

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Andressa Alves de Andrade

Análise de parâmetros bioquímicos de fêmeas submetidas à dieta hipercalórica ou restritiva durante a gestação e a lactação

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2017**

Andressa Alves de Andrade

Análise de parâmetros bioquímicos de fêmeas submetidas à dieta hipercalórica ou restritiva durante a gestação e a lactação

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientadora: Dra. Márcia Giovenardi
Coorientadora: Dra. Silvana de Almeida

**Porto Alegre
2017**

Andressa Alves de Andrade

Análise de parâmetros bioquímicos de fêmeas submetidas à dieta hipercalórica ou restritiva durante a gestação e a lactação

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Porto Alegre, 30 de outubro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profª .Drª. Alethéa Gatto Barschak

Profª .Drª. Norma Possa Marroni

Profª .Drª. Marilene Porawski Garrido

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde e força para superar todas as dificuldades.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Marcia Giovenardi, pela paciência, disponibilidade e compreensão que foram essenciais na realização deste trabalho.

Aos meus pais, que me ensinaram o valor da persistência, da humildade e do respeito aos demais, valores com os quais consegui trilhar este caminho sem arrependimentos, apenas com gratidão.

Ao meu grupo de pesquisa, pois ao longo do trabalho percebemos o quanto nos completávamos e éramos melhores juntos.

Ao grupo de pesquisa do Laboratório de Genética Toxicológica, cuja parceria enriqueceu o trabalho desenvolvido.

À colega de mestrado Gabriela Hahn, pela disponibilidade e colaboração.

E enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, fica registrado aqui, o meu muito obrigado!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
1.1 Obesidade	9
1.2 Ganho de peso, obesidade e gestação	11
1.3 Restrição calórica e gestação	13
1.4 Estresse oxidativo	16
1.5 Dieta, estresse oxidativo e gestação	17
1.6 Obesidade, sobrepeso e inflamação	21
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo Geral	26
3.2 Objetivos Específicos	26
4 ARTIGO CIENTÍFICO	28
5 CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXOS	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

AMPK	Proteína Quinase Ativada por Adenosina Monofosfato
Akt	Proteína Quinase
CAT	Catalase
CONT	Grupo controle
CRP	Proteína C reativa
DPP	Dia Pós Parto
EO	Estresse Oxidativo
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GPx	Enzima Glutationa Peroxidase
HD	Grupo com Dieta Hipercalórica
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HOMA	Índice Modelo de avaliação da Homeostase
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
IKK	Quinase I-kappa B
Mtor	Proteína Quinase Alvo da Rapamicina em Mamíferos
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1,
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
O ₂ [•]	Radical Superóxido
ORAC	Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI-1	Inibidor de ativador de plasminogênio-1
RC	Restrição Calórica
SOD	Enzima Superóxido Dismutase
TBARS	Análise das Substâncias Reativas Ao Ácido Tiobarbitúrico
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

RESUMO

A dieta materna antes e durante a gestação pode influenciar na saúde da mãe e do feto bem como em futuras da prole. Observando-se as preferências alimentares atuais, com alimentos altamente calóricos, nosso estudo teve como objetivo analisar parâmetros bioquímicos no sangue e nos tecidos metabólicos, em fêmeas que durante a gestação e a lactação foram submetidas à dieta hipercalórica ou restritiva. Foram estudadas camundongos fêmeas isogênicas (n=24), da linhagem BALB/c (60 dias de idade, peso entre 18-25 g), provenientes do biotério da UFCSPA. Foram separadas em grupos de acordo com a dieta que receberam: dieta padrão *ad libitum* (CONT), dieta restritiva (RD, 30% Kcal a menos do que a dieta padrão), dieta hipercalórica (HD: acréscimo de 60% Kcal comparada a padrão). A adaptação à dieta foi de 25 dias e, a seguir, foram acasaladas. O de peso foi aferido periodicamente e o índice de Lee calculado. No 22º DDP fez-se eutanásia dos animais, coletamos o sangue e os tecidos adiposo, hepático e muscular. O perfil lipídico e glicídico foi analisado utilizando-se kits comerciais e, nos tecidos metabólicos, foi analisado: atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), geração de espécies reativas de oxigênio por ensaio de oxidação de diacetato de dihidroclorofluoresceína, peroxidação lipídica por TBARS e quantificação do nível de proteína NF-kB. Os dados foram expressos por média \pm SEM e analisados pela variância única seguindo o teste de comparação múltipla de Dunnett ($p < 0,05$). A análise sérica mostrou um aumento significativo nos triglicerídeos do grupo HD em comparação com o CONT e o RD. Os outros parâmetros do perfil lipídico e a glicemia permaneceram similares entre os 3 grupos. O tempo (dias) para as fêmeas emprenhar foi mais longo no RD comparado ao grupo CONT, embora não tenha sido observada diferença significativa no número de camundongos por fêmea entre os grupos avaliados, bem como no aumento de peso das ninhadas. Nossos resultados mostraram que as modificações da dieta afetaram mais significativamente os parâmetros de estresse oxidativo no fígado e nos músculos do que o tecido adiposo em animais expostos à dieta hipercalórica. A diminuição da superóxido dismutase está fortemente correlacionada ao nível EROs em todos os tecidos avaliados, com um perfil de correlação muito semelhante nos tecidos hepático e muscular.

Palavras-chave: Superóxido dismutase. Catalase. Peroxidação lipídica. Perfil lipídico. NF-kB

ABSTRACT

The maternal diet before and during pregnancy can influence the health of the mother and the fetus as well as future propensities of the offspring. The present study aimed at analyzing biochemical parameters in the blood and metabolic tissues in females that were submitted to a hypercaloric or restrictive diet during pregnancy and lactation. Female mice (n = 24) of the BALB / c strain (60 days of age, weighing 18-25 g) were collected from the UFCSPA. They were separated into groups according to the diet they received: standard diet *ad libitum* (CONT), restrictive diet (RD, 30% Kcal less than standard diet), high calorie diet (HD: 60% Kcal increase compared to standard). The adaptation to the diet was 25 days and then they were mated. The weight was measured periodically and the Lee index calculated. In the 22nd DDP we made euthanasia of the animals, we collected the blood and the adipose, hepatic and muscular tissues. The lipid and glucose profile was analyzed using commercial kits and, in the metabolic tissues, it was analyzed the activity of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes, generation of reactive oxygen species by oxidation assay of dihydro-dichlorofluorescein diacetate, lipid peroxidation by TBARS and quantification of the NF-kB protein level. Data were expressed as mean \pm SEM and analyzed by single-variance following Dunnett's multiple comparison test ($p < 0.05$). Serum analysis showed a significant increase in triglycerides in the HD group compared to CONT and RD. The other parameters of the lipid profile and glycemia remained similar among the 3 groups. The time (days) for pregnant females was longer in the RD compared to the CONT group, although no significant difference was observed in the number of mice per female between the groups evaluated, as well as in the weight gain of the litters. Our results showed that dietary modifications affected more significantly the parameters of oxidative stress in the liver and muscles than the adipose tissue in animals exposed to the hypercaloric diet. The decrease in superoxide dismutase is strongly correlated to the ROS level in all tissues evaluated, with a very similar correlation profile in the hepatic and muscular tissues.

Palavras-chave: Superoxide dismutase. Catalase. Lipid peroxidation. Lipid profile. NF-kB.

1 INTRODUÇÃO

Estudos experimentais e clínicos têm demonstrado que a nutrição materna ao longo da gestação, tem papel fundamental no desenvolvimento do feto e na saúde do neonato, assim como a capacidade materna para a lactação (LEE, 2015; THORBURN et al., 2015; YAMADA-OBARA et al., 2016; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000).

Em humanos, tem se mostrado uma relação entre a dieta da mãe e as condições de vitalidade do recém-nascido. Sabe-se que o ganho de peso insuficiente da mãe está relacionado ao maior risco de retardo de crescimento intrauterino e mortalidade perinatal. Já o ganho de peso excessivo pode estar associado à diabetes gestacional, dificuldades no parto e riscos para o feto no período perinatal (PINHEIRO, 2004). Outro aspecto a ser considerado é o momento que ocorre a mudança da dieta materna, pois isto repercute no feto. Se ocorrer no primeiro trimestre da gestação pode afetar o desenvolvimento e diferenciação de vários órgãos, já num estágio mais avançado pode influenciar o crescimento fetal geral, bem como o desenvolvimento do encéfalo (FLEGAL, 2002; JAMES, 2004; MANSON, 1995).

Discute-se fortemente na literatura que estados nutricionais extremos, tanto excesso quanto redução de peso, durante a gestação expõe a mãe e o concepto a riscos de saúde.

1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença crônica não transmissível caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal onde os indivíduos acometidos apresentam prejuízos à saúde. Atualmente, trata-se de uma condição cada vez mais comum, cujo aumento já pode ser caracterizado como uma pandemia de grande preocupação para a saúde pública (JAMES, 2004; PINHEIRO, 2004; NG et al., 2014; STRASSER, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000). A elevação de sua prevalência ocorre tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, porém nos últimos, tende a somar-se a problemas duradouros de desnutrição. Inicialmente era predominante nas classes econômicas de maior renda, no entanto vem apresentando progressivo aumento nas populações mais pobres, principalmente entre as mulheres (JAMES, 2004; PINHEIRO, 2004; FLEGAL, 2012; NG et al., 2014)

No ano de 2014 mais de 1,9 bilhão de adultos (18 anos ou mais) estavam acima do peso. Destes, mais de 600 milhões eram obesos, o que representa 13% da população mundial adulta (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016) Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a distribuição de gordura em determinadas regiões do corpo, bem como a quantidade excessiva de gordura armazenada diferem entre indivíduos obesos, sendo que a distribuição pode influenciar nos tipos de doenças resultantes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2000, 2016). Em particular, a obesidade abdominal é um fator de risco importante para as doenças cardiovasculares, quando somada a níveis elevados de triglicérides no sangue, baixos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL),

altos níveis sanguíneos de glicose e hipertensão. Ainda, deve-se levar em conta, que a combinação de dois destes fatores, além da circunferência da cintura, são importantes critérios de diagnóstico para síndrome metabólica (JAMES, 2004).

A dieta é o principal fator ambiental que determina o ganho de peso. Uma dieta rica em gordura, colesterol, açúcar e outros carboidratos refinados, embora bastante palatável é altamente calórica e promove menor saciedade. Em contraste, uma dieta rica em proteína ou carboidratos complexos provê uma maior saciedade e tende a ser relacionada a uma menor ingestão calórica total (HILL, 1999; PAERATAKUL, 2006; POPKIN, 2003). Cabe salientar que diversos fatores também exercem influência sobre a ingestão de alimentos, mas observa-se cada vez mais o contínuo declínio no gasto energético diário, o que contribui diretamente para o sobrepeso (HILL, 1999; HRUBY, 2015; PAERATAKUL, 2006; PEREIRA, 2003; POPKIN, 2003).

Em animais, a dieta obesogênica, que na sua composição apresenta grandes quantidades de gordura e carboidrato, é capaz de induzir alterações a longo prazo no sistema hematopoiético, incluindo a perda de células estaminais e perda de auto renovação, o que pode resultar em uma diminuição das células tronco hematopoiéticas e células progenitoras mais primitivas. Isto pode, conseqüentemente, provocar distúrbios nas respostas imunológicas a infecções e contribuir para a persistência e/ou progressão de doenças inflamatórias crônicas (VAN DEN BERG, 2016).

Num estudo realizado com ratos machos adultos de várias cepas expostos a uma dieta altamente palatável durante meses verificou-se que tornaram-se obesos. A análise da morfologia do tecido adiposo apresentou aumento no

tamanho e número de adipócitos. A reintrodução de uma dieta padrão de comida precipitou um período de perda durante o qual apenas o tamanho dos adipócitos voltou ao normal, no entanto o número de adipócitos permaneceu elevado. Assim, a obesidade alimentar transitória em ratos resultou em uma obesidade persistente de forma puramente hiperplásica e não hipertrófica (FAUST, 1978). Em estudos posteriores (BAYS, 2011; FUSTER et al., 2016) observou-se que a remodelação do tecido adiposo, resultante da ingestão calórica excessiva modifica a estrutura e composição celular, sendo esta remodelação associada a um estado proinflamatório sistêmico, mediado por uma produção desequilibrada de citocinas derivadas de adipócitos (adipocinas), resultando em distúrbios endócrinos e imunológicos, podendo contribuir de forma direta para as doenças cardiovasculares.

1.2 Ganho de peso, obesidade e gestação

Há um aumento crescente no número de mulheres que entram na gravidez obesas, isso é decorrente do aumento da prevalência de sobrepeso e obesidade nas mulheres em idade fértil (LARAIA, 2007). Este sobrepeso ou obesidade materna influenciam diretamente no desenvolvimento da gestação, podendo causar diabetes gestacional, hipertensão arterial, anemia pós-parto, parto prematuro, taxas aumentadas de macrossomia fetal, defeitos do tubo neural, desenvolvimento da doença cardiometabólica na prole, dentre outros (BODNAR, 2004; CNATTINGIUS, 1998; DIETZ, 2006; GODFREY et al., 2017; LARAIA, 2007; SYMONDS et al., 2009; THADHANI, 1999; VAHRATIAN, 2005; WERLER, 1996).

Entre os principais determinantes das alterações no peso durante a gestação estão a dieta, o nível de atividade física e algumas características sócio demográficas, tais como, idade, paridade, escolaridade e raça (NUCCI, 2001; HANSON et al., 2017)

A saúde e o bem-estar da prole são influenciados pelas mudanças na dieta materna, bem como o período gestacional em que ocorre esta mudança também é determinante para algumas alterações no feto. Se esta mudança ocorrer no primeiro trimestre da gestação afeta o desenvolvimento e diferenciação de vários órgãos, num estágio mais adiantado influenciaria no crescimento fetal geral, bem como no desenvolvimento do cérebro (INSTITUTE OF MEDICINE (US), 1990; RIFAS-SHIMAN, 2009; SYMONDS et al., 2009).

O Brasil por ser um país muito heterogêneo e com distribuição de renda desigual apresenta problemas tanto no ganho de peso excessivo e obesidade na gestação, quanto baixa nutrição e ganho de peso gestacional insuficiente (NUCCI, 2001). A análise da variabilidade no ganho de peso durante a gestação deve levar em conta variações fisiológicas naturais do período, retenção de líquidos, multiparidade e presença de patologias como diabetes e hipertensão, além é claro do consumo de alimentos (INSTITUTE OF MEDICINE (US), 1992).

Neste sentido o ganho de peso gestacional é um fenômeno complexo influenciado não só por alterações na fisiologia materna, mas também pelo metabolismo placentário, cuja função pode alterar a sensibilidade à insulina e a inflamação sistêmica influenciando na gestação (SYMONDS et al., 2009; YAKTINE, 2009).

Muitos estudos em modelo animal têm sido realizados com o objetivo de esclarecer ainda mais os efeitos da dieta materna no desenvolvimento da gestação. Em ratos, um estudo prévio demonstrou que o ganho de peso materno, decorrente da exposição à dieta hipercalórica antes do período de gestação, influencia significativamente nos machos recém-nascidos na deposição de gordura visceral e subcutânea e aumento do peso do fígado (CORDERO, 2012).

Também, observa-se uma relação entre a obesidade induzida por dieta e a atenuação da vasodilatação, sendo mais pronunciada em fêmeas do que machos (NADERALI, 2001). Num estudo realizado com suínos miniatura (minipig) fêmeas e machos que receberam dieta hiperlipídica (40% de gordura) observou-se uma resposta mais exacerbada no perfil lipídico das fêmeas em relação aos machos. Estes animais passaram por um protocolo de exercício físico moderado, mas mesmo assim, o treinamento físico não foi capaz de reverter os efeitos de uma dieta aterogênica no perfil lipídico destes animais (THOMAS, 2002).

1.3 Restrição calórica e gestação

As observações sobre os possíveis benefícios da ingestão de uma dieta restritiva são referidas desde a década de 30. Estudos realizados com ratos demonstraram que estes viviam por mais tempo e apresentavam menor número de doenças relacionadas à idade (WEINDRUCH, 1988,1997). A ingestão calórica abaixo do *ad libitum* (à vontade), sem causar desnutrição, é tida como restrição calórica e pode estar relacionada a longevidade em muitas espécies (DE SOUZA GENARO, 2009; WEINDRUCH,1997). Em roedores, trabalhos prévios mostraram

que a redução de 30 a 60% da ingesta alimentar aumenta a média de vida nesses animais (WEINDRUCH, 1988, 1997). Já em camundongos foi observado que a restrição alimentar pode impedir ou retardar a ocorrência de doenças crônicas como: cardiomiopatia, diabetes, doenças autoimunes, câncer, Alzheimer e Parkinson (PATEL, 2005; WANG, 2007).

Camundongos nocaute para o gene da Apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) submetidos a dieta restritiva apresentaram menor lesão nos estágios iniciais da aterosclerose quando comparados ao grupo ApoE^{-/-} que recebeu dieta *ad libitum* (GUO, 2002).

As hipóteses propostas para explicar os efeitos da restrição calórica vão desde a redução da gordura corporal e sinalização da insulina até a redução da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e atenuação dos danos oxidativos (DE SOUZA GENARO, 2009; KOUBOVA, 2003; MASORO, 2005; WEINDRUCH, 1988, 1997).

Experimentos utilizando dois diferentes modelos de restrição alimentar demonstraram que animais expostos ao jejum compensavam a ingesta alimentar nos períodos de alimentação, o que fez com que a ingesta calórica semanal fosse semelhante ao grupo controle (ingesta *ad libitum*). Neste estudo os animais apresentaram maior longevidade e resistência ao estresse quando comparados aos grupos controle e restrição calórica diária. Desta forma, estes resultados sugerem que os benefícios obtidos na restrição calórica vão além da redução da ingestão de energia (ANSON; JONES; DE CABOD, 2005). Os benefícios da realização de jejum são controversos, porém um estudo realizado por Willcox

(2014) aponta efeitos benéficos em seres humanos, incluindo: efeitos sobre a síndrome metabólica, incidência de câncer e doenças cardiovasculares.

Um dos fatores que pode estar envolvido nos efeitos benéficos da restrição calórica (RC) é a autofagia. A RC é o método mais eficiente na indução da autofagia, pois ativa múltiplas vias de regulação como a inibição do complexo TOR 1 e ativação do AMPK, o qual, por sua vez, ativa a autofagia. A reciclagem citoplasmática que ocorre na autofagia neutraliza o acúmulo de organelas e proteínas danificadas associadas à idade, melhorando o desempenho metabólico das células (MACKEH, 2014).

Achados experimentais indicam que a inibição das principais vias de sinalização relacionadas à homeostase energética (como exemplo, proteínas quinase e AMPK) e ao crescimento (fator de crescimento semelhante a insulina e Akt/mTor), bem como a regulação positiva de rotas antienvhecimento atuam através da indução de autofagia (BERGAMINI, 2007). Muitos estudos sugerem que a autofagia seria suficiente para aumentar a longevidade (OHSUMI, 2014; MADEO, 2015; MIZUSHIMA; KOMATSU, 2011), embora, ainda haja muitos questionamentos para serem elucidados sobre os efeitos da restrição calórica na saúde dos indivíduos (INGRAM, 2017).

Entretanto, durante a gestação, estados nutricionais extremos podem expor a gestante e o conceito a riscos à saúde, uma vez que o baixo peso ao nascer está relacionado ao baixo peso da gestante antes da gravidez e ao insuficiente ganho de peso durante a gestação (BARKER, 1993; HALES, 1991; PHILLIPS, 1998; ZHENG, 2015;). O estado nutricional da mãe antes e durante a gravidez

também afetam o crescimento e o desenvolvimento do feto (DIETZ, 2006; SIEGARIZ, 1996).

Em animais, a restrição de nutrientes na vida intrauterina causa prematuridade, aumento do risco de infecções pulmonares, doença pulmonar obstrutiva crônica, diabetes, hipertensão, entre outras (DELAHAYE et al., 2008; REHAN, 2014; SYMONDS et al., 2009; VIEAU et al., 2007).

Num estudo realizado com ovelhas, a restrição de nutrientes materna durante o período de crescimento placentário, resultou em efeitos sobre o desenvolvimento do tecido renal com redução significativa do número de néfrons e aumento do estado pró-inflamatório além de redução do tecido adiposo da prole. Na vida adulta, quando esta prole foi alimentada com uma dieta obesogênica, observou-se que estes animais apresentaram os sintomas da síndrome metabólica mais cedo do que o normal (SYMONDS, 2009; SHARKEY et al., 2009).

1.4 Estresse oxidativo

A produção de EROs é feita de forma contínua pelas células como parte de seus processos metabólicos. Sendo que o desequilíbrio entre a geração destas espécies e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante é conhecido como estresse oxidativo (EO) (FINKEL; HOLBROOK, 2000; FRIDOVICH, 1995; ROBERTS; SINDHU, 2009).

O desempenho do sistema antioxidante tem como objetivo reduzir ou inibir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou espécies reativas

não radicais, podendo ser dividido em enzimático (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx)) e não enzimático (vitaminas C, E e A, clorofilina, flavonóides, carotenoides, curcumina, entre outros). O sistema não enzimático pode ser de origem endógena ou dietética, constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes (BARBOSA, 2010; BIANCHI, 1999; HALLIWELL, 2012).

As EROs desempenham funções relevantes na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém, em demasia, apresentam efeitos prejudiciais ao organismo conduzindo à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, entre os fatores envolvidos neste processo estão a peroxidação dos lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas e o prejuízo às enzimas, carboidratos e DNA (HALLIWELL, 2004; HUSAIN, 1987).

A dieta é um dos fatores que pode influenciar na produção ou redução das EROs, uma vez que o aumento da ingestão calórica pode induzir o EO por meio da diminuição da fluidez da membrana mitocondrial, enquanto, a suplementação de antioxidantes e a adequação da ingestão energética demonstram efeitos positivos sobre o mesmo (BURNEIKO, 2006; ESPOSITO, 1999).

1.5 Dieta, estresse oxidativo e gestação

Sabe-se que a ingestão de dietas hiperenergéticas aumenta a probabilidade de uma produção descontrolada de EROs e, como consequência,

elevação do EO. O conjunto destes fatores aumenta o risco para o desenvolvimento de câncer, doenças degenerativas relacionadas ao envelhecimento, neuroinflamação, resistência à insulina, síndrome metabólica, dislipidemia, aterosclerose, doenças cardiovasculares, entre outras (BONDIA-PONS; RYAN; MARTINEZ, 2012; BURNEIKO, 2006; CERIELLO; MOTZ, 2004; FURUKAWA et al., 2017; JOHNSON et al., 2007; RANI et al., 2016).

Um estudo realizado com roedores que associava hipóxia intermitente e dieta rica em gordura mostrou um aumento do estado inflamatório e oxidativo mensurado pelo aumento da peroxidação lipídica, diminuição da atividade da SOD, aumento da proteína C-reativa e ativação do fator nuclear kappa-B (NF- κ B), além de hiperatividade simpática e hipertensão. Ademais, foi demonstrado elevação nos níveis sanguíneos de colesterol, triglicerídeos, glicemia, insulina, leptina, lipídios no fígado e no índice de HOMA (OLEA, 2014).

Um ponto a ser destacado é que o tecido adiposo não é apenas um órgão de armazenamento de triglicerídeos, mas também desempenha papel importante na produção de adipocinas. Algumas destas adipocinas regulam a ingestão de alimentos, exercendo um efeito direto sobre o controle de peso, como é o caso da leptina. Essas adipocinas induzem a produção de EROs, gerando EO. Entre os mecanismos pelos quais o sobrepeso e a obesidade produzem EO, estão à oxidação mitocondrial e peroxissomal de ácidos graxos, e o excesso de consumo de oxigênio, que gera radicais livres na cadeia respiratória mitocondrial. Dietas ricas em lípidios são capazes de gerar EROs por alterar o consumo de oxigênio (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011).

Em um estudo recente correlacionando resultados obtidos em humanos e camundongos, encontrou-se uma relação entre acúmulo de gordura corporal e o EO sistêmico. Nos camundongos obesos, a produção de EROs aumentou seletivamente no tecido adiposo, acompanhada do aumento da expressão da NADPH oxidase e diminuição da expressão de enzimas antioxidantes. O tratamento com o inibidor da NADPH oxidase reduziu a produção de EROs no tecido adiposo, atenuou a desregulação de adipocitocinas, melhorou a diabetes, a hiperlipidemia e a esteatose hepática. Os resultados sugerem que o aumento do EO juntamente com o acúmulo de gordura é um indicador precoce da síndrome metabólica e, que o estado redox no tecido adiposo, possa ser um potencial alvo terapêutico para a síndrome metabólica associada à obesidade (FURUKAWA et al., 2017).

A obesidade demonstra influência significativa sobre a fertilidade, reduzindo as taxas de sucesso nos casos de reprodução assistida, comprovado pelo baixo percentual da fertilização de ovócitos e/ou do desenvolvimento embrionário (IGOSHEVA et al., 2010; PANDEY, 2010). A alimentação em excesso induz elevação das taxas metabólicas podendo comprometer os oócitos e o desenvolvimento embrionário, através da produção excessiva de EROs pelas mitocôndrias (BRANNIAN, 2011; LEESE, 2008). Em ratos, um estudo demonstrou relação entre obesidade e o aumento da síntese de EROs nos oócitos e zigotos (ROBKER, 2009).

Estudos prévios realizados em mães ratas que foram expostas a dieta de cafeteria durante a gestação, observou-se que a prole apresentou diminuição na capacidade antioxidante total (ORAC) e níveis mais elevados de H_2O_2 no plasma.

Também os filhotes, quando comparados ao controle cuja mãe recebeu dieta normal, apresentaram maior ganho de peso tanto no desmame como no terceiro mês de idade. Estes resultados sugerem que a adiposidade materna e a alta ingestão energética podem influenciar no desenvolvimento de distúrbios metabólicos na prole pelo aumento do EO (BOUANANE et al., 2009; SIMMONS, 2006).

Em humanos é observado que durante a gestação, o desenvolvimento placentário tende a aumentar a produção de EROs, devido à formação de novos tecidos e metabolismo inerente. Durante o primeiro trimestre, a placenta ainda não está conectada à circulação materna e, portanto, a concentração de oxigênio na placenta é muito baixa resultando num estado hipóxico, capaz de gerar EROs (PEREIRA; MARTEL, 2014). No final do primeiro trimestre, a circulação materna dentro da placenta torna-se totalmente estabelecida, o que aumenta em três vezes a concentração de oxigênio. Este aumento, por sua vez, eleva a produção de EROs o que tende a ser compensado por níveis mais elevados de antioxidantes (ZIELIŃSKA et al., 2017).

O equilíbrio entre a produção de EROs e antioxidantes pode ser perdido em algumas situações como: obesidade, excesso de ingestão calórica e diabetes (BURTON, 2009; DRÖGE, 2002; HEMPSTOCK, 2003; MYATT ; CUI, 2004). Um IMC (índice de massa corporal) pré-gestacional elevado pode estar associado ao aumento de riscos para pré-eclâmpsia (GREGG, 2005; MURAKAMI, 2005; O'BRIEN, 2003; SEBIRE, 2001). E a mesma contribui de forma importante no nascimento de prematuros, restrição de crescimento fetal, mortalidade materna e

infantil, estando também relacionada ao EO (HUBEL, 1999; ROBERTS, 2003; WALSH, 1997).

A RC demonstra diminuir o nível de EO, retardando a acumulação de danos oxidativos associado à idade além de aumentar o potencial metabólico (SOHAL; WEINDRUCH, 1996; WALSH; SHI; VAN REMMEN, 2014). Em estudos realizados em roedores submetidos a RC de 40% observou-se atenuação no aumento nas taxas de O_2^{\bullet} e H_2O_2 mitocondriais, (SOHAL et al., 1994-a), menor dano oxidativo, (SOHAL et al., 1994-a, 1994-b) e retardo na perda de fluidez da membrana (CHEN; YU, 1994; SOHAL; WEINDRUCH, 1996; WALSH; SHI; VAN REMMEN, 2014) associados ao envelhecimento.

1.6 Obesidade, sobrepeso e inflamação

O processo inflamatório tem como objetivo a eliminação da causa inicial de uma lesão, coordenando as reações do sistema imune inato, eliminando as células e/ou os tecidos danificados para iniciar a reparação dos tecidos e restaurar a função. Este processo envolve uma extensa rede de mecanismos, mediadores e células. A inflamação pode ser considerada uma reação benéfica, no entanto, quando prolongada pode causar importantes danos ao organismo (LARSEN; HENSON, 1983; HAGEMANN et al., 2013; KULKARNI et al., 2016)

Evolutivamente, há uma grande importância na interação entre os sistemas metabólico e imunológico em especial quando se fala em mecanismos de sobrevivência. Além de usar maquinaria celular semelhante, muitas citocinas, hormônios, proteínas de sinalização, lipídios bioativos e fatores de transcrição

podem exercer papéis metabólicos e/ou imunológicos. As disfunções destes sistemas podem levar a um conjunto de distúrbios metabólicos crônicos como: diabetes tipo 2, obesidade e doenças cardiovasculares (HOTAMISLIGIL, 2006; LEVIN; LIPSITCH, 1999; WELLEN; HOTAMISLIGIL, 2005).

O delicado equilíbrio entre as respostas metabólicas e inflamatórias pode ser interrompido por desequilíbrios nutricionais prolongados ou inflamação crônica. A fome e a desnutrição prejudicam a função imune e reduzem a sobrevivência pós-infecção (HOTAMISLIGIL; ERBAY, 2008), enquanto o excedente de energia induz inflamação e compromete a imunidade (BAKER; HAYDEN, 2011; HOTAMISLIGIL; ERBAY, 2008; HOTAMISLIGIL, 2010; KARAGIANNIDES; POTHOUKAKIS, 2007).

