

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**AMANDA BRONDANI MUCELLINI**

**OBESIDADE MATERNA INDUZIDA PELA DIETA DE CAFETERIA EM RATAS**  
**WISTAR: PARÂMETROS METABÓLICOS E COMPORTAMENTAIS RELACIONADOS**  
**À MEMÓRIA DE LONGO-PRAZONOS FILHOTES MACHOS**

**Porto Alegre**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: FISILOGIA**

**AMANDA BRONDANI MUCELLINI**

**OBESIDADE MATERNA INDUZIDA PELA DIETA DE CAFETERIA EM RATAS**  
**WISTAR: PARÂMETROS METABÓLICOS E COMPORTAMENTAIS RELACIONADOS**  
**À MEMÓRIA DE LONGO-PRAZO NOS FILHOTES MACHOS**

**Dissertação apresentada à Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Fisiologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto**

**Co-orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Pelufo Silveira**

**Porto Alegre**

**2013**

A quem mais amo:  
Pater, Mater, meu príncipe e meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus Pai, por ter me guiado em todos os momentos e me conduzido até o final desta conquista. Este trabalho é para Ti e espero que seja o primeiro de muitos! À Mãe também, pois soube me acolher quando foi necessário e se mostrou Vitoriosa no final de tudo. MPHCH!

A meu querido Giovanni: por todo amor, tempo e paciência dispensados. Obrigada por acreditar em mim e lutar comigo até o fim!

A meus pais, Anete e Odemar, que, mesmo não entendendo a ausência e os sacrifícios meus, se desdobram para me ver feliz. Obrigada, Paula, por tentar me entender cada vez mais!

Aos meus queridos amigos que acreditaram em mim.

Aos meus colegas de laboratório que me ajudaram a realizar este trabalho.

Aos meus orientadores, Gilberto e Patrícia: obrigada pelos imensos ensinamentos passados a mim!

Ao CNPq, a UFRGS e, principalmente, à sociedade Brasileira, que possibilitaram a realização e conclusão deste trabalho.



## RESUMO

Existem evidências de que dietas compostas por níveis elevados de lipídeos e/ou carboidratos contribuem para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas e de déficit cognitivo. Entretