muscular externa (**Figura 20**). A expressão deste receptor foi diminuída em todas camadas intestinais no grupo HDL.

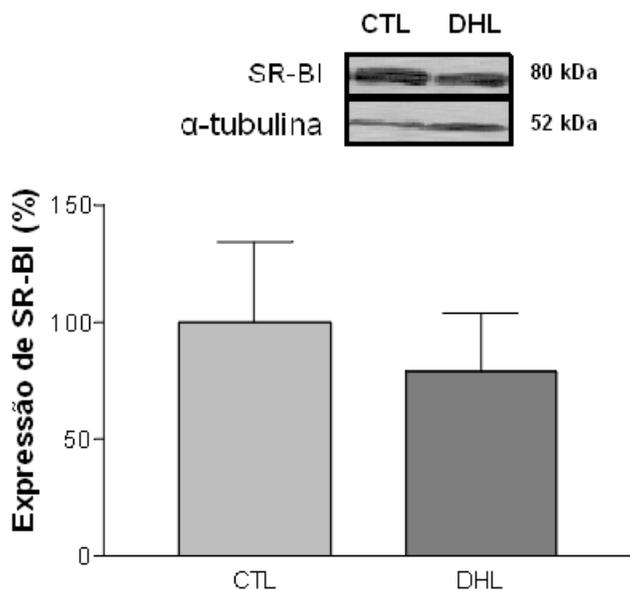


Figura 17. Expressão da proteína SR-BI (%) no intestino de ratos E17. Os resultados estão expressos como média ± DPM. (n=4) Teste *t* de Student.

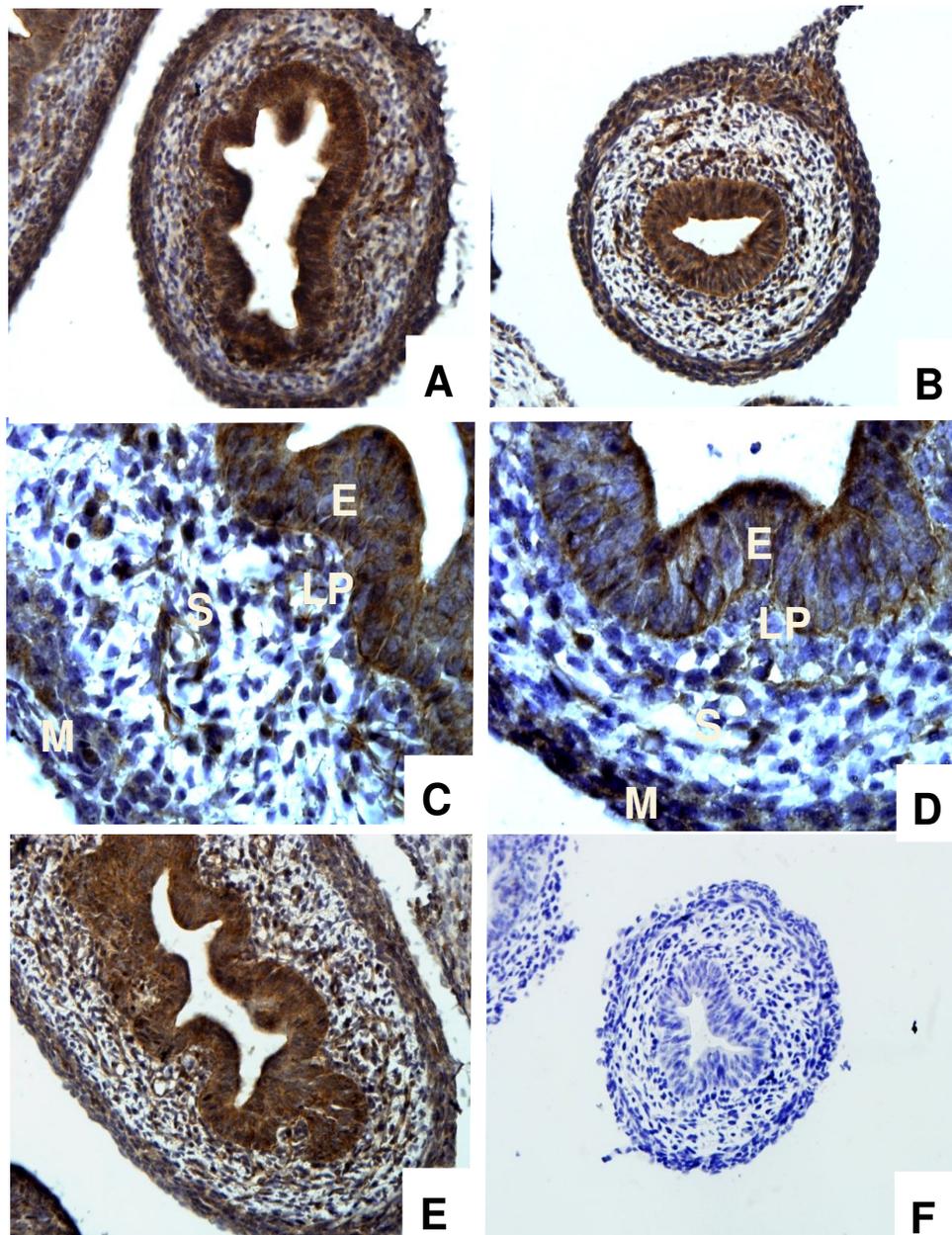


Figura 18. Imuno-localização de SR-BI no intestino delgado de ratos E17. **A e B)** CTL e DHL respectivamente. Em **C** detalhe da localização deste receptor nas camadas intestinais em animais CTL. Observe a localização na membrana e citosol das células que originarão os epitélios (**E**) de revestimento e glandular. Em algumas células presentes na porção que originará a lâmina própria (**LP**) e a submucosa (**S**) observamos localização deste receptor, bem como na camada muscular externa (**M**). Em D, observe que SR-BI localiza-se apenas na membrana das células epiteliais em animais DHL. **E)** Detalhe da formação das vilosidades em CTL. **F)** controle negativo. Aumento 400x **A, B, E e F** e 1000x **C e D**.

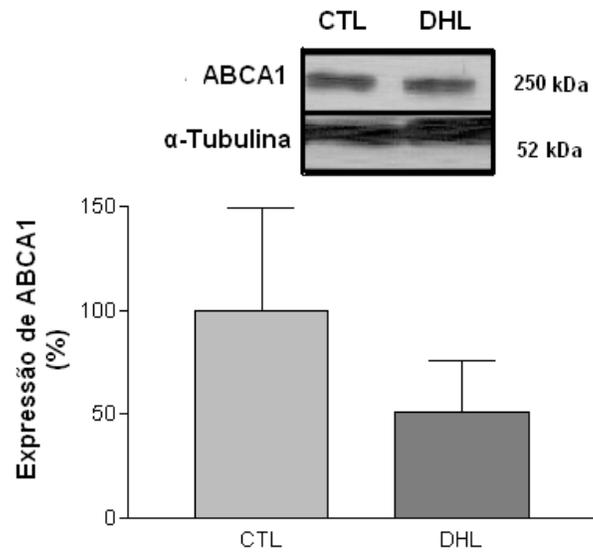


Figura 19 . Expressão da proteína ABCA1 (%) no intestino delgado de ratos com 17 dias de vida fetal. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (n=3) Teste *t* de Student.

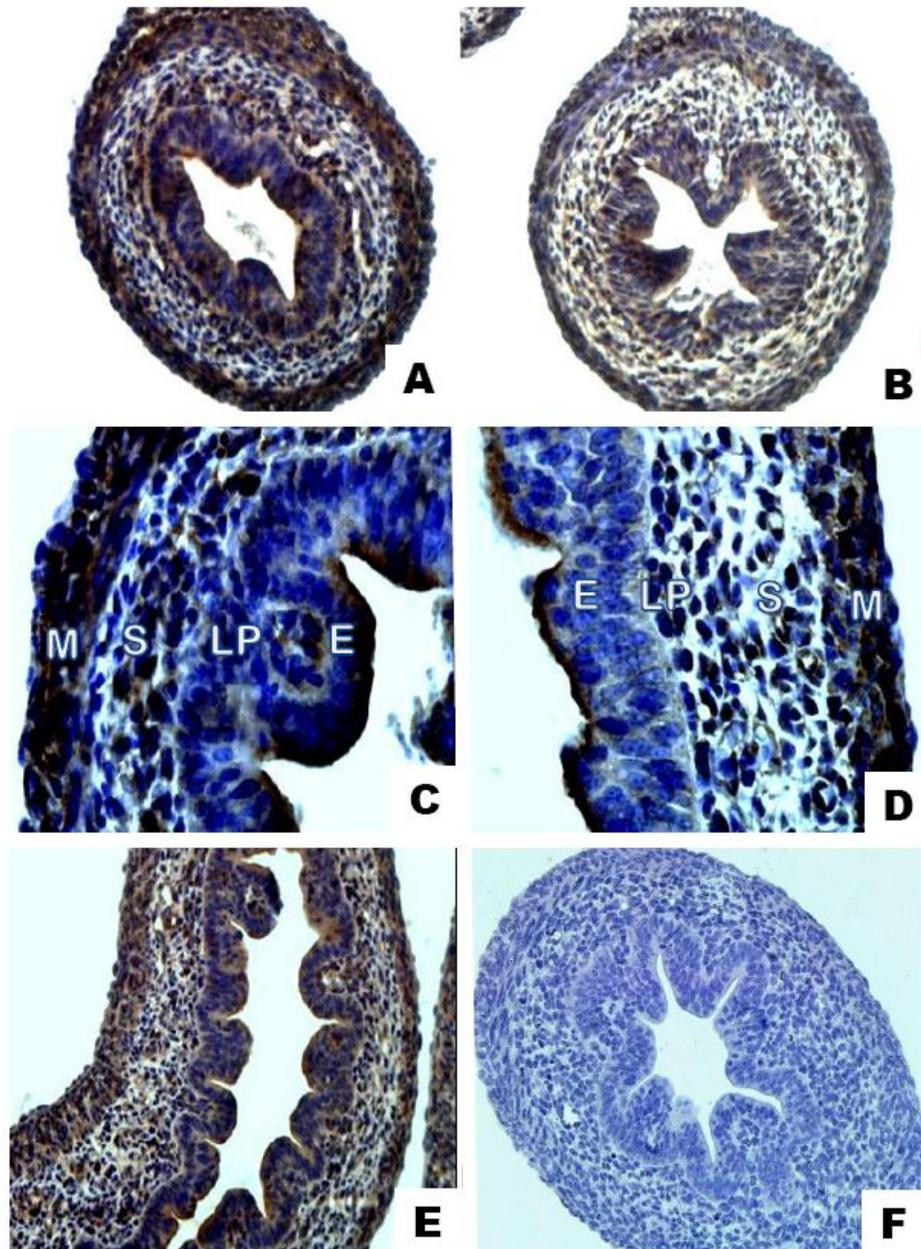


Figura 20. Imuno-localização de ABCA1 no intestino delgado de ratos E17. **A e B)** CTL e DHL respectivamente. Observe que a marcação é bem mais fraca em todas as camadas nos animais DHL. Em **C** detalhe da localização deste receptor nas camadas intestinais em animais CTL. Observe a forte localização na membrana apical das células que originarão os epitélios (**E**) de revestimento e glandular. Em algumas células presentes na porção que originará a lâmina própria (**LP**) e a submucosa (**S**) observamos localização deste receptor, bem como grande concentração na camada muscular externa (**M**). Em **D**, observe a redução na marcação em DHL. **E)** Detalhe da formação das vilosidades em CTL. **F)** controle negativo. **Aumento 400x A, B, E e F e 1000x C e D.**

A expressão de SR-BI parece ser maior no duodeno e jejuno nos animais com 12 dias de vida, tanto nos enterócitos quanto na lâmina própria, quando comparado a prole de 8 e 16 semanas pós-natal em ambos os grupos CTL ou DHL. A expressão deste receptor é maior em animais DHL com 12 dias (**Figura 21**). A avaliação de SR-BI nos demais tempos de vida não revelou modificações em sua expressão. O SR-BI foi principalmente localizado na região apical do enterócito, nas microvilosidades, e marcação moderada no citoplasma. As criptas intestinais também mostraram marcação positiva para SR-BI (**Figura 21 e 22**). No íleo diferentemente das outras duas porções do intestino delgado, há discreta localização de SR-BI, predominando na região intracelular com pouca ou nenhuma marcação na região apical do enterócito (**Figura 23**).

Na **Figura 24** observa-se que diferentemente de SR-BI a marcação de ABCA1 no duodeno ocorre predominantemente nas células caliciformes. Esta localização parece estar restrita às vesículas de reserva lipídica (musinogênio) destas células e, nos animais DHL com PN8s, a expressão nestas células é menor do que a observada no controle (**Figura 24 A-D**). Observamos redução evidente na expressão de ABCA1 nas glândulas mucosas de Brünner presentes na submucosa (**Figura 24 A e B**). Esta proteína foi também observada em células do tecido conjuntivo e no endotélio de vasos na lâmina própria e na submucosa, e a expressão foi maior nos animais do grupo DHL (**Figura 24 A-D**). Também observamos marcação intensa na região do plexo mioentérico (Auerbach) e na muscular externa.

Nos animais de 16 semanas observamos aumento na expressão desta proteína nas glândulas de Brünner paralelamente à redução no tecido conjuntivo da submucosa e na muscular externa dos animais DHL (**Figura 24 E-F**).

No jejuno a expressão de ABCA1 é muito mais intensa que a observada no duodeno (**Figura 25**). A localização deste receptor também é diferente no jejuno ocorrendo tanto em células caliciformes quanto nos enterócitos. Também na lâmina própria, em células endoteliais, na submucosa e na muscular externa sua expressão é maior que a observada no duodeno. A comparação entre os grupos não revelou diferenças no padrão de expressão (**Figura 25**).

No íleo a localização do receptor ABCA1 em animais de 8 semanas é similar à observada no duodeno, isto é, preferencialmente nas células caliciformes (**Figura 26 A e B**). A expressão deste receptor é maior nos animais DHL de PN8s tanto nas caliciformes quanto

na lâmina própria. Com 16 semanas de vida não foi observada diferença entre os grupos (**Figura 26 C e D**).

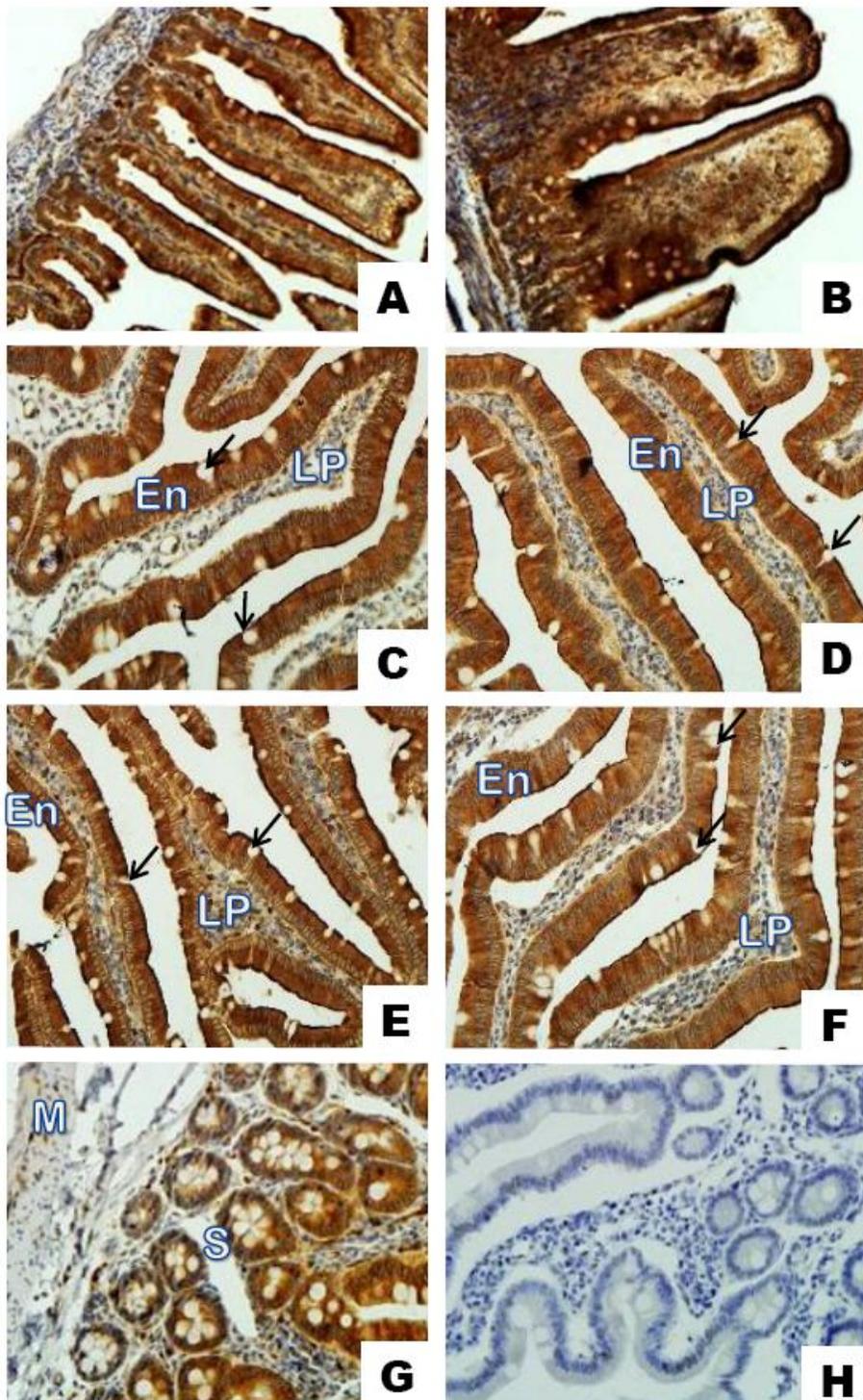


Figura 21. Imuno-localização de SR-BI no duodeno de machos PN12d (A e B), PN8s (C e D) e PN16s (E e F). Grupo controle. (A,C, E, e G) Grupo dieta (B, D eF). H) Controle negativo. G) Detalhe das glândulas de Brünner. **En.** Enterócitos; **LP.** Lâmina própria; **S.** Submucosa; **M.** Camada muscular externa; **Seta.** Célula caliciforme. Aumento 400x.

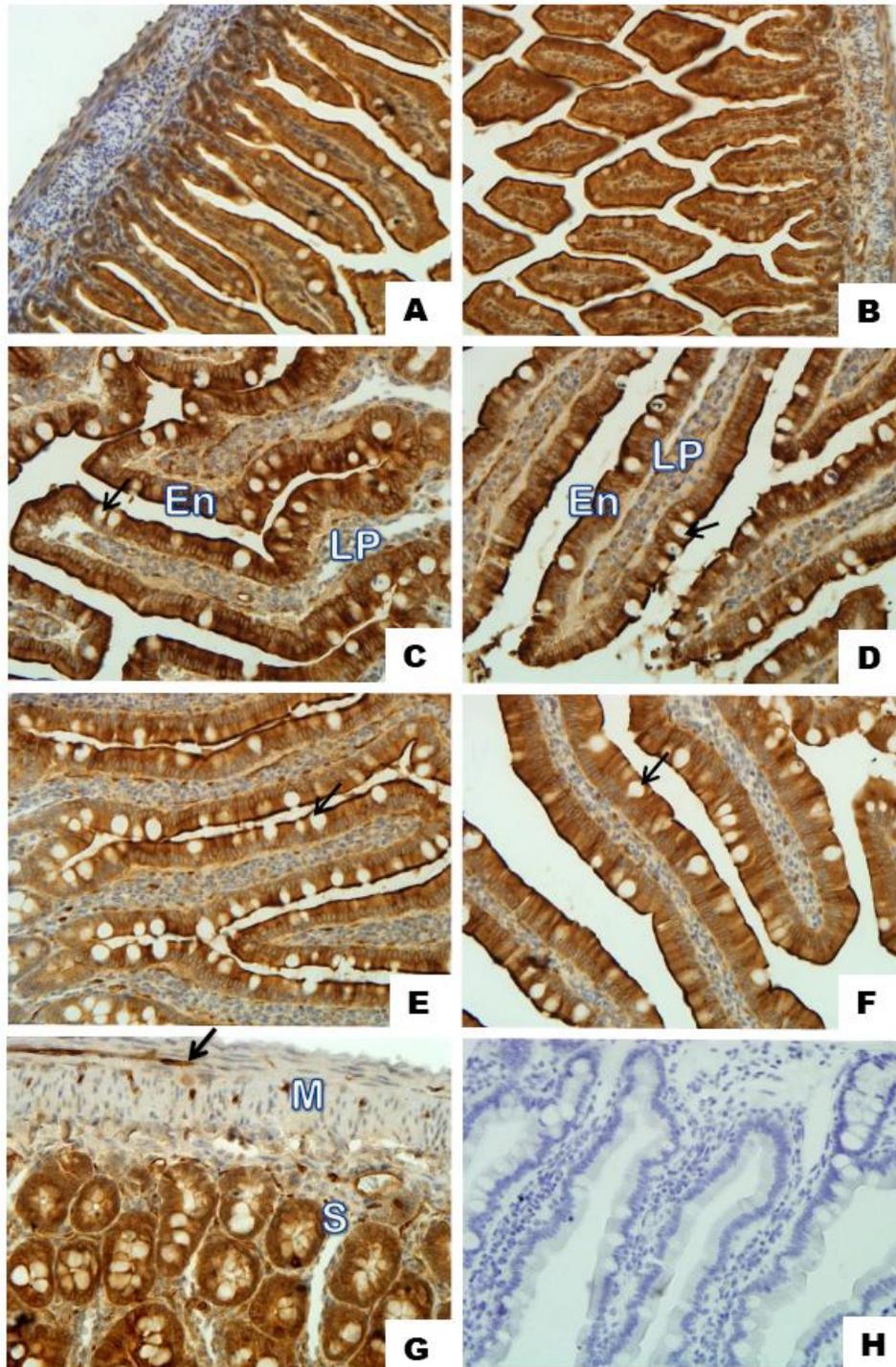


Figura 22. Imuno-localização de SR-BI no jejunum de machos PN12d (A e B), PN8s (C e D) e PN16s (E e F). Grupo controle. (A,C, E, e G) Grupo dieta (B, D eF). H) Controle Negativo. G) Detalhe da região glandular. En. Enterócitos; LP. Lâmina própria; S. Submucosa; M. Camada muscular externa; **Seta preta.** Célula caliciforme; **Seta preta (bold).** Plexo Mioentérico. Aumento 400x.

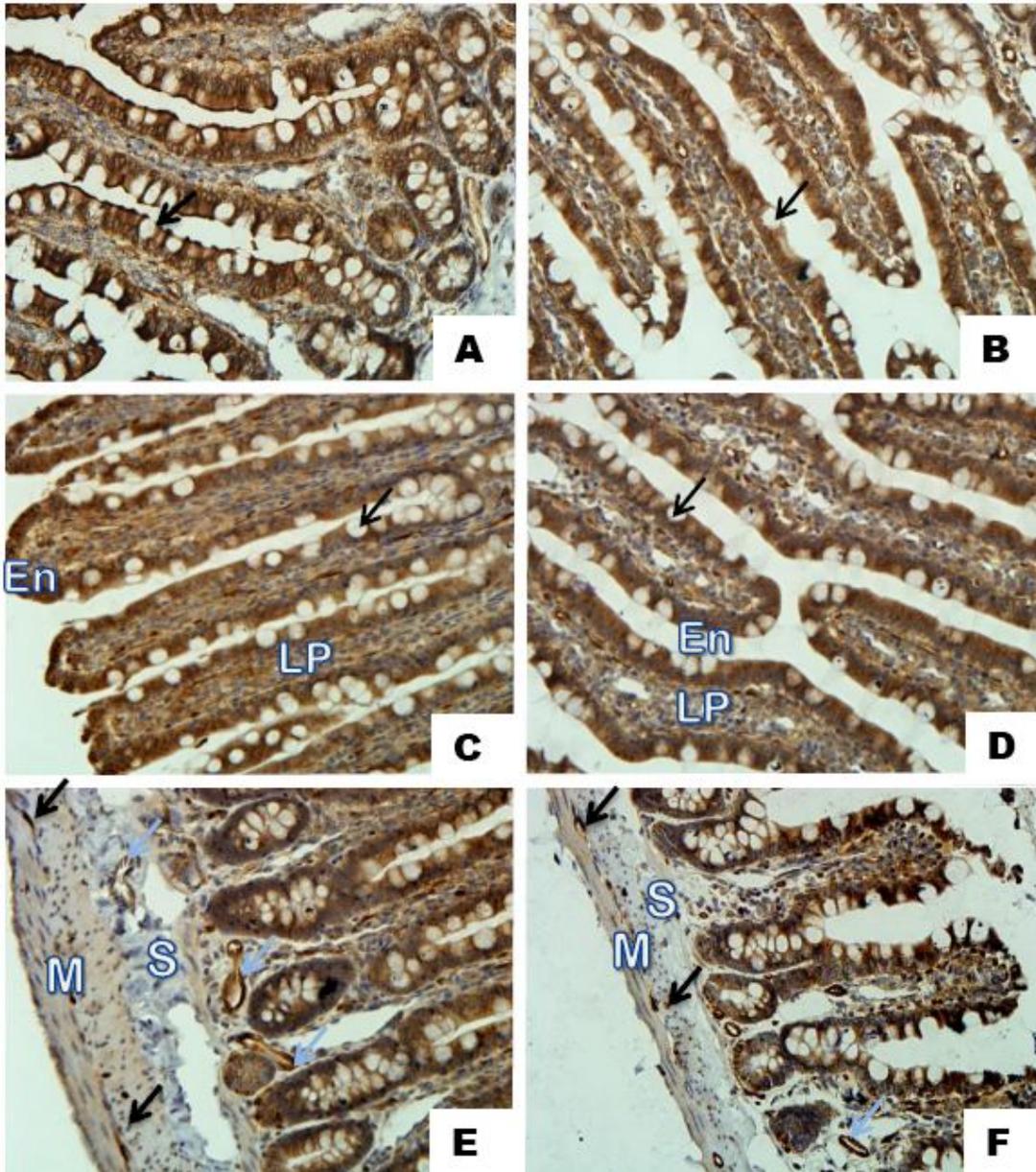


Figura 23. Imuno-localização de SR-BI no íleo de machos PN8s (A e B) e PN16s (C e D). E e F região glandular. Grupo controle (A, C, e E) Grupo dieta (B, D e F). En. Enterócitos; LP. Lâmina própria; S. Submucosa; M. Camada muscular externa; **Seta preta.** Célula caliciforme; **Seta preta (bold).** Plexo Mioentérico; **Seta azul.** Endotélio vascular. Aumento 400x.

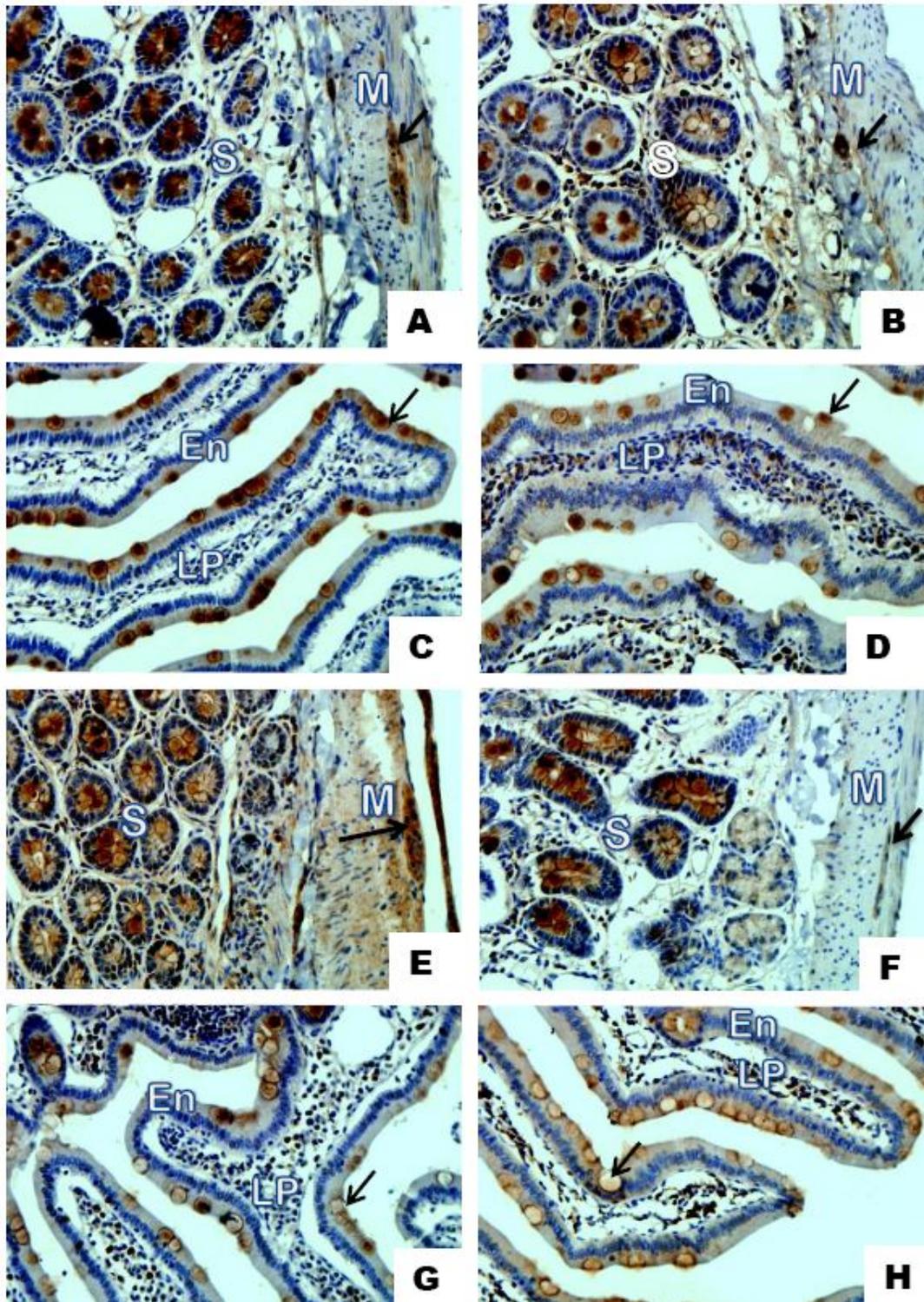


Figura 24. Imuno-localização de ABCA1 no duodeno de machos PN8s (A, B, C e D) e PN16s (E, F, G, e H). A, C, E, e G) Grupo controle. B, D, F e H) Grupo dieta. En. Enterócitos; LP. Lâmina própria; S. Submucosa; M. Camada muscular externa; **Seta preta**. Célula caliciforme; **Seta preta (bold)**. Plexo Mioentérico. Aumento 400x.

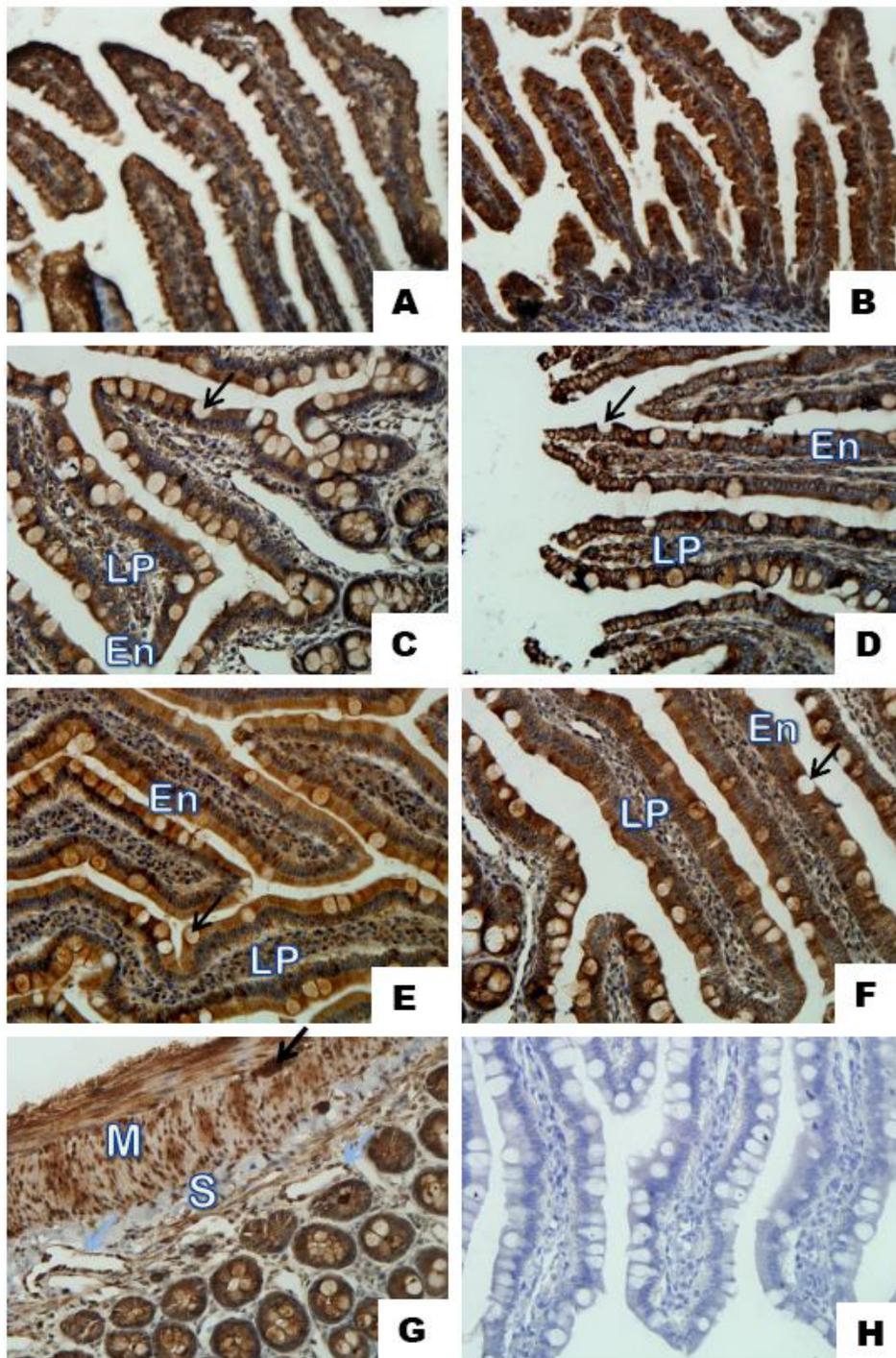


Figura 25. Imuno-localização de ABCA1 no jejuno. (A e B) PN12d. (C e D) PN8s. (E e F) PN16s. (A, C, E e G) Grupo controle. B, D, F) Grupo dieta. H) Controle negativo. G) Detalhe da camada muscular. **En.** Enterócitos; **LP.** Lâmina própria; **S.** Submucosa; **M.** Camada muscular externa; **Seta preta.** Célula caliciforme; **Seta preta (bold).** Plexo Mioentérico; **Seta azul.** Endotélio vascular. Aumento 400x.

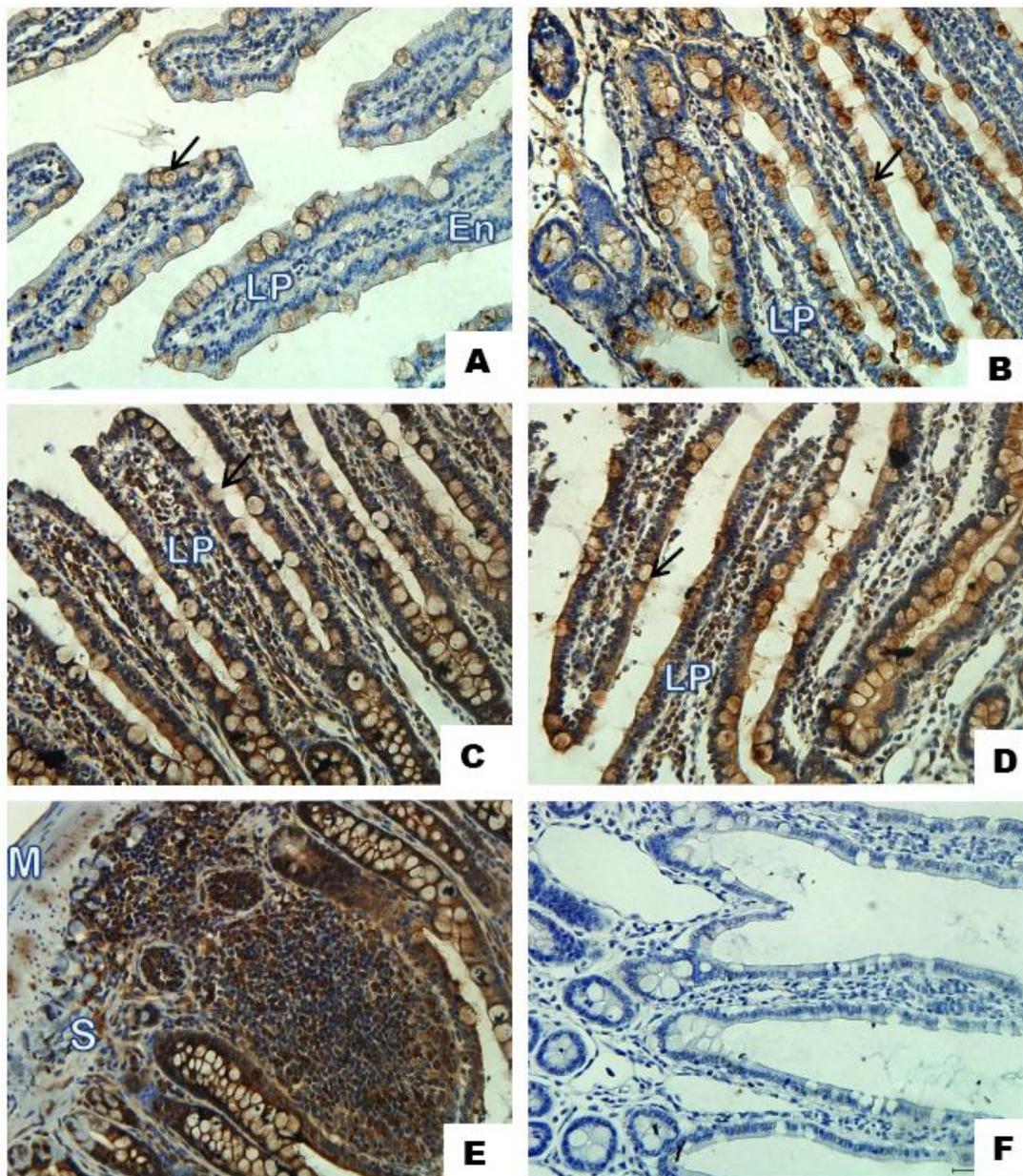


Figura 26. Imuno-localização de ABCA1 no íleo de machos PN8s (A e B) e PN16s (C e D). Grupo controle. (A e E) Grupo dieta (B e D). E) Detalhe de uma placa de Peyer. F) Controle Negativo. **En.** Enterócitos; **LP.** Lâmina própria; **S.** Submucosa; **M.** Camada muscular externa; **Seta preta.** Célula caliciforme. Aumento 400x.

No fígado a técnica de western blot não revelou diferença na expressão de SR-BI em animais E17 quando comparados os grupos CTL e DHL (**Figura 27**). Este receptor foi localizado na membrana dos hepatócitos em desenvolvimento (**Figura 29 A e B**). Sua expressão aumenta significativamente com 12 dias de vida (**Figuras 27 e 29 C e D**) porém, embora não significativo, é 7,7% menor em DHL comparativamente ao controle. Com 16 semanas de vida a expressão de SR-BI diminui comparativamente a observada com 12 dias e localiza-se, quase que exclusivamente, na membrana dos hepatócitos nas faces voltadas para os sinusóides (**Figura 29 E-H**).

Quanto aos receptores ABCA1 observamos diminuição de 15,35%, embora não significativa, na sua expressão com E17 pela técnica de westwern blot e na imunistoquímica a expressão também foi menor no grupo DHL (**Figuras 28 e 30 A e B**). Com 12 dias de vida a expressão é maior que a observada com E17 sendo este aumento maior e significativo nos animais DHL (**Figuras 28 e 30 C e D**). A expressão de ABCA1 foi 36% maior no grupo DHL com PN12d comparativamente ao controle.

Embora a técnica de western blot tenha demonstrado redução significativa na expressão deste receptor com 8 e 16 semanas, comparativamente aos períodos anteriores (**Figura 28**), pela imunistoquímica esta redução não foi evidente (**Figura 30 E-H**).

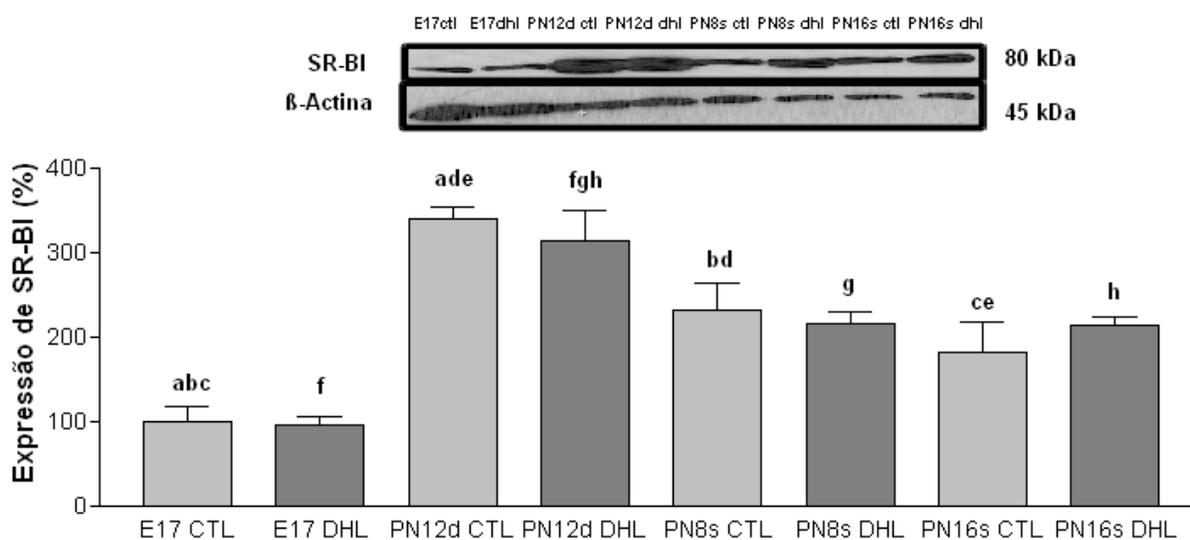


Figura 27. Expressão da proteína SR-BI (%) no fígado de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (n=3-4). ANOVA *post-hoc* Bonferroni acbdef = $P < 0,05$.

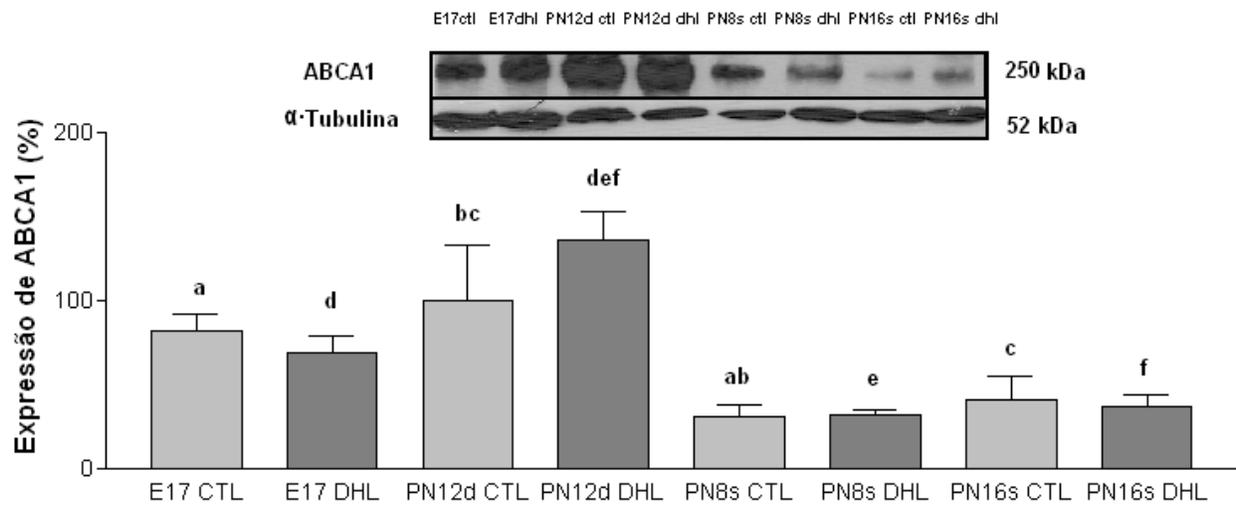


Figura 28. Expressão da proteína ABCA1 (%) no fígado de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (n=3-4). ANOVA *post-hoc* Bonferroni acbdef = $P < 0,05$.