Existe uma ligação entre o balanço energético e a inflamação onde diversos estudos já demonstraram que a RC é capaz de reduzir os níveis de inflamação, diminuindo os níveis circulantes de citocinas e atividade de sinalização inflamatória em diversos tecidos (DIXIT, 2008; FONTANA, 2009; MORGAN; WONG; FINCH, 2007). Os efeitos benéficos da RC podem ser relacionados a uma diminuição da gordura visceral e reatividade adiposa (DIXIT, 2008; MUZUMDAR et al., 2008; YE ; KELLER, 2010).

No sobrepeso e obesidade, um dos fatores desencadeantes da resposta inflamatória é o excesso de lipídeos que influencia tanto no aumento do volume quanto no número de adipócitos. Essa adipogênese atua na secreção de adipocinas (IL-6, MCP-1, CRP, PAI-1 e outras), bem como em efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos, que caracterizam a inflamação metabólica ou

metainflamação. Além disso, a liberação de adipocinas também prejudica a via de sinalização da insulina (FRANCISQUETI, 2015; RICHARD et al., 2017).

O NF- κ B (fator nuclear kappa B) é um fator de transcrição que induz a transcrição de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6, MCP-1 entre outras). O NF- κ B é bem conhecido por suas funções na imunidade, inflamação e oncogênese (DIDONATO, 2012; HAYDEN, 2008; PERKINS, 2010), porém tem sido associado a um papel central nas doenças metabólicas. Diversos resultados sugerem que o NF- κ B promove o gasto e inibe a acumulação de energia, mediado por citocinas inflamatórias tais como IL-6, IL-1, and TNF- α . Esses estudos demonstram que o NF- κ B regula a homeostase energética através do engajamento direto nas redes celulares que regem a glicólise e a respiração, com implicações profundas para além das doenças metabólicas (BAKER; HAYDEN, 2011; HOTAMISLIGIL; ERBAY, 2008; SOLINAS; KARIN, 2010).

A via de sinalização do NF- κ B é fundamental para a ligação do metabolismo, inflamação e ação da insulina (BAKER; HAYDEN, 2011; HOTAMISLIGIL; ERBAY, 2008; SOLINAS; KARIN, 2010; TORNATORE et al., 2012). A maioria dos sinais de estresse metabólicos, tais como, sinais nutricionais intracelulares e extracelulares, citocinas pró-inflamatórias, produtos associados a agentes patogênicos e danos, ativam a via de sinalização do NF- κ B em células metabólicas e inflamatórias que resultam em resistência à insulina ou disfunção das células β pancreáticas. (HOTAMISLIGIL; ERBAY, 2008; SOLINAS; KARIN, 2010).

O padrão de alimentação da gestante bem como seu estilo de vida antes e durante a gestação revelam-se de extrema importância e podem ser a chave para

abordar a prevenção da obesidade e o sobrepeso nas gerações futuras (BRION et al., 2010). A atividade física e as intervenções dietéticas demonstram desempenhar um papel efetivo no controle do peso materno e podem ser uma maneira econômica e útil para conter a crescente epidemia de doenças não transmissíveis relacionadas à nutrição (WATSON et al., 2017).

2 JUSTIFICATIVA

O estado nutricional e a alimentação no período da gestação e da lactação são fundamentais para o desenvolvimento e saúde da prole da mãe.

A associação entre um IMC elevado e a ingestão de dietas altamente calóricas pode interferir nas concentrações plasmáticas de lipídeos e glicídios, expondo a gestante ao desenvolvimento de doenças crônicas, tais como síndrome metabólica, elevação da pressão arterial, entre outras.

Uma dieta equilibrada no período gestacional ajuda no controle do ganho de peso, diminui o dano oxidativo pela redução da geração de EROs, melhora a sinalização da insulina e atenua estados pró-inflamatórios, desta forma, evitando ou retardando o desenvolvimento de doenças crônicas, vinculadas a oxidação e inflamação crônica.

Embora já se tenha avançado nesta temática, a literatura científica ainda é escassa em estudos que avaliam os efeitos de diferentes tipos de nutrição (hipercalórica, normal e restrição calórica) durante o período da gestação e da lactação. O nosso estudo é inovador e se propõem a utilizar uma dieta hipercalórica, tendo como base o consumo predominante de carboidratos e não apenas lipídeos. Esta composição se assemelha à realidade da população mundial que consome alimentos ricos em carboidratos e não apenas em gordura. Desta forma, estudos experimentais são essenciais para o melhor entendimento do perfil lipídico, glicídico e oxidativo dos tecidos metabólicos em mães submetidas a diferentes dietas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo teve como objetivo analisar parâmetros bioquímicos, no sangue e nos tecidos adiposo, hepático e muscular, em fêmeas que durante a gestação e a lactação foram submetidas a dieta hipercalórica ou restritiva.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinar os níveis de glicose, colesterol total e triglicerídeos no soro;
- Acompanhar periodicamente as variações de peso corporal;
- Analisar a geração de espécies reativas de oxigênio nos tecidos adiposo, hepático e muscular esquelético;
- Avaliar / Determinar a atividade das enzimas SOD e catalase nos tecidos adiposo, hepático e muscular;
- Avaliar a lipoperoxidação nos tecidos hepático e muscular;
- Quantificar o marcador pró-inflamatório, fator de transcrição nuclear kappa b, nos tecidos hepático e muscular.

Artigo Científico: The hypercaloric diet during gestation and lactation promotes changes in triglycerides and oxidative stress parameters in the liver and muscles

- Revista escolhida: Journal of Nutrition (<http://jn.nutrition.org/>)

- Instrução para os autores: <http://jn.nutrition.org/site/misc/instructions-for-authors.xhtml>

- Fator de impacto: 4,14

The hypercaloric diet during gestation and lactation promotes changes in triglycerides and oxidative stress parameters in the liver and muscles

Andressa Alves de Andrade¹, Vanessa Feistauer¹, Joana Fisch², Ana Moira Morás^{1,3}, Luiza Steffens Reinhardt^{1,3}, Carolina Kalkmann da Silva Oliveira³, Vanessa Becker Bollis³, Silvana de Almeida¹, Dinara Jaqueline Moura^{1,3}, Márcia Giovenardi^{1*}

¹ *Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil*

² *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil*

³ *Laboratório de Genética Toxicológica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil*

⁴ *Curso de Graduação em Biomedicina, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brazil*

*Corresponding Author: Dr Márcia Giovenardi
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmiento Leite, 245/308C
Porto Alegre/RS, 90050-170, Brazil
Tel. +55-51-33308751
E-mail: giovenardi.marcia@gmail.com

ABSTRACT

Diet plays a relevant role in maintaining the mother's health and fetal development. The objective of our study was analyze biochemical parameters in the blood and metabolic tissues of females that received a normal, hypercaloric or restrictive diet during gestation and lactation. Female mice (n=24) of the BALB/c (approximately 60 days of age and weigh between 18-25 g) were obtained from the animal facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). They were separated in groups the according to the diet received: standard diet (CONT), restrictive diet (RD: 30% Kcal less than standard diet), high calorie diet (HD: 60% Kcal increase compared to standard). The adaptation the diet was of 25 days and then was mated with the males. The females were periodically weighed for further calculation of the Lee index. At 22° DDP the animals were euthanized and blood, adipose, hepatic and muscle tissues were collected. The lipid and glucose profile was analyzed using commercial kits. In the metabolic tissues, the dihydrodichlorofluorescein diacetate oxidation assay was measured, the activity of the catalase and superoxide dismutase enzymes, the lipid peroxidation of the cell membrane and the quantification of protein level NF- κ B were analyzed. The data was expressed by mean \pm SEM, and analyzed by the One-Way of variance following Dunnett's multiple comparison test ($p < 0.05$). Our results showed a significant increase in triglyceridesHD group compared to the CONT and RD. The other lipid profile parameters and glycemia remained similar among the 3 groups. The time (days) for the females to become pregnant was longer in the RD compared to the CONT group, although, no significant difference was observed in the number of pups per female among evaluated groups, as well as on the weight gain of the litters. Our results showed that dietary modifications affected more significantly oxidative stress parameters in liver and muscle than adipose tissue in animal exposed to hyperlipidic diet. Decrease in superoxide dismutase is strongly correlated to ROS level in all tissues evaluated, with a very similar correlation profile in hepatic and muscular tissues.

Keywords: Superoxide dismutase, catalase, lipid peroxidation, lipid profile, NF- κ B.

1. INTRODUCTION

The gestational period is considered a developmental window of vulnerability (BECK et al., 1990; BELL et al., 2010). Studies in which female mice were exposed to nutritional challenges have provided some of the clearest examples of how phenotypes can be lost or retained across generations (DHILLON , 2006; DO et al., 2008; DOCHE et al., 2012; DOEHNER; CLARK ; ANKER , 2010; DOEHNER , 2012; DOTTA ; FONDELLI ; DI MARIO , 2005). Previous study showed that the maternal diet has an important impact on the regulation of endocrine reproductive axis of offspring. Maternal consumption of cafeteria diet affected reproductive hormone regulation of the adult male offspring, which was demonstrated by modifications on sexual performance (JACOBS et al., 2014).

Diet is the main environmental factor that determines weight gain during pregnancy (STUEBE; OKEN; GILLMAN, 2009). Exposure of the mother to a high-fat diet during pregnancy is associated with reduced insulin and glucose sensitivity and increased body size and adiposity in the first-generation offspring of humans, non-human primates and rodents (DO et al., 2008; DUBE et al., 1999; DUNN-MEYNELL; GOVEK; LEVIN, 1997; DUNN-MEYNELL et al., 2009; DUNN; BALE, 2009; EDMOND et al., 1987). The incidence of pregnancy obesity increased from 70 to 100% in the past decade, that explains for the majority of complications during pregnancy, as well as the increase in fetal health disorders, which include, congenital anomalies, birth weight and size inappropriate for gestational age, and higher risk for obesity and metabolic syndrome development (MCMILLEN; ADAM; MUHLHAUSER, 2005; TAYLOR; POSTON, 2007; BLAIR; THOMPSON; BLACK,

2007; BONEY et al., 2005; SWELL et al., 2006; HULL et al., 2008; HILLIER et al., 2007).

In humans, previous studies (RAVELLI et al., 1998; LI et al., 2010) showed that undernutrition during pregnancy promotes long-term metabolic changes in offspring. In animals, nutrient restriction in intrauterine life causes prematurity, increased risk of lung infections, chronic obstructive pulmonary disease, increased risk of glucose intolerance, insulin resistance, diabetes, hypertension (BLÁZQUEZ et al., 1998; GAROFANO; CZERNICHOW; BREANT, 1999; SYMONDS et al., 2009; VICKERS et al., 2000; VIEAU et al., 2007).

Studies in animal models reinforce this concept that rapid postnatal growth following in utero growth restriction is detrimental to long-term metabolic health, including increased risk of obesity. Rodent models of maternal protein restriction, caloric restriction, and intrauterine artery ligation, which all demonstrate low birth weight, develop increased adiposity when suckled by normally fed dams during the lactation period and therefore undergo postnatal catch up growth (OZANNE et al , 2004; SIMMONS; TEMPLETON; GERTZ, 2001; VICKERS et al ., 2000).

As mentioned earlier, female nutrition during gestation and lactation is crucial for the healthy development of offspring. Our study proposed to use a hypercaloric diet, based on the predominant consumption of carbohydrates and not just lipids. This composition resembles the reality of the world's population that consumes foods high in carbohydrates and not just in fat. Thus, the objective of this work was to analyze biochemical parameters in the blood and metabolic

tissues in females that during pregnancy and lactation were submitted to a normal, hypercaloric or restrictive diet.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

2.1 Animals

Ten male and 24 female BALB/c albino mice (60 days old, weighing approximately 18-24 g) were obtained from the Animal House of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Animals were suitable housed and maintained under standard temperature (21 ± 1 °C), humidity (55 ± 5 %) and illumination (12 h light/dark cycle; lights on at 4 a.m.) conditions. All procedures were performed in conformity with the Brazilian Society of Neuroscience and Guide for the Care and Use of Laboratory Animal of Institute for Laboratory Animal Research, and this study was approved by the Ethics Committee from Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (Protocol Number 388/15). All efforts were made to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

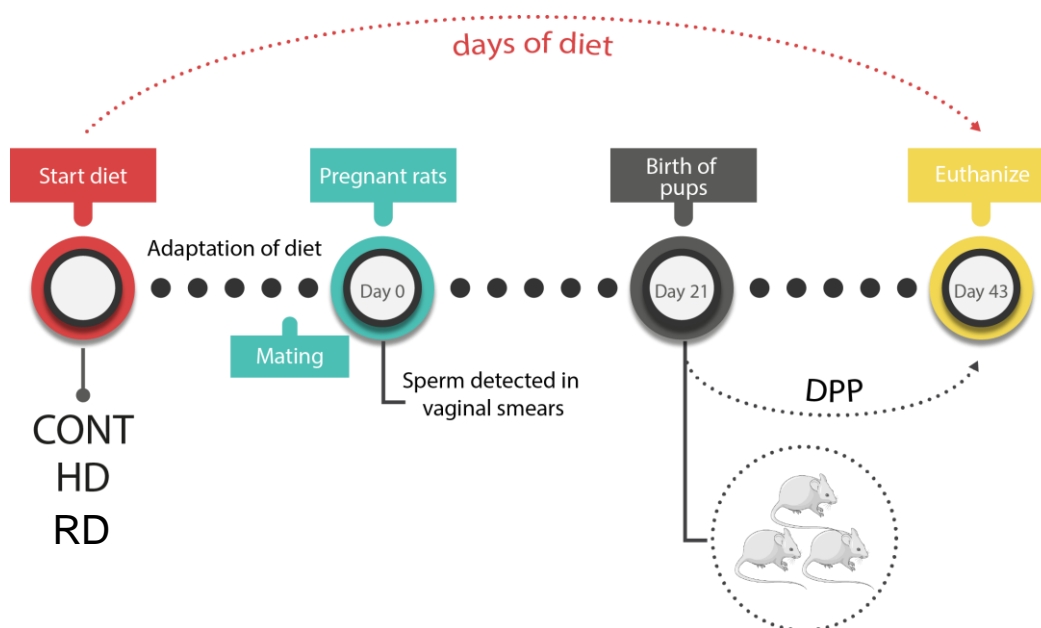
2.2 Experimental procedures

The females were weighed, divided into three groups (eight females each group) and housed individually, with water *ad libitum*: a control group (CONT, with a total of 3 Kcal / g 42.0% carbohydrate, 22.0% protein, 4.0% fat) was fed *ad libitum*, a restrictive diet group (RD, with a 30% reduction in amount), and a hypercaloric diet group (HD, with a 60% increase in amount). The hypercaloric diet (HD) providing a total energy of 5.0 kcal/g (52.0% carbohydrate, 12.2% protein,

26.0% fat), according to manufacturer's information (Pragsoluções Biociências, Jaú, SP, Brazil). Males were housed five to a cage with food and water available *ad libitum*. After 25 days of different diet treatment, female were caged with males, in a ratio of 3: 1, for mating. The vaginal smears were taken to detect the presence of sperm, which was the confirmation of the gestation. After the confirmation, the females were separated and placed individually until the day of pups-birth. In the first postpartum day (PPD), the number of pups per females was standardized at 6. During the lactation period, we monitor the weight of the females. The adjustment of the amount of feed offered to the RD group was performed daily according to the consumption of the CONT group. To biometrical analyses, the weight of the females was monitored on days 4, 8, 12, 21 and 22 PPD. On day 22 DPP the nasal-anal length was taken to calculate the LEE index (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

2.3 Tissue and blood collection

On the 22 PPD, mice were euthanized by decapitation and truncal blood was collected. Blood samples were collected in sterile tubes and centrifuged at 3.000 rpm for 10 min at 4°C and were stored at - 20 °C until analysis the glycemia and lipid perfil. After that, adipose, hepatic and muscle tissues were collected, under light protection, frozen in liquid nitrogen and stored at - 20 °C. These tissues were chosen, because they are likely involved in the deleterious consequences of oxidative stress under nutritional challenges.



