



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS**

**VÍCTOR PEREIRA DO COUTO MUNIZ**

**ALTERAÇÕES RENAIIS NA PROLE ADULTA DE RATAS WISTAR**  
**EXPOSTAS A DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LIPÍDEOS**  
**DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

**Uberlândia**  
**Janeiro - 2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL APLICADAS**

**VÍCTOR PEREIRA DO COUTO MUNIZ**

**ALTERAÇÕES RENAIIS NA PROLE ADULTA DE RATAS WISTAR**  
**EXPOSTAS A DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LIPÍDEOS**  
**DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de  
Pós- Graduação em  
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade Federal de  
Uberlândia , como requisito para a obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

**Orientadora:** Profª Drª Ana Paula Coelho Balbi  
**Co-orientador:** Prof.Dr. Luiz Borges Bispo da Silva

**Uberlândia**  
**Janeiro - 2020**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M966 2020	<p>Muniz, Vítor Pereira do Couto, 1993- Alterações renais na prole adulta de ratas Wistar expostas a dietas com diferentes teores de lipídeos durante a gestação e lactação [recurso eletrônico] / Vítor Pereira do Couto Muniz. - 2020.</p> <p>Orientadora: Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.Ana Paula Coelho Balbi. Coorientador: Prof.Dr.Luiz Borges Bispo da Silva. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.231">http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.231</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Citologia. I. Balbi, Prof<sup>a</sup>.Dr<sup>a</sup>.Ana Paula Coelho, 1976-, (Orient.). II. Silva, Prof.Dr.Luiz Borges Bispo da,1978-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 576.3</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural  
 Aplicadas

Rua Piauí, Bloco 2B, Sala 2B218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: 34 3225-8484 - ppgbc@icbim.ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Biologia Celular e Estrutural Aplicadas				
	Dissertação de Mestrado Acadêmico , número 002/2020, do PPGBC				
Data:	31/01/2020	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	18:00
Matrícula do Discente:	11722BCE005				
Nome do Discente:	Victor Pereira do Couto Muniz				
Título do Trabalho:	Alterações renais na prole adulta de ratas Wistar expostas a dietas com diferentes teores de lipídeos durante a gestação e lactação				
Área de concentração:	Biologia Celular				
Linha de pesquisa:	Biologia dos Sistemas Cardiovascular e Renal				
Projeto de Pesquisa de vinculação:					

Reuniu-se na Sala de Práticas Virtuais, no Bloco 2A Campus Umarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, assim composta: Professores Doutores: Simone Ramos Deconte – IFASC; Alberto da Silva Moraes – UFU e Ana Paula Coelho Balbi orientadora do candidato.

Iniciando os trabalhos a presidente da mesa, Dra. Ana Paula Coelho Balbi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Alberto da Silva Moraes, Membro de Comissão**, em 31/01/2020, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Coelho Balbi, Presidente**, em 31/01/2020, às 17:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Simone Ramos Deconte, Biólogo(a)**, em 03/02/2020, às 10:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Simone Ramos Deconte, Usuário Externo**, em 16/03/2020, às 13:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1823712** e o código CRC **296DB1C2**.

---

**VÍCTOR PEREIRA DO COUTO MUNIZ**

**ALTERAÇÕES RENAIAS NA PROLE ADULTA DE RATAS WISTAR  
EXPOSTAS A DIETAS COM DIFERENTES TEORES DE LIPÍDEOS  
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de  
Pós- Graduação em  
Biologia Celular e Estrutural Aplicadas, do Instituto de  
Ciências Biomédicas da Universidade Federal de  
Uberlândia , como requisito para a obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Coelho Balbi

**Co-orientador:** Prof.Dr. Luiz Borges Bispo da Silva

Banca de avaliação:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Coelho Balbi  
(Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM – UFU)

---

Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Alberto da Silva Moraes  
(Instituto de Ciências Biomédicas – ICBIM – UFU)

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Ramos Deconte  
(Faculdade Santa Rita de Cássia – UNIFASC)

Uberlândia, 31 de Janeiro de 2020

## AGRADECIMENTOS

Mais um ciclo se encerra em minha jornada de vida, e eu não poderia estar mais satisfeito e grato pelas bênçãos e graças divinas recebidas ao longo desses anos. Agradeço a Deus pela oportunidade que ele me deu de estar finalizando mais uma parte importante da minha vida acadêmica, me proporcionando força e determinação para seguir em frente, mesmo diante das dificuldades enfrentadas nos últimos meses. À minha família e amigos mais próximos, vocês fazem parte desta conquista, por sempre me dar suporte e conforto em vários momentos da vida, me proporcionando experiências inesquecíveis e inigualáveis ao longo de todos esses anos. Dedico esta conquista a você mamãe Valéria, vovó Dalva e minha irmã Laís, vocês são meu alicerce e meu porto seguro, sem o apoio incondicional de vocês, eu não chegaria até aqui. Aos meus amigos mais próximos, os quais levo para a vida toda um sentimento de gratidão, companheirismo e lealdade, dedico a vocês, Aline, Aurélio e Alice (nossa princesinha); Andréa, Gabriel, Leevan, Bruna, Talita, Cássio, Vinicius, Alberto, Ronny e tantos outros que fazem dos meus dias sempre cada vez melhores. Vocês são especiais!!! Agradeço também, a minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Coelho Balbi pelo excepcional trabalho de orientação e dedicação para com nós, seus alunos, sou grato por todos os ensinamentos e paciência em me ensinar o que sei hoje. E, por todo apoio recebido quando eu estava afastado por problemas de saúde. Ao meu grande amigo, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Alberto da Silva Moraes, que me acompanha desde o início da graduação e que sempre esteve presente nas minhas defesas de trabalhos, contribuindo com sua experiência no mundo científico, mas sobretudo com seu companheirismo e capacidade de nos despertar interesse em aprofundar cada vez mais nos assuntos abordados em sala, agradeço por nossa convivência e amizade de longa data. Ao meu co-orientador Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Luiz Borges Bispo-da-Silva, que aceitou mais vez contribuir conosco com sua vivência no mundo da pesquisa e ensinamentos acerca da influência da espiritualidade em minha vida, para compreender as situações difíceis que passei nos últimos meses, agradeço imensamente por tudo professor. À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Simone Ramos Deconte, que aceitou com alegria ser membro da minha banca, agradeço a você e a Isabella por todo apoio durante o processamento do material para a realização desse trabalho e os bons papos durante as tardes no laboratório. Aos meus colegas de laboratório, Víctor e Matheus, que continuaram a prosseguir com meu primeiro trabalho no mestrado, quando eu estava afastado, agradeço a vocês pelo apoio e solidariedade. Dedico esta conquista também a você Edilge, agradeço por todo empenho,

companheirismo e amizade ao longo de todos esses anos, seu apoio foi crucial para que tudo isso fosse possível. A todos os mestres e doutores, com os quais tive a honra de conviver ao longo desses anos na Universidade, agradeço por todo ensinamento e qualificação alcançados.

*“Não há progresso sem esforço, vitória sem luta, aperfeiçoamento sem sacrifício, assim como não existe tranquilidade sem paciência”.*

*Chico Xavier*

## RESUMO

Estudos experimentais e em humanos demonstram que alterações no ambiente intrauterino podem programar doenças na vida adulta da progênie. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as possíveis alterações renais na prole adulta de ratas *Wistar* expostas à dieta hiperlipídica, com diferentes teores de lipídeos, durante a gestação e lactação. Para isso, foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas para acasalamento. Uma vez grávidas, as ratas e seus filhotes fêmeas de 120 dias foram divididos nos grupos: **1) Controle - C:** filhotes (n=10) de mães que receberam dieta comercial (3,5% de lipídeos); **2) Experimental 1 – E1:** filhotes (n=10) de mães que receberam dieta hiperlipídica com 28% de lipídeos; **3) Experimental 2:** filhotes (n=10) de mães que receberam dieta hiperlipídica com 40% de lipídeos. Foram avaliados parâmetros maternos como consumos hídrico, alimentar, calórico diário e de macronutrientes e variação de peso corporal na gestação; e parâmetros da prole como determinação da taxa de filtração glomerular (TFG), excreção urinária de proteínas (EUP), níveis plasmáticos de triglicerídeos (TG), colesterol total (CT) e glicemia e coleta dos rins para quantificação de colágeno cortical e estudos morfométricos e imunohistoquímicos. Já as ratas de E1 ingeriram mais calorias que os demais grupos e, juntamente com as mães de E2, consumiram mais lipídeos. A porcentagem de colágeno total e de colágeno tipo I foi maior nos grupos experimentais, principalmente em E1, e a porcentagem de colágeno tipo III foi maior em E2. Os animais de E2 apresentaram maior número de células em proliferação no compartimento tubulointersticial (TBI) renal e juntamente com os de E1 tiveram maior expressão de alfa-actina glomerular, que foi mais evidente em E1, assim como a expressão TBI. Os 2 grupos experimentais, principalmente E1, também apresentaram maior expressão glomerular de desmina. Não houve diferenças significativas entre os grupos nos estudos morfométricos, nem nos níveis plasmáticos de CT e TG e glicemia, mas os animais de E1 apresentaram redução da TFG. O consumo materno de dietas hiperlipídicas, durante a gestação e lactação, pode programar alterações renais importantes na prole adulta de ratas *Wistar*, mas de magnitude e tipo diferentes, dependendo do teor de lipídeos da dieta.

**Palavras-chave:** dieta hiperlipídica materna, prole adulta, rins, ratas *Wistar*.

## ABSTRACT

Experimental and human studies demonstrate that changes in the intrauterine environment can program diseases in the adult life of the progeny. Thus, this study aimed to evaluate possible renal changes in the adult offspring from Wistar rats exposed to a high-fat diet, with different levels of lipids, during pregnancy and lactation. For this, male and female Wistar rats were used for mating. Once pregnant, the rats and their 120-day old female pups were divided into groups: **1) Control - C:** pups (n = 10) from dams who received a commercial diet (3.5% lipids); **2) Experimental 1 - E1:** pups (n = 10) from dams who received a high-fat diet with 28% lipids; **3) Experimental 2:** pups (n = 10) from dams who received a high fat diet with 40% lipids. Maternal parameters were evaluated, such as water, food, daily caloric and macronutrient consumption and body weight variation during pregnancy; and offspring parameters such as determination of glomerular filtration rate (GFR), urinary protein excretion (EUP), plasma triglyceride levels (TG), total cholesterol (TC) and blood glucose and kidney collection for quantification of cortical collagen and morphometric and immunohistochemistry studies. E2 dams consumed less food than E1, in addition to less carbohydrates and proteins. The E1 dams consumed more calories than the other groups and, together with the E2 dams, consumed more lipids. The percentage of total collagen and type I collagen was higher in the experimental groups, mainly in E1, and the percentage of type III collagen was higher in E2. The animals from E2 showed a greater number of proliferating cells in the renal tubulointerstitial compartment (TBI) and, together with those of E1, they had greater expression of glomerular alpha-actin, which was more evident in E1, as well as the expression of TBI. The experimental groups, mainly E1, also showed greater glomerular expression of desmin. There were no significant differences between the groups in the morphometric studies, nor in the plasma levels of CT and TG and glycemia, but the E1 animals showed a reduction in GFR. Maternal consumption of high-fat diets, during pregnancy and lactation, can schedule important renal changes in the adult offspring of Wistar rats, but of different magnitude and type, depending on the lipid content of the diet.

**Keywords:** maternal hyperlipidic diet, adult offspring, kidneys, Wistar rats.

## SUMÁRIO

<b>1) INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2) OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3) MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4) RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>5) DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>6) CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>

## 1) INTRODUÇÃO:

### 1.1. Obesidade

A obesidade é caracterizada por um acúmulo excessivo de tecido adiposo corporal e resulta em uma série de eventos fisiopatológicos que podem prejudicar a saúde do indivíduo. Tal condição é considerada um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica, além de estar intimamente relacionada a alterações fisiopatológicas nos sistemas cardiovascular, renal e endócrino (AL-GOBLAN et al., 2014; HALL et al., 2015). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde – OMS, em 2014 cerca de 11% da população masculina e 15% da população feminina acima de 18 anos eram obesas e que no ano de 2013, 42 milhões de crianças com idade abaixo de 5 anos estavam em condição de sobrepeso. De acordo com a pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel) de 2018, a taxa de obesidade brasileira passou de 11,8% para 19,8%, entre 2006 e 2018, representando um aumento percentual de 67%.

Segundo dados das Diretrizes Brasileiras de Obesidade - DBO (2016), a etiologia da obesidade é complexa e multifatorial, resultando da interação de genes, ambiente, estilos de vida e fatores emocionais. Em relação à influência genética, a obesidade tem herança poligênica, pois nem todos os indivíduos ganham a mesma quantidade de peso quando expostos a dietas hipercalóricas. O ambiente moderno é um potente estímulo para a obesidade, a diminuição de atividade física e o aumento da ingestão calórica são fatores determinantes mais potentes para o desenvolvimento de sobrepeso na população. Nas últimas décadas, a população tem aumentado o consumo de alimentos com alta densidade calórica, alta palatabilidade, baixo poder de saciedade e de fácil absorção e digestão. Estas características favorecem o aumento da ingestão alimentar e, portanto, contribuem para o desequilíbrio energético. Mudanças sócio-comportamentais da população também estão implicadas no aumento da ingestão alimentar e portanto, no aparecimento da obesidade, como a diminuição do número de refeições realizadas em casa e o aumento compensatório da alimentação em redes de *fast food* contribuem para o aumento do conteúdo calórico de cada refeição.

Além disso, sabe-se que fatores emocionais podem estar intimamente relacionados com o desenvolvimento da obesidade. Estresse, depressão, nervosismo e o hábito de se alimentar quando problemas emocionais estão presentes são comuns em

pacientes com sobrepeso ou obesidade, sugerindo uma relação entre estresse, compulsão por comida palatável, transtorno de compulsão alimentar e obesidade (DBO , 2016).

## **1.2. Obesidade, consumo de dietas ricas em gorduras e função renal**

Sabe-se que a obesidade pode estar relacionada a doenças, especialmente Diabetes Mellitus e hipertensão, pelo fato de estarem associadas ao aumento de inflamação sistêmica de baixo grau, podendo contribuir para quadros de lesão renal e doenças cardiovasculares (HOSSAIN et al., 2007; KANEKO, et al. 2011). Hall e colaboradores (2014) demonstraram que o rápido aumento de peso ponderal em animais experimentais pode ocasionar hiperfiltração glomerular, que em longo prazo, pode resultar em diminuição de Taxa de Filtração Glomerular (TFG), devido a possível perda de nefros funcionantes no decorrer do processo.

O consumo de dietas ricas em gorduras por camundongos pode induzir várias alterações metabólicas, como obesidade, hiperglicemia, perfil lipídico anormal, que são muito similares ao que é observado em pacientes com síndrome metabólica. Além disso, foram observados vários tipos de lesões renais, como lesões glomerulares e tubulointersticiais (JIANG et al; 2005a; KUME et al; 2007; WEI et al; 2004).

No mesmo sentido, pacientes portadores de síndrome metabólica, podem apresentar maior risco de desenvolvimento de doença renal crônica, devido a vários fatores ligados intimamente a esta síndrome, sendo um deles a dislipidemia, ocasionada por dietas ricas em colesterol (CHEN et al; 2004; KURELLA et al; 2005; NINOMIYA et al; 2006; PALANIAPPAN et al; 2003).

Deji e colaboradores (2009) observaram em camundongos C57BL/6 que a dieta rica em gorduras (60% de lipídeos) por 12 semanas provocou anormalidades metabólicas sistêmicas, como aumento no peso corporal, pressão arterial sistólica, insulina plasmática, glicemia, triglicérides e lesões renais como albuminúria, além do aumento da área do tufo glomerular e expansão mesangial. Outras alterações fisiopatológicas renais encontradas foram: acúmulo de lipídeos nos rins (lipotoxicidade), aumento de colágeno tipo IV nos glomérulos, infiltração de macrófagos na medula renal e desregulação do metabolismo de sódio.

### **1.3) Possíveis mecanismos envolvidos no dano renal resultante do consumo de dietas hiperlipídicas**

Os fatores que relacionam metabolismo lipídico alterado e a ocorrência de lesão renal ainda não estão totalmente estabelecidos (KUME et al; 2007), mas a elucidação desses mecanismos faz-se necessária para o aperfeiçoamento de estratégias terapêuticas contra este tipo de lesão (JIANG et al; 2005).

Alguns estudos mostram que a dieta hiperlipídica associada a uma ingestão excessiva de calorias, contribua para o desenvolvimento da síndrome metabólica, e como consequência, acúmulo de lipídeos nos rins. Sabe-se que lesões glomerulares e tubulointersticiais associadas com glomerulopatias crônicas, síndrome nefrótica, dano renal crônico, obesidade associada à doença renal e nefrosclerose com o processo de envelhecimento são ocasionados pelo acúmulo de lipídeos renais (KIM et al; 2009; ABRASS, 2004; PINHAL et al; 2013; JIANG et al; 2005). Esse acúmulo pode ocasionar lesão celular tubular renal; fibrose tubulointersticial; lesão de podócitos; esclerose mesangial e alterações estruturais glomerulares, culminando em proteinúria, glomerulonefrite e, conseqüentemente, doença renal crônica (NOSADINI et al ; 2011; TAKABATAKE et al ; 2017; ABRASS ,2004; KEANE, 2000; ZHOU et al; 2016; BOBULESCU, 2010).

Há evidências de que o desequilíbrio entre a lipogênese e a lipólise nos tecidos contribua para o acúmulo de lipídeos locais e alterações fisiopatológicas subsequentes. Além disso, pode-se fazer uma associação importante entre o acúmulo de lipídeos nos rins e mediadores pró-inflamatórios renais, como interleucina -1(IL-1), interleucina - 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF –  $\alpha$ ) (MARTINS et al ; 2015).

Estudos experimentais confirmam a relação entre excesso de lipídeos e prejuízos renais. Muller e colaboradores (2019) observaram que ratos *Wistar* adultos jovens, submetidos à dieta rica em lipídeos e observados por 8 semanas, apresentaram diminuição da TFG. A análise histológica mostrou retração glomerular e aumento da deposição de lipídeos renais e, ainda, um aumento de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-1b, sem alterar a citocina anti-inflamatória IL-10. Esses danos podem estar associados a um risco maior de desenvolvimento de doença renal crônica na idade adulta, sugerindo que a redução da ingestão de uma dieta rica em lipídeos durante as fases iniciais da vida possa prevenir possíveis distúrbios metabólicos e lipotoxicidade renal.

Além da lipotoxicidade renal, o consumo de dieta hiperlipídica parece estar relacionado à disfunção endotelial e hipertensão, sendo ambos induzidos por aumento de

estresse oxidativo, em resposta a um processo inflamatório exacerbado, que prejudica a integridade da barreira de filtração, resultando em lesão renal (KNIGHT et al; 2008; PINHAL et al; 2013; EBENEZER et al; 2009).

#### **1.4. Programação fetal e dietas hiperlipídicas**

Sabe-se que a exposição de fetos a agentes ou doenças maternas durante o período de organogênese possa comprometer sua saúde na vida adulta, conceito que ficou conhecido como programação fetal (*fetal programming*). Este termo foi criado por Hales e Barker em 2001 e demonstra que a necessidade de adaptação do feto a um ambiente intrauterino hostil pode resultar em mudanças fisiológicas permanentes para o indivíduo na vida adulta, que ocorrem devido à plasticidade celular que existe na fase de organogênese do desenvolvimento fetal (LANGLE-EVANS, 2014; NEHIRI et al., 2008).

A programação fetal relacionada à oferta calórica e/ou de nutrientes à prole pode ser obtida por dois modelos: insuficiência placentária com a ligação da artéria uterina ou manipulação dietética (restrição calórica global, restrição proteica, restrição de micronutrientes, dieta hiperlipídica, dieta rica em carboidratos, entre outras) (ARMITAGE et al., 2004; NÜSKEN et al., 2011, RAO et al., 2012). Quando é realizada a ligação da artéria uterina, em ratos *Wistar*, acontece a programação da resistência à insulina, resistência à leptina, aumento dos triglicerídeos circulantes e da adiposidade global no início da vida adulta em até 10 semanas de idade. Em contrapartida, quando a programação acontece devido à manipulação dietética, esses eventos acontecem mais tardiamente nos animais, com exceção da hipertensão arterial que aparece mais cedo em animais submetidos à restrição alimentar do que aqueles expostos à insuficiência placentária (NÜSKEN et al., 2011).

Vários são os modelos animais usados para se estudar obesidade e síndrome metabólica a partir de programação fetal. O tratamento prolongado de roedores com dieta hiperlipídica/hipercalórica pode levar a um aumento de 10-20% no peso corporal destes animais em comparação aos controles (BUETTNER; SCHOLMERICH & BOLLHEIMER, 2007).

Alguns estudos atestam o fato de que a obesidade durante a gravidez aumenta o risco de desenvolvimento de diabetes gestacional e pré-eclâmpsia, além de sérias complicações no período de parto e pós-natal. Dessa forma, existem evidências que comprovam que a programação fetal desempenha um papel na regulação das complicações metabólicas, as quais a prole pode estar vulnerável. Assim, a obesidade

materna em longo prazo, pode ocasionar efeitos adversos na composição corporal, metabolismo, resistência insulínica e dislipidemia (HESLEHURST et al, 2010; NOHR et al, 2008; DEARDEN et al, 2018; WANKHADE et al, 2016).

Há indícios de que a programação fetal possa interferir no desenvolvimento da prole, desde a pré-concepção, gestação precoce e gestação tardia, ocasionando efeitos sobre a fisiologia e o desenvolvimento de órgãos da prole. Por exemplo, fetos removidos de camundongos fêmeas obesas (C57BL/6J) no 18º dia de gestação, apresentaram aumento de gordura subcutânea com hipertrofia de adipócitos e diminuição da expressão do gene para GLUT-4, sugerindo uma diminuição da sensibilidade insulínica fetal, quando comparados com fetos obtidos de camundongos C57BL/6J magros (ELLSWORTH et al, 2018; FALL et al, 2019; MURABAYASHI et al, 2013). Samuelsson e colaboradores (2008) mostraram que camundongos fêmeas C57BL/6J, mantidas com dieta hiperlipídica por 6 semanas antes do acasalamento e durante a lactação, tiveram filhotes com aumento da ingestão de ração, adiposidade, hipertensão e resistência à insulina em comparação com camundongos C57BL/6J controle, nascidos de fêmeas que foram mantidas com dieta normolipídica.

Outro estudo mostrou que filhotes de camundongos fêmeas C57BL/6J expostas à dieta hiperlipídica, apenas durante a gestação e que permaneceram com dieta padrão (normolipídica), apresentaram aumento de peso corporal, hiperglicemia, hipertensão, esteatose hepática e resistência insulínica, quando comparados à prole nascida de camundongos C57BL/6J expostos à dieta padrão (LIANG et al, 2009; ELAHI et al, 2009).

A exposição à dieta hiperlipídica, em momentos diferentes, pode ocasionar fenótipos alterados na prole, dependendo de quais células e tecidos estão se desenvolvendo naquele estágio de desenvolvimento. A disfunção do tecido adiposo tem vários efeitos fisiológicos, de forma que altos níveis de ácidos graxos livres liberados do tecido adiposo visceral durante a exposição à dieta hiperlipídica, são responsáveis por uma resposta aguda inflamatória na prole, que se estende até restaurar a homeostase metabólica, com a ação do recrutamento de células do sistema imune, ativando citocinas e adipocinas (KOTAS et al, 2015; MORRIS et al, 2013). Os impactos da obesidade materna ou do consumo de dietas hiperlipídicas durante a gestação e amamentação para a prole vão além dos mencionados até o momento, há evidências também de comprometimento renal. Glastras e colaboradores (2015) demonstraram que a prole de mães obesas de camundongos C57BL/6 alimentadas com dieta hiperlipídica (43% de lipídeos) durante 6 semanas, antes do acasalamento e durante toda a gestação e lactação, apresentou

tolerância à glicose diminuída e alterações no metabolismo lipídico no 20º dia de vida. Além disso, os filhotes apresentaram acúmulo de lipídeos no córtex renal, inflamação e marcadores fibróticos precoces nos rins ao nascimento.

Dentro desta perspectiva, Chang e colaboradores (2019) propuseram um estudo onde se pretendia investigar os efeitos da programação materno-fetal com dieta hiperlipídica durante a pré-concepção e o período pré-concepção/gestação, avaliando a adiposidade e inflamação do tecido adiposo na prole de camundongos C57BL/6J. A prole do grupo pré-concepção obteve maior ganho de peso corporal, com maior tecido adiposo subcutâneo e maior massa hepática. Já a prole do grupo pré-concepção/gestação apresentou piora na tolerância à glicose e aumento de macrófagos, confirmando que os efeitos da programação materno-fetal em diferentes estágios de desenvolvimento podem influenciar diferentemente no fenótipo da prole.

Existem estudos experimentais e em humanos mostrando que o consumo de dieta hiperlipídica, durante a gestação e amamentação, pode programar distúrbios renais na progênie. Trabalhos anteriores do laboratório mostraram que filhotes fêmeas de 30 dias de mães que receberam dietas com 28 e 40% de lipídeos, apresentaram menor peso que as do grupo controle e as de 90 dias do grupo 28% tiveram redução da TFG e aumento de pressão arterial sistólica, enquanto que as do grupo 40% tiveram hiperfiltração, além de aumento na excreção de proteínas urinárias, embora o peso corporal não tenha sido diferente entre os grupos nesta idade. Ou seja, o aumento no teor de lipídeos na dieta materna não agravou as alterações renais apresentadas pela prole, mas teve repercussões diferentes, mesmo sem ter provocado obesidade nas mães. Sendo assim, o presente trabalho se propôs a acompanhar esses filhotes fêmeas por mais tempo, cerca de 120 dias de idade, para avaliar se o fator tempo também alteraria a magnitude/tipo dessas alterações, além de detalhá-las do ponto de vista funcional, morfológico, imunohistoquímico e morfométrico.

Estudos como o proposto são importantes para compreensão dos mecanismos envolvidos nos distúrbios renais apresentados por indivíduos adultos, que podem ter sido programados no ambiente intrauterino, com vistas a contribuir com possíveis estratégias terapêuticas para esse tipo de paciente e conscientizar gestantes sobre a importância da adoção de dieta adequada, do ponto de vista calórico, privilegiando a proporção adequada entre os macronutrientes.

## 2) OBJETIVOS:

### 2.2) OBJETIVO GERAL:

Avaliar as possíveis alterações renais na prole adulta de ratas *Wistar* expostas à dieta hiperlipídica, com diferentes teores de lipídeos, durante a gestação e lactação.

### 2.3) OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Avaliar parâmetros maternos durante a gestação, como ganho de peso e consumos de ração, hídrico; calórico e dos macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos, dos grupos Controle, Experimental 1 (dieta hiperlipídica - 28%) e Experimental 2 (dieta hiperlipídica – 40%).
- ✓ Avaliar parâmetros gerais na prole, como: peso corporal, peso relativo renal, taxa de filtração glomerular (TFG), excreção urinária de proteína (EUP), níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos e glicemia dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 (dieta hiperlipídica - 28%) e Experimental 2 (dieta hiperlipídica – 40%).
- ✓ Analisar parâmetros renais específicos da prole, como: a porcentagem de colágeno cortical total, colágeno cortical tipo 1 e colágeno cortical tipo 3; expressão de alfa-actina, desmina e células em proliferação (PCNA – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*), além de determinar as áreas dos corpúsculos renais, tufo glomerulares e espaços capsulares dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 (dieta hiperlipídica - 28%) e Experimental 2 (dieta hiperlipídica – 40%).
- ✓ Correlacionar os efeitos de dietas maternas com diferentes teores de lipídeos para as mães, durante a gestação, e para a prole adulta de ratas *Wistar*.

### 3) MATERIAL E MÉTODOS:

Todos os protocolos experimentais necessários para o desenvolvimento deste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais sob o protocolo CEUA/UFU nº 054/18 de 29 de agosto de 2018 (ANEXO).

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (350g) e fêmeas (180g) provenientes do da Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU). Os animais foram separados por sexo e mantidos em caixas, de polipropileno grandes (dimensões CxLxA: 41x34x16cm) com maravalha, distribuídas em estantes, em salas com temperatura controlada, ciclo claro-escuro de 12 horas e com água e ração *ad libitum*, no depósito de animais localizado no Departamento de Fisiologia (DEFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da UFU. Os machos (n=15) foram mantidos individualmente em suas caixas para reconhecimento de território e diariamente, ao final da tarde, as fêmeas (n=33) foram colocadas nas caixas dos machos na proporção de 2 a 3 fêmeas para cada macho. No início da manhã do dia seguinte, foi realizado o esfregaço vaginal para detecção de uma possível gravidez, pela presença de espermatozoides no esfregaço. Uma vez grávidas, as fêmeas foram colocadas em caixas individuais (dimensões CxLxA: 30x19x13cm) e após o nascimento, seus filhotes fêmeas foram divididos nos seguintes grupos:

- **Controle - C:** filhotes (n=10) de mães (n=7) que receberam dieta comercial durante a gestação e lactação;
- **Experimental 1 - E1:** filhotes (n=10) de mães (n=8) que receberam dieta hiperlipídica com teor de 28% de lipídeos, durante a gestação e lactação.
- **Experimental 2 - E2:** filhotes (n=10) de mães (n=8) que receberam dieta hiperlipídica com teor de 40% de lipídeos, durante a gestação e lactação.

Durante o tratamento com as respectivas dietas foram acompanhados parâmetros maternos como: consumo médio diário de ração e líquido por 5 dias consecutivos, bem como a variação de peso corporal ao longo dos 21 dias de gestação. As mães e, posteriormente, os filhotes foram mantidos com água e ração *ad libitum*. Após o desmame, os filhotes foram mantidos com ração comercial.

O consumo médio diário de ração pelas ratas grávidas foi acompanhado durante cinco dias, a partir do 8º dia de gestação. Para isso, a ração foi pesada e o volume de

líquidos foi avaliado por meio de uma proveta inicialmente (no dia 0) e todos os dias, no mesmo horário, durante os cinco dias de avaliação, a ração era pesada e o volume de líquido avaliado, sendo a diferença da primeira e da segunda avaliações, a quantidade de ração e líquidos, respectivamente, ingeridos pelos animais. Através de cálculos nutricionais foram feitas estimativas sobre o consumo de macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos, levando-se em consideração a quantidade de ração ingerida e a composição de cada uma das dietas. A análise da variação de peso corporal durante a gestação foi realizada pesando-se as ratas no 1º e no 20º dia de gravidez.

### **3.2 Composição das Rações**

A ração normolipídica consistiu em ração comercial (Nuvilab) para ratos contendo por peso: 19% de proteínas, 56% de carboidratos e 3,5% de lipídeos, totalizando 4,068kcal/g (17,03KJ/g). Já a ração hiperlipídica 28% consistiu na adição de alimentos hipercalóricos à 65g de ração comercial (Nuvilab) na seguinte proporção: 12g de amendoim torrado, 4g de chocolate ao leite, 2g de biscoito maisena e 17g de banha de porco, de modo que a composição centesimal dessa ração foi de 15% de proteínas, 42% de carboidratos, 28% de lipídeos, totalizando 5,25kcal/g (21,96 KJ/g) (adaptado de DUARTE et al, 2006). Enquanto a ração hiperlipídica 40% continha os mesmos ingredientes que foram adicionados à ração 28%, mas em proporções diferenciadas. Foram adicionados à 48g de ração comercial (Nuvilab), 18g de amendoim torrado, 5g de chocolate ao leite, 3g de biscoito maisena e 26g de banha de porco. Estes ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de peletes, contendo por peso: 14% de proteínas, 35% carboidratos e 40% de lipídeos, totalizando 5,83 kcal/g (24,39 KJ/g).

### **3.3 Testes Funcionais**

Os estudos de função renal foram feitos nos animais de 120 dias pelo *clearance* de creatinina. Os filhotes fêmeas foram colocados em gaiolas metabólicas durante 24 horas para adaptação. Em seguida, permaneceram por mais 24 horas para a coleta de urina, quando também foi coletada uma amostra de sangue. Para determinação do *clearance* de creatinina e conseqüentemente da Taxa de Filtração Glomerular (TFG), a dosagem de creatinina urinária e plasmática foi feita utilizando-se método colorimétrico (YAN et al, 2014).

A Excreção Urinária de Proteína foi determinada por colorimetria nos animais de 120 dias com o auxílio do vermelho de pirogalol (Labtest). Esta substância reage com o

molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul. A absorvância obtida pela leitura das amostras em espectrofotômetro é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra (MORAIS et al, 2018).

### **3.4 Coleta dos rins**

Após os estudos funcionais, os animais foram devidamente anestesiados com halotano (*Cristália*) e tiveram os rins coletados para a realização das análises morfométricas e de imunohistoquímica e para quantificação de colágeno cortical. Os animais foram pesados antes da coleta, assim como os rins, posteriormente. Os rins foram fixados em metacarn por 24 horas e, posteriormente, lavados em álcool 70%. Em seguida, os rins foram processados e incluídos em parafina para a realização de cortes de 4 µm de espessura com auxílio de um micrótomo.

### **3.5 Estudos morfométricos e quantificação de colágeno**

Os cortes foram corados com *Picrosirius Red* para quantificação de colágeno cortical total e realização dos estudos morfométricos.

A combinação da coloração com *Picrosirius red* e a luz polarizada fornece uma ferramenta poderosa para a análise estrutural do colágeno (RICH; WHITTAKER, 2005). As fibras de colágeno mais espessas, fortemente birrefringentes que apresentam-se coradas em amarelo ou vermelho, representam o colágeno tipo I, enquanto as fibras mais finas e dispersas, fracamente birrefringentes, apresentam-se coradas em verde, representando o colágeno tipo III (MONTES; JUNQUEIRA; 1991).

Para a quantificação do colágeno total e dos colágenos corticais dos tipos I e III, lâminas coradas com *Picrosirius red* foram observadas em microscópio Nikon equipado com filtro de polarização. Foram analisados 20 campos histológicos aleatórios de rim de cada animal, com ampliação de 200 vezes. Todas as imagens foram analisadas no programa *Image J*, e os valores obtidos foram expressos como porcentagem de área marcada.

A morfometria foi realizada determinando-se as medidas das áreas totais dos corpúsculos renais, dos tufo glomerulares e dos espaços capsulares de 20 glomérulos aleatórios/lâmina de cada animal capturados no aumento de 10x com o auxílio de um microscópio Olympus do Laboratório de Registro de Imagens Histológicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), acoplado a uma vídeo-câmera, que transmitia

as informações para o computador. A quantificação das áreas supracitadas foi realizada no programa *HL Image++97* (*Western Vision*, Salt Lake City, UT, USA).

### **3.6 Estudos imunohistoquímicos**

Para as imunorreações, os cortes foram incubados com os anticorpos primários monoclonais anti- $\alpha$ -SMA (1:1000 - *DAKO Corporation*) *overnight* a 4°C, anti-PCNA (1:1000 - *Sigma Chemical Company*) durante 30 minutos em temperatura ambiente, e anti-desmina (1:100 - *DAKO Corporation*) durante 60 minutos em temperatura ambiente.

Em seguida, os cortes foram submetidos a uma nova incubação, agora com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (1:200 – monoclonal - *Vector Laboratories*) durante 30 minutos em temperatura ambiente. A reação foi detectada com o sistema avidina-biotina peroxidase (*Vector Laboratories*), sendo que a adição de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (*Sigma Chemical Company*) juntamente com peróxido de hidrogênio permitiu o desenvolvimento de cor e a contracoloração foi feita com *metilgreen* – verde de metila.

Foi utilizado também solução tampão (PBS) com albumina sérica bovina (BSA - *Sigma Chemical Company*) a 5% para diluir os anticorpos e, assim, bloquear ligações inespecíficas.

### **3.7 Avaliação dos estudos imunohistoquímicos**

A imunohistoquímica para os anticorpos anti- $\alpha$ -SMA e anti-desmina foi avaliada analisando-se a porcentagem do glomérulo e/ou do compartimento tubulointersticial (TBI) renal marcado, atribuindo-se um escore de 0 a 4. O escore 0 equivale em 0 a 5% do campo marcado, o escore 1, entre 5 e 25%, o escore 2, entre 25 e 50%, o escore 3, entre 50 e 75% e o escore 4, entre 75 e 100% (KLIEM et al., 1996). Já as reações de PCNA foram analisadas pela contagem de células positivas por glomérulo ou compartimento TBI renal. Foi determinado um escore ou número médio de células por compartimento glomerular e TBI para cada animal, sendo que análise foi realizada na lâmina inteira. Ambos os estudos foram realizados utilizando microscopia de luz.

### **3.8 Determinação de lipídios séricos e glicemia**

Os níveis séricos de colesterol total e de triglicerídeos foram determinados por método enzimático-Trinder e avaliados nos filhotes fêmeas de 120 dias, a partir da coleta de sangue da cauda dos mesmos. Os ésteres de colesterol são hidrolisados pela enzima

colesterol esterase a colesterol livre e ácidos graxos. O colesterol livre é oxidado pela enzima colesterol oxidase a colest-4-em-ona e peróxido de hidrogênio. Na presença de peroxidase e peróxido de hidrogênio, o fenol e a 4-aminoantipirina são oxidados formando a antipirlquinonimina que tem absorvidade máxima em 500nm. A intensidade da cor vermelha formada na reação final é diretamente proporcional à concentração do colesterol na amostra.

Já para a determinação dos triglicerídeos, a lipoproteína lipase promove hidrólise dos triglicerídeos liberando glicerol, que é convertido pela ação da glicerolquinase, em glicerol-3-fosfato. Este é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e 4-clorofenol, catalisada pela enzima peroxidase, produzindo uma quinoneimina que tem máximo de absorbância em 505nm. A intensidade da cor vermelha formada é diretamente proporcional à concentração dos triglicerídeos na amostra.