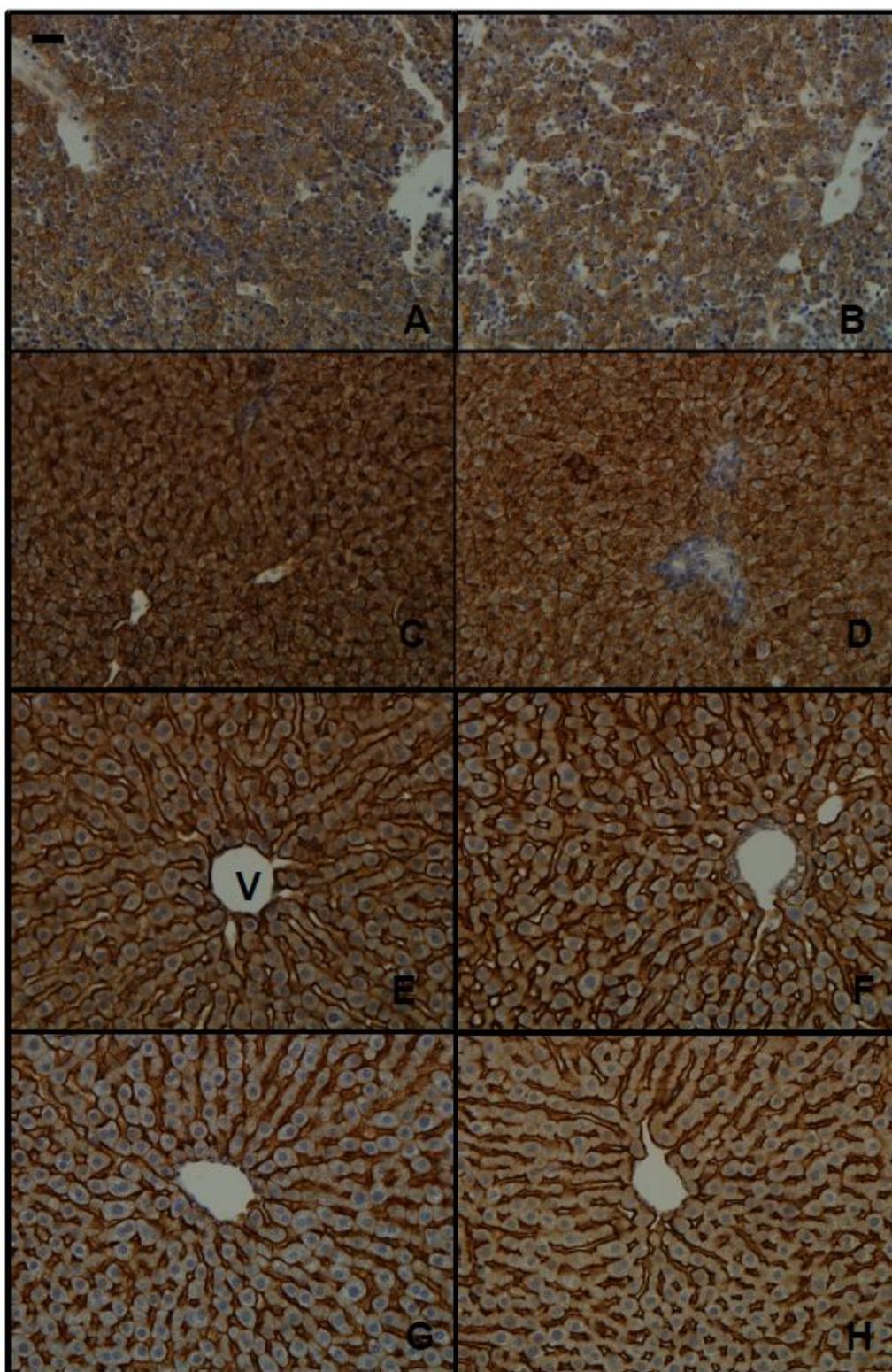


Figura 29. Imuno-localização de SR-BI no fígado de machos E17 (A e B), PN12d (C e D), PN8s (E e F) e PN16s (G e H). (A, C, E e G) Grupo controle. (B, D, F e H) Grupo Dieta. . Aumento 400x.

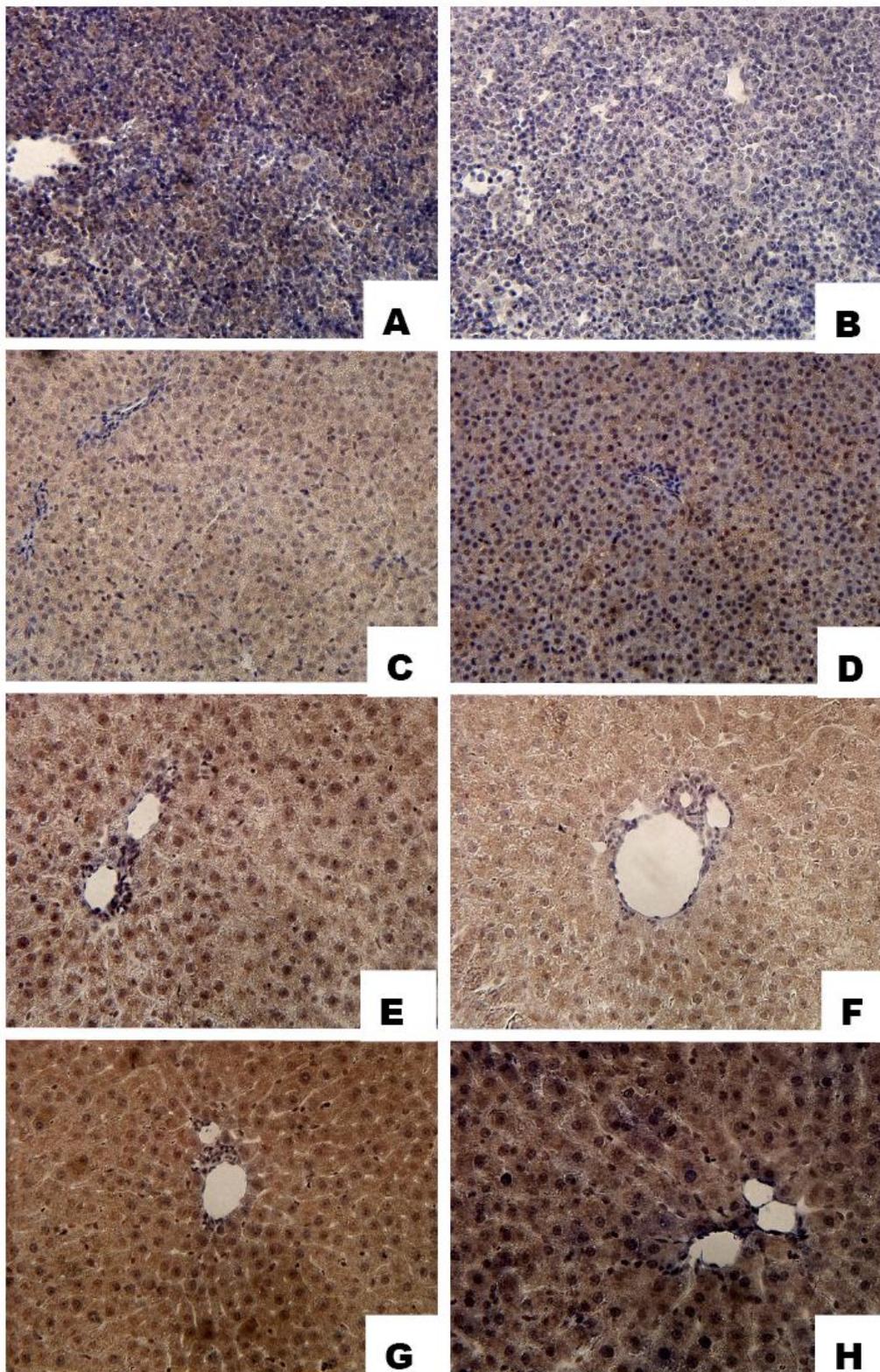


Figura 30. Imuno-localização de ABCA1 no fígado de machos E17 (**A e B**), PN12d (**C e D**), PN8s (**E e F**) e PN16s (**G e H**). (**A, C, E e G**) Grupo controle. (**B, D, F e H**) Grupo Dieta. Aumento 400x.

A **Figura 31** mostra a expressão renal de SR-BI em E17, PN12d, PN8s e PN16S . Pode-se observar a presença desse receptor já na vida fetal persistindo durante toda a vida dos animais estudados. Nos animais PN12d a expressão é maior. O estudo imunistoquímico revelou que em E17 este receptor é expresso nas células epiteliais em diferentes estágios da nefrogênese bem como nas células mesenquimais (**Figura 32 A e B**). Parece haver aumento na expressão deste receptor em animais DHL. No PN12d a expressão de SR-BI é maior quando comparada a observada em E17 ocorrendo em todos os segmentos tubulares e nos glomérulos. A expressão é mais intensa em segmentos pós-proximais (**Figura 32 C e D**). Embora a técnica de Western demonstre redução não significativa de 15% na expressão deste receptor em animais PN12d isso não foi evidente na imunistoquímica (**Figuras 31 e 32 C e D**). Com 8 semanas de vida os rins dos animais controle apresentam maior expressão deste receptor que se localiza nos segmentos tubulares pós-proximais, nos animais DHL, ocorre aumento de 35% na expressão deste receptor. Este aumento foi observado em segmentos proximais e nos tufo de capilares glomerulares (**Figuras 31 e 32 E e F**). Este aumento foi mais pronunciado em animais de 16 semanas de vida sendo sua expressão 85,8% maior no grupo DHL comparativamente ao controle (**Figuras 31 e 32 G e H**).

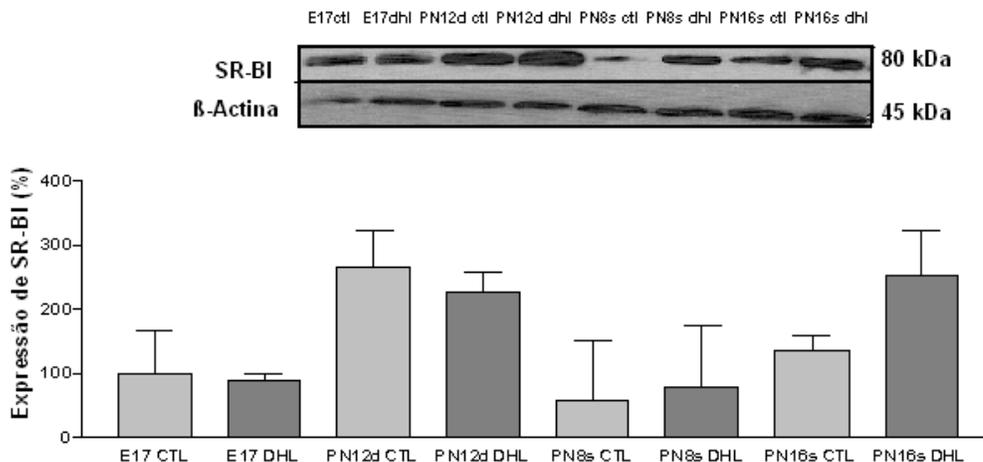


Figura 31. Expressão da proteína SR-BI (%) no rim da prole de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (n=3) ANOVA *post-hoc* Bonferroni .

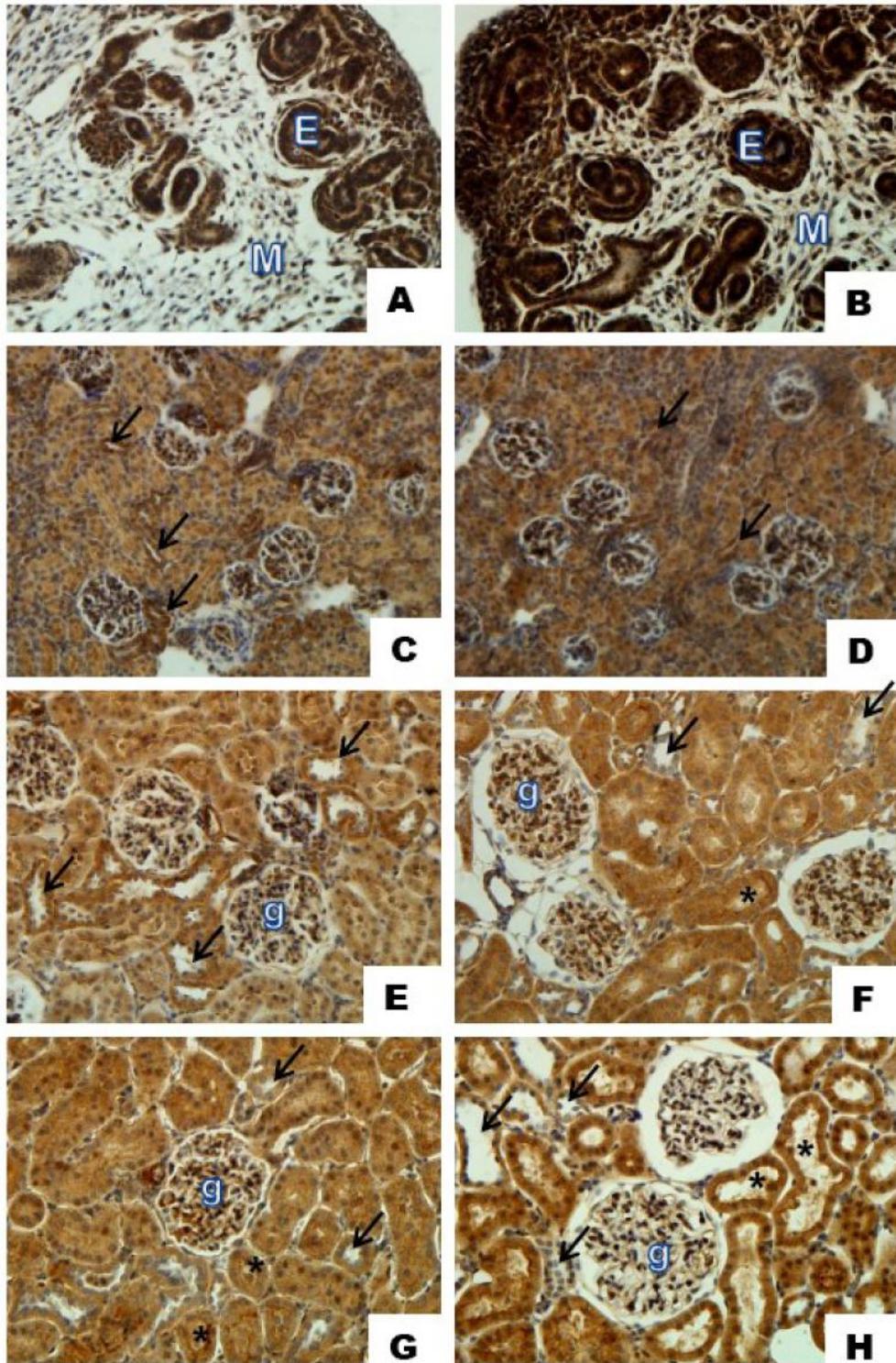


Figura 32. Imuno-localização de SR-BI no rim de machos E17 (A e B), PN12d (C e D), PN8s (E e F) e PN16s (G e H). A, C, E e G) Grupo controle. B, D, F e H) Grupo Dieta. E: epitélios do néfron em desenvolvimento; M: mesênquima metanefrogênico; Seta: segmentos pós-proximais; asterisco: segmentos proximais; g: glomérulo. Aumento 400x.

A expressão de ABCA1 no rim em desenvolvimento dos animais E17 foi, embora não significativa, 26,84% menor nos animais DHL (**Figura 33**). Pela imunistoquímica observamos intensa marcação nas células mesenquimais e, nos animais DHL, aumento tanto nestas células quanto nos nefrons em desenvolvimento (**Figura 36 A-B**). com 12 dias de vida a expressão deste receptor é mais intensa nos segmentos pós proximais dos animais controle e no grupo DHL observamos aumento de 14,7 % (não significativo) na expressão de ABCA1 estando também os segmentos proximais intensamente marcados (**Figuras 33 e 36 C e D**). Com 8 semanas de vida a expressão de ABCA1 é menor que a observada com 12 dias estando presente nos segmentos pós proximais, no epitélio parietal da capsula de Bowman e em células glomerulares (**Figuras 33 e 36 C-F**). Não observamos diferenças entre os grupos DHL e CTL. Já nos animais de 16 semanas observamos aumento de 94,28% na expressão de ABCA1 nos animais DHL pela técnica de Western blot (**Figura 35**). A imunistoquímica confirmou este aumento e este receptor foi expresso predominantemente nas células dos segmentos pós proximais e também nos proximais e nos tufo de capilares glomerulares (**Figura 36 G e H**).

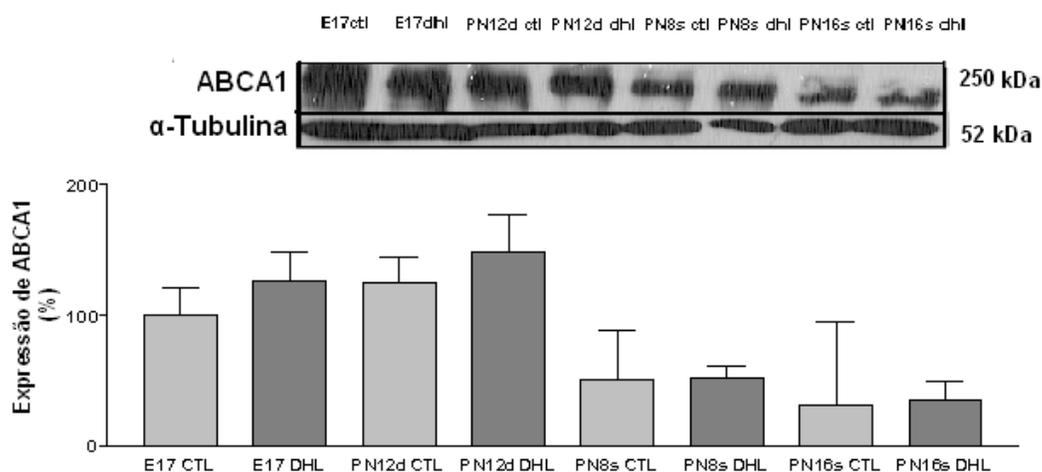


Figura 33. Expressão da proteína ABCA1 (%) no rim de machos E17, PN12d, PN8s e PN16s. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (n=3-4) ANOVA *post-hoc* Bonferroni.