Schematic representing the time line of experimental procedures

2.5 Seric Analysis

The levels of glucose, triglycerides and total cholesterol in serum were performed by colorimetric enzyme method, with endpoint reaction by commercial kit (Labtest) according to the manufacturer's specifications.

2.6 Oxidative stress parameters

Tissues were homogenized in Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7.4) with PMSF using a homogenizer, and then centrifuged for 5 min. The supernatants were used for the SOD, CAT, DCF and TBARS assays, and all procedures were performed under cold conditions. Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) using serum bovine albumin as the standard. The measurement of parameters was performed by a SpectraMax reader M^{2e} (Molecular Devices, USA).

2.6.1 Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was evaluated by inhibition of superoxide-dependent autoxidation of epinephrine (Misra and Fridovich, 1972). Briefly, to 20 μL of each sample were added 170 μL of a mixture containing 50 mM glycine buffer, pH 10.2, and 10 mM catalase. After that, 10 μL of 60 mM epinephrine were added and the absorbance was recorded immediately, each 36 s for 10 min, at 480 nm. The inhibition of autoxidation of epinephrine occurs in the presence of SOD, whose activity can indirectly be assayed spectrophotometrically. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of epinephrine autoxidation and the specific activity is reported as SOD Units/mg protein.

2.6.2 Catalase (CAT) activity

CAT activity was assayed according to the method described by Aebi (1984), based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm. Briefly, 10 μL of each sample were added to 180 μL of 20 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2. Subsequently, 10 μL of 10mM H_2O_2 were added and the absorbance was recorded immediately, each 36 s for 5 min, at 240 nm. One CAT unit is defined as one μmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT Units/mg protein.

2.6.3 Dihydrodichlorofluorescein diacetate ($\text{H}^2\text{DCF-DA}$) oxidation assay

The DCFH-DA assay is a reliable method for measuring intracellular reactive oxygen species (ROS). The method is based on the deacetylation of the DCFH-DA probe, and its subsequent oxidation by ROS into a highly fluorescent

compound (2',7'-dichlorofluorescein; DCF) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). For this assay, phosphate-buffered saline (pH 7.4), 500 μ M DCFH-DA, and 5 μ L of tissue homogenate were incubated in 96-well dark plates at 37 °C for 30min. Fluorescence was measured with excitation and emission wavelengths at 490 nm and 525 nm, respectively (KO et al., 2005). All experiments were carried out in a dark room to prevent the oxidation of DCFH-DA. The results were expressed as intensity of fluorescence from DCF per mg of protein.

2.6.4 Lipid Peroxidation

Thiobarbituric acid-reactive material (TBARS) was measured using a technique modified from Slater and Sawyer (1971). Aliquots (0.5 ml) of the tissues homogenates were extracted with 0.5 ml of trichloroacetic acid (20% w/v). After centrifugation, 0.9 ml of the supernatant was added to 1.0 ml of thiobarbituric acid (0.67%) dissolved in 0.026 M-Tris-HCl buffer (pH 7.0). The samples were heated in boiling water for 10 min. After cooling, the absorbance was determined at 532 nm on a Zeiss spectrophotometer. Extraction blanks were prepared and treated in the same way as the experimental samples, but without tissue. TBARS was quantitated using a standard curve prepared using malondialdehyde (MDA) obtained by periodate oxidation of 2-deoxyribose (WARAVDEKAR; SASLAW, 1957; 1959; REHNCRONA et al, 1980), and the results were normalized by protein content.

2.6.5 Detection and quantification of protein level NF- κ B

A monoclonal capture antibody specific for NF- κ B p65 (regardless of phosphorylation site) has been coated onto the wells of the 96-well plate provided. Tissues homogenate, including a standard of known NF- κ Bp65 (Total) content, controls, and unknowns, are pipetted into these wells and then a rabbit detection antibody specific for NF- κ B p65 (Total) is added to the wells. During the first incubation, the NF- κ Bp65 antigen binds to the immobilized capture antibody and the NF- κ Bp65 rabbit antibody serves as a detection antibody by binding to the immobilized NF- κ Bp65 (Total) protein. After washing, a horseradish peroxidase labeled anti-rabbit IgG is added. This binds to the detection antibody to complete the four member sandwich. After a third incubation and washing to remove all the unbound enzyme, a substrate solution (TMB) is added, which is acted upon by the bound enzyme to produce color. The intensity of this colored product is directly proportional to the concentration of NF- κ Bp65 (Total) present in the original specimen and the optical density can be read on a standard microplate reader. The total assay incubation time is only 4 hours. The Novex® ELISA kits from Life Technologies was utilized.

2.7 Statistical analyses

Data distribution was determinate by Kolmogorov–Smirnov test. The results of data on glycemia, lipid profile, weight gain and Lee's index was expressed by mean \pm SEM and the results of oxidative stress parameters was expressed by mean \pm EPM. In all cases, to compare among groups was using the

software Prism™ by the One-Way analysis of variance following Dunnett's multiple comparison test. In all cases, $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. RESULTS

The table 1 shows the biochemical parameters, the weight gain and the Lee index of the females submitted to different diets (control, restrictive and hypercaloric). Our results show that there was a significant increase in serum triglyceride levels in HD when compared to RD and CONT ($F(2,15) = 17.87$, $p = 0.002$). Concerning glucose and cholesterol levels there was no difference between the groups studied ($p = 0.167$). In addition, we verified that there was no significant difference in the weight gain and Lee Index in the groups CONT, RD and HD ($p=0.272$; $p=0.507$, respectively).

In Figure 1 are show characteristics of pregnancy and puppies. Our results indicates an increase in time (number of days) to pregnant in females of RD group when compared to CONT group ($F(2,33)=4.035$; $p=0.027$), while no difference was observed in the HD group (figure 1A). Curiously, no significant difference was observed in the pups number per female between evaluated groups ($F(2,31)=0.490$; $p=0.617$) (figure 1B), as well as on the weight gain of the litters, evaluated until 12 days of pups age ($F(2,11)=0.142$; $p=0.868$), although, there was a tendency of a smaller weight gain from the 4th day for the puppies of the RD group (Figure 1C).

In the liver tissue (figure 2A) our results demonstrate an absence of alteration in the ROS levels between the with RD and HD groups, when compared to the

CONT group The antioxidant CAT activity was significantly increased in HD when compared to CONT ($F(2,14)=4.391$; $p=0.04$), however the activity of the SOD was decreased when compared to CONT ($F(2,17)=5.337$; $p=0.01$). The same tendency was observed to RD group (figures 2B and C). Although there was an increase in MDA formation in HD group this was not significant (figure 2D). In the NF- κ B activation measured, only the HD was significantly decreased when compared to CONT ($F(2,17)=4.749$; $p=0.02$) (figure 2E).

The same profile was observed in muscle tissue with the three groups presenting similar ROS level (figure 3A). The results presented in figure 3C showed that SOD activity was significantly decreased in HD when compared to CONT ($F(2,15)=4.850$; $p=0.02$, ($F(2,13)=3.580$; $p=0.06$, respectively), while, although not significant, it is possible to observe an increase in CAT activity (figure 3B). On the other hand, the MDA was increased in HD when compared to CONT group ($F(2,14)=3.466$; $p=0.06$), indicating lipid peroxidation (figure 3D). In the NF- κ B activation was not observed significant difference between evaluated groups.

Our results showed that in adipose tissue we did not observe any significant differences in the levels of ROS production ($F(2,16)=1.671$; $p=0.22$) (figure 4A). CAT activity showed no significant change between groups ($F(2,15)=1.307$; $p=0.30$, $F(2,15)=1.798$; $p=0.20$, respectively), whilst the RD and HD groups presented a decrease in CAT activity (figure 4B). The SOD activity in the adipose was significantly decreased in HD group when compared to CONT ($F(2,17)=3.409$; $p=0.05$) (figure 4C).

In order to understand our data, we performed analyzes of the CAT and SOD activity rate. The results presented in figure 5 showed a significant decrease in

SOD/CAT ration in HD groups in both liver e muscle tissue. Still, in liver there is a significant decrease in RD group. These results indicate a redox imbalance, which may be associated with an excessive increase of catalase activity in these tissues in HD group. No significant difference was observed in adipose tissue.

4. DISCUSSION

The gestation and lactation are period characterized by high metabolic demand due to physiological changes in the female and the needs for fetal growth. There is a change in nutrient levels tissues and fluids due to hormonal and metabolic changes that guarantees the growth and development of the uterus, mammary glands, placenta, embryo and fetus (BLACK, 2001). For all these factors, the adequate nutrition in the reproductive period is necessary to preserve the mother's health and the viability, health and growth of the puppies (BREIER et al., 2001; TAKASAKI et al., 2012). Our results showed that the hypercaloric diet was able to alter the plasma levels of triglycerides in the HD group when compared with CONT and RD. However, we did not observe differences in the other biochemical parameters, weight gain and Lee index among the 3 groups studied. Nevertheless, when was analyzed the time elapsing until females become pregnant, we observed that the females in RD group showed a significant increase in the number of days in comparison to the CONT. Although the RD females took longer to pregnancy, our results not showed significant difference in the number of pups born per female in the three groups studied.

Other important aspect is the composition of breast milk because this is influenced by physiological and metabolic state of the mother and can have important effects on the metabolic state and feeding preferences of their pups. Studies in animal models reinforce this concept that rapid postnatal growth following in utero growth restriction is detrimental to long-term metabolic health, including increased risk of obesity. Rodent models of maternal protein restriction, caloric restriction, and intrauterine artery ligation, which all demonstrate low birth weight, develop increased adiposity, increased blood pressure and oxidative stress parameters when adults (BARKER; CLARK, 1997; PAINTER; ROSEBOOM; BLEKER, 2005; ERIKSSON, et al., 1999; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2017). On the other hand, mothers which were fed with a high fat diet give birth to puppies that, when adults, have changes in oxidative stress parameters, increased risk of obesity impaired renal function, lipoperoxidation of cardiac tissue, which may result in cardiac arrhythmias, heart failure or sudden death (NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011; FÉRÉZOU-VIALA et al., 2007; HOWIE et al, 2009; TAIN, et al., 2017). Although our results did not show significant difference in litter weight gain (up to 12 days of age) among the studied groups, it is important to note that pups of the RD group from 4 days of age presented a tendency to gain less weight. The neonatal period is a phase of high metabolic demand and fundamental for the puppy's physical and cognitive development.

Previous study (ZHANG et al., 2009) demonstrated that maternal nutrition modification during pregnancy and lactation influences health in the adult life of offspring, which could alter their responses to environmental challenges, and

increase their susceptibility to disease. The majority of studies focus in the obesogenic diets and our study concentrated on a diet rich in carbohydrates and fats (similar to the intake of the general population) or calorie restriction.

Previous studies (FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ et al., 2011; MATSUZAWA NAGATA et al., 2008; MALTI et al., 2014; LI; SLOBODA; VICKERS, 2011) have shown that the condition of obesity leads to oxidative stress and the production of inflammatory mediators. This scenario has been recognized as a mechanism that triggers the developmental effects of maternal obesity on the outcome of metabolic changes. Increased of ROS that outweigh antioxidant defense mechanisms will lead to cellular injury initiating the inflammatory signalling cascade (LOCATELLI et al., 2003; GLASTRAS et al., 2017). Increased oxidative stress is a result of a reduced antioxidant response, which most likely occurs due to diminished SOD protein expression. A failing antioxidant response may lead to further ROS production, thus leading to inflammation and cytotoxicity (PATKI et al., 2013).

Our results showed that in the liver there was significant alteration of oxidative stress parameters, since HD presented increase in CAT and HR decreased in SOD when compared to CONT group. Although it was not significant, it is possible to observe a clear tendency of lipid peroxidation increase in the HD group and a decrease of the SOD activity. Regarding the SOD/CAT ratio, both groups had a reduction in relation to the CONT.

A previous study (AMIRKHIZI et al., 2010) has shown that the consumption of hypercaloric diet caused an increase of lipid peroxidation in hepatic tissues and of the triglycerides what could contribute to the alteration in the oxidative-antioxidant balance. ROS and lipid peroxidation products damage the

respiratory chain in hepatocytes through oxidative damage, leading to mitochondrial dysfunction that could cause an apoptosis or necrosis depending on the energy state of the cell (ARMITAGE; TAYLOR; POSTON, 2005). The reduction of antioxidant enzymes has also been observed and may be related to the rapid consumption and the exhaustion of the storage of these enzymes in the fight against the free radicals generated (NOEMAN; HAMOODA; BAALASH, 2011). The SOD decreased activity and increased CAT activity may be associated with the neutralization of ROS, measured by DCF assay, which justifies an absence of increase in the formation of free radicals, considering that our study was endpoint. However, this neutralization was not as efficient, since there is an increase of lipid peroxidation in the HD group. In addition, is important to consider that the liver is an organ with a set of different metabolic pathways that can be activated in adverse situations. Otherwise, a comparative study between high-fat diet and western diet, both with great amount of carbohydrates, evidenced the induction of oxidative stress. The western diet appears to have negative effects on cardiovascular and metabolic health, and data indicates that offspring health, particularly the liver metabolism may be affected by the western diet (PRUIS et al., 2014; HEINONEN et al., 2014).

When the body cannot supply the energy needs, the most affected tissue will be the muscular one, whose energy reserves will be rapidly consumed and several routes will be activated to obtain energy (CAPUTO et al., 2009). In our study, we can observe that the balance between the SOD/CAT decreases in HD in relation to the CONT, but with no difference in ROS production. However, HD has higher lipid peroxidation than CONT indicating increased cell membrane damage.

A previous study (HANCOCK et al., 2008) demonstrated that in the skeletal muscles a high caloric diet increases mitochondrial biogenesis and oxidative capacity. These adaptive responses may affect the tissue's ability to produce and react with ROS formation. Hypercaloric diets tend to increase the H₂O₂ production of the mitochondria, shifting the redox state to a more oxidized state (ANDERSON et al., 2009; PINHO et al., 2017).

The adipose tissue is the main energetic source of the organism. Adipocytes are the only cells specialized in the storage of lipids in the form of triacylglycerol in their cytoplasm, having intense metabolic activity, contributing to the control of the body's energy homeostasis (KERSHAW; FLIER, 2004; COELHO; OLIVEIRA; FERNANDES, 2013). Our findings showed that the adipose tissue was slightly affected by the diet modification, since only HD showed a decrease in SOD compared to CONT. In addition, the RD and HD groups presented a decrease in CAT activity.