A glicemia ocasional foi avaliada por meio de uma gota de sangue obtida através de um pequeno corte na cauda no animal e verificada com auxílio de um glicosímetro *Accu check active, Roche*.

### **3.9 Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada no software *GraphPad Prism Version 5.00* (Trial). Primeiramente, verificou-se se os dados apresentaram ou não distribuição normal com os testes de *Kolmogorov-Smirnov*, *D'Agostino e Pearson* e *Shapiro Wilk*. Quando foi constatada uma distribuição normal dos dados analisados, utilizou-se um teste paramétrico, caso contrário, utilizou-se um teste não-paramétrico. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . Os testes utilizados para cada parâmetro estudado são citados na legenda de cada gráfico constante no item Resultados.

## **4) RESULTADOS:**

### **Dados maternos**

Com relação aos parâmetros maternos avaliados durante a gestação, não houve diferenças entre os grupos para o ganho de peso, nem para o consumo de líquidos. No entanto, no que diz respeito ao consumo alimentar, as mães de E2 consumiram

quantitativamente menos ração que o grupo E1, além de menos carboidratos e proteínas, quando comparadas às mães controles e de E1. Já as ratas grávidas expostas à dieta hiperlipídica 28% (E1) apresentaram maior consumo calórico diário que os demais grupos e, juntamente com as mães de E2, consumiram mais lipídeos em comparação ao grupo Controle (**Tabela 1**). Vale destacar que o consumo de macronutrientes foi avaliado indiretamente, com o auxílio de cálculos nutricionais, levando-se em consideração a quantidade de ração ingerida e a composição das rações oferecidas aos animais.

**Tabela 1.** Parâmetros maternos avaliados durante a gestação nos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.

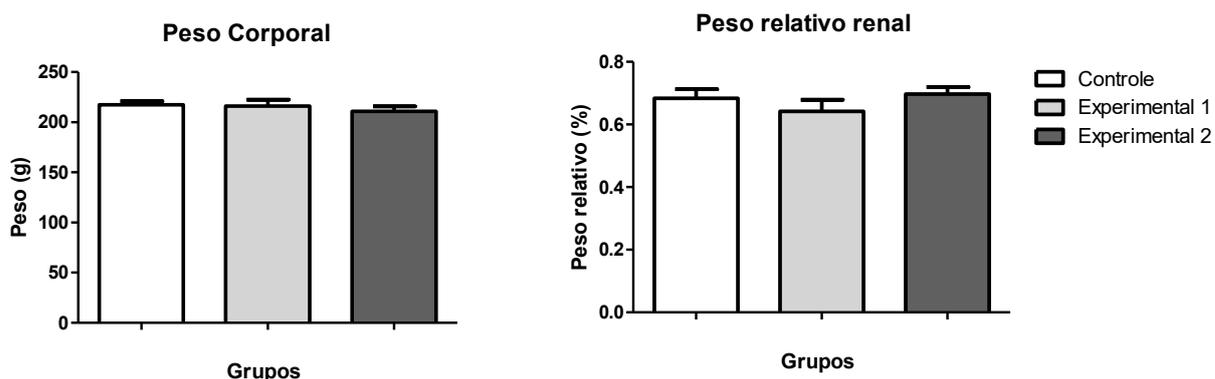
Parâmetros maternos	Controle	Experimental 1	Experimental 2
<b>Ganho de peso materno</b>	105,70±8,13	122,50±9,88	122,20±12,81
<b>Consumo de ração (g)</b>	21,94 (19,93-23,06)	27,01 (20,17-29,40)	16,93 (13,64-19,94)**E1
<b>Consumo de líquido (mL)</b>	66,40±3,41	63,10±3,35	61,85±6,36
<b>Consumo calórico (Kcal/dia)</b>	87,81±2,94	135,30±9,09***C***E2	99,22±6,70
<b>Consumo de carboidratos (g)</b>	12,09±0,41	10,80±0,73	5,99±0,42***C***E1
<b>Consumo de proteínas (g)</b>	4,10±0,14	3,98±0,27	2,30±0,16***C***E1
<b>Consumo de lipídeos (g)</b>	0,76±0,03	7,24±0,49***C	6,83±0,48***C

Parâmetros maternos avaliados durante a gestação dos grupos C (n=7), E1 (n=8), E2 (n=8). Ganho de peso, consumos de líquido, calórico, de carboidratos, proteínas e lipídeos: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média ± EPM. Consumo de ração: teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de p<0,05. \*\*\*C: p<0,001 versus Controle; \*\*\*E1: p<0,001 versus Experimental 1; \*\*E1: p<0,01 versus Experimental 1; \*\*\*E2: p<0,01 versus Experimental 2.

## Dados da prole

Quanto aos parâmetros avaliados nos filhotes fêmeas de 120 dias de idade, não houve diferenças entre os grupos para o peso corporal e peso relativo renal (**Figura 1**).

**Figura 1.** Gráficos do peso corporal e peso relativo renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.

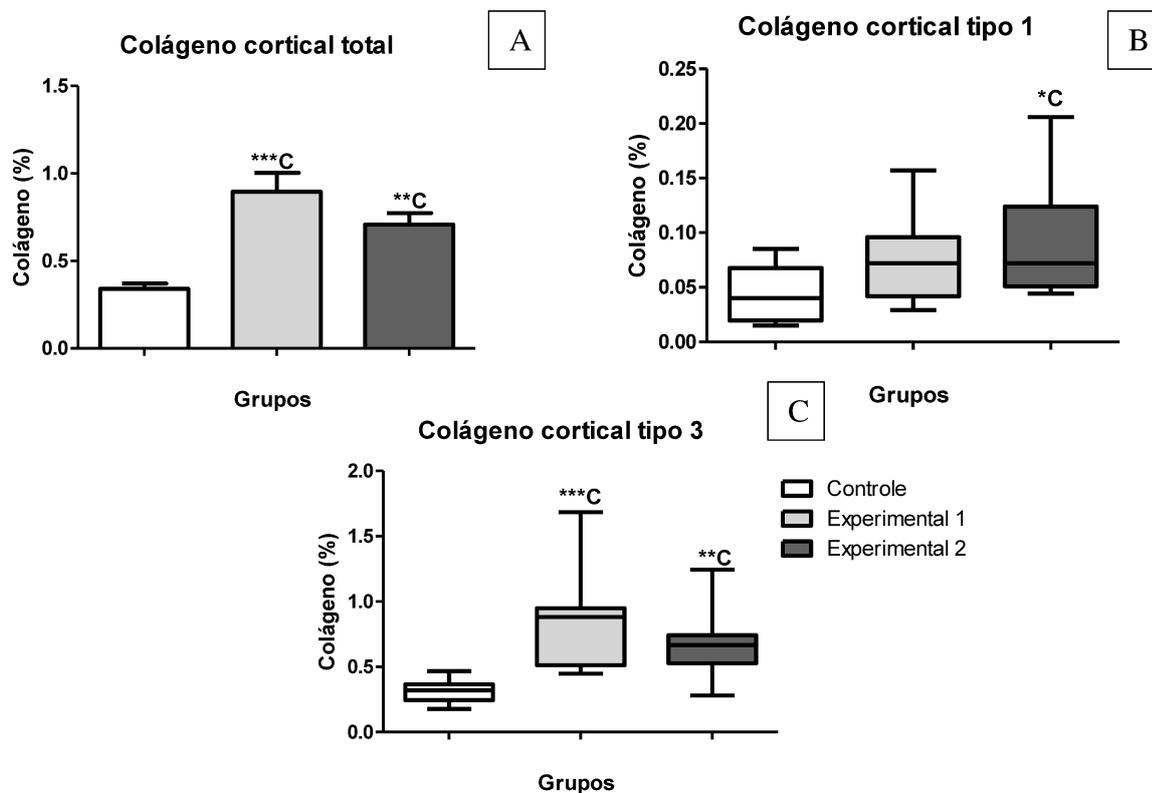


Peso corporal e peso relativo renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2. ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

Sabe-se da literatura, que o colágeno é um componente da matriz extracelular que se encontra aumentado em situações patológicas de lesões renais. Sendo assim, os rins da prole dos 3 grupos estudados foram coletados para quantificação de colágeno e realização de estudos imunohistoquímicos e morfométricos. A porcentagem de colágeno total e de colágeno tipo I foram maiores nos grupos experimentais, mas esse aumento foi mais evidente em E1 para o colágeno total e em E2 para o colágeno tipo I, que corresponde às fibras coradas em vermelho. Já a porcentagem de colágeno tipo III, que corresponde às fibras coradas em verde, foi mais expressiva no córtex renal de E1, todos em comparação ao grupo controle (**Figura 2**).

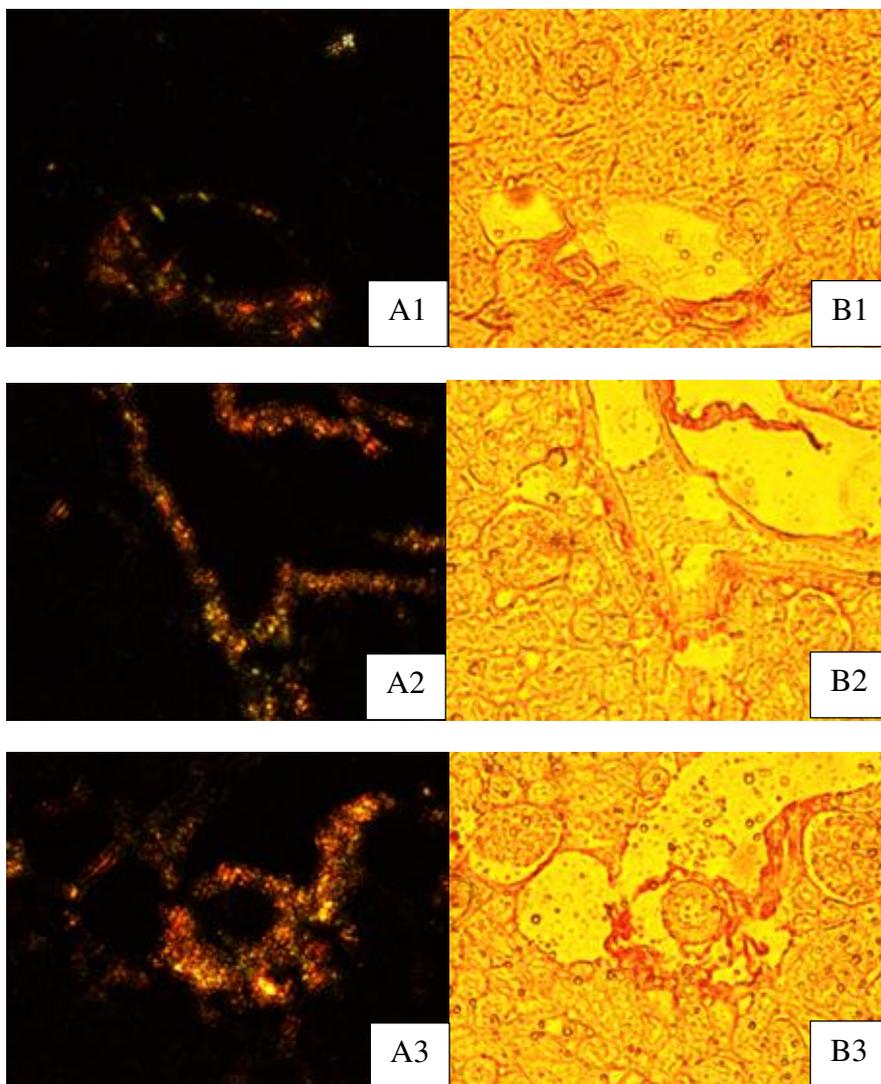
Foram obtidas imagens das lâminas coradas com *Picrossirius Red*, que no microscópio de luz polarizada, evidenciam a presença de colágeno cortical total, colágeno cortical tipo I, mostrado em vermelha e tipo III, mostrado em verde, no córtex renal dos animais dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2 (**Figura 3**).

**Figura 2.** Gráficos da porcentagem de colágeno cortical total (A), colágeno cortical tipo 1 (B) e colágeno cortical tipo 3 (C) renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.



Colágeno cortical total (A), colágeno tipo 1 (B) e colágeno tipo 3 (C) renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2. Colágeno cortical total: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. Colágeno cortical tipos I e III: Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . \*\*\*C:  $p < 0,001$  versus Controle, \*\*C:  $p < 0,01$  versus Controle; \*C:  $p < 0,05$  versus Controle.

**Figura 3.** Imagens das lâminas coradas com *Picrossirius Red* para quantificação de colágeno cortical total renal em luz polarizada (A) e não polarizada (B) dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle (A1, B1), Experimental 1 (A2, B2) e Experimental 2 (A3, B3).