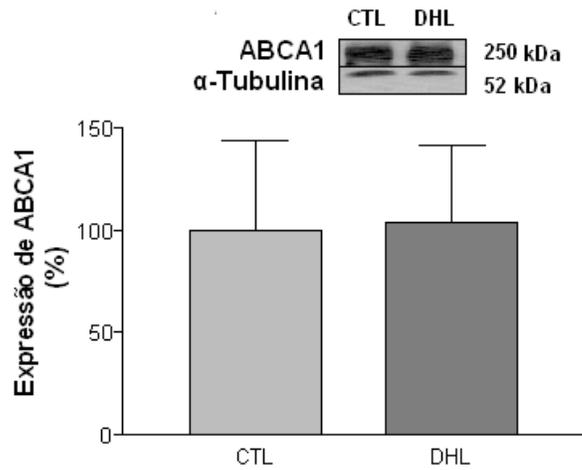


Figura 34. Expressão da proteína ABCA1 (%) no rim de machos PN8s . Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (n=4) Teste *t* de Student.

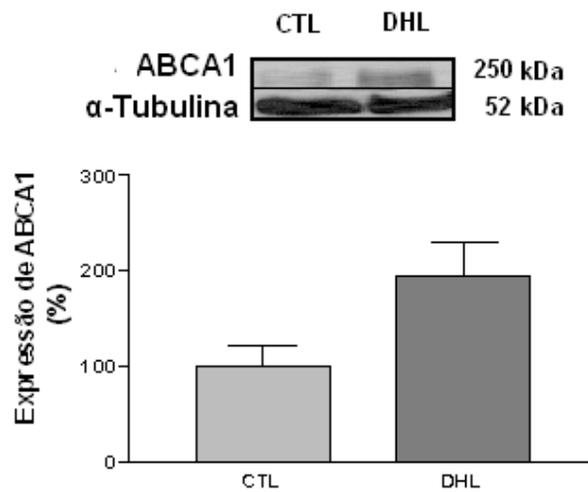


Figura 35. Expressão da proteína ABCA1 (%) no rim da prole machos PN16S. Os resultados estão expressos como média \pm DPM. (n=4) Teste *t* de Student.

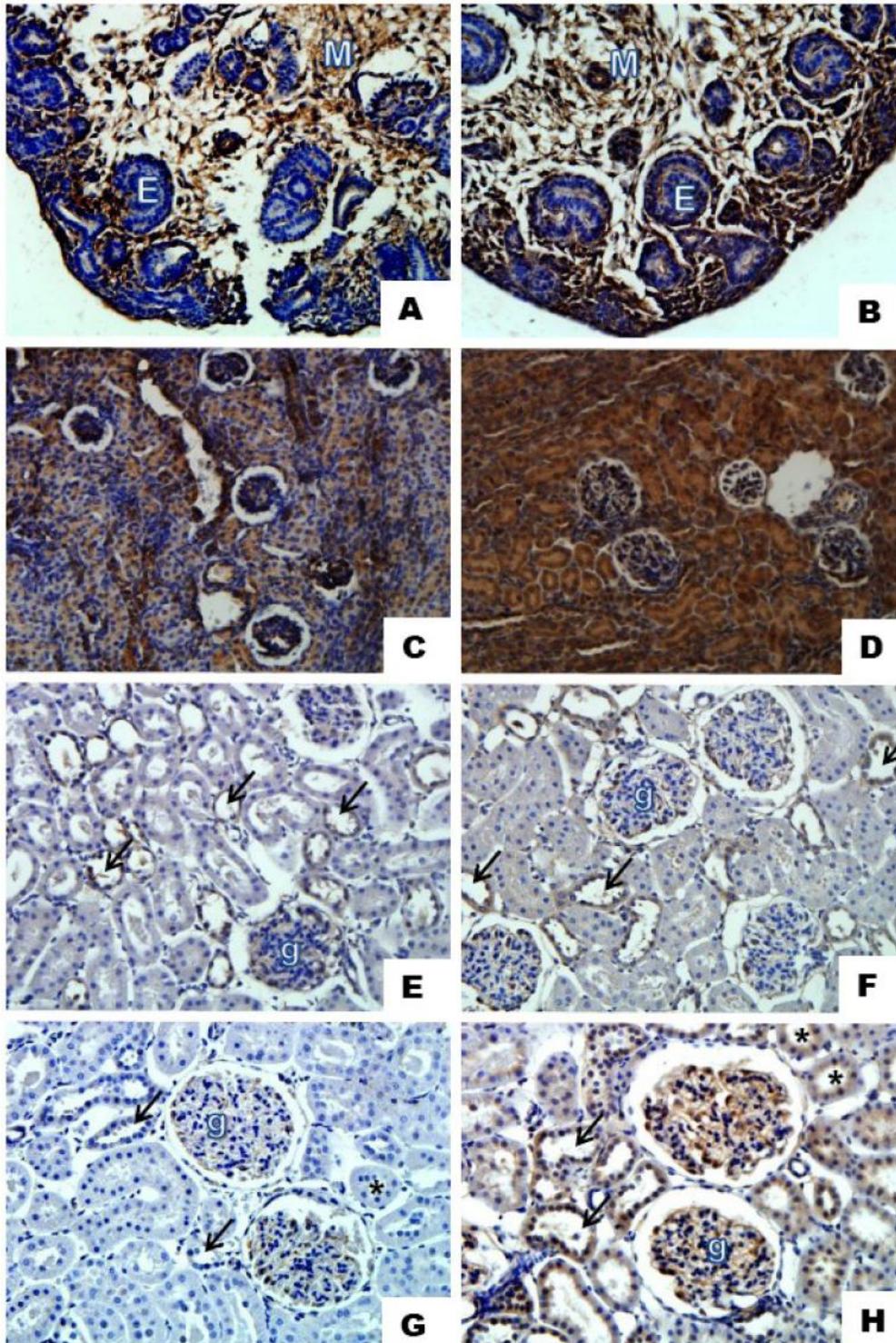


Figura 36. Imuno-localização de ABCA1 no rim de machos E17 (A e B), PN12d (C e D), PN8s (E e F) e PN16s (G e H). A, C, E e G) Grupo controle. B, D, F e H) Grupo Dieta. E: epitélios do néfron em desenvolvimento; M: mesênquima metanefrogênico; Seta: segmentos pós-proximais; asterisco: segmentos proximais; g: glomérulo. Aumento 400x.

DISCUSSÃO



3.5. DISCUSSÃO

O baixo peso ao nascer tem sido considerado fator preditivo importante capaz de fornecer informações sobre possíveis alterações ocorridas durante o desenvolvimento fetal e sua repercussão fenotípica futura, principalmente quando a mãe é submetida a situações de estresse nutricional. Em uma série de trabalhos epidemiológicos realizados por Barker e colaboradores (1985; 1995) foi demonstrada uma íntima relação entre o baixo peso ao nascer e riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares durante a fase adulta, sendo estas em consequência de uma alimentação materna desequilibrada.

Tem sido descritas diferentes respostas em modelos experimentais com murinos, frente ao consumo materno de dieta hiperlipídica durante períodos críticos do desenvolvimento fetal. Enquanto alguns trabalhos demonstraram não haver diferenças ponderais significativas ao nascer (JONES et al., 2009; FÉRÉZOU-VIALA et al., 2007), outros, de maneira oposta apresentam elevação (HOWIE, et al., 2008), ou decréscimo da massa corporal da prole de ratas submetidas a dieta hiperlipídicas (KHAN, 2007). Essa diferença encontrada na literatura deve-se ao fato de terem sido seguidos diferentes protocolos nos estudos realizados. Estas diferenças estão relacionadas ao tipo de lipídio e quantidade destes nas diferentes dietas usadas, o tempo de exposição a dieta, bem como as diferentes linhagens de animais utilizadas nestes estudos.

Dentre os fatores que têm justificado as diferenças ponderais encontradas após o nascimento tem sido atribuído, principalmente, ao desenvolvimento de diabetes gestacional e conseqüentemente, a maior oferta de glicose aos fetos uma parcela importante de responsabilidade. Adicionalmente, a secreção de insulina, por si só um dos principais fatores de crescimento durante o desenvolvimento fetal, no modelo experimental utilizado neste estudo, apresenta-se menor, e desta forma a exposição da prole destas mães a menor secreção insulínica, pode comprometer o crescimento fetal desde os primeiros dias da gestação. Durante o processo de desenvolvimento fetal, efetivamente, a placenta dessas fêmeas também apresentou alterações demonstrada pelo menor crescimento e peso. Liang e colaboradores (2010) demonstraram que a dieta hiperlipídica altera o metabolismo glicídico da placenta bem como eleva o seu estresse oxidativo. Autores também encontraram um

significativo retarde no desenvolvimento da vascularização da placenta (HAYES, 2012) e aumento na expressão de citocinas e mediadores inflamatórios (RADAELLI et al., 2003). Alterações placentárias e secreção de insulina, além do próprio estado nutricional materno, podem ter contribuído para um desenvolvimento alterado nesses filhotes levando a um baixo peso ao nascimento.

Com o passar da idade, a prole DHL continua a apresentar um menor crescimento ponderal em relação a CTL até a 8ª semana de vida, é como se a deficiência ocorrida ainda no período intrauterino se mantivesse persistente, efeito diferente do observado em outros modelos de estresse nutricional, tal como a restrição proteica, quando já na primeira semana pós-natal ocorre recuperação praticamente total do crescimento da prole, fenômeno este conhecido como *catch up growth*. Também, durante o desenvolvimento embrionário e o período pós-natal, esta prole pode apresentar um maior gasto de energia como tem sido demonstrado em fêmeas resistentes à obesidade (FÉRÉZOU-VIALA et al., 2007; JACKMAN et al., 2010). Nestes casos, a prole parece ser protegida de um ganho excessivo de peso devido a mudanças na organização neuronal central, bem como na expressão de proteínas relacionadas com a termogênese como a UCP-2 e receptores de adiponectina no fígado (COUVREUR et al., 2011), sendo esta última relacionada com a regulação da produção de glicose hepática e ao catabolismo de ácidos graxos. Têm sido também demonstrada modificações na expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos no fígado (SHANKAR ET AL, 2010).

Catalano e Ehrenberg (2006) observaram uma hiperfagia na prole das ratas obesas, e preferência nestas por comidas gordurosas. No presente trabalho não foi observado a qualquer momento, alterações na ingestão de ração. Muitos trabalhos tem associado essa hiperfagia com modificações na sinalização da leptina em centros reguladores da fome a partir do núcleo arqueado do hipotálamo, uma vez que esse hormônio é um dos reguladores do apetite. White e colaboradores (2009) sugeriram que a hiperleptinemia na prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica é decorrente da obesidade e não é efeito da dieta *per se*.

A prole DHL ingeriu mais água após o desmame até a 5ª semana vida, não havendo diferença após esse período. Esse fato pode estar relacionado ao leite materno produzido por essas fêmeas que, não sendo suficiente para suprir as necessidades hídricas desses animais, leva a um consumo maior de água, mesmo após o desmame. Não podemos afastar alterações do sistema nervoso central relacionados à resposta a vasopressina ou aos efeitos

centrais e periféricos do sistema renina-angiotensina. Somente na 7ª semana de vida o equilíbrio foi restabelecido (**Figura 6**).

Uma das principais alterações observadas em modelos de programação fetal, seja por restrição proteica ou por dieta hiperlipídica, é o desenvolvimento de resistência à insulina e progressão para o desenvolvimento de diabetes tipo 2. Uma das possíveis explicações é que a gliconeogênese ocorre a uma taxa muito lenta durante a gestação, de tal forma que adaptativamente, o feto utilize glicose fornecida pela mãe, assim a ativação prematura dessa via com aumento na produção de glicose pode predispor a prole ao desenvolvimento de hiperglicemia inicialmente seguida de resistência periférica à insulina. Esta situação pode ser agravada pelo retorno da prole, no período pós-natal (precisamente pós-lactação) a uma dieta com um percentual maior de carboidratos. Também foi observado um aumento na expressão de genes hepáticos relacionados à produção de glicose (STRAKOVSKY et al., 2011). Uma vez que as mães submetidas a dieta hiperlipídica, apresentam uma menor secreção de insulina, pode ser que o pâncreas da prole sujeitas a elevada concentração glicídica passem a secretar precocemente, alta concentração de insulina evoluindo para fadiga deste órgão com o passar do tempo e/ou, *downregulation* dos receptores periféricos para este peptídeo. Como mostrado na **Figura 7**, na 8ª semana de vida, a prole DHL apresenta tendência a menor captação periférica de glicose com uma maior secreção de insulina, sugerindo um estado de resistência periférica, embora a glicemia basal não apresente alterações significativas, a homeostasia desta pode estar sendo mantida provavelmente a custo de uma secreção aumentada de insulina. Com o passar da idade, ambos os grupos aumentaram a secreção de insulina, demonstrando que a própria idade em si poder ser um fator que predispõe a resistência à insulina. Em PN16s não foram encontradas diferenças na resposta ao GTT, embora os níveis de secreção de insulina ainda continuem elevado. No grupo CTL o aumento de secreção de insulina em PN16s em relação a PN8s foi maior quando comparado com o grupo DHL sugerindo já uma toxicidade ou disfunção pancreática nestes animais.

Os níveis plasmáticos de triglicérides nos animais filhos de mães DHL em PN16S estão aumentados em relação ao controle. Se levarmos em consideração a hipótese de que esses animais utilizam preferencial e adaptativamente, lipídeos como fonte de energia, esta elevação pode sugerir uma maior mobilização no suprimento da demanda metabólica. Deve-se ressaltar também que devido ao estado de resistência à insulina, onde há uma menor

captação de glicose pelas células, a liberação de ácidos graxos na corrente sanguínea se faz necessária a fim de suprir o animal com o aporte de energia necessária para o funcionamento de órgãos e tecidos. De fato, é comum indivíduos com resistência à insulina apresentarem hipertrigliceridemia (HAYASHI et al., 2011). Em relação aos níveis séricos de colesterol e HDL-colesterol não se observou diferenças entre os grupos estudados, o que chama a atenção nos resultados é o fato de que tanto os níveis de triglicérides como colesterol mudarem conforme a idade independente do tratamento recebido pelas mães. Pode-se observar que em geral os níveis destes estão aumentados em PN12d ao comparar essa idade com a idade adulta, deve-se considerar neste caso um grande e transitório aporte de lipídeos à prole DHL pelo leite materno rico em gorduras nesta fase. Deve-se considerar também que, os animais PN12d estão em fase de rápido crescimento com grande proliferação celular, então a mobilização de nutrientes bem como de colesterol para o crescimento celular nesses animais pode ser bem maior. Em PN8s esses níveis tendem a diminuir uma vez que o animal já entra na fase adulta e as demandas energéticas caem proporcionalmente à idade, nesse ponto a estocagem de energia passa a predominar sobre o consumo com crescimento. Porém, em PN16s os níveis voltam a subir, principalmente de colesterol, uma vez que com o passar da idade níveis hormonais diminuem, assim como o metabolismo. A diminuição de hormônios que diminuem a concentração plasmática de lipídeos, associados a menor utilização de colesterol como substrato para hormônios esteroidogênicos, podem ser fatores preponderantes que interferem em um maior acúmulo de lipídeos sanguíneos nesta fase da vida.