Another important aspect is that adipose tissue has high levels of antioxidant enzymes to manage the high production of ROS. In obese individuals, the expression and activity of antioxidant enzymes such as CAT, SOD, and glutathione peroxidase (GPX) decreased in the adipose tissue (OKUNO et al., 2008; OKURO et al., 2010; FURUKAWA et al., 2017; KOBAYASHI et al., 2009). These data indicate that an increase in ROS production and a decrease in antioxidant enzymes can lead to oxidative stress in adipose tissue (FURUKAWA et al., 2017, MATSUDA, SHIMOMURA, 2013).

Our results showed that dietary modifications, proposed in this study, affected more significantly oxidative stress parameters in liver and muscle than

adipose tissue in animal exposed to hyperlipidic diet. The relationship between oxidative potential and antioxidant enzyme activity is show in Figure 6. Decrease in SOD is strongly correlated to ROS level in all tissues evaluated, with a very similar correlation profile in hepatic and muscular tissues, which justifies these tissues to have a more prominent effect in the HD group which result in damage to membrane lipids. Our hypothesis is that in liver and muscle the increase of CAT and reduction of SOD keeps ROS levels controlled, but does not prevent lipid damage. However, we cannot but consider the possibility related to time of supply of the superimposed diets to the female reproductive period, which made it difficult to evaluate the effect of diet on own account, which would justify the absence of significant results in adipose tissue and in the RD group.

Acknowledgements

We thank PROAP/UFCSPA, CAPES, and FAPERGS for financial support.

References

AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.

AMIRKHIZI, Farshad et al. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidation and oxidative stress in women?. **ARYA Atheroscler**, v. 2, n. 4, 2010.

ARMITAGE, James A.; TAYLOR, Paul D.; POSTON, Lucilla. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. **The Journal of physiology**, v. 565, n. 1, p. 3-8, 2005.

ANDERSON, Ethan J. et al. Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 3, p. 573, 2009.

- BARKER, D. J. P.; CLARK, Phillipa M. Fetal undernutrition and disease in later life. **Reviews of reproduction**, v. 2, n. 2, p. 105-112, 1997.
- BECK, Bernard et al. Hyperphagia in obesity is associated with a central peptidergic dysregulation in rats. **The Journal of nutrition**, v. 120, n. 7, p. 806-811, 1990.
- BELL, Christopher G. et al. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies haplotype-specific methylation in the FTO type 2 diabetes and obesity susceptibility locus. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e14040, 2010.
- BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between'Lee index'and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.
- BLACK, Robert E. Micronutrients in pregnancy. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. S2, p. S193-S197, 2001.
- BLAIR, Nikki J. et al. Risk factors for obesity in 7-year-old European children: the Auckland Birthweight Collaborative Study. **Archives of disease in childhood**, v. 92, n. 10, p. 866-871, 2007.
- BLÁZQUEZ, Cristina et al. Role of carnitine palmitoyltransferase I in the control of ketogenesis in primary cultures of rat astrocytes. **Journal of neurochemistry**, v. 71, n. 4, p. 1597-1606, 1998.
- BREIER, B. H. et al. Fetal programming of appetite and obesity. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 185, n. 1, p. 73-79, 2001.
- BONEY, Charlotte M. et al. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. **Pediatrics**, v. 115, n. 3, p. e290-e296, 2005.
- CAPUTO, Fabrizio et al. Exercício aeróbio: Aspectos bioenergéticos, ajustes fisiológicos, fadiga e índices de desempenho. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 11, n. 1, p. 94-102, 2009.
- CARMIEL-HAGGAI, Michal; CEDERBAUM, Arthur I.; NIETO, Natalia. A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 1, p. 136-138, 2005.
- COELHO, Marisa; OLIVEIRA, Teresa; FERNANDES, Ruben. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Archives of medical science: AMS**, v. 9, n. 2, p. 191, 2013.
- DHILLON, Harveen et al. Leptin directly activates SF1 neurons in the VMH, and this action by leptin is required for normal body-weight homeostasis. **Neuron**, v. 49, n. 2, p. 191-203, 2006.
- DO, Ron et al. Genetic variants of FTO influence adiposity, insulin sensitivity, leptin levels, and resting metabolic rate in the Quebec Family Study. **Diabetes**, v. 57, n. 4, p. 1147-1150, 2008.

DOCHE, Michael E. et al. Human SH2B1 mutations are associated with maladaptive behaviors and obesity. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 12, p. 4732, 2012.

DOEHNER, Wolfram; CLARK, Andrew; ANKER, Stefan D. The obesity paradox: weighing the benefit. 2009.

DOEHNER, Wolfram et al. Inverse relation of body weight and weight change with mortality and morbidity in patients with type 2 diabetes and cardiovascular co-morbidity: an analysis of the PROactive study population. **International journal of cardiology**, v. 162, n. 1, p. 20-26, 2012.

DOTTA, Francesco; FONDELLI, Cecilia; DI MARIO, Umberto. Type 1 diabetes mellitus as a polygenic multifactorial disease: immunopathogenic mechanisms of beta-cell destruction. **Acta Biomed**, v. 76, n. Suppl 3, p. 14-18, 2005.

DUBE, Michael G. et al. Disruption in neuropeptide Y and leptin signaling in obese ventromedial hypothalamic-lesioned rats. **Brain research**, v. 816, n. 1, p. 38-46, 1999.

DUNN, Gregory A.; BALE, Tracy L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 11, p. 4999-5009, 2009.

DUNN-MEYNELL, A. A.; GOVEK, E.; LEVIN, B. E. Intracarotid glucose selectively increases Fos-like immunoreactivity in paraventricular, ventromedial and dorsomedial nuclei neurons. **Brain research**, v. 748, n. 1, p. 100-106, 1997.

DUNN-MEYNELL, Ambrose A. et al. Relationship among brain and blood glucose levels and spontaneous and glucoprivic feeding. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 21, p. 7015-7022, 2009.

EDMOND, J. et al. Capacity for substrate utilization in oxidative metabolism by neurons, astrocytes, and oligodendrocytes from developing brain in primary culture. **Journal of neuroscience research**, v. 18, n. 4, p. 551-561, 1987.

FÉRÉZOU-VIALA, Jacqueline et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 3, p. R1056-R1062, 2007.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, Alba et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FURUKAWA, Shigetada et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2004.

GAROFANO, A.; CZERNICHOW, P.; BREANT, B. Effect of ageing on beta-cell mass and function in rats malnourished during the perinatal period. **Diabetologia**, v. 42, n. 6, p. 711-718, 1999.

GLASTRAS, Sarah J. et al. The renal consequences of maternal obesity in offspring are overwhelmed by postnatal high fat diet. **PLoS one**, v. 12, n. 2, p. e0172644, 2017.

HALLIWELL, B. Cellular responses to oxidative stress: adaptation, damage, repair, senescence and death. **Free radicals in biology and medicine**, p. 187-267, 2007.

HANCOCK, Chad R. et al. High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 22, p. 7815-7820, 2008.

HEINONEN, I. et al. The effects of equal caloric high fat and western diet on metabolic syndrome, oxidative stress and vascular endothelial function in mice. **Acta Physiologica**, v. 211, n. 3, p. 515-527, 2014.

HILLIER, Teresa A. et al. Childhood obesity and metabolic imprinting. **Diabetes care**, v. 30, n. 9, p. 2287-2292, 2007.

HOWIE, G. J. et al. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **The Journal of physiology**, v. 587, n. 4, p. 905-915, 2009.

HULL, Holly R. et al. Impact of maternal body mass index on neonate birthweight and body composition. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 198, n. 4, p. 416. e1-416. e6, 2008.

JACOBS, Silvana et al. The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. **Physiology & behavior**, v. 129, p. 280-286, 2014.

KERSHAW, Erin E.; FLIER, Jeffrey S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

KO, Seong-Hee et al. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. **Journal of medicinal food**, v. 8, n. 1, p. 41-46, 2005.

KOBAYASHI, Hironori et al. Dysregulated glutathione metabolism links to impaired insulin action in adipocytes. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, v. 296, n. 6, p. E1326-E1334, 2009

LI, M.; SLOBODA, D. M.; VICKERS, M. H. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. **Experimental diabetes research**, v. 2011, 2011.

LI, Yanping et al. Exposure to the Chinese famine in early life and the risk of hyperglycemia and type 2 diabetes in adulthood. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2400-2406, 2010.

- LOCATELLI, Francesco et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 18, n. 7, p. 1272-1280, 2003.
- MALTI, N. et al. Oxidative stress and maternal obesity: feto-placental unit interaction. **Placenta**, v. 35, n. 6, p. 411-416, 2014.
- MATSUDA, Morihiro; SHIMOMURA, Ichihiro. Increased oxidative stress in obesity: implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. **Obesity research & clinical practice**, v. 7, n. 5, p. e330-e341, 2013.
- MATSUZAWA-NAGATA, Naoto et al. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. **Metabolism**, v. 57, n. 8, p. 1071-1077, 2008.
- MISRA, Hara P.; FRIDOVICH, Irwin. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
- MCMILLEN, I. Caroline; ADAM, Clare L.; MÜHLHÄUSLER, Beverly S. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **The Journal of physiology**, v. 565, n. 1, p. 9-17, 2005.
- NOEMAN, Saad A.; HAMOODA, Hala E.; BAALASH, Amal A. Biochemical study of oxidative stress markers in the liver, kidney and heart of high fat diet induced obesity in rats. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 3, n. 1, p. 17, 2011.
- OKUNO, Yosuke et al. Adipose expression of catalase is regulated via a novel remote PPAR γ -responsive region. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 366, n. 3, p. 698-704, 2008.
- OKUNO, Yosuke et al. Human catalase gene is regulated by peroxisome proliferator activated receptor-gamma through a response element distinct from that of mouse. **Endocrine journal**, v. 57, n. 4, p. 303-309, 2010.
- OZANNE, Susan E. et al. Early programming of weight gain in mice prevents the induction of obesity by a highly palatable diet. **Clinical Science**, v. 106, n. 2, p. 141-145, 2004.
- PAINTER, Rebecca C.; ROSEBOOM, Tessa J.; BLEKER, Otto P. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. **Reproductive toxicology**, v. 20, n. 3, p. 345-352, 2005.
- PATKI, Gaurav et al. Depression, anxiety-like behavior and memory impairment are associated with increased oxidative stress and inflammation in a rat model of social stress. **Brain research**, v. 1539, p. 73-86, 2013.
- PINHO, Ricardo A. et al. High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 110, p. 381-389, 2017.

PRUIS, M. G. M. et al. Maternal western diet primes non-alcoholic fatty liver disease in adult mouse offspring. **Acta Physiologica**, v. 210, n. 1, p. 215-227, 2014.

RAVELLI, Anita CJ et al. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. **The Lancet**, v. 351, n. 9097, p. 173-177, 1998.

REHNCRONA, Stig et al. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺-and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation in vitro. **Journal of neurochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1630-1638, 1980.

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Pilar et al. Long term effects of fetal undernutrition on rat heart. Role of hypertension and oxidative stress. **PLoS one**, v. 12, n. 2, p. e0171544, 2017.

SASLAW, I.; WARAVDEKAR, V. Preparation of Malonaldehyde bis-Bisulfide, Sodium Salt. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 843-844, 1957.

SEWELL, Mark F. et al. Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 195, n. 4, p. 1100-1103, 2006.

SIMMONS, Rebecca A.; TEMPLETON, Lori J.; GERTZ, Shira J. Intrauterine growth retardation leads to the development of type 2 diabetes in the rat. **Diabetes**, v. 50, n. 10, p. 2279-2286, 2001.

SLATER, T. F.; SAWYER, B. C. The stimulatory effects of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. General features of the systems used. **Biochemical Journal**, v. 123, n. 5, p. 805-814, 1971.

STUEBE, Alison M.; OKEN, Emily; GILLMAN, Matthew W. Associations of diet and physical activity during pregnancy with risk for excessive gestational weight gain. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 201, n. 1, p. 58. e1-58. e8, 2009.

SYMONDS, Michael E.; SEBERT, Sylvain P.; BUDGE, Helen. The impact of diet during early life and its contribution to later disease: critical checkpoints in development and their long-term consequences for metabolic health: Symposium on 'Early nutrition and later disease: current concepts, research and implications'. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 4, p. 416-421, 2009.

TAIN, You-Lin et al. High Fat Diets Sex-Specifically Affect the Renal Transcriptome and Program Obesity, Kidney Injury, and Hypertension in the Offspring. **Nutrients**, v. 9, n. 4, p. 357, 2017.

TAKASAKI, Mariko et al. Continuous intake of a high-fat diet beyond one generation promotes lipid accumulation in liver and white adipose tissue of female mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 23, n. 6, p. 640-645, 2012.

TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Developmental programming of obesity in mammals. **Experimental physiology**, v. 92, n. 2, p. 287-298, 2007.

THOMÀS-MOYÀ, Elena et al. Gender Related Differences in Paraoxonase 1 Response to High-fat Diet-induced Oxidative Stress. **Obesity**, v. 16, n. 10, p. 2232-2238, 2008.

VIEAU, Didier et al. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. S16-S20, 2007.

VICKERS, Mark H. et al. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 279, n. 1, p. E83-E87, 2000.

WARAVDEKAR, V. S. et al. A sensitive colorimetric method for the estimation of 2-deoxy sugars with the use of the malonaldehyde-thiobarbituric acid reaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 234, p. 1945-1950, 1959.

ZHANG, Junlong et al. Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 478, 2009.

Legends

Figure 1. Time (days) elapsing until females become pregnant (A), number of pups per mice (B) and weight mean of pups at birth until 12 days (C) of the control (CONT), caloric restriction (CR) and hypercaloric diet (HD) groups. * $p < 0.05$ when compared to CONT.

Figure 2. The 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCF) oxidation assay (A), catalase (CAT) (B), superoxide dismutase (SOD) (C), malondialdehyde (MDA) (D) and NF- κ B activation (E) in the liver tissue of control (CONT), caloric restriction (CR) and hypercaloric diet (HD) female groups. Data expressed as mean \pm EPM compared by the One-Way analysis of variance following Dunnett's multiple comparison test ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ when compared to CONT.

Figure 3. The 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCF) oxidation assay (A), catalase (CAT) (B), superoxide dismutase (SOD) (C), malondialdehyde (MDA) (D) and NF- κ B activation (E) in the muscle tissue of control (CONT), caloric restriction (CR) and hypercaloric diet (HD) female groups. Data expressed as mean \pm EPM compared by the One-Way analysis of variance following Dunnett's multiple comparison test ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ when compared to CONT.

Figure 4. The 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCF) oxidation assay (A), catalase (CAT) (B), superoxide dismutase (SOD) (C) in the adipose tissue of control

(CONT), caloric restriction (CR) and hypercaloric diet (HD) female groups. Data expressed as mean \pm EPM, compared by the One-Way analysis of variance following Dunnett's multiple comparison test ($p < 0.05$). * $p < 0.05$ when compared to CONT.

Figure 5. The SOD/CAT ratio in the liver, muscle and adipose tissue of control (CONT), caloric restriction (CR) and hypercaloric diet (HD) female groups. Data expressed as mean \pm EPM, compared by the One-Way analysis of variance following Dunnett's multiple comparison test ($p < 0.05$). ** $p < 0.05$ when compared to CONT.