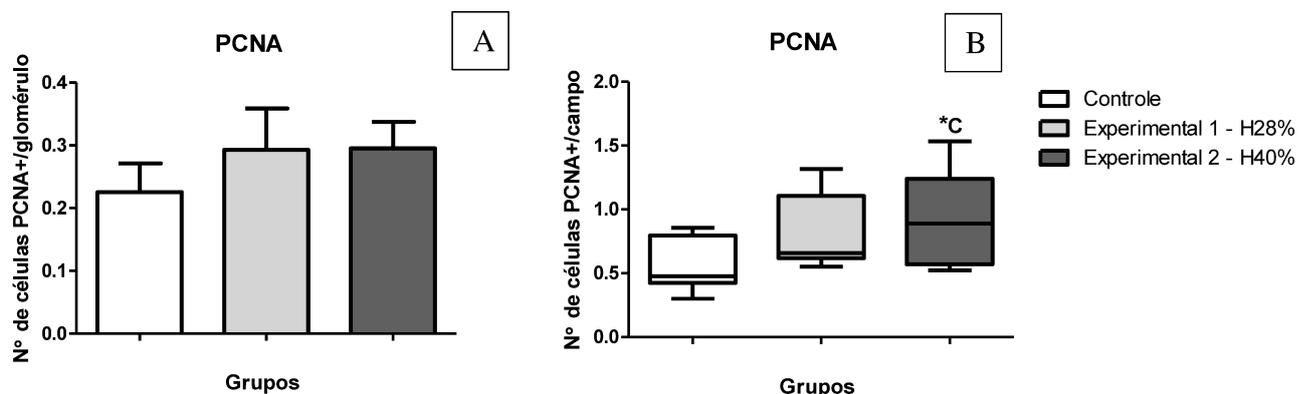
Os estudos imunohistoquímicos foram feitos utilizando-se anticorpos primários anti-PCNA, anti-alfa-actina e anti-desmina. O PCNA é um marcador de células em proliferação, esse parâmetro não foi diferente nos glomérulos entre os grupos estudados, mas estava aumentado no compartimento TBI do córtex renal de E2, em comparação ao grupo Controle (**Figura 4**). Foram obtidas imagens das lâminas submetidas à imunohistoquímica para PCNA, que mostram células em proliferação no córtex renal dos animais dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2 (**Figura 5**).

A alfa-actina (SMA – *smooth muscle actin*) é uma proteína do citoesqueleto, normalmente expressa na musculatura lisa de vasos. No entanto, em situações patológicas pode ser considerada um marcador de lesão renal. A expressão glomerular dessa proteína foi maior nos 2 grupos experimentais, em relação ao controle. Já a expressão TBI estava aumentada somente no grupo E1, quando comparado aos demais grupos (**Figura 6**). Foram obtidas imagens das lâminas submetidas à imunohistoquímica para alfa-actina no córtex renal dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2 (**Figura 7**).

A desmina foi quantificada somente no compartimento glomerular, por se tratar de um importante marcador de lesão de podócitos. Os podócitos constituem o terceiro componente da barreira de filtração, da qual também fazem parte o endotélio capilar e a membrana basal. A expressão de desmina estava aumentada nos glomérulos dos grupos experimentais, mas esse aumento foi maior em E1, quando comparado aos controles (**Figura 8**). Foram obtidas imagens das lâminas submetidas à imunohistoquímica para desmina no córtex renal dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2 (**Figura 9**).

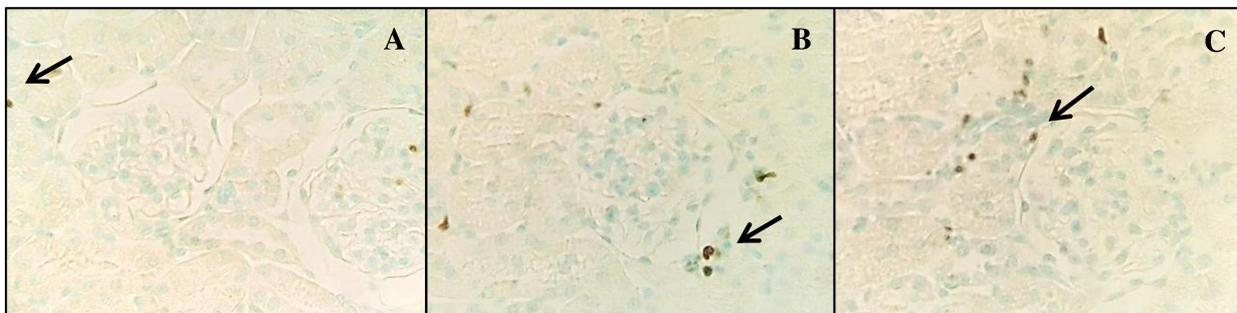
Os estudos morfométricos mostraram que não houve diferenças entre os grupos para as áreas dos corpúsculos renais, dos tufo glomerulares e dos espaços capsulares (**Figura 10**), mostrando que o consumo materno de dieta hiperlipídica não interferiu na arquitetura corpuscular renal da prole.

**Figura 4.** Gráficos da quantificação de células em proliferação (PCNA positivas) glomerular (A) e TBI (B) do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.



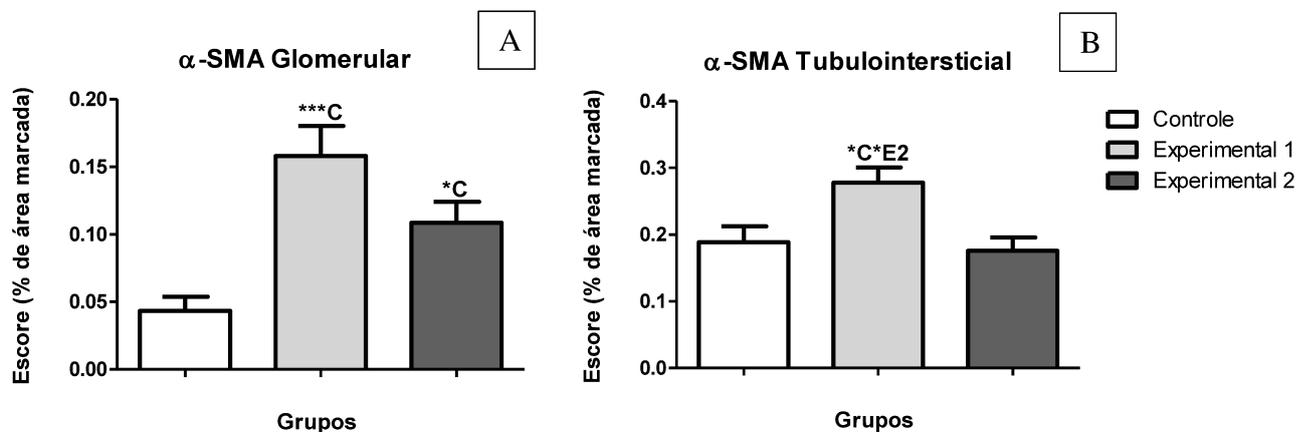
Quantificação de células em proliferação glomerular (A) e TBI (B) do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2. PCNA Glomerular: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. PCNA TBI: teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . \*C:  $p < 0,05$  versus Controle.

**Figura 5.** Imagens das lâminas usadas para quantificação de células em proliferação (PCNA positivas) no córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle (A), Experimental 1 (B) e Experimental 2 (C).



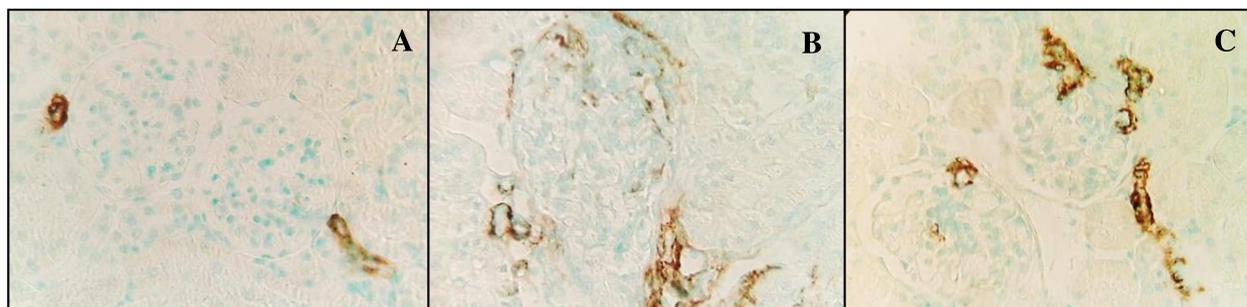
Observar que o número de células em proliferação (seta preta) é maior no compartimento TBI do córtex renal do grupo Experimental 2 quando comparado ao Controle. Aumento de 40X.

**Figura 6.** Gráficos da quantificação de alfa-actina glomerular (A) e TBI (B) no córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.



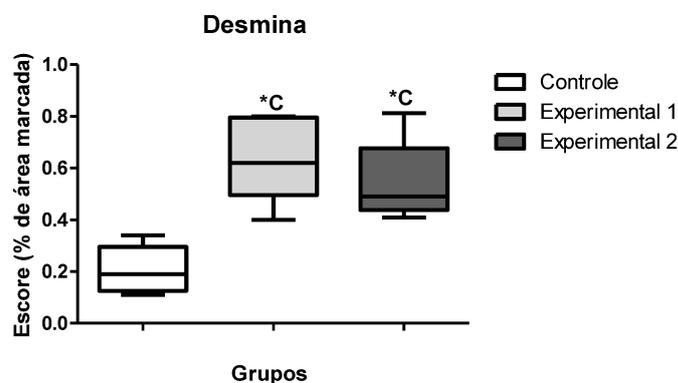
Quantificação da expressão de alfa-actina glomerular (A) e TBI do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2. ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . \*\*\*C:  $p < 0,001$  versus Controle; \*C:  $p < 0,05$  versus Controle; \*E2:  $p < 0,05$  versus Experimental 2.

**Figura 7.** Imagens das lâminas usadas para quantificação de alfa-actina glomerular (A) e TBI (B) do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.



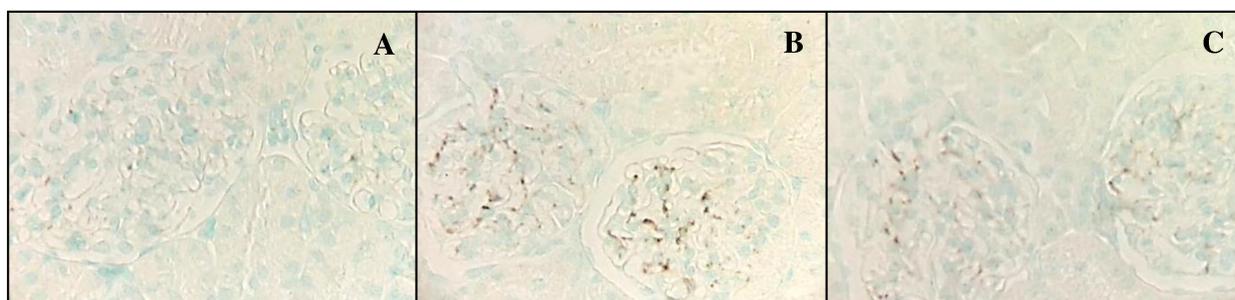
Observar que a expressão de alfa-actina é maior nos glomérulos do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos experimentais, sendo mais evidente em E1, e também no compartimento TBI do córtex renal do grupo Experimental 1, ambos em relação ao Controle. Aumento de 40X.

**Figura 8.** Gráfico da quantificação de desmina glomerular no córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.