Os mecanismos pelos quais ocorre o transporte de colesterol da mãe para o feto através da placenta ainda não está completamente elucidado, embora a síntese endógena de colesterol fetal possa suprir as necessidades para o desenvolvimento. Uma série de trabalhos têm mostrado a presença de receptores de colesterol na placenta, não somente pelo fato dela ser um órgão esteroidogênico, mas que também contribuem para o transporte lipídico transplacentário para os filhotes. Um exemplo da existência destes transportadores pode ser avaliado pela síndrome de Smith-Lemli-Opitz, na qual o feto é incapaz de sintetizar colesterol, resultando em uma série de deformações fetais, onde a elevação da expressão placentária de ABCA1, compensatoriamente, tenta aumentar o transporte do colesterol (LINDEGAARD et al., 2008). As concentrações plasmáticas de colesterol materno também podem influenciar os níveis de lipídeos fetais em hamsters (MCCONIHAY et al., 2001). As

Figuras 15 e 16 mostraram a localização de SR-BI e ABCA1 na placenta, pode se observar que enquanto a ABCA1 se encontra mais localizada no lado materno, o SR-BI concentra-se principalmente no lado fetal. Até então os mecanismos propostos para o transporte de colesterol através da placenta são aqueles que envolvem a conjugação à lipoproteínas ou a apolipoproteínas ou captação destes por receptores como SR-BI ou ABCA1 em placenta humana (WOOLLETT, 2005). Schmid e colaboradores (2003) observaram que o colesterol movimenta-se através da placenta saindo pela circulação materna, no lado apical, para a circulação fetal, no lado basolateral. Mesmo que os receptores ABCA1 e SR-BI possam sofrer a influência de uma dieta hiperlipídica em outros órgãos tais como fígado e intestino, a placenta parece não mostrar alterações significativas (Figura 14). Além disso, em humanos, a diminuição de receptores de LDL ocorre na placenta de mulheres hipercolesterolêmicas, mas não há alteração de SR-BI (ETHIER-CHIASSON et al., 2007).

No 17º dia de vida intrauterina de roedores, o intestino ainda não está completamente formado, embora o epitélio intestinal já mostre-se bastante organizado. As vilosidades estão começando a se formar nesse período, o que ocorrerá de forma bem rápida, uma vez que o intestino terá que estar completamente formado até o nascimento, quando o filhote passa a se alimentar do leite materno. Nas **figuras 18 e 20** podemos observar que o intestino já passa a expressar tanto ABCA1, presente principalmente no ápice das vilosidades em formação, enquanto SR-BI está mais disperso nas células da vilosidade sem alterações entre filhos de mãe CTL ou DHL.

Em PN12d, PN8s e PN16s o intestino já está completamente formado, nota-se através das **Figuras 21, 22 e 23** que a dieta hiperlipídica materna não alterou a expressão de SR-BI nas três porções do intestino delgado da prole, sugerindo que não há uma adaptação destes receptores no sentido de captar mais ou menos lipídios causado pela dieta hiperlipídica e supostamente pela programação fetal. Independentemente do tipo dieta ingerida, observa-se que o padrão de expressão de SR-BI muda conforme o segmento intestinal, onde há uma maior expressão nas porções proximais diminuindo progressivamente até alcançar o íleo, fato já observado por Hui e colaboradores (2008). Também pode-se notar que no íleo o SR-BI parece não realizar a função de captação de lipídios, uma vez que sua expressão na borda em escova não está evidente como no duodeno e no jejuno. Assim, neste segmento, o SR-BI parece estar mais envolvido em processos regulatórios da síntese lipoproteica, pois ele é capaz de se translocar para o meio intracelular e regular a produção de lipoproteínas

tais como o quilomícron (HAYASHI et al., 2011).

A expressão de ABCA1 também mostrou significativas mudanças no seu padrão de expressão ao longo do intestino delgado (**Figuras 24, 25 e 26**), mostrando-se pouco expressa no duodeno e aumentando sua expressão progressivamente até o íleo. Porém, de forma semelhante à expressão de SR-BI, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos CTL e DHL, e entre as idades estudadas. No intestino a ABCA1 tem como principal função o efluxo de colesterol do enterócito para apolipoproteínas como a ApoA1, participando assim na processo da formação da HDL-nascente. Esse mecanismo é responsável pela produção de cerca de 30% da HDL circulante. O íleo parece ser o principal segmento do intestino delgado a contribuir com a formação de HDL (MULLIGAN et al., 2003; BRUNHAM et al., 2006). Embora em alguns pontos a ABCA1 mostre-se localizada na membrana apical do enterócitos, e trabalhos mais antigos propõem que a ABCA1 possa contribuir para o efluxo do excesso de colesterol do enterócito para o lúmen intestinal, devido sua localização na membrana plasmática (REPA et al., 2000; NEUFELD et al., 2001), estes achados necessitam ser confirmados.

No fígado, tanto o SR-BI quanto ABCA1 mostraram ser menos expressos com o passar da idade (**Figuras 27 e 28**), independentemente da dieta materna. Essa queda ao longo da vida pode ser bastante prejudicial, uma vez que os dois transportadores são responsáveis pela captação do excesso de colesterol plasmático. Particularmente ABCA1 por participar do processo de formação de HDL a diminuição deste transportador pode causar o acúmulo de colesterol nos tecidos periféricos, com elevação do risco aparecimento de doenças cardiovasculares. De fato parece que a idade em si é um fator que deve ser levado em consideração no que se diz respeito a expressão desses receptores e consequente aumento nos níveis de colesterol plasmático. Na **Figura 29** podemos observar que o SR-BI está expresso na membrana lateral do hepatócito, em contato com partículas de HDL madura presentes nos capilares sinusoidais. Já a expressão de ABCA1 está localizada dispersa no citoplasma, demonstrando que essa trafega entre os meios intra- e extracelular transportando lipídios, principalmente fosfolipídios e colesterol, para lipoproteínas (**Figura 30**), confirmando prévios estudos (NEUFELD et al., 2001; NEUFELD et al., 2004; BOADU & FRANCIS, 2006).

Nos rins o SR-BI já começa a ser expresso em E17 até a fase adulta, localiza-se principalmente nos túbulos distais, proximais e algumas célula do glomérulo. Pela

imunoistoquímica parece não haver diferenças entre os grupos estudados, porém com o passar do tempo, observa-se uma maior expressão em E17 e PN12d, provavelmente pelo fato desses animais estarem em desenvolvimento e necessitarem de uma maior quantidade de colesterol e lipídeos estruturais para a proliferação e crescimento celulares (**Figura 32**). Já a ABCA1 mostrou-se alterada nos machos PN12s e PN16S nos filhos de mãe DHL (**Figura 36**).

A função desses dois receptores no rim, ainda não está completamente entendida, em ratos que apresentam glomerulonefrite o acúmulo de colesterol parece ser causado por aumento na expressão de HMG-Coa redutase, aumentando a síntese de colesterol (ZAGER et al., 2001). Nestas circunstâncias, há uma elevação da permeabilidade das membranas glomerulares com aumento da filtração de colesterol livre e esterificado ligados lipoproteínas, que simultaneamente promove uma elevação da captação tubular de lipídeos via receptores *scavenger* como SR-BI, CD36 e SRA. Além da diminuição da expressão de ABCA1 reduzindo o efluxo de colesterol (KIM et al., 2009; JOHNSON et al., 2002) e aumento na expressão de fatores de regulação de síntese triglicérides e colesterol como SREBP-1 e 2 (JIANG et al., 2005; WANG et al., 2005). Enquanto que o SR-BI parece ser responsável pela captação do colesterol vindo de lipoproteínas para as células renais, o ABCA1 tem um papel importante no efluxo deste para as lipoproteínas impedindo assim, o acúmulo de colesterol nessas células, evitando os danos causados pelo excesso de lipídios depositado e, conseqüentemente pela degeneração lipídica renal. Assim, na prole de animais DHL, a elevada expressão de ABCA1 renal pode evitar o acúmulo de colesterol nas células renais, atuando como mecanismo protetor da programação fetal, aumentando o efluxo do colesterol, e conseqüentemente evitando possíveis em células tubulares renais.

CONCLUSÃO



3.5. CONCLUSÃO

A dieta hiperlipídica pode predispor a prole de machos a um menor ganho de peso, e ao desenvolvimento alterações metabólicas como hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia.

A idade é um fator relevante na expressão de transportadores de colesterol SR-BI e ABCA1 no fígado e no rim, podendo levar deposição anormal de lipídeos nos tecidos periféricos e alterar o metabolismo glicídico e lipoproteico, independente da dieta materna.

Aumenta a expressão de ABCA1 no rim da prole:

- para evitar o acúmulo de lipídeos nas células tubulares renais, sendo este um mecanismo protetor desenvolvido pela programação fetal ou:
- uma resposta ao aumento da expressão de SR-BI, sendo este um mecanismo de compensação para realizar o efluxo do excesso de colesterol, sinalizando uma possível alteração morfofisiológica nos rins.

DISCUSSÃO GERAL



4. DISCUSSÃO GERAL

A alimentação materna durante períodos críticos de desenvolvimento da prole, como a gestação e a lactação, tem sido alvo de muitos estudos. Tem se observado que existe uma grande relação entre o estado nutricional materno e o surgimento de alterações metabólicas na prole, principalmente durante a vida adulta (BARKER, 1995). Os nutrientes fornecidos pela mãe podem modular a expressão de determinados genes na prole, alterando seu fenótipo para se adequar aos estímulos impostos pelo meio. No entanto, após o nascimento se a prole encontra um ambiente diferente ao qual foi “programado” a sobreviver, seu metabolismo pode responder de maneira inadequada, levando ao aparecimento de disfunções metabólicas, principalmente cardiovasculares (WEST-EBERHARD, 1989; BARKER, 1995).

Já é bastante conhecido na literatura os efeitos de uma dieta hiperlipídica sobre o metabolismo em geral, como por exemplo, alterações na massa corporal, comprometimento do pâncreas e secreção de insulina, levando ao desenvolvimento de diabetes, elevações nos níveis de lipídios no sangue, dentre outros dieta (BUETTNER et al., 2007). Quando esse excesso de lipídios na dieta ocorre durante a gestação, o feto e a placenta também podem sofrer alterações em seu metabolismo, prejudicando o desenvolvimento deste.

O presente trabalho mostrou que o consumo crônico de um dieta desequilibrada com excesso de calorias e lipídios provenientes principalmente de gordura saturada, podem causar problemas fisiológicos e morfológicos em ratas Wistar resistentes a obesidade, como menor ganho de peso e secreção insulínica e menor captação periférica de glicose, elevações nos níveis de triglicérides plasmáticos e alterações morfológicas renais, como dilatação pielocalicial associada a nefrocalcinose e nefrolitíase.

Durante a gestação o peso fetal e placentário na prole das fêmeas DHL apresentaram menor massa, e discretas alterações na expressão de ABCA1 na placenta, o que poderia de alguma forma alterar o transporte de colesterol materno/fetal, prejudicando o desenvolvimento deste. Após o nascimento a prole

continua a apresentar menor ganho de massa ponderal até a 8ª semana de vida, na havendo diferenças estatísticas nos grupos estudados após esse período. A prole também mostrou aumento na expressão de ABCA1 e SR-BI nos rins, o que pode sugerir uma disfunção glomerular e tubular na filtração e transporte de colesterol no rim desses animais, podendo ser este um efeito causado pela programação fetal.

A figura 37 mostra um esquema dos principais resultados encontrados neste presente trabalho e possíveis mecanismos envolvidos.

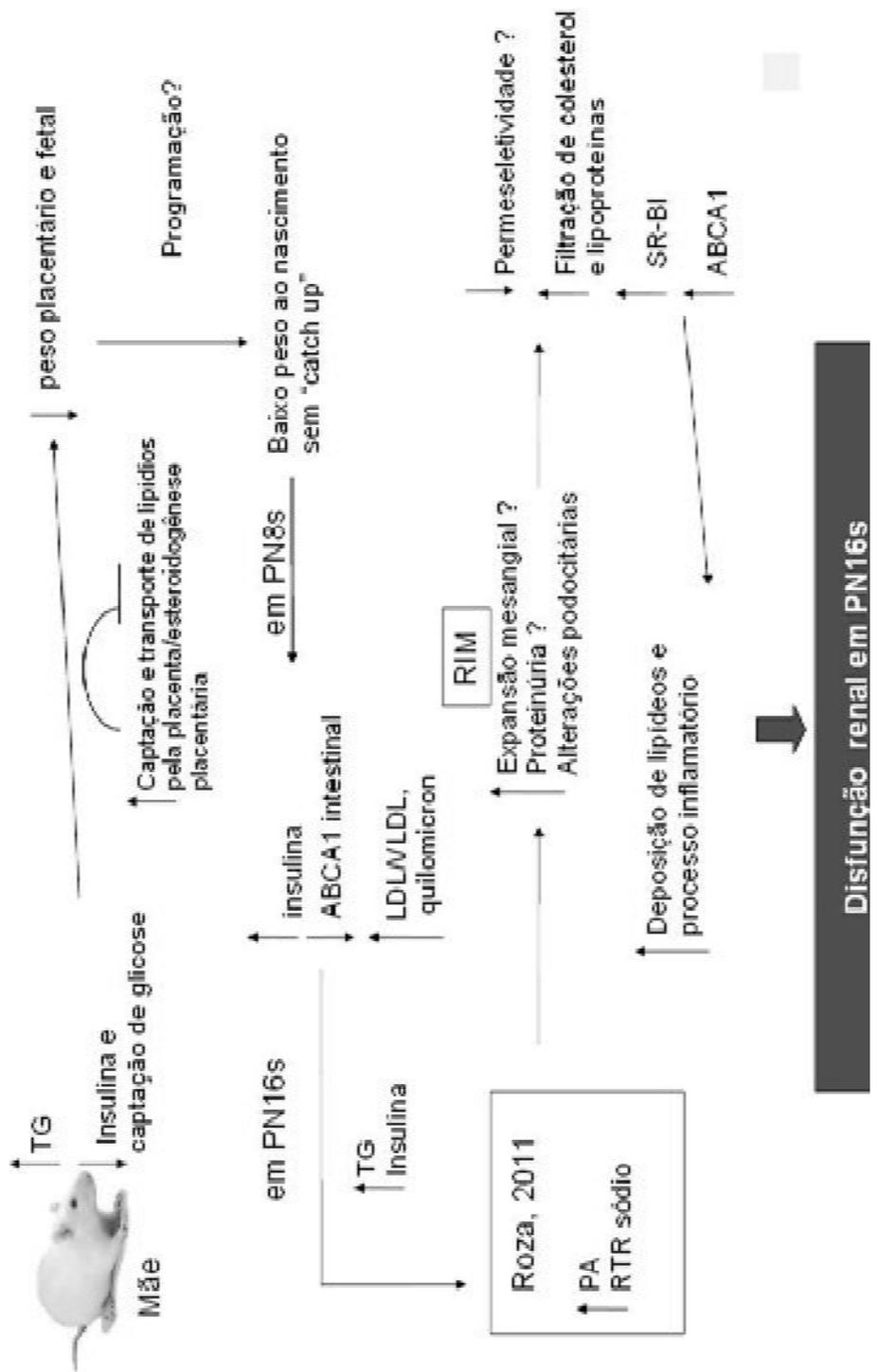


Figura 37. Resumo esquemático dos principais resultados obtidos no presente trabalho.

CONCLUSÃO GERAL



5. CONCLUSÃO GERAL

A partir dos dados apresentados é possível concluir que o consumo de uma dieta materna desequilibrada, com excesso de lipídios a longo prazo, principalmente durante a gestação e lactação, pode predispor na prole a alterações renais metabólicas na vida adulta que colaboram para o conceito de programação fetal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* 1994; 269: 21003-21009.

Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science.* 1996; 271(5248):518-20.

Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, Fruchart JC, James WPT, Loria CM, Smith SC, Jr. Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation.* 2009; 120:1640-1645.

Altmann SW, Davis HRJr., Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, Iyer SP, Maguire M, Golovko A, Zeng M, Wang L, Murgolo N, Graziano MP. Niemann-Pick C1 Like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004; 303: 1201–1204.

Altunkaynak ME, Özbek E, Altunkaynak BZ, Can I, Unal D, Unal B. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. *J of Anat.* 2008; 212(6): 845-852.

Annema W & Tietge UJ. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep.* 2011;13(3):257-65.

0

Arakawa R and Yokoyama S. Helical apolipoproteins stabilize ATP-binding cassette transporter A1 by protecting it from thiol protease-mediated degradation. *J Biol Chem.* 2002; 277: 22426–22429.

Asztalos BF, de la Llera-Moya M, Dallal GE, Horvath KV, Schaefer EJ, Rothblat GH. Differential effects of HDL subpopulations on cellular ABCA1- and SR-BI-mediated cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2005;46(10):2246-53.

Attie AD, Kastelein JP, Hayden MR. Pivotal role of ABCA1 in reverse cholesterol transport influencing HDL levels and susceptibility to atherosclerosis. *J Lipid Res.* 2001;42(11):1717-26.

Aubin, M.C., Lajoie, C., Clement, R., Gosselin, H., Calderone, A., Perrault, L.P. Female rats fed a high-fat diet were associated with vascular dysfunction and cardiac fibrosis in the absence of overt obesity and hyperlipidemia: therapeutic potential of resveratrol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2008;325, 961–968.

Ayres-Silva JP; Manso PPA, Madeira, MRC, Pelajo-Machado M, Lenzi HL. Sequential morphological characteristics of murine fetal hematopoietic microenvironment in Swiss Webster mice liver. *Cell and tissue Res.* 2011;344(3):455-469.

Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S, Krieger M. Murine SR-BI, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is N-glycosylated and fatty acylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J. Biol. Chem.* 1997; 272, 13242-13249.

Balasubramaniyan N, Shahid M, Suchy FJ, Ananthanarayanan M. Multiple mechanisms of ontogenic regulation of nuclear receptors during rat liver development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2005;288(2):G251-60.

Barker DJP, Osmond C, Winter PD, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet*. 1989;2:577–580.

Barker DJP. Fetal origins of coronary heart disease. *Br Me J*. 1995;311:171-174.

Bauman DE, Currie WB. Partitioning of Nutrients During Pregnancy and Lactation: A Review of Mechanisms Involving Homeostasis and Homeorhesis. *J Dairy Sci*. 1980; 63(9):1514-1529.

Beaulieu JF & Calvert R. Influences of dexamethasone on the maturation of fetal mouse intestinal mucosa in organ culture. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol*. 1985;82(1):91-5. apud Pácha J. Development of Intestinal Transport Function in Mammals. *Physiol Rev*. 2000;80(4):1633-1667.

Bhattacharjee J, Ietta F, Giacomello E, Bechi N, Romagnoli R, Fava A, Paulesu L. Expression and localization of ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) in first trimester and term human placenta. *Placenta*. 2010; 31(5):423-30.

Bietrix F, Yan D, Nauze M, Rolland C, Bertrand-Michel J, Comera C, Schaak S, Barbaras R, Groen AK, Perret B, Terce F, Collet X. Accelerated lipid absorption in mice overexpressing intestinal SR-BI. *J Bio Chem*. 2006; 281: 7214–7219.

Boadu E, Francis GA. The role of vesicular transport in ABCA1-dependent lipid efflux and its connection with NPC pathways. *J Mol Med (Berl)*. 2006;84(4):266-75.

Brenner BM, Garcia DL, Anderson S. Glomeruli and blood pressure. Less of one, more the other? *Am J Hypertens*. 1988; 1:335-347.

Brown MS, Basu SK, Falck JR, Ho YK, Goldstein JL. The scavenger cell pathway for lipoprotein degradation: specificity of the binding site that mediates the uptake of negatively-charged LDL by macrophages. *J Supramol Struct.* 1980;13(1):67-81.

Brown MS & Goldstein JL. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest.* 1983;72(3): 743–747.

Bruin JE, Gerstein HC, Holloway AC. Long-term consequences of fetal and neonatal nicotine exposure: a critical review. *Toxicol Sci.* 2010 Aug;116(2):364-74.

Brunham LR, Kruit JK, Iqbal J, Fievet C, Timmins JM, Pape TD, Coburn BA, Bissada N, Staels B, Groen AK, Hussain MM, Parks JS, Kuipers F, Hayden MR. Intestinal ABCA1 directly contributes to HDL biogenesis in vivo. *J Clin Invest.* 2006;116(4):1052-62.

Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring).* 2007; 15(4):798-808.

Cai SF, Kirby RJ, Howles PN, Hui DY. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res.* 2001;42(6):902-9.

Cai L, Eckhardt ER, Shi W, Zhao Z, Nasser M, de Villiers WJ, van der Westhuyzen DR. Scavenger receptor class B type I reduces cholesterol absorption in cultured enterocyte CaCo-2 cells. *J Lipid Res.* 2004; 45(2):253-62.

Calvo D, Gómez-Coronado D, Lasunción MA, Vega MA. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17(11):2341-9.

Cases S, Novak S, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Welch CB, Lusic AJ, Spencer TA, Krause BR, Erickson SK, Farese RV Jr. ACAT-2, a second mammalian acyl-CoA:cholesterol acyltransferase. Its cloning, expression, and characterization. *J Biol Chem.* 1998;273(41):26755-64.

Catalano P. M., Ehrenberg H.M. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *J Obst & Gyn.* 2006;113:1126–1133.

Chang G. O., Gaysinskaya V., Karatayev O., Leibowitz S. F. Maternal High-Fat Diet and Fetal Programming: Increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *The J Neuro.* 2008;28(46):12107–12119.

Clearfield MB. Underidentification and undertreatment of dyslipidemia. *J Am Osteopath Assoc.* 2003,103:S16–S20.

Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation.* 2000;101(20):2411-7.

Couvreur O, Ferezou J, Gripois D, Serougne C, Crépin D, Aubourg A, Gertler A, Vacher CM, Taouis M, Ko, B. Unexpected Long-Term Protection of Adult Offspring Born to High-Fat Fed Dams against Obesity Induced by a Sucrose-Rich Diet. PLoS ONE, vol. 6, issue 3, p. E18043.

Cross AJ, Leitzmann MF, Subar AF, Thompson FE, Hollenbeck AR, Schatzkin. A prospective study of meat and fat intake in relation to small intestinal cancer. Cancer Res. 2008; 15;68(22):9274-9.

Cummins AG, Jones BJ, Thompson FM. Postnatal epithelial growth of the small intestine in the rat occurs by both crypt fission and crypt hyperplasia. Dig Dis Sci. 2006;51(4):718-23.

Deji N, Kume S, Araki S-i, Soumura M, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Koya D, Haneda M, Kashiwagi A, Uzu T. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. Am J Phys - Renal Physiology. 2009; 296: F118-F126.

Ding S, Chi MM, Scull BP, Rigby R, Schwerbrock NMJ, Magness S, Jobin C, Lund PK. High-Fat Diet: Bacteria Interactions Promote Intestinal Inflammation Which Precedes and Correlates with Obesity and Insulin Resistance in Mouse. Plos one. 2010; 5(8):e12191.

Dudley KJ, Sloboda DM, Connor KL, Beltrand J, Vickers MH. Offspring of mothers fed a high fat diet display hepatic cell cycle inhibition and associated changes in gene expression and DNA methylation. PLoS One. 2011;6(7):e21662.

Douglas, C. R. Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas. 2006. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

Drozdowski LA, Clandinin T, Thomson ABR. Ontogeny, growth and development of the small intestine: Understanding pediatric gastroenterology. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(7): 787–799.

Ebato C, Uchida T, Arakawa M, Komatsu M, Ueno T, Komiya K, Azuma K, Hirose T, Tanaka K, Kominami E, et al. Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet. *Cell Metab.* 2008;8:325–332.

Ethier-Chiasson M, Duchesne A, Forest JC, Giguère Y, Masse A, Mounier C, Lafond J. Influence of maternal lipid profile on placental protein expression of LDLr and SR-BI. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;359(1):8-14.

Fåk F, Karlsson CL, Ahrné S, Molin G, Weström B. Effects of a high-fat diet during pregnancy and lactation are modulated by *E. coli* in rat offspring. *Int J Obes (Lond).* 2012;36(5):744-51.

Férézou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, Gertler A, Delplanque B, Djiane J, Riottot M & Taouis M. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293, R1056–R1062.

Fitzgerald ML, Morris AL, Chroni A, Mendez AJ, Zannis VI, Freeman MW. ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res.* 2004;45(2):287-94.

Frias AE, Morgan TK, Evans AE, Rasanen J, Oh KY, Thornburg KL, Grove KL.

Maternal high-fat diet disturbs uteroplacental hemodynamics and increases the frequency of stillbirth in a nonhuman primate model of excess nutrition. *Endocrinology*. 2011;152(6):2456-64.

Glomsett JA. The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction. *J Lipid Res*. 1968;9(2):155-67.

Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76(1): 333–337.

Grant WF, Gillingham MB, Batra AK, Fewkes NM, Comstock SM, et al. Maternal High Fat Diet Is Associated with Decreased Plasma n–3 Fatty Acids and Fetal Hepatic Apoptosis in Nonhuman Primates. *PLoS ONE*. 2011;6(2): e17261.

Gu X, Trigatti B, Xu S, Acton S, Babitt J, Krieger M. The efficient cellular uptake of high density lipoprotein lipids via scavenger receptor class B type I requires not only receptor-mediated surface binding but also receptor-specific lipid transfer mediated by its extracellular domain. *J Biol Chem*. 1998;273(41):26338-48.

Ha SK, Chae C. Inducible nitric oxide distribution in the fatty liver of a mouse with high fat diet-induced obesity. *Exp Anim*. 2010; 59(5):595-604.

Hassan HH, Denis M, Lee DY, Iatan I, Nyholt D, Ruel I, Krimbou L, Genest J. Identification of an ABCA1-dependent phospholipid-rich plasma membrane apolipoprotein A-I binding site for nascent HDL formation: implications for current models of HDL biogenesis. *J Lipid Res*. 2007;48(11):2428-42.

Hatzopoulos AK, Rigotti A, Rosenberg RD, Krieger M. Temporal and spatial pattern of expression of the HDL receptor SR-BI during murine embryogenesis. *J Lipid Res.* 1998;39(3):495-508.

Hayashi AA, Webb J, Choi J, Baker C, Lino M, Trigatti B, Trajcevski KE, Hawke TJ, Adeli K. Intestinal SR-BI is upregulated in insulin-resistant states and is associated with overproduction of intestinal apoB48-containing lipoproteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(2):G326-37.

Hayes EK, Lechowicz A, Petrik JJ, Storozhuk Y, Paez-Parent S, Dai Q, Samjoo IA, Mansell M, Gruslin A, Holloway AC, Raha S, Reiss, I. Adverse Fetal and Neonatal Outcomes Associated with a Life-Long High Fat Diet: Role of Altered Development of the Placental Vasculature. *Plos one.* 2012;7(3):e33370.

Hernandez LA, Grayson BE, Yadav E, Seeley RJ, Horseman ND. High Fat Diet Alters Lactation Outcomes: Possible Involvement of Inflammatory and Serotonergic Pathways. *PLoS One.* 2012; 7(3): e32598.

Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, Keilbaugh SA, Hamady M, Chen YY, Knight R, Ahima RS, Bushman F, Wu GD. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology.* 2009 ;137(5):1716-24.

Hirano S & Kataoka K. Histogenesis of the mouse jejunal mucosa, with special reference to proliferative cells and absorptive cells. *Arch Histol Jpn.* 1986;49(3):333-48.

Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol.* 2009;587(Pt 4):905-15.

Hui DY, Labonté ED, Howles PN. Development and Physiological Regulation of Intestinal Lipid Absorption. III. Intestinal transporters and cholesterol absorption. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294:G839-G843.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orcamentos Familiares, 2008-2009: Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011, 150p.

Jackman MR, MacLean PS, Bessesen DH. Energy expenditure in obesity-prone and obesity-resistant rats before and after the introduction of a high-fat diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299(4):R1097-105.

Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Bio Chem*. 1997; 272(34):20982-5.

Jiang T, Wang Z, Proctor G, Moskowitz S, Liebman SE, Rogers T, Lucia MS, Li J, Levi M. Diet-induced obesity in C57BL/6J mice causes increased renal lipid accumulation and glomerulosclerosis via a sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent pathway. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32317-25.

Johnson ACM, Yabu JM, Hanson S, Shah VO, Zager RA. Experimental Glomerulopathy Alters Renal Cortical Cholesterol, SR-B1, ABCA1, and HMG CoA Reductase Expression. *Am J Patho*. 2003; 162(1):283-291.

Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PA, Powell TL, Jansson T. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J*. 2009;23(1): 271–278.

Kennedy MA, Barrera GC, Nakamura K, Baldán A, Tarr P, Fishbein MC, Frank J, Francone OL, Edwards PA. ABCG1 has a critical role in mediating cholesterol efflux to HDL and preventing cellular lipid accumulation. *Cell Metab.* 2005;1(2):121-31.

Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, Taylor PD. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005;288(1):R127-33.

Kim HJ, Yuan J, Norris K, Vaziri ND. High-calorie diet partially ameliorates dysregulation of intrarenal lipid metabolism in remnant kidney. *J Nutr Biochem.* 2010; 21:999-1007.

Kim HJ. & Vaziri ND. Sterol Regulatory Element-Binding Proteins, Liver X Receptor, ABCA1 Transporter, CD36, Scavenger Receptors A1 and B1 in Nephrotic Kidney. *Am J Nephro.* 2009. 29:607-614.

Kume S, Uzu T, Araki S-i, Sugimoto T, Isshiki K, Chin-Kanasaki M, Sakaguchi M, Kubota N, Terauchi Y, Kadowaki T, Haneda M, Kashiwagi A, Koya D. Role of Altered Renal Lipid Metabolism in the Development of Renal Injury Induced by a High-Fat Diet. *J Am Soc Nephro.* 2007; 18: 2715-2723.

Li X, Peegel H, Menon KM. In situ hybridization of high density lipoprotein (scavenger, type 1) receptor messenger ribonucleic acid (mRNA) during folliculogenesis and luteinization: evidence for mRNA expression and induction by human chorionic gonadotropin specifically in cell types that use cholesterol for steroidogenesis. *Endocrinology.* 1998;139(7):3043-9.

Liang C, DeCourcy K, Prater MR. High-saturated-fat diet induces gestational diabetes and placental vasculopathy in C57BL/6 mice. *Metabolism*. 2010;59(7):943-50.

Lindegaard ML, Wassif CA, Vaisman B, Amar M, Wasmuth EV, Shamburek R, Nielsen LB, Remaley AT, Porter D. Characterization of placental cholesterol transport: ABCA1 is a potential target for in utero therapy of Smith- emli-Opitz syndrome. *Hum Mol Genet*. 2008;(23):3806-13:

Lindsay, D. B. Changes in the pattern of glucose metabolism in growth, pregnancy and lactation in ruminants. *Proc. Nutr. Soc.* 1971; 30:272.

Lobo MVT, Huerta L, Ruiz-Velasco N, Teixeira E, Cueva P, Celdrán A, Martín-Hidalgo A, veja MA, Bragado R. Localization of the Lipid Receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the Human Gastrointestinal Tract: Towards the Identification of Receptors Mediating the Intestinal Absorption of Dietary Lipids. *J Histochem Cytochem*. 2001; 49(10): 1253–1260.

Locher KP. Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364(1514):239-45.