Figure 6. The correlation between DCF and SOD in the liver, muscle and adipose tissue of control (CONT), caloric restriction (CR) and hypercaloric diet (HD) female groups. Data expressed as mean \pm EPM and compared by Spearman correlation.

Tabela 1. Biochemical parameters, weight gain and Lee index in female *Mus musculus* mice submitted to control, restrictive and hypercaloric diets.

Variables	Control (n= 6-8)	Restriction (n=6-7)	Hypercaloric (n= 5-7)
Glucose (mg/dL)	153.2 ± 1.65	140.2 ± 11.04	162.2 ± 7.52
Triglycerides (mg/dL)	116.1 ±8.1	78.6 ± 5.61	183.1 ± 20.87 *
Total cholesterol (mg/dL)	113.7 ± 7.24	97.30 ± 3.32	107.4 ± 9.45
Weight gain (g)	7.4 ± 0.6	6.0± 0.91	5.3 ± 1.16
Lee's Index (g/cm ³)	338.2 ± 6,75	337.0 ± 3.94	328.8 ± 5.84

*when compared to RD and HD group

Figure 2

Liver Tissue

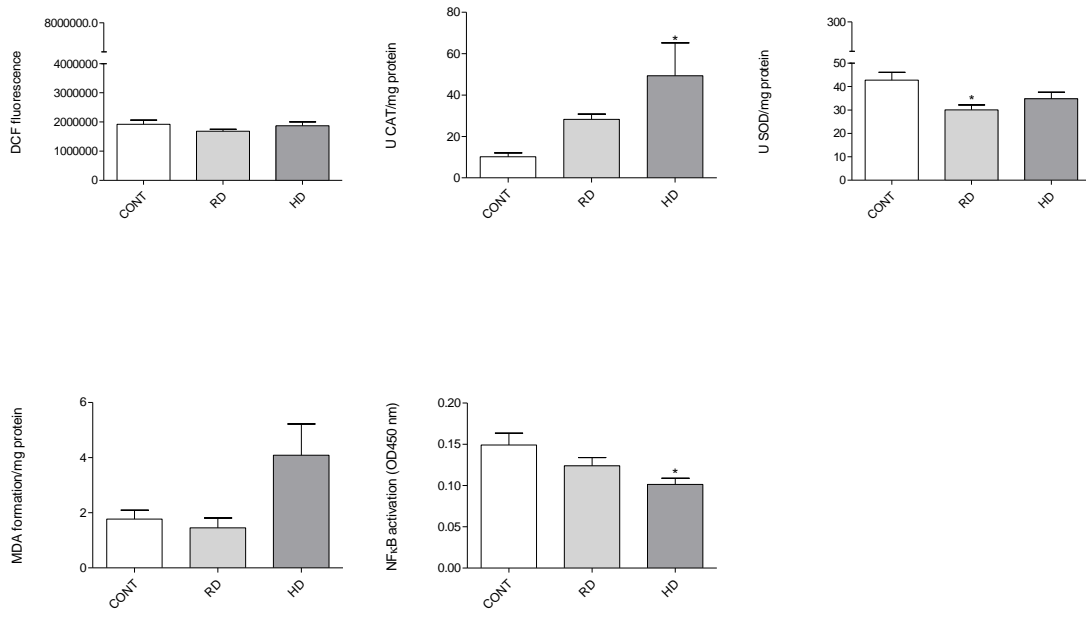


Figure 3

Muscle Tissue

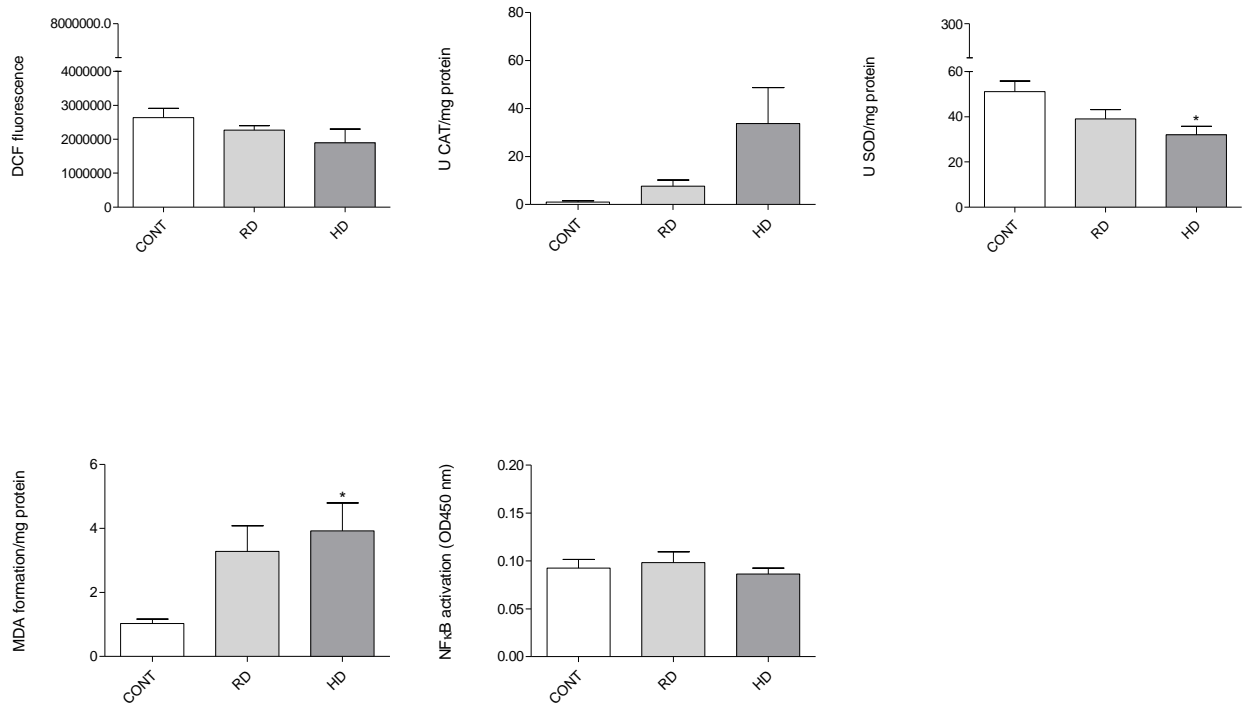


Figure 4

Adipose Tissue

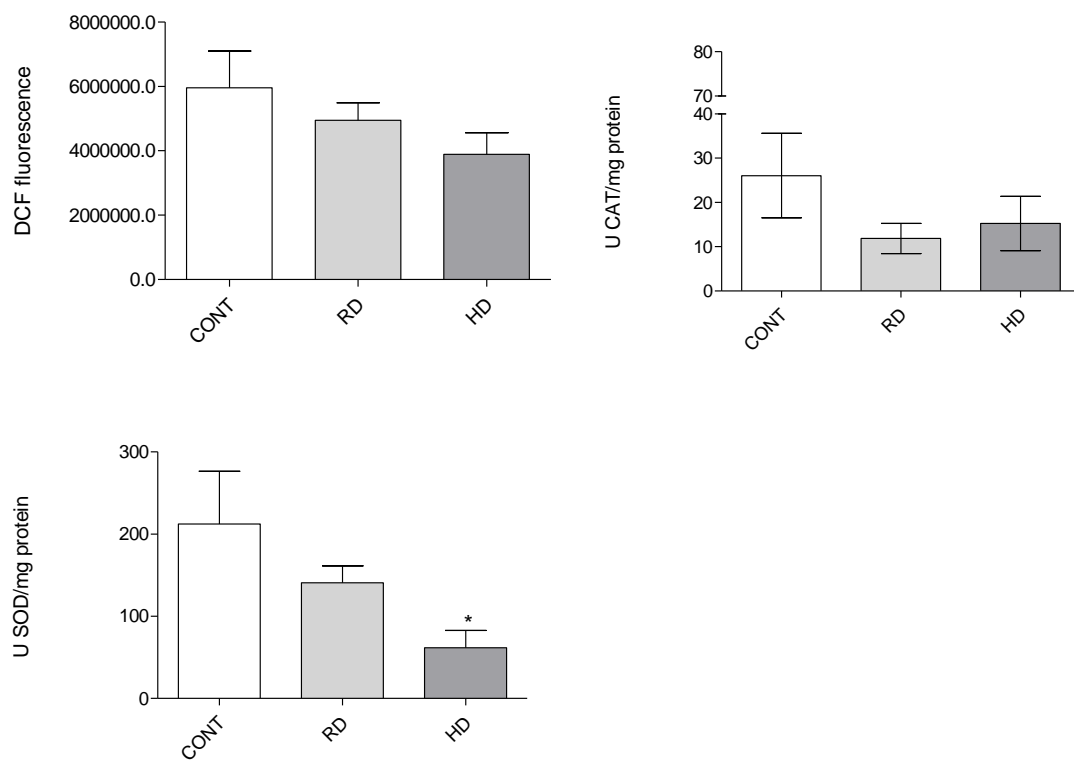


Figure 5

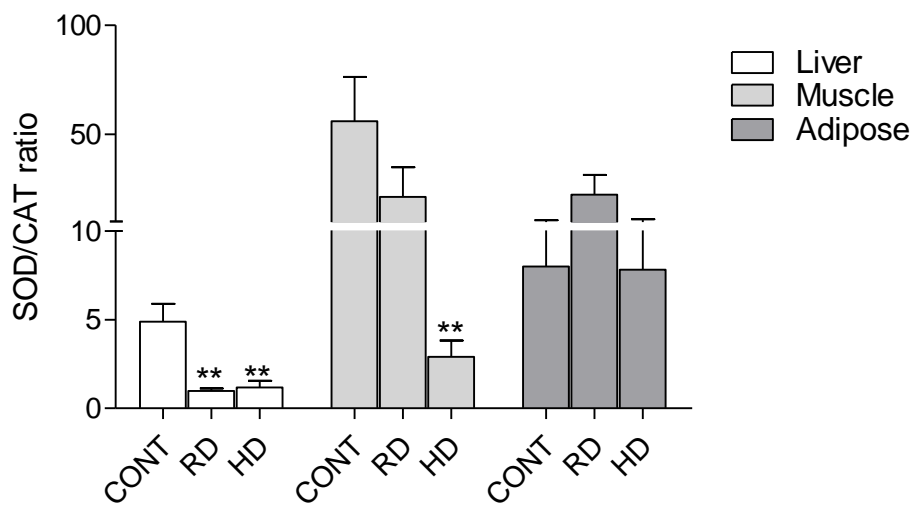
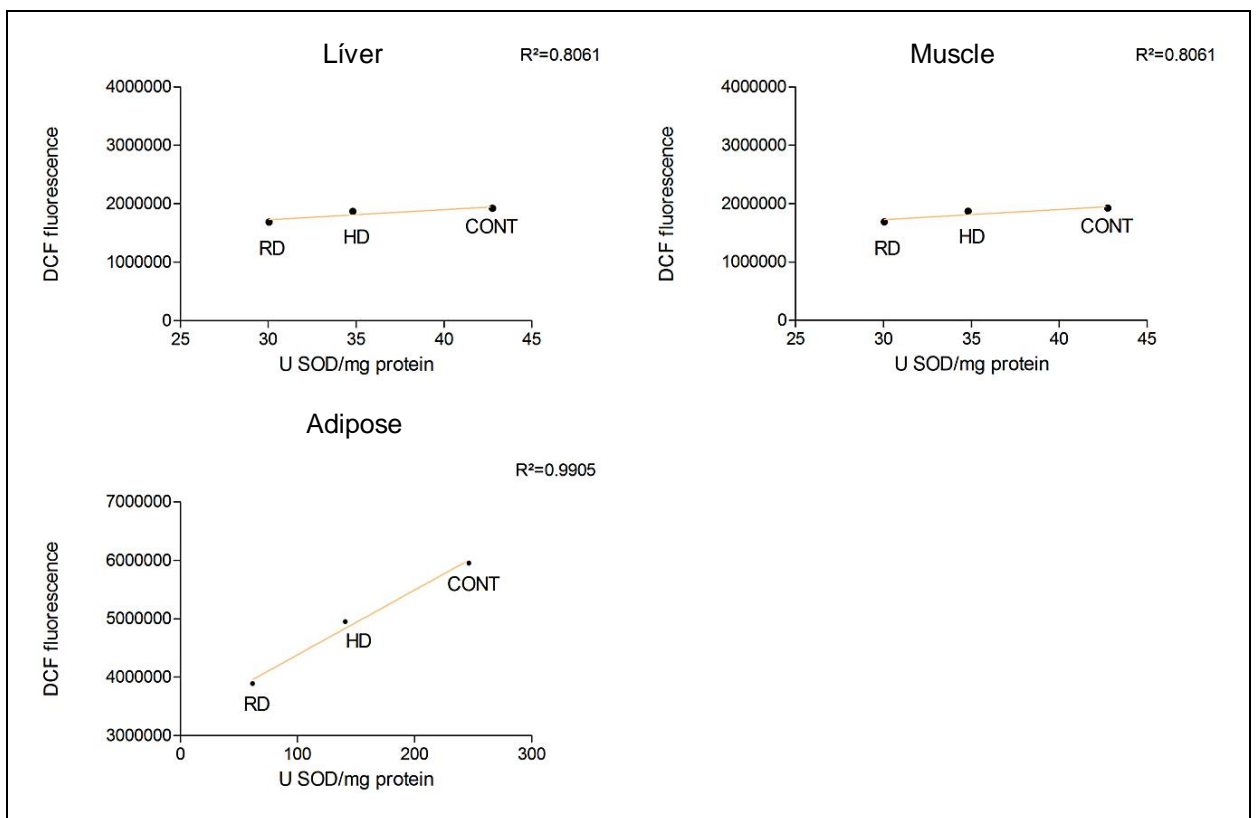


Figura 6



5 CONCLUSÕES

Diante dos resultados observados podemos concluir que a dieta materna durante a gestação e lactação é de suma importância, pois pode alterar perfil lipídico, bem como parâmetros de estresse oxidativo, quando trata-se da ingestão de alimentos com alto valor calórico. No que se refere à restrição calórica podemos inferir que esta, interfere na capacidade reprodutiva das fêmeas, o que evidenciamos pelo maior número de dias para engravidar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSON, R. Michael; JONES, Bruce; DE CABOD, Rafael. The diet restriction paradigm: a brief review of the effects of every-other-day feeding. **Age**, v. 27, n. 1, p. 17-25, 2005.

BARBOSA, Kiriague Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. nutr**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARKER, D. J. P. et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, n. 1, p. 62-67, 1993.

BAKER, Rebecca G.; HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar. NF- κ B, inflammation, and metabolic disease. **Cell metabolism**, v. 13, n. 1, p. 11-22, 2011

BAYS, Harold E. Adiposopathy: is "sick fat" a cardiovascular disease?. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 57, n. 25, p. 2461-2473, 2011.

BERGAMINI, Ettore et al. The role of autophagy in aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1114, n. 1, p. 69-78, 2007.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

BIANCHI, Maria de Lourdes Pires; ANTUNES, Lusânia Maria Greggi. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **RevNutr**, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BODNAR, Lisa M.; SIEGA-RIZ, Anna Maria; COGSWELL, Mary E. High prepregnancy BMI increases the risk of postpartum anemia. **Obesity Research**, v. 12, n. 6, p. 941-948, 2004.

BONDIA-PONS, Isabel; RYAN, Lisa; MARTINEZ, J. Alfredo. Oxidative stress and inflammation interactions in human obesity. **Journal of physiology and biochemistry**, v. 68, n. 4, p. 701-711, 2012.

BOUANANE, Samira et al. Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. **Clinical Science**, v. 116, n. 8, p. 669-680, 2009.

BRANNIAN, John D. Obesity and fertility. *South Dakota medicine: the journal of the South Dakota State Medical Association*, v. 64, n. 7, p. 251-254, 2011.

BRION, Marie-Jo A. et al. Maternal macronutrient and energy intakes in pregnancy and offspring intake at 10 y: exploring parental comparisons and prenatal effects. **The American journal of clinical nutrition**, v. 91, n. 3, p. 748-756, 2010.

BURNEIKO, Regina CM et al. Interaction of hypercaloric diet and physical exercise on lipid profile, oxidative stress and antioxidant defenses. **Food and chemical toxicology**, v. 44, n. 7, p. 1167-1172, 2006.

BURTON, G. J. et al. Placental endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in the pathophysiology of unexplained intrauterine growth restriction and early onset preeclampsia. **Placenta**, v. 30, p. 43-48, 2009.

CNATTINGIUS, Sven et al. Prepregnancy weight and the risk of adverse pregnancy outcomes. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 3, p. 147-152, 1998.

CERIELLO, Antonio; MOTZ, Enrico. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 24, n. 5, p. 816-823, 2004.

CHEN, Juan Juan; YU, Byung Pal. Alterations in mitochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 5, p. 411-418, 1994.

CORDERO, P. et al. Maternal weight gain induced by an obesogenic diet affects adipose accumulation, liver weight, and insulin homeostasis in the rat offspring depending on the sex. **Journal of endocrinological investigation**, v. 35, n. 11, p. 981-986, 2012.

DE SOUZA GENARO, Patricia; SARKIS, Karin Sedó; MARTINI, Ligia Araújo. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 53, p. 5, 2009.

DELAHAYE, Fabien et al. Maternal perinatal undernutrition drastically reduces postnatal leptin surge and affects the development of arcuate nucleus proopiomelanocortin neurons in neonatal male rat pups. **Endocrinology**, v. 149, n. 2, p. 470-475, 2008.

DIETZ, Patricia M. et al. Combined effects of prepregnancy body mass index and weight gain during pregnancy on the risk of preterm delivery. **Epidemiology**, v. 17, n. 2, p. 170-177, 2006.

DIDONATO, Joseph A.; MERCURIO, Frank; KARIN, Michael. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. **Immunological reviews**, v. 246, n. 1, p. 379-400, 2012.

DIXIT, Vishwa Deep. Adipose-immune interactions during obesity and caloric restriction: reciprocal mechanisms regulating immunity and health span. **Journal of leukocyte biology**, v. 84, n. 4, p. 882-892, 2008.

DRÖGE, Wulf. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

ESPOSITO, Luke A. et al. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 9, p. 4820-4825, 1999.

FAUST, IRVING M. et al. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 235, n. 3, p. E279, 1978.

FERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. **International journal of molecular sciences**, v. 12, n. 5, p. 3117-3132, 2011.

FINKEL, Toren; HOLBROOK, Nikki J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FLEGAL, Katherine M. et al. Prevalence and trends in obesity among US adults, 1999-2000. **Jama**, v. 288, n. 14, p. 1723-1727, 2002.

FLEGAL, Katherine M. et al. Prevalence of obesity and trends in the distribution of body mass index among US adults, 1999-2010. **Jama**, v. 307, n. 5, p. 491-497, 2012.

FONTANA, Luigi. Neuroendocrine factors in the regulation of inflammation: excessive adiposity and calorie restriction. **Experimental gerontology**, v. 44, n. 1, p. 41-45, 2009.

FRANCISQUETI, Fabiane Valentini; NASCIMENTO, André Ferreira do; CORRÊA, Camila Renata. Obesidade, inflamação e complicações metabólicas. **Nutrire**, p. 81-89, 2015.

FRIDOVICH, Irwin. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 97-112, 1995.

FURUKAWA, Shigetada et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. **The Journal of clinical investigation**, v. 114, n. 12, p. 1752-1761, 2017.

FUSTER, José J. et al. Obesity-induced changes in adipose tissue microenvironment and their impact on cardiovascular disease. **Circulation research**, v. 118, n. 11, p. 1786-1807, 2016.

GREGG, Edward W. et al. Secular trends in cardiovascular disease risk factors according to body mass index in US adults. **Jama**, v. 293, n. 15, p. 1868-1874, 2005.

GODFREY, Keith M. et al. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 53-64, 2017.

GUO, ZhongMao et al. Dietary restriction reduces atherosclerosis and oxidative stress in the aorta of apolipoprotein E-deficient mice. **Mechanisms of ageing and development**, v. 123, n. 8, p. 1121-1131, 2002.

HAGEMANN, Jan H. et al. Danger control programs cause tissue injury and remodeling. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 6, p. 11319-11346, 2013.

HALES, C. N. et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. **Bmj**, v. 303, n. 6809, p. 1019-1022, 1991.

HALLIWELL, Barry. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutritionreviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HALLIWELL, Barry; WHITEMAN, Matthew. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British journal of pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HANSON, Mark et al. Interventions to prevent maternal obesity before conception, during pregnancy, and post partum. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 65-76, 2017.

HAYDEN, Matthew S.; GHOSH, Sankar. Shared principles in NF- κ B signaling. **Cell**, v. 132, n. 3, p. 344-362, 2008.

HEMPSTOCK, Joanne et al. The contribution of placental oxidative stress to early pregnancy failure. **Human pathology**, v. 34, n. 12, p. 1265-1275, 2003.

HILL, James O.; MELANSON, Edward L. Overview of the determinants of overweight and obesity: current evidence and research issues. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 31, n. 11 Suppl, p. S515-21, 1999.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation and metabolic disorders. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 860, 2006.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S.; ERBAY, Ebru. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 12, p. 923, 2008.

HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 900-917, 2010.

HRUBY, Adela; HU, Frank B. The epidemiology of obesity: a big picture. **Pharmacoeconomics**, v. 33, n. 7, p. 673-689, 2015.

HUBEL, Carl A. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. **Experimental Biology and Medicine**, v. 222, n. 3, p. 222-235, 1999.

HUSAIN, S. Rafat; CILLARD, Josiane; CILLARD, Pierre. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.

IGOSHEVA, Natalia et al. Maternal diet-induced obesity alters mitochondrial activity and redox status in mouse oocytes and zygotes. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10074, 2010.

INGRAM, Donald K.; DE CABO, Rafael. Calorie Restriction in Rodents: Caveats to Consider. **Ageing Research Reviews**, 2017

INSTITUTE OF MEDICINE (US). SUBCOMMITTEE ON NUTRITIONAL STATUS et al. **Nutrition during pregnancy: part I, weight gain: part II, nutrient supplements**. Natl Academy Pr, 1990.

INSTITUTE OF MEDICINE (US). SUBCOMMITTEE FOR A CLINICAL APPLICATION GUIDE. **Nutrition During Pregnancy and Lactation:: An Implementation Guide**. National Academies, 1992.

JAMES, Philip T. et al. The obesity epidemic, metabolic syndrome and future prevention strategies. **European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation**, v. 11, n. 1, p. 3-8, 2004.

JOHNSON, James B. et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 5, p. 665-674, 2007.

KARAGIANNIDES, Iordanes; POTHOUKAKIS, Charalabos. Obesity, innate immunity and gut inflammation. **Current opinion in gastroenterology**, v. 23, n. 6, p. 661-666, 2007

KOUBOVA, Jana; GUARENTE, Leonard. How does calorie restriction work?. **Genes & development**, v. 17, n. 3, p. 313-321, 2003.

KULKARNI, Onkar P. et al. The immune system in tissue environments regaining homeostasis after injury: is "inflammation" always inflammation?. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.

LARAIA, Barbara A.; BODNAR, Lisa M.; SIEGA-RIZ, Anna Maria. Pregravid body mass index is negatively associated with diet quality during pregnancy. **Publichealthnutrition**, v. 10, n. 09, p. 920-926, 2007.

LARSEN, Gary L.; HENSON, Peter M. Mediators of inflammation. **Annual review of immunology**, v. 1, n. 1, p. 335-359, 1983.

LEE, Ho-Sun. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental programming of diseases in childhood and adulthood. **Nutrients**, v. 7, n. 11, p. 9492-9507, 2015.

LEESE, Henry J. et al. Metabolism of the viable mammalian embryo: quietness revisited. **Molecular human reproduction**, v. 14, n. 12, p. 667-672, 2008.

LEVIN, Bruce R.; LIPSITCH, Marc; BONHOEFFER, Sebastian. Population biology, evolution, and infectious disease: convergence and synthesis. **Science**, v. 283, n. 5403, p. 806-809, 1999.
MACKEH, Rafah et al. Reactive oxygen species, AMP-activated protein kinase, and the transcription cofactor p300 regulate α -tubulin acetyltransferase-1 (α TAT-1/MEC-17)-dependent

microtubule hyperacetylation during cell stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 17, p. 11816-11828, 2014.

MADEO, Frank et al. Essential role for autophagy in life span extension. **The Journal of clinical investigation**, v. 125, n. 1, p. 85, 2015.

MANSON, JoAnn E. et al. Body weight and mortality among women. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 11, p. 677-685, 1995

MASORO, E. J.; YU, B. P.; BERTRAND, H. A. Action of food restriction in delaying the aging process. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 79, n. 13, p. 4239-4241, 1982.

MASORO, Edward J. Overview of caloric restriction and ageing. **Mechanisms of aging and development**, v. 126, n. 9, p. 913-922, 2005.

MIZUSHIMA, Noboru; KOMATSU, Masaaki. Autophagy: renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728-741, 2011.

MORGAN, T. E.; WONG, A. M.; FINCH, C. E. Anti-inflammatory mechanisms of dietary restriction in slowing aging processes. In: **Mechanisms of Dietary Restriction in Aging and Disease**. Karger Publishers, 2007. p. 83-97.

MURAKAMI, Maki et al. Prepregnancy body mass index as an important predictor of perinatal outcomes in Japanese. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 271, n. 4, p. 311-315, 2005.

MUZUMDAR, Radhika et al. Visceral adipose tissue modulates mammalian longevity. **Aging cell**, v. 7, n. 3, p. 438-440, 2008.

MYATT, Leslie; CUI, Xiaolan. Oxidative stress in the placenta. **Histochemistry and cell biology**, v. 122, n. 4, p. 369-382, 2004.

NADERALI, Ebrahim K. et al. Dietary obesity in the rat induces endothelial dysfunction without causing insulin resistance: a possible role for triacylglycerols. **Clinical Science**, v. 101, n. 5, p. 499-506, 2001.

NG, Marie et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The lancet**, v. 384, n. 9945, p. 766-781, 2014.

NUCCI, Luciana Bertoldi et al. Assessment of weight gain during pregnancy in general prenatal care services in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 1367-1374, 2001.

O'BRIEN, Tara E.; RAY, Joel G.; CHAN, Wee-Shian. Maternal body mass index and the risk of preeclampsia: a systematic overview. **Epidemiology**, v. 14, n. 3, p. 368-374, 2003.

OLEA, Elena et al. Intermittent hypoxia and diet-induced obesity: effects on oxidative status, sympathetic tone, plasma glucose and insulin levels, and arterial pressure. **Journal of Applied Physiology**, v. 117, n. 7, p. 706-719, 2014.

OHSUMI, Yoshinori. Historical landmarks of autophagy research. **Cell research**, v. 24, n. 1, p. 9, 2014.

PAERATAKUL, Sahaspahorn. BRAY George A.; POPKIN Barry M. Capítulo 13: Diet in the Prevention and Treatment of Obesity. In: TEMPLE, Norman J.; WILSON, Ted; JACOBS JR, David R. *Nutritional health: strategies for disease prevention*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2006. P. 223-238

PANDEY, Shilpi; BHATTACHARYA, Siladitya. Impact of obesity on gynecology. **Women's Health**, v. 6, n. 1, p. 107-117, 2010.

PATEL, Nilay V. et al. Caloric restriction attenuates A β -deposition in Alzheimer transgenic models. **Neurobiology of aging**, v. 26, n. 7, p. 995-1000, 2005.

PEREIRA, Ana C.; MARTEL, Fátima. Oxidative stress in pregnancy and fertility pathologies. **Cell biology and toxicology**, v. 30, n. 5, p. 301-312, 2014.

PEREIRA, Luciana O.; FRANCISCHI, Rachel P. de; LANCHETA JR, Antonio H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 47, n. 2, p. 111-27, 2003.

PERKINS, Neil D. The diverse and complex roles of NF- κ B subunits in cancer. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 2, p. 121, 2012.

PINHEIRO, Anelise Rizzolo de Oliveira; FREITAS, Sérgio Fernando Torres de; CORSO, Arlete Catarina Tittoni. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. 2004.

PHILLIPS, David IW. Birth weight and the future development of diabetes: A review of the evidence. **Diabetes care**, v. 21, p. B150, 1998.

POPKIN, Barry M.; NIELSEN, Samara Joy. The sweetening of the world's diet. **Obesity research**, v. 11, n. 11, p. 1325-1332, 2003.

RANI, Vibha et al. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life sciences**, v. 148, p. 183-193, 2016.

REHAN, Virender K. et al. Metyrapone Blocks Maternal Food Restriction-Induced Changes in Female Rat Offspring Lung Development. **Reproductive Sciences**, v. 21, n. 4, p. 517, 2014.

RICHARD, Caroline et al. Individuals with obesity and type 2 diabetes have additional immune dysfunction compared with obese individuals who are metabolically healthy. **BMJ Open Diabetes Research and Care**, v. 5, n. 1, p. e000379, 2017.

RIFAS-SHIMAN, Sheryl L. et al. Dietary quality during pregnancy varies by maternal characteristics in Project Viva: a US cohort. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 109, n. 6, p. 1004-1011, 2009.

ROBERTS, Christian K.; SINDHU, Kunal K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life sciences**, v. 84, n. 21, p. 705-712, 2009.

ROBERTS, James M. et al. Summary of the NHLBI working group on research on hypertension during pregnancy. **Hypertension in Pregnancy**, v. 22, n. 2, p. 109-127, 2003.

ROBKER, Rebecca L. et al. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1533-1540, 2009.

SEBIRE, N. Jolly et al. Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. **International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 25, n. 8, p. 1175-1182, 2001.

SHARKEY, Don et al. Maternal nutrient restriction during pregnancy differentially alters the unfolded protein response in adipose and renal tissue of obese juvenile offspring. **The FASEB Journal**, v. 23, n. 5, p. 1314-1324, 2009.

SIEGA-RIZ, Anna Maria; ADAIR, Linda S.; HOBEL, Calvin J. Maternal underweight status and inadequate rate of weight gain during the third trimester of pregnancy increases the risk of preterm delivery. **Journal of Nutrition**, v. 126, n. 1, p. 146-153, 1996.

SIMMONS, Rebecca A. Developmental origins of diabetes: the role of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 917-922, 2006.

a- SOHAL, Rajindar S. et al. Oxidative damage, mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in response to food restriction in the mouse. **Mechanisms of ageing and development**, v. 74, n. 1, p. 121-133, 1994.

b- SOHAL, R. S. et al. Effect of age and caloric restriction on DNA oxidative damage in different tissues of C57BL/6 mice. **Mechanisms of ageing and development**, v. 76, n. 2, p. 215-224, 1994.

SOHAL, Rajindar S.; WEINDRUCH, Richard. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science (New York, NY)**, v. 273, n. 5271, p. 59, 1996.

SOLINAS, Giovanni; KARIN, Michael. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 8, p. 2596-2611, 2010.

STRASSER, Barbara. Immune-mediated inflammation as a driver of obesity and comorbid conditions. **Obesity**, v. 25, n. 6, p. 987-988, 2017.

SYMONDS, Michael E.; SEBERT, Sylvain P.; BUDGE, Helen. The impact of diet during early life and its contribution to later disease: critical checkpoints in development and their long-term consequences for metabolic health. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 04, p. 416-421, 2009.

THADHANI, Ravi et al. High body mass index and hypercholesterolemia: risk of hypertensive disorders of pregnancy. **Obstetrics & Gynecology**, v. 94, n. 4, p. 543-550, 1999.

THOMAS, Tom R. et al. Exercise training does not reduce hyperlipidemia in pigs fed a high-fat diet. **Metabolism**, v. 51, n. 12, p. 1587-1595, 2002.

THORBURN, Alison N. et al. Evidence that asthma is a developmental origin disease influenced by maternal diet and bacterial metabolites. **Nature communications**, v. 6, p. 7320, 2015.

TORNATORE, Laura et al. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. **Trends in cell biology**, v. 22, n. 11, p. 557-566, 2012.

VAHRATIAN, Anjel et al. Maternal pre-pregnancy overweight and obesity and the risk of cesarean delivery in nulliparous women. **Annals of epidemiology**, v. 15, n. 7, p. 467-474, 2005.

VAN DEN BERG, Susan M. et al. Diet-induced obesity in mice diminishes hematopoietic stem and progenitor cells in the bone marrow. **The FASEB Journal**, v. 30, p.1-10, 2016.

VIEAU, Didier et al. HPA axis programming by maternal undernutrition in the male rat offspring. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. S16-S20, 2007.

WALSH, Scott W. Maternal-placental interactions of oxidative stress and antioxidants in preeclampsia. In: **Seminars in reproductive endocrinology**. 1997. p. 93-104.

WALSH, Michael E.; SHI, Yun; VAN REMMEN, Holly. The effects of dietary restriction on oxidative stress in rodents. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 88-99, 2014.

WANG, Zhihui et al. Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2845-2853, 2007.

WATSON, Estelle D. et al. The effect of lifestyle interventions on maternal body composition during pregnancy in developing countries: a systematic review. **Cardiovascular journal of Africa**, v. 2, 2017.

WEINDRUCH, Richard et al. The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake. **J Nutr**, v. 116, n. 4, p. 641-54, 1986.

WEINDRUCH, Richard; WALFORD, Roy L. Retardation of aging and disease by dietary restriction. CC Thomas, 1988.

WEINDRUCH, Richard; SOHAL, Rajindar S. Caloric intake and aging. **New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 14, p. 986-994, 1997.

WELLEN, Kathryn E.; HOTAMISLIGIL, Gökhan S. Inflammation, stress, and diabetes. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 5, p. 1111, 2005.

WERLER, Martha M. et al. Prepregnant weight in relation to risk of neural tube defects. **Jama**, v. 275, n. 14, p. 1089-1092, 1996.

WILLCOX, Bradley J.; WILLCOX, Donald Craig. Caloric Restriction, CR Mimetics, and Healthy Aging in Okinawa: Controversies and Clinical Implications. **Current opinion in clinical nutrition and metabolic care**, v. 17, n. 1, p. 51, 2014.

WHO. **Obesity and overweight-2016**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>>. Acesso em: 01 Out. 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Obesity: preventing and managing the global epidemic**. World Health Organization, 2000.

YAKTINE, Ann L. et al. (Ed.). **Weight Gain During Pregnancy:: Reexamining the Guidelines**. National Academies Press, 2009.

YAMADA-OBARA, Nana et al. Maternal exposure to high-fat and high-fructose diet evokes hypoadiponectinemia and kidney injury in rat offspring. **Clinical and experimental nephrology**, v. 20, n. 6, p. 853-861, 2016.

YE, Jianping; KELLER, Jeffrey N. Regulation of energy metabolism by inflammation: a feedback response in obesity and calorie restriction. **Aging (Albany NY)**, v. 2, n. 6, p. 361, 2010.

ZHENG, Huaqing; CHEN, Changhong. Body mass index and risk of knee osteoarthritis: systematic review and meta-analysis of prospective studies. **BMJ open**, v. 5, n. 12, p. e007568, 2015.

ZIELIŃSKA, Monika A. et al. Health Effects of Carotenoids during Pregnancy and Lactation. **Nutrients**, v. 9, n. 8, p. 838, 2017.

ANEXO A - Aprovação do Estudo na Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Ufcsa.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

1) PROTOCOLO Nº: 171/15

2) DATA DO PARECER: 09/03/2016

Parecer 388/15

3) TÍTULO DO PROJETO:

Análise comportamental, bioquímica e epigenética do efeito da nutrição materna em modelo animal.

4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Márcia Giovenardi

5) RESUMO DO PROJETO:

O projeto visa analisar parâmetros comportamentais, bioquímicos e epigenéticos dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico em camundongos expostos a diferentes dietas (restrição calórica-DR, normal-DC e hipercalórica-DHC). Protocolo 1: camundongas serão acasaladas na proporção de 3:1 e iniciarão a dieta quando confirmada a prenhez (esfregaço vaginal), sendo avaliadas no 1º e 10º dia pós-natal, quanto a massa corporal e no 7º dia pós-natal quanto ao comportamento maternal, 8º dia – ansiedade (labirinto em cruz) e 9º dia, quanto a locomoção (campo aberto). Estas serão avaliadas também, quanto a massa corporal nos dias 3, 9, 15 e 21 pós-natal e eutanasiadas por decaptação no 22º dia, para coleta de sangue troncular para avaliação bioquímica (glicemia, colesterol total, triglicerídeos, HDL, LDL e colesterol) e regiões cerebrais para análise da expressão de genes envolvidos nos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico. Protocolo 2: as ninhadas serão padronizadas ao nascimento, em oito filhotes cada e, 3 machos e 3 fêmeas de cada ninhada serão submetidos as respectivas dietas (independentemente da dieta materna). Será verificado na prole: massa corporal nos dias 3, 9, 15 e 21 pós-natal, 55º dia - ansiedade (labirinto em cruz) e 60º dia - locomoção (campo aberto), sendo as fêmeas acompanhadas quanto ao ciclo estral (3 ciclos regulares) e testadas em diestro. A eutanásia será realizada em torno de 65 dias pós-natal, da mesma forma e com avaliação das mesmas variáveis descritas para as mães.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Geral: Analisar parâmetros comportamentais, bioquímicos e epigenéticos dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico em camundongos expostos a diferentes dietas (restrição calórica-DR, normal-DC e hipercalórica-DHC).

Específicos:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

<p>- analisar o efeito das diferentes dietas nos comportamentos maternal, de ansiedade e de locomoção das genitoras;</p> <p>- analisar o efeito das diferentes dietas na expressão de genes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico das genitoras;</p> <p>- analisar o efeito das diferentes dietas nos comportamentos de ansiedade e locomoção da prole;</p>
<p>- analisar o efeito das diferentes dietas na expressão de genes dos sistemas dopaminérgico e serotoninérgico da prole;</p> <p>Identificar padrão de metilação nos genes que possuam modificação da expressão de genes do sistema dopaminérgico da prole;</p> <p>- identificar padrão de metilação nos genes que possuam modificação da expressão de genes do sistema serotoninérgico da prole;</p> <p>- analisar o efeito de diferentes dietas no perfil lipídico da genitora e da prole.</p>

7) FINALIDADE DO PROJETO: Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários

Relevância e Justificativa Adequados Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Detalhar na metodologia:

- o cálculo do tamanho da amostra foi apresentado e referenciado;
- o procedimento de acasalamento e adequado a espécie em consonância com os objetivos da pesquisa.
- a justificativa para a decaptação foi apresentada e referenciada.

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE: Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Grau de dor/estresse: B C D E

Justifique:

Espécie: **Número Amostral:**

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Local de Realização (Biotério/Labotatório): Biotério da UFCSPA, Laboratório de Fisiologia comportamental e metabólica e o Laboratório de Biologia Molecular.

Outra instituição. Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
Não referida	Camundongos	Macho	15
Não referida	Camundongas	Fêmeas	45



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

12) RECOMENDAÇÃO:

- Aprovado
 Com Pendência
 Não aprovado

Data de início 10/03/2016 Data de Término 30/12/2019

Comentários gerais sobre o projeto:

O tema é relevante, o uso dos animais é justificado por necessitar avaliação genética, metabólica e comportamental *in vivo*. O projeto está adequado para ser desenvolvido na forma apresentada.

ANEXO B- Currículo Lattes

05/10/2017

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Andressa Alves de Andrade)

Andressa Alves de Andrade

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2648562848565687>

Última atualização do currículo em 05/10/2017


Possui graduação em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário Metodista (2009). Durante a graduação participou do programa de estágios do Centro Estadual de Vigilância em Saúde-CEVS. Especialista em Análises Clínicas. Membro efetivo do corpo docente do estado do Rio Grande do Sul, atualmente como vice-diretora e supervisora pedagógica. Com experiência também na área técnica tendo atuado como supervisora técnica - bióloga e no setor de hematologia - Laboratório de Análises Clínicas Iberleo LTDA. Tem experiência na área de Saúde Coletiva, com ênfase em Saúde Coletiva. Mestranda em biociências pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Andressa Alves de Andrade 
Nome em citações bibliográficas ANDRADE, A. A.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2015 Mestrado em andamento em BIOCIÊNCIAS (Conceito CAPES 4).
 Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
 Orientador:  Marcia Giovenardi.
 Coorientador: Silvana Almeida.

2011 - 2012 Especialização em Análises Clínicas Laboratoriais. (Carga Horária: 420h).
 Universidade Luterana do Brasil, ULBRA, Brasil.
 Título: Incidência de Comportamento de Risco Para DST-AIDS Entre Estudantes do Ensino Médio de Uma Escola Estadual, no Interior do Rio Grande do Sul.
 Orientador: Luciene Cardodo Sherer.

2007 - 2009 Graduação em Ciências Biológicas.
 Centro Universitário Metodista, IPA-RS, Brasil.
 Título: PLANTAS MEDICINAIS E A COMUNIDADE ESCOLAR: CONHECIMENTO POPULAR x CONHECIMENTO CIENTÍFICO.
 Orientador: MSc. Camila Dellanese Inácio.

2003 - 2005 Bolsista do(a): PROUNI, BR, Brasil.
 Curso técnico/profissionalizante em Ensino Médio e Curso Normal.
 Instituto de Educação Cenequista Marques de Herval, CENEC, Brasil.
 Bolsista do(a): Campanha Nacional de Escolas da Comunidade (CNEC), CNE, Brasil.

Atuação Profissional

Laboratório de Análises Clínicas Iberleo LTDA, RS, Brasil.

Vínculo institucional

2013 - 2015

Outras informações

Vínculo: , Enquadramento Funcional: Bióloga
 Supervisora técnica e analista clínica

Escola Estadual de Ensino Médio Albano Alves Pereira, RS, Brasil.

Vínculo institucional

2011 - Atual

Outras informações

Vínculo: Servidor Público, Enquadramento Funcional: Professora, Carga horária: 20
 Ministrando aulas para o Ensino Médio regular e EJA

05/10/2017

Currículo do Sistema de Currículos Lattes (Andressa Alves de Andrade)

Centro Estadual de Vigilância em Saúde, CEVS, Brasil.**Vínculo institucional****2009 - 2009****Outras informações**Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 35
A conclusão da faculdade levou ao término do contrato de estágio.**Escola Municipal De Ensino Fundamental Bento Gonçalves, EMEF, Brasil.****Vínculo institucional****2011 - 2011****Outras informações**Vínculo: , Enquadramento Funcional: Professor de Ciências, Carga horária: 20
Contrato.**Áreas de atuação**

-
1. Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva.

Idiomas**Espanhol**

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Pouco.

Inglês

Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Produções**Produção bibliográfica****Eventos****Participação em eventos, congressos, exposições e feiras**

1. "World Congress on Brain, Behavior and Emotions 2017". 2017. (Congresso).
2. 37ª Semana Científica do HCPA. Avaliação de comportamento de ansiedade, atividade locomotora e memória de camundongos lactantes submetidas a dietas hipercalórica e de restrição. 2017. (Outra).
3. WORLD CONGRESS OF PHYSIOLOGY IUPS-2017. MOTOR ACTIVITY, ANXIETY-LIKE AND MEMORY BEHAVIORS EVALUATION OF LACTATING SUBMITTED TO HYPERCALORIC AND RESTRICTION DIETS. 2017. (Congresso).
4. I Encontro do Programa de Pós Graduação em Biociências. EFEITO DA NUTRIÇÃO MATERNA EM MODELO ANIMAL: ANÁLISE DO METABOLISMO LIPÍDICO E GLICÍDICO E MARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIV. 2016. (Encontro).
5. I Curso de Toxicidade Genética: Causas, Consequências e Ensaios Pré-clínicos, módulos teórico-práticos, na cidade de Porto Alegre. 2015. (Outra).
6. Evento Comemorativo dos 60 anos do Instituto de Fisiologia Experimental da UFRGS, IV Simpósio de Atualização em Fisiologia do Sistema Nervoso e IV Mostra de Projetos em Fisiologia. 2014. (Simpósio).
7. XVIII Fórum Internacional de Educação. 2014. (Outra).
8. III Fórum Estadual Integrando meio ambiente à vida. 2009. (Outra).
9. Formação continuada do programa Formar em Rede com a temática sob: Incentivo a Leitura. 2008. (Encontro).
10. Seminário de Formação continuada dos Professores. 2008. (Seminário).
11. Seminário de Gestão Sustentável nos Municípios. 2008. (Seminário).
12. V Semana Nacional e Municipal de Ciência e Tecnologia. 2008. (Encontro).
13. Formação continuada do programa Formar em Rede com a temática sobre o BRINCAR. 2007. (Encontro).
14. II Seminário Municipal dos Direitos da Criança e do Adolescente.. 2007. (Seminário).
15. Seminário de Formação Continuada de Professores. 2007. (Seminário).
16. IX Fórum Internacional de Educação "Escola e Processos de Inclusão". 2005. (Outra).
17. Seminário de Formação Continuada de Professores. 2005. (Seminário).

Página gerada pelo Sistema Currículo Lattes em 05/10/2017 às 11:06:05

Imprimir currículo