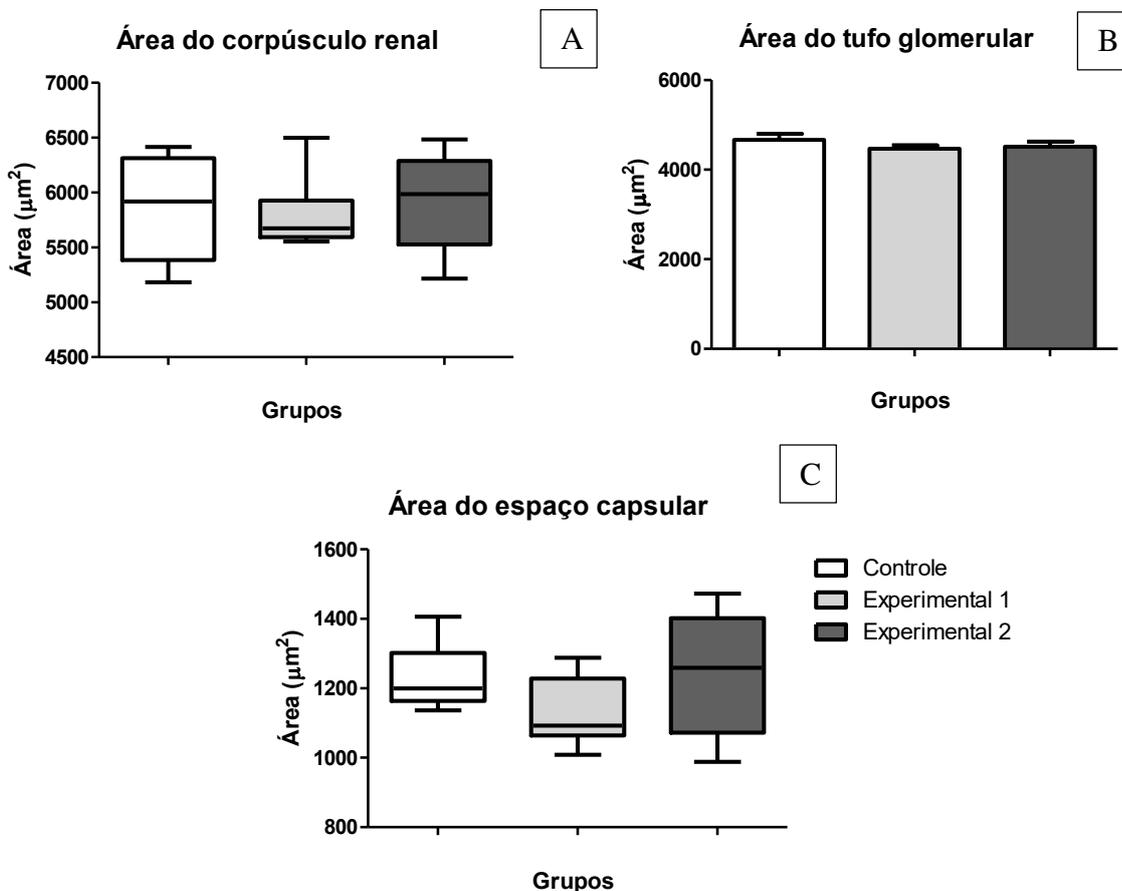
Quantificação da expressão de desmina nos glomérulos do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2. Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . \*C:  $p < 0,05$  versus Controle.

**Figura 9.** Imagens das lâminas usadas para quantificação de desmina glomerular do córtex renal dos filhotes de 120 dias do córtex renal dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.



Observar que a expressão de desmina é maior nos glomérulos do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos experimentais, quando comparados ao Controle, sendo o aumento mais evidente em E1. Aumento de 40X.

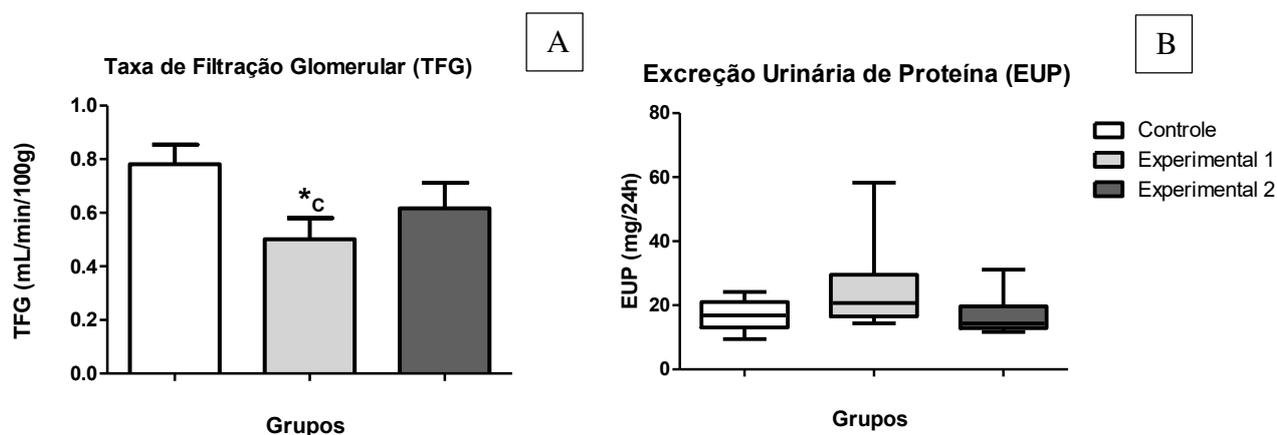
**Figura 10.** Gráficos das análises das áreas do corpúsculo renal (A), do tufo glomerular (B) e do espaço capsular (C) do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.



Áreas do corpúsculo renal (A), tufo glomerular (B) e espaço capsular (C) do córtex renal dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2. Área do tufo glomerular: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. Áreas do corpúsculo renal e espaço capsular: Teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . \*\*\*C:  $p < 0,001$  versus Controle, \*\*C:  $p < 0,01$  versus Controle; \*C:  $p < 0,05$  versus Controle.

No que diz respeito aos estudos funcionais, foram avaliados a TFG, pelo *clearance* de creatinina, e a EUP. Pode-se observar uma redução na TFG no grupo E1 quando comparado ao Controle. Já em relação à EUP, embora não tenha sido registrada diferença significativa entre os grupos estudados, pode-se perceber uma tendência ao aumento em E1, em relação aos demais grupos (**Figura 11**). Com relação aos parâmetros metabólicos: níveis plasmáticos de colesterol total, triglicerídeos e glicose, não houve diferenças entre os grupos estudados (**Tabela 2**).

**Figura 11.** Gráficos da TFG (A) e EUP (B) dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.



TFG (A) e EUP (B) dos filhotes de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2. TFG: ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. EUP: teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. Os resultados representam a mediana com IQ 75 e IQ 25. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ . \*C:  $p < 0,05$  versus Controle.

**Tabela 2.** Parâmetros avaliados nos filhotes fêmeas de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2.

Parâmetros	Controle	Experimental 1	Experimental 2
<b>Glicemia</b>	102,90 $\pm$ 3,56	93,45 $\pm$ 4,19	98,36 $\pm$ 1,63
<b>Colesterol total</b>	59,18 $\pm$ 3,90	54,77 $\pm$ 2,86	65,60 $\pm$ 6,19
<b>Triglicerídeos</b>	72,20 $\pm$ 4,10	69,29 $\pm$ 5,85	80,40 $\pm$ 5,07

Parâmetros avaliados nos filhotes fêmeas de 120 dias dos grupos Controle, Experimental 1 e Experimental 2. ANOVA com pós-teste de Tukey. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM. O nível de significância adotado foi de  $p < 0,05$ .

## 5) DISCUSSÃO:

Existem vários estudos sobre modelos animais de programação fetal que mostram as repercussões para a prole de distúrbios endócrinos maternos como diabetes e hipotireoidismo, situações de estresse intenso, uso de determinados medicamentos e dietas alteradas durante a gestação. Como dietas alteradas, a abordagem é feita restringindo-se proteína ou com excesso de carboidratos e/ou de lipídeos na dieta materna, estando essa última quase sempre associada à obesidade. O presente trabalho se propôs a estudar as repercussões renais para a prole adulta de mães expostas a dietas hiperlipídicas, com diferentes teores de lipídeos (28 e 40%), durante a gestação e lactação, destacando que a dieta normolipídica comercial para roedores contém 3,5% de lipídeos.

Com relação aos dados maternos, as dietas utilizadas não foram capazes de provocar obesidade nas mães, uma vez que não houve diferença entre os grupos para o ganho de peso durante a gestação, fato que pode ser explicado pelo tempo com as dietas, cerca de 21 dias de gestação, quando foi avaliado o peso das mães, e outros 21 dias de lactação, somando-se 42 dias. Observou-se que diante do aumento da oferta calórica, as mães de E2 consumiram menos ração que as mães de E1 e essas últimas, mais calorias que os demais grupos, já o consumo hídrico não foi diferente. Além disso, as mães de E2 ingeriram menos carboidratos e proteínas que as mães controles e de E2 e os 2 grupos experimentais consumiram maior teor de lipídeos. É importante destacar que as rações hiperlipídicas continham proporcionalmente menos carboidratos e proteínas e maior de lipídeos, em relação à ração normolipídica comercial, embora não possam ser consideradas dietas hipoglicídicas e hipoproteica. Diferentemente desses dados, Jackson e colaboradores (2012) ofereceram dieta hiperlipídica (45%) e água contendo 0,1g/mL de frutose para ratas *Sprague-Dawley* por 6 semanas, antes do acasalamento e depois durante toda a gestação e lactação, e observaram maior ganho de peso, maior ingestão de ração e maior consumo calórico diário nesse grupo, um dia após o desmame da prole, em relação ao grupo que consumiu ração comercial. Já Hokke e colaboradores (2016), estudando os efeitos de dieta hiperlipídica (21%) oferecidas às fêmeas de camundongos C57BL6/J, pelo mesmo tempo que o trabalho citado anteriormente, não constataram diferenças entre os grupos para o ganho de peso materno, durante a gestação, embora as mães com dieta hiperlipídica tenham consumido maior teor energético que as controles. No entanto, as diferenças entre os trabalhos podem ser explicadas pela linhagem diferente de animais

utilizados, tempo com a dieta hipercalórica e o fato de uma das dietas ser rica em lipídeos e carboidratos e não somente em lipídeos, como no presente estudo.

White e colaboradores (2013) ofereceram dieta comercial e dieta à base de 57,5% de lipídeos a camundongos *Swiss*, durante 10 semanas, e observaram que o consumo de ração padrão e água foi significativamente maior no grupo controle, quando comparado ao grupo que recebeu ração hiperlipídica, mas não houve diferenças significativas quanto ao consumo calórico entre os grupos e o consumo de macronutrientes, em separado, não foi avaliado. Embora os camundongos expostos à dieta hiperlipídica tenham ingerido menos ração e consumido mesmo teor calórico que os controles, apresentaram maior massa corpórea e média de ganho total de peso ao final das 10 semanas. Townsend e colaboradores (2008) também mostraram que camundongos C57BL/6 expostos à dieta hiperlipídica (HFD – *high fat diet*) por 15 semanas ganharam mais peso que os animais consumidores de dieta hipolipídica (LFD – *low fat diet*), apesar de consumirem menos energia. Os animais HFD apresentaram ainda maiores níveis de leptina, insulina e glicose que os LFD, lembrando que a leptina é um hormônio sinalizador de saciedade (BERNE & LEVY, 2018; GUYTON & HALL, 2017). Vale ressaltar que White (2013), Townsend e colaboradores (2008) trabalharam com camundongos machos e não fêmeas grávidas.

Macronutrientes, como carboidratos, proteínas e lipídeos são importantes para o consumo energético do organismo e a dinâmica de absorção destes nutrientes é complexa e dependente de inúmeros fatores. Têm-se observado que alterações na quantidade de macronutrientes podem ocasionar modificações no ganho ponderal de peso, mesmo com consumo energético médio sendo constante (HALL & GUO, 2017; HALL et al., 2012). Além disso, um aumento da ingestão de lipídeos implica em maior ingestão energética. Porém, sabe-se que dietas ricas em lipídeos e pobres em carboidratos podem reduzir o apetite, resultando em aumento de corpos cetônicos circulantes no organismo, (ROLLS et al., 2009; WILLIAMS et al., 2013; GIBSON et al., 2015; PAOLI et al., 2015).

Sabe-se também que o processamento de lipídeos no intestino delgado é mais lento que o dos demais macronutrientes, sendo assim, uma dieta rica em lipídeos desencadearia mecanismos reflexos e hormonais, que resultariam em liberação de colecistocinina e, conseqüentemente, em contração do piloro, reduzindo a velocidade de esvaziamento gástrico (BERNE & LEVY, 2018; GUYTON & HALL, 2017). Esse retardo do esvaziamento gástrico, somado ao poder de saciedade promovido pelos lipídeos e o fato dos animais se alimentarem para atenderem às demandas energéticas podem explicar

o reduzido consumo de ração feito pelas mães de E2, em relação às de E1, já que a oferta calórica foi maior na ração hiperlipídica 40%.

Considerando os dados da prole, observou-se que não houve diferenças significativas quanto ao peso corporal e o peso relativo renal dos filhotes fêmeas de 120 dias de idade, ou seja, a manipulação do ambiente intrauterino com dieta hiperlipídica não influenciou no peso da prole, nem no peso relativo dos rins. No entanto, a dieta materna hiperlipídica 28% foi capaz de programar redução da TFG na prole de 120 dias, quando comparada ao grupo Controle, enquanto a EUP não foi diferente, apesar da tendência ao aumento nesse mesmo grupo (E1). Hokke e colaboradores (2016) estudaram embriões e a prole de 21 dias, 6 e 9 meses de idade, de mães tratadas com dieta hiperlipídica, por 6 semanas, antes de engravidarem e por todo o período gestacional/lactacional. Os autores verificaram que embora os filhotes de 21 dias tenham apresentado maior número de nefros e maior volume renal que os controles de mesma idade, ao se corrigir esses parâmetros para o peso corporal, não houve diferenças entre os grupos. Além disso, dados como o peso corporal, a função renal e as relações albumina-creatinina e volume glomerular-volume renal também não foram diferentes entre os animais de 6 e 9 meses de idade dos grupos avaliados. No presente trabalho, apesar da reduzida TFG apresentada pela prole de E1, o consumo materno de dietas hiperlipídicas (28% e 40%) também não foi capaz de alterar a arquitetura glomerular, dado que as áreas dos corpúsculos renais, dos tufo glomerulares e espaços capsulares não foram diferentes entre os grupos. No entanto, o número de corpúsculos renais/área de secção renal não foi quantificado. O fato é que um estudo ainda não publicado do laboratório mostrou que aos 90 dias de idade, a prole dos grupos experimentais 1 (28%) e 2 (40%) apresentaram maiores áreas de corpúsculos renais e tufo glomerulares, mas reduzida TFG em E1 e aumentada TFG e EUP em E2. Ou seja, não só o teor de lipídeos, mas a perda de proporção entre macronutrientes da dieta materna e o fator tempo influenciaram nas repercussões renais da prole.

Chowdhury e colaboradores (2016) demonstraram que a obesidade paterna em ratos *Sprague-Dowley* foi capaz de provocar acúmulo de triglicerídeos renais e alterações histológicas tubulares em filhotes de 27 semanas de idade, eventos responsáveis por um distúrbio renal leve que pode cursar com doença renal crônica. De qualquer forma, no presente estudo não foram avaliados parâmetros como acúmulo de lipídeos renais, mas observou-se que as dietas hiperlipídicas maternas não resultaram em glicemia e perfil

lipídico alterados da prole, o que pode ser constatado pelos níveis de colesterol total, triglicerídeos e glicose, semelhantes entre os grupos.

Quanto à análise de colágeno cortical, a porcentagem de colágeno total e do tipo I foram maiores nos grupos experimentais, mas esse aumento foi mais evidente em E1, já a porcentagem de colágeno tipo III foi maior em E2, todos em comparação ao grupo controle. Esses dados confirmam que a dieta hiperlipídica materna têm efeitos deletérios sobre os rins da prole adulta, que devido ao aumento do colágeno total pode ter resultado em redução da TFG nos filhotes de E1. Um estudo de Deji e colaboradores (2009) utilizando camundongos C57BL/6 submetidos à dieta hiperlipídica (60% de lipídeos) por 12 semanas, também mostrou alterações histomorfológicas renais importantes, como o acúmulo de colágeno tipo IV, uma das principais proteínas da matriz extracelular, além de acúmulo de lipídeos renais e infiltração de macrófagos nos glomérulos do córtex renal desses animais, que contribuíram para o aumento da área dos tufo glomerulares do córtex renal desses animais.

As mudanças registradas na expressão de colágeno cortical foram acompanhadas por alterações na quantificação de alfa-actina, uma vez que as expressões glomerular e TBI dessa proteína estavam aumentadas nos animais de E1, em relação aos controles. A actina é a principal proteína do sistema de microfilamentos de células eucarióticas. A presença deste marcador de músculo liso ( $\alpha$ -SMA – *Smooth Muscle Actin*) no rim adulto em condições normais encontra-se restrita à musculatura lisa dos vasos, com função principal de contratilidade (JOHNSON *et al*, 1991). No entanto, já foi demonstrado que sob condições patológicas, algumas células renais como as mesangiais, tubulares e intersticiais, podem apresentar alterações no seu fenótipo, passando a expressar a proteína  $\alpha$ -SMA de músculo liso e algumas proteínas de filamentos intermediários, tornando-se potencialmente capazes de produzir mais colágeno e outros elementos da matriz extracelular (JOHNSON *et al*, 1991; MEGUID EL NAHAS *et al*, 1996).

O PCNA é uma proteína nuclear de 36 KD que está associada com o ciclo celular (HALL *et al*, 1990). Sua expressão aumenta da fase final “G1” para as fases iniciais “S” do ciclo celular. Vários estudos de imunohistoquímica realizados com anticorpos anti-PCNA mostram que eles são capazes de identificar células na fase de divisão (HALL *et al*, 1990). Nesse estudo, o número de células em proliferação foi maior somente no compartimento TBI do córtex renal dos animais de E2, quando comparados aos controles. Estados proliferativos alterados estão bem caracterizados em modelos de programação fetal com dietas maternas restritas em proteína (WOLF; WELHAM, 2002; WELHAM;

WADE; WOOD, 2002) e o quadro de *Diabetes mellitus* tipo 1 materno, que resultou em aumento de células PCNA positivas no córtex renal de filhotes fêmeas de 7 dias e redução nas de 30 dias, além de maior expressão de alfa-actina em 1 e 7 dias, comparadas aos controles de mesma idade. Essas alterações provavelmente contribuíram para redução da TFG e aumento da pressão arterial sistólica nos animais de 30 dias de mães diabéticas (FRANÇA-SILVA, OLIVEIRA, BALBI, 2014). Em modelos com dietas maternas hiperlipídicas seria importante investigar qual (is) tipo (s) de células está (ão) em proliferação nos túbulos e interstício renais para compreender o significado desse achado, uma vez que a maior expressão dos outros marcadores utilizados nesse estudo, bem como as alterações funcionais foram registradas em E1.

A desmina, por sua vez, é um tipo de proteína do citoesqueleto frequentemente pouco expressa por células da membrana glomerular, não aparecendo no epitélio visceral da cápsula de *Bowman*. No entanto, quando ocorre lesão de podócitos, a expressão de desmina aumenta significativamente (HERRMANN, TOZZO, FUNK, 2012). Nesse estudo, constatou-se aumento da expressão de desmina nos glomérulos dos animais de E1 e de E2, mas o aumento foi mais evidente em E1. É possível que a lesão de um dos componentes da barreira de filtração, somado ao aumento de colágeno e de alfa-actina corticais, nos animais desse grupo, tenham sido fatores decisivos para a redução da TFG. No mesmo sentido, Jackson e colaboradores (2012) encontraram aumento da expressão de nestina, proteína presente nos diafragmas de filtração existentes entre os podócitos, no córtex renal de filhotes de mães expostas à dieta hiperlipídica e frutose, demonstrando que o *status* nutricional materno contribuiu com a lesão de podócitos da prole.

## 6) CONCLUSÃO:

Pode-se concluir que o consumo de dietas hiperlipídicas, durante a gestação e lactação, apesar de não ter resultado em obesidade materna, foi capaz de programar alterações renais importantes na prole adulta de ratas *Wistar*, como aumento de colágeno cortical total, além de aumentada expressão de alfa-actina, desmina e células em proliferação, que somadas podem ter contribuído para a perda de função renal. No entanto, a magnitude e o tipo de alteração observada são dependentes do teor de lipídeos da dieta, uma vez que a dieta materna com 28% de lipídeos teve repercussões mais significativas para a prole.

## 7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABRASS CK. Cellular lipid metabolism and the role of lipids in progressive renal disease. **Am J Nephrol.** 24:46–53, 2004.

<https://doi.org/10.1159/000075925>

AL-GOBLAN, A. S.; AL-ALFI, M. A.; KHAN, M. Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes, metabolic syndrome and obesity: targets and therapy**, v. 7, p. 587, 2014.

<https://doi.org/10.2147/DMSO.S67400>

ARMITAGE, J.A.; et al. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: How strong is the evidence from experimental models in mammals. **Journal of Physiology**, p.355-377, 2004.

<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072009>

BERNE R. M.; LEVY M. N. **Fisiologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

BOBULESCU IA. Renal lipid metabolism and lipotoxicity. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 19:393–402, 2010.

<https://doi.org/10.1097/MNH.0b013e32833aa4ac>

BUETTNER, R.; SCHÖLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L. C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity**, v. 15, p. 798-808, 2007.

<https://doi.org/10.1038/oby.2007.608>

CHANG, E., HAFNER, H., VARGHESE, M. *et al.* Programming effects of maternal and gestational obesity on offspring metabolism and metabolic inflammation. **Sci Rep** 9, 16027,2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-52583-x>

CHEN J, MUNTNER P, HAMM LL, JONES DW, BATUMAN V, FONSECA V, WHELTON PK, HE J. The metabolic syndrome and chronic kidney disease in US adults. *Ann Intern Med* 140: 167–174, 2004. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-3-200402030-00007>

CHOWDHURY, SS.; LECOMTE, V.;, ERLICH, JH.; MALONEY, CA.; MORRIS, MJ. Paternal high fat diet in rats leads to renal accumulation of lipid and tubular changes in adult offspring. *Nutrients*. Aug 23;8 (9). 2016. <https://doi.org/10.3390/nu8090521>

DEARDEN, L., BOURET, S. G. & OZANNE, S. E. Sex and gender differences in developmental programming of metabolism. *Molecular metabolism* 15, 8–19, <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.04.007> (2018). <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2018.04.007>

DEJI, NAOKO ET AL. Structural and functional changes in the kidneys of high-fat diet-induced obese mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 296: *Am J Physiol Renal Physiol* 296. Shiga, p. 118-126. out. 2009. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00110.2008>

DIRETRIZES BRASILEIRAS DE OBESIDADE 2016 / **ABESO - Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome Metabólica**. – 4.ed. - São Paulo, SP, 2016.

DUARTE, A.C.G.D.O. et al. **Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos**. *Rev Nutr*, v. 19, p. 341-348. 2006. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732006000300005>

EBENEZER PJ, MARIAPPAN N, ELKS CM, HAQUE M, FRANCIS J. Diet-induced renal changes in Zucker rats are ameliorated by the superoxide dismutase mimetic TEMPOL. *Obesity* 2009; 17: 1994\_2009. <https://doi.org/10.1038/oby.2009.137>

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

<https://doi.org/10.1017/S000711450820749X>

ELLSWORTH, L., HARMAN, E., PADMANABHAN, V. & GREGG, B. Lactational programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. **Reproduction** 156, R23–R42, 2018.

<https://doi.org/10.1530/REP-17-0780>

FALL, C. H. D. & KUMARAN, K. Metabolic programming in early life in humans. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 374, 20180123, 2019.

<https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0123>

FRANÇA-SILVA, N.; OLIVEIRA, NDG.; BALBI, APC. Morphofunctional renal alterations in rats induced by intrauterine hyperglycemic environment. **Arch Med Sci**. Apr 1;12(2):243-51, 2016.

<https://doi.org/10.5114/aoms.2015.48220>

GLASTRAS SJ, WONG MG, CHEN H et al. FXR expression is associated with dysregulated glucose and lipid levels in the offspring kidney induced by maternal obesity. **Nutr. Metab. (Lond.)**; 12: 40, 2015.

<https://doi.org/10.1186/s12986-015-0032-3>

GIBSON, A. A.; SEIMON, R. V.; LEE, C. M. Do ketogenic diets really suppress appetite? A systematic review and meta-analysis. **Obesity Reviews**, v. 16, p. 64-76, 2015.

<https://doi.org/10.1111/obr.12230>

GUYTON A. C.; HALL J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 13. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

HALL, P.A.; LEVISON, D.A.; WOODS, A.L.; YU C.C.; KELLOCK, D.B.; WATKINS, J.A.; BARNES, D.M.; GILLETT, C.E.; CAMPLEJOHN, R.; DOVER, R. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: the index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. **J. Pathol.** 162: 285-294, 1990.

<https://doi.org/10.1002/path.1711620403>

HALL, K. D.; GUO, J. Obesity energetics: body weight regulation and the effects of diet composition. **Gastroenterology**, v. 152, p. 1718-1727, 2017.

<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.052>

HALL, K. D.; HEYMSFIELD, S. B.; KEMNITZ, J. W.; KLEIN, S.; SCHOELLER, D. A.; SPEAKMAN, J. R. Energy balance and its components: implications for body weight regulation. **American Society of Nutrition**, v. 95, p. 989-994, 2012.

<https://doi.org/10.3945/ajcn.112.036350>

HALL, M. E.; CARMO, J. M.; SILVA, A. A.; JUNCOS, L. A.; WANG, Z.; HALL, J. E. Obesity, hypertension and chronic kidney disease. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 7, p. 75-88, 2014.

<https://doi.org/10.2147/IJNRD.S39739>

HALL, M. E.; CARMO, J. M.; SILVA, A. A.; WANG, Z.; HALL, J. E. Obesity-induced hypertension. **Circulation Research**, p. 991-1007, 2015.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305697>

HERRMANN, A.; TOZZO, E.; FUNK, J. Semi-automated quantitative image analysis of podocyte desmin immunoreactivity as a sensitive marker for acute glomerular damage in the rat puromycin aminonucleoside nephrosis (PAN) model. **Exp Toxicol Pathol.** 64: 45-49, 2012.

<https://doi.org/10.1016/j.etp.2010.06.004>

HESLEHURST, N., RANKIN, J., WILKINSON, J. R. & SUMMERBELL, C. D. A nationally representative study of maternal obesity in England, UK: trends in incidence and demographic inequalities in 619 323 births, 1989-2007. **Int J Obes (Lond)** 34, 420–428, 2010.

<https://doi.org/10.1038/ijo.2009.250>

HOKKE, S.; PUELLES, VG.; ARMITAGE, JA.; FONG, K.; BERTRAM, JF.; CULLEN-MCEWEN, LA. Maternal Fat Feeding Augments Offspring Nephron Endowment in Mice. **PLoS ONE**. 11(8): e0161578, 2016.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161578>

HOSSAIN, P.; KAWAR, B.; EL NAHAS, M. Obesity and diabetes in the developing world—a growing challenge. **New England journal of medicine**, v. 356, n. 3, p. 213-215, 2007.

<https://doi.org/10.1056/NEJMp068177>

JACKSON, CM; ALEXANDER, BT; ROACH, L; HAGGERTY, D; MARBURY, DC; HUTCHENS, ZM; FLYNN, ER; MARIC-BILKAN, C. Exposure to maternal overnutrition and a high-fat diet during early postnatal development increases susceptibility to renal and metabolic injury later in life. **Am J Physiol Renal Physiol**. 302: F774–F783, 2012.

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.00491.2011>

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** 280: 32317–32325, 2005.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M500801200>

JIANG T, LIEBMAN SE, LUCIA S, LI J, LEVI M. Role of altered lipid metabolism and the sterol regulatory element binding proteins in the pathogenesis of age-related renal disease. **Kidney Int**; 68: 2608-20, 2005.

<https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2005.00733.x>

JOHNSON, R.J.; ILDA, H.; ALPERS, C.E.; MAJESKY, M.W.; SCHWARTZ, S.M. Expression of smooth cell phenotype by rat mesangial cells in immune complex nephritis. **J. Clin. Invest**, New York, 87: 847-858, 1991.

<https://doi.org/10.1172/JCI115089>

KANEKO, K.; KIMATA, T.; TSUJI, S.; SHIRAISHI, K.; YAMAUCHI, K.; MURAKAMI, M.; KITAGAWA, T. Impact of obesity on childhood kidney. **Pediatric Reports**, v. 3, 2011.

<https://doi.org/10.4081/pr.2011.e27>

KEANE WF. The role of lipids in renal disease: Future challenges. **Kidney Int.** 57:S27–31, 2000.

<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.07503.x>

KIM HJ, MORADI H, YUAN J, NORRIS K, VAZIRI ND. Renal mass reduction results in accumulation of lipids and deregulations of lipid regulatory proteins in the remnant kidney. **Am J Physiol Renal Physiol**; 296: F1297-306, 2009.

<https://doi.org/10.1152/ajprenal.90761.2008>

KLIEM, V. et al. Mechanism involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. **Kidney Int.**, Malden, v. 49, p. 666-678, 1996.

<https://doi.org/10.1038/ki.1996.95>

KNIGHT SF, QUIGLEY JE, YUAN J, ROY SS, ELMARAKBY A, IMIG JD. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. **Hypertension**; 51: 352-9, 2008.

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.099499>

KOTAS, M. E. & MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell** 160, 816–827, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.010>

KURELLA M, LO JC, CHERTOW GM. Metabolic syndrome and the risk for chronic kidney disease among nondiabetic adults. **J Am Soc Nephrol** 16: 2134–2140, 2005.

<https://doi.org/10.1681/ASN.2005010106>

KUME S, UZU T, ARAKI S, 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 Nephrol* v. 18, n. 10, p.2715-2723, 2007.

<https://doi.org/10.1681/ASN.2007010089>

LANGLEY-EVANS, S. C. Nutrition in early life and the programming of adult disease: a review. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, p. 1-14, 2014.

<https://doi.org/10.1111/jhn.12212>

LIANG, C., OEST, M. E. & PRATER, M. R. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 86, 377–384, 2009.

<https://doi.org/10.1002/bdrb.20206>

MARTINS AR, MAS S. Lipotoxicity and kidney. *Portug J Nephrol Hypertens.* 29:306–15. 2015.

MEGUID EL NAHAS, E.; MUCHANETA-KUBARA, C.; ZHANG, G-Z; ADAM, A. Phenotypic modulation of renal cells during experimental and clinical renal scarring. *Kidney Int*, Malden, 49: S23- S27, 1996.

MONTES, G. S.; JUNQUEIRA, L. C. U.. The use of the Picrosirius-polarization method for the study of the biopathology of collagen. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 86, supl. 3, p. 1-11, 1991.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000700002>

MORRIS, D. L. et al. Adipose tissue macrophages function as antigen-presenting cells and regulate adipose tissue CD4+ T cells in mice. *Diabetes* 62, 2762–2772, 2013.

<https://doi.org/10.2337/db12-1404>

MORAIS, RB; MUNIZ, VPC; COSTA, EN; FERREIRA- FILHO, SR; HIRAKI, KRN; BISPO-DA-SILVA, LB; BALBI, APC. Mast cell population in the development of diabetic nephropathy: Effects of renin angiotensin system inhibition. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 107, p. 1115-1118, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.08.066>

MULLER, CYNTHIA R. ET AL. Post-weaning Exposure to High-Fat Diet Induces Kidney Lipid Accumulation and Function Impairment in Adult Rats. *Frontiers In Nutrition*, [s.l.], v.6, p.1-8, 3 maio. Frontiers Media SA, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00060>

MURABAYASHI, N. et al. Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 169, 39–44, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.02.003>

NEHIRI, T. et al. Exposure to maternal diabetes induces salt-sensitive hypertension and impairs renal function in adult rat offspring. *Diabetes*, v. 57, n. 8, p. 2167-2175, 2008.

<https://doi.org/10.2337/db07-0780>

NINOMIYA T, KIYOHARA Y, KUBO M, YONEMOTO K, TANIZAKI Y, DOI Y, HIRAKATA H, IIDA M. Metabolic syndrome and CKD in a general Japanese population: the Hisayama Study. *Am J Kidney Dis* 48: 383–391, 2006.

<https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2006.06.003>

NOSADINI R, TONOLO G. Role of oxidized low density lipoproteins and free fatty acids in the pathogenesis of glomerulopathy and tubulointerstitial lesions in type 2 diabetes. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 21:79–85, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.numecd.2010.10.002>

NOHR, E. A. et al. Combined associations of prepregnancy body mass index and gestational weight gain with the outcome of pregnancy. *Am J Clin Nutr* 87, 1750–1759, 2008.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/87.6.1750>

NÜSKEN, K.D.; et al. Fetal programming of gene expression in growth-restricted rats depends on the cause of low birth weight. **Endocrinology**, v.152, p.1327-1335, 2011.

<https://doi.org/10.1210/en.2010-1116>

OMS (Organização Mundial da Saúde). **Global status report on noncommunicable diseases**, 2014.

PALANIAPPAN L, CARNETHON M, FORTMANN SP. Association between microalbuminuria and the metabolic syndrome: NHANES III. **Am J Hypertens** 16: 952–958, 2003.

[https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(03\)01009-4](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(03)01009-4)

PAOLI, A.; BOSCO, G.; CAMPORESI, E. M. Ketosis, ketogenic diet and food intake control: a complex relationship. **Frontiers in Psychology**, p. 6-27, 2015.

<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2015.00027>

PINHAL CS, LOPES A, TORRES DB, FELISBINO SL, ROCHA GONTIJO JA, BOER PA. Time-course morphological and functional disorders of the kidney induced by long-term high-fat diet intake in female rats. **Nephrol Dial Transplant**; 28: 2464-76, 2013.

<https://doi.org/10.1093/ndt/gft304>

RAO, R.K.; PADMAVATHI, I.J.N.; RAGHUNATHET, M. Maternal micronutrient restriction programs the body adiposity, adipocyte function and lipid metabolism in offspring: a review. **Rev. Endocr. Metab. Disord**, v. 13, p.103-8, 2012.

<https://doi.org/10.1007/s11154-012-9211-y>

RICH, L; WHITTAKER, P. Collagen and Picrosirius Red Staining: A polarized light assessment of fibrillar hue and spatial distribution. **Braz. J. morphol. Sci.** 22(2), 97-104, 2005.

ROLLS, B. J. The relationship between dietary energy density and energy intake. **Physiology & Behavior**, v. 97, p. 609-615, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.011>

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

<https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477>

TAKABATAKE Y, YAMAMOTO T, ISAKA Y. Stagnation of autophagy: a novel mechanism of renal lipotoxicity. *Autophagy*. 13:775–6, 2017.

<https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1283084>

TOWNSEND, L. K.; LORENZI, M. M.; WIDMAIER, E. P. High-fat diet-induced changes in body mass and hypothalamic gene expression in wild-type and leptin-deficient mice. *Hormone*, v. 33 (2), p. 176-188, 2008.

<https://doi.org/10.1007/s12020-008-9070-1>

VIGITEL BRAZIL 2018: surveillance of risk and protective factors for chronic diseases by telephone survey: estimates of frequency and sociodemographic distribution of risk and protective factors for chronic diseases in the capitals of the 26 Brazilian states and the Federal District in 2018.

WANKHADE, U. D., TAKALI, K. M. & SHANKAR, K. Persistent influence of maternal obesity on offspring health: Mechanisms from animal models and clinical studies. *Mol Cell Endocrinol* 435, 7–19, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.07.001>

WEI P, LANE PH, LANE JT, PADANILAM BJ, SANSOM SC. Glomerular structural and functional changes in a high-fat diet mouse model of early-stage Type 2 diabetes. *Diabetologia* 47: 1541–1549, 2004.

<https://doi.org/10.1007/s00125-004-1489-1>

WELHAM, S.J.; WADE, A.; WOOLF, A.S. Protein restriction in pregnancy is associated with increased apoptosis of mesenchymal cells at the start of rat metanephrogenesis. *Kidney Int.* Apr;61(4):1231-42, 2002.

<https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2002.00264.x>

WHITE, P. A. S.; CERCATO, L. M.; ARAÚJO, J. M. D.; SOUZA, L. A.; SOARES, A. F.; BARBOSA, A. P. O.; NETO, J. M. R.; MARÇAL, A. C.; MACHADO, U. F.; CAMARGO, E. A.; SANTOS, M. R.; BRITO, L. C. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência á ação da insulina e intolerância à glicose. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 57, p. 339-345, 2013.

<https://doi.org/10.1590/S0004-27302013000500002>

WILLIAMS, R. A.; ROE, L. S.; ROLLS, B. J. Comparison of three methods to reduce energy density. Effects on daily energy intake. **Appetite**, v. 66, p. 75-83, 2013.

<https://doi.org/10.1016/j.appet.2013.03.004>

WOOLF, AS.; WELHAM, SJ. Cell turnover in normal and abnormal kidney development. **Nephrol Dial Transplant**.17 Suppl 9:2-4, 2002.

[https://doi.org/10.1093/ndt/17.suppl\\_9.2](https://doi.org/10.1093/ndt/17.suppl_9.2)

YAN J, LI X, SU R, ZHANG K, YANG H. Long-term effects of maternal diabetes on blood pressure and renal function in rat male offspring. **PLoS One**. Feb 5;9(2), 2014.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088269>

ZHOU Y, LIN S, ZHANG L, LI Y. Resveratrol prevents renal lipotoxicity in high-fat diet-treated mouse model through regulating PPAR-a pathway. **Mol Cell Biochem**. 411:143–50, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s11010-015-2576-y>

## ANEXO



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Exposição intrauterina a dieta hiperlipídica, com diferentes teores de lipídeos, e suas repercussões renais, gastrintestinais, cardiovasculares e metabólicas: um modelo de programação fetal em ratos Wistar”. protocolo nº 054/18, sob a responsabilidade de Ana Paula Coelho Balbi – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião 24 de Agosto de 2018.

(We certify that the project entitled “Exposição intrauterina a dieta hiperlipídica, com diferentes teores de lipídeos, e suas repercussões renais, gastrintestinais, cardiovasculares e metabólicas: um modelo de programação fetal em ratos Wistar”, protocol 054/18, under the responsibility of - Ana Paula Coelho Balbi involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of August 24th, 2018).

Vigência do Projeto	Início: 01/09/2018 Término: 20/08/2020
Espécie/Linhagem/Grupos Taxonômicos	Rato heterogênico - Wistar
Número de animais	150
Peso/Idade	180g a 350g/ Adultos e Filhotes
Sexo	Machos e Fêmea
Origem/Local	Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) - UFU
Local onde serão mantidos os animais:	Departamento de Fisiologia (DEFIS) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)- UFU

Uberlândia, 29 de agosto de 2018

**Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão**  
Coordenador da CEUA/UFU