Mardones P, Quiñones V, Amigo L, Moreno M, Miquel JF, Schwarz M, Miettinen HE, Trigatti B, Krieger M, VanPatten S, Cohen DE, Rigotti A. Hepatic cholesterol and bile acid metabolism and intestinal cholesterol absorption in scavenger receptor class B type I-deficient mice. *J Lipid Res*. 2001;42(2):170-80.

McDonald SD, Pesarchuk E, Don-Wauchope A, El Zimaity H, Holloway AC. Adverse metabolic effects of a hypercaloric, high-fat diet in rodents precede observable changes in body weight. *Nutr Res*. 2011; 31(9):707-14.

McConihay JA, Horn PS, Woollett LA. Effect of maternal hypercholesterolemia on fetal sterol metabolism in the Golden Syrian hamster. *J Lipid Res.* 2001;42(7):1111-9.

Mitra A, Alvers KM, Crump EM, Rowland NE. Effect of high-fat diet during gestation, lactation, or postweaning on physiological and behavioral indexes in borderline hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2009;296(1):R20-8.

Mao J, Zhang X, Sieli PT, Falduto MT, Torres KE, Rosenfeld CS. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(12):5557-62.

Massimi M, Lear SR, Huling SL, Jones AL, Erickson SK. Cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A): patterns of messenger RNA expression during rat liver development. *Hepatology.* 1998;28(4):1064-72.

Mesquita FF, Gontijo JA, Boer PA. Expression of renin-angiotensin system signalling compounds in maternal protein-restricted rats: effect on renal sodium excretion and blood pressure. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(2):380-8.

Moritz KM, Wintour-Coghlan M, Blak MJ, Bertram JF, Caruana G. Factors Influencing mammalian kidney development: Implications for healthy in adult life. 2008. Springer, USA.

Mulligan JD, Flowers MT, Tebon A, Bitgood JJ, Wellington C, Hayden MR, Attie AD. ABCA1 is essential for efficient basolateral cholesterol efflux during the absorption of dietary cholesterol in chickens. *J Biol Chem.* 2003;278: 13356–13366.

Nauli AM, Nassir F, Zheng S, Yang Q, Lo CM, Vonlehmden SB, Lee D, Jandacek RJ, Abumrad NA, Tso P. CD36 is important for chylomicron formation and secretion and may mediate cholesterol uptake in the proximal intestine. *Gastroenterology*. 2006;131: 1197–1207.

Neufeld EB, Remaley AT, Demosky SJ, Stonik JA, Cooney AM, Comly M, Dwyer NK, Zhang M, Blanchette-Mackie J, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem*. 2001;276(29):27584-90.

Neufeld EB, Stonik JA, Demosky SJ Jr, Knapper CL, Combs CA, Cooney A, Comly M, Dwyer N, Blanchette-Mackie J, Remaley AT, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. The ABCA1 transporter modulates late endocytic trafficking: insights from the correction of the genetic defect in Tangier disease. *J Biol Chem*. 2004; 279(15):15571-8.

Nieland TJ, Ehrlich M, Krieger M, Kirchhausen T. Endocytosis is not required for the selective lipid uptake mediated by murine SR-BI. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1734(1):44-51.

Oliveira EP, McLellan KCP, Silveira LAV, Burini RC. Dietary factors associated with metabolic syndrome in Brazilian adults. *Nutr J*. 2012;11:13.

Out R, Hoekstra M, Spijkers JA, Kruijt JK, van Eck M, Bos IS, Twisk J, Van Berkel TJ. Scavenger receptor class B type I is solely responsible for the selective uptake of cholesteryl esters from HDL by the liver and the adrenals in mice. *J Lipid Res*. 2004; 45(11):2088-95.

Oram JF, Lawn RM. ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue

cholesterol. *J Lipid Res.* 2001;42(8):1173-9.

Oram JF, Heinecke JW. ATP-binding cassette transporter A1: a cell cholesterol exporter that protects against cardiovascular disease. *Physiol Rev.* 2005;85(4):1343-72.

Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de Galan P, Heine RJ, Maassen JA, Diamant M. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. *Diabetologia.* 2005;48(6):1229-37.

Palinsk W, Nicolaidis E, Liguori A. Influence of maternal dysmetabolic conditions during pregnancy on cardiovascular disease. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* 2009;2:277–285.

Pittman RC, Steinberg D. Sites and mechanisms of uptake and degradation of high density and low density lipoproteins. *J Lipid Res.* 1984; 15;25(13):1577-85.

Pagler TA, Rhode S, Neuhofer A, Laggner H, Strobl W, Hinterndorfer C, Volf I, Pavelka M, Eckhardt ER, van der Westhuyzen DR, Schütz GJ, Stangl H. SR-BI-mediated high density lipoprotein (HDL) endocytosis leads to HDL resecretion facilitating cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2006;281(16):11193-204.

Priego T, Sánchez J, Picó C, Palou ^a Sex-differential expression of metabolism-related genes in response to a high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2008;16(4):819-26.

Radaelli T, Varastehpour A, Catalano P, Hauguel-de Mouzon S. Gestational diabetes induces placental genes for chronic stress and inflammatory pathways. *Diabetes* 2003;52:2951-2958

Raybould HE, Meyer JH, Tabrizi Y, Liddle RA, Tso P. Inhibition of gastric emptying in response to intestinal lipid is dependent on chylomicron formation. *Am J Physiol.* 1998;274(6 Pt 2):R1834-8.

Reaven E, Nomoto A, Leers-Sucheta S, Temel R, Williams DL, Azhar S. Expression and microvillar localization of scavenger receptor, class B, type I (a high density lipoprotein receptor) in luteinized and hormone-desensitized rat ovarian models. *Endocrinology.* 1998 ;139(6):2847-56.

Reaven E, Zhan L, Nomoto A, Leers-Sucheta S, Azhar S. Expression and microvillar localization of scavenger receptor class B, type I (SR-BI) and selective cholesteryl ester uptake in Leydig cells from rat testis. *J Lipid Res.* 2000; 41(3):343-56.

Reboul E, Klein A, Bietrix F, Gleize B, Malezet-Desmoulins C, Schneider M, Margotat A, Lagrost L, Collet X, Borel P. Scavenger receptor class B type I (SR-BI) is involved in vitamin E transport across the enterocyte. *J Biol Chem.* 2006;281(8):4739-45.

Reboul E, Soayfane Z, Goncalves A, Cantiello M, Bott R, Nauze M, Tercé F, Collet X, Coméra C. Respective contributions of intestinal Niemann-Pick C1-like 1 and scavenger receptor class B type I to cholesterol and tocopherol uptake: in vivo v. in vitro studies. *Br J Nutr.* 2011;20:1-9.

Remaley AT, Stonik JA, Demosky SJ, Neufeld EB, Bocharov AV, Vishnyakova TG, Eggerman TL, Patterson AP, Duverger NJ, Santamarina-Fojo S, Brewer HB Jr. Apolipoprotein specificity for lipid efflux by the human ABCA1 transporter. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(3):818-23.

Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. Regulation of absorption and ABC1-mediated

efflux of cholesterol by RXR heterodimers. *Science* 2000;1524–1529.

Rigotti A, Acton SL, Krieger M. *J Biol Chem*. The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids. 1995;270(27):16221-4.

Roza NAV. Efeito da ingestão crônica da dieta hiperlipídica durante a prenhez: repercussão sobre a pressão arterial da prole [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2011.

Schmid KE, Davidson WS, Myatt L, Woollett LA. Transport of cholesterol across a BeWo cell monolayer: implications for net transport of sterol from maternal to fetal circulation. *J Lipid Res*. 2003;44(10):1909-18.

Shankar K, Kang P, Harrell A, Zhong Y, Marecki JC, Ronis MJ, Badger TM. Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology*. 2010 Jun;151(6):2577-89.

Schreyer SA, Hart LK, Attie AD. Hypercatabolism of lipoprotein-free apolipoprotein A-I in HDL-deficient mutant chickens. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1994;14:2053-2059.

Sone H, Kagawa Y. Pancreatic beta cell senescence contributes to the pathogenesis of type 2 diabetes in high-fat diet-induced diabetic mice. *Diabetologia*. 2005;48(1):58-67.

Sprong H, van der Sluijs P, van Meer G. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2001; 2, 504–513.

Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2006;291(4):E792-9.

Strakovsky RS, Zhang X, Zhou D, Pan YX. Gestational high fat diet programs hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression and histone modification in neonatal offspring rats. *J Physiol.* 2011 Jun 1;589(Pt 11):2707-17.

Sullivan EL, Grayson B, Takahashi D, Robertson N, Maier A, Bethea CL, Smith MS, Coleman K, Grove KL. Chronic Consumption of a High-Fat Diet during Pregnancy Causes Perturbations in the Serotonergic System and Increased Anxiety-Like Behavior in Nonhuman Primate Offspring. *J Neuro.* 2010;30(10):3826-3830.

Stein, Z.A., Susser, M., Saenger, G., Moraolla, F. *Famine and Human Development: The Dutch Hunger Winter of 1944–1945.* Oxford University Press, New York. 1975.

Suzuki T, Hara H. Dietary fat and bile juice, but not obesity, are responsible for the increase in small intestinal permeability induced through the suppression of tight junction protein expression in LETO and OLETF rats. *Nutr Metab (Lond).* 2010; 7:19.

Tanaka AR, Ikeda Y, Abe-Dohmae S, Arakawa R, Sadanami K, Kidera A, Nakagawa S, Nagase T, Aoki R, Kioka N, Amachi T, Yokoyama S, Ueda K. Human ABCA1 contains a large amino-terminal extracellular domain homologous to an epitope of Sjogren's Syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 283:1019–102.

Tachibana S, Hirano M, Hirata T, Matsuo M, Ikeda I, Ueda K, Sato R. Cholesterol and plant sterol efflux from cultured intestinal epithelial cells is mediated by ATP-binding cassette transporters. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2007;71(8):1886-95.

Teegarden SL, Scott AN, Bale TL. Early life exposure to a high fat diet promotes long-term changes in dietary preferences and central reward signaling. *Neuroscience.* 2009;162(4):924-32.

Vassy J, Kraemer M, Chalumeau MT, Foucrier J. Development of the fetal rat liver: ultrastructural and stereological study of hepatocytes. *Cell Differ.* 1988;24(1):9-24.

Vaughan AM & Oram JF. ABCA1 and ABCG1 or ABCG4 act sequentially to remove cellular cholesterol and generate cholesterol-rich HDL. *J Lipid Res.* 2006;47(11):2433-43.

Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int.* 2001; 59(1):138-145.

VIGITEL - Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. Brasília, 2012. Acessado: 15 de junho de 2012. disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/zip/vigitel_2011_final.zip.

Voshol PJ, Schwarz M, Rigotti A, Krieger M, Groen AK, Kuipers F. Down-regulation of intestinal scavenger receptor class B, type I (SR-BI) expression in rodents under conditions of deficient bile delivery to the intestine. *Biochem J.* 2001;356(Pt 2):317-25.

Wadsack C, Hammer A, Levak-Frank S, Desoye G, Kozarsky KF, Hirschmugl B, Sattler W, Malle E. Selective cholesteryl ester uptake from high density lipoprotein by human first trimester and term villous trophoblast cells. *Placenta*. 2003;24(2-3):131-43.

Wang N, Arai T, Ji Y, Rinninger F, Tall AR. Liver-specific overexpression of scavenger receptor BI decreases levels of very low density lipoprotein ApoB, low density lipoprotein ApoB, and high density lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem*. 1998; 4;273(49):32920-6.

Wang N, Silver DL, Costet P, Tall AR. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem*. 2000;275(42):33053-8.

Wang N, Silver DL, Thiele C, Tall AR. ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) functions as a cholesterol efflux regulatory protein. *J Biol Chem*. 2001 Jun 29;276(26):23742-7.

Wang Z, Jiang T, Li J, Proctor G, McManaman JL, Lucia S, Chua S, Levi M. Regulation of renal lipid metabolism, lipid accumulation, and glomerulosclerosis in FVBdb/db mice with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54(8):2328-35.

Wang MD, Franklin V, Marcel YL. In Vivo Reverse Cholesterol Transport From Macrophages Lacking ABCA1 Expression Is Impaired. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1837-1842.

Wellington CL, Walker EK, Suarez A, Kwok A, Bissada N, Singaraja R, Yang YZ, Zhang LH, James E, Wilson JE, Francone O, McManus BM, Hayden MR. ABCA1 mRNA and protein distribution patterns predict multiple different roles and levels of regulation. *Lab Invest*. 2002;82(3):273-83.

West-Eberhard MJ. Phenotypic plasticity and the origins of diversity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 1989;20:249-78.

White CL, Whittington A, Barnes MJ, Wang Z, Bray GA, Morrison CD. HF diets increase hypothalamic PTP1B and induce leptin resistance through both leptin-dependent and -independent mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009 Feb;296(2):E291-9.

Wiersma H, Nijstad N, Gautier T, Iqbal J, Kuipers F, Hussain MM, Tietge UJ. Scavenger receptor BI facilitates hepatic very low density lipoprotein production in mice. *J Lipid Res.* 2010;51(3):544-53.

Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar MM, Jansen J, Müller M, van der Meer R. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Med Genomics.* 2008 ;6;1:14.

Woollett LA. Maternal cholesterol in fetal development: transport of cholesterol from the maternal to the fetal circulation. *Am J Clin Nutr.* 2005;82(6):1155-1161.

Xu S, Laccotripe M, Huang X, Rigotti A, Zannis VI, Krieger M. Apolipoproteins of HDL can directly mediate binding to the scavenger receptor SR-BI, an HDL receptor that mediates selective lipid uptake. *J Lipid Res.* 1997;38(7):1289-98.

Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54(7):628-40.

Yesilaltay A, Kocher O, Pal R, Leiva A, Quiñones V, Rigotti A, Krieger M. PDZK1 Is Required for Maintaining Hepatic Scavenger Receptor, Class B, Type I (SR-BI) Steady State Levels but Not Its Surface Localization or Function. *J Bio Chem.* 2006; 281(39): 28975–28980.

Yu L, Li-Hawkins J, Hammer RE, Berge KE, Horton JD, Cohen JC, Hobbs HH. Overexpression of ABCG5 and ABCG8 promotes biliary cholesterol secretion and reduces fractional absorption of dietary cholesterol. *J Clin Invest.* 2002;110(5):671-80.

Zager RA, Johnson A, Anderson K, Wright S. Cholesterol ester accumulation: an immediate consequence of acute in vivo ischemic renal injury. *Kidney.* 2001;59(5):1750-61.

Zambrano E, Martínez-Samayoa PM, Rodríguez-González GL, Nathanielsz PW. Dietary intervention prior to pregnancy reverses metabolic programming in male offspring of obese rats. *J Physiol.* 2010;15;588(Pt 10):1791-9.

Zhao Y, Pennings M, Hildebrand RB, Ye D, Calpe-Berdiel L, Out R, Kjerrulf M, Hurt-Camejo E, Groen AK, Hoekstra M, Jessup W, Chimini G, Van Berkel TJ, Van Eck M. Enhanced foam cell formation, atherosclerotic lesion development, and inflammation by combined deletion of ABCA1 and SR-BI in Bone marrow-derived cells in LDL receptor knockout mice on western-type diet. *Circ Res.* 2010;107(12):e20-31.

Zhang W, Yancey PG, Su YR, Babaev VR, Zhang Y, Fazio S, Linton MF. Inactivation of macrophage scavenger receptor class B type I promotes atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2003;108(18):2258-63.

Zhang Y, Zanotti I, Reilly MP, Glick JM, Rothblat GH, Rader DJ. Overexpression of apolipoprotein A-I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces in vivo. *Circulation*. 2003;108(6):661-3.

Zhang Y, Da Silva JR, Reilly M, Billheimer JT, Rothblat GH, Rader DJ. Hepatic expression of scavenger receptor class B type I (SR-BI) is a positive regulator of macrophage reverse cholesterol transport in vivo. *J Clin Invest*. 2005;(10):2870-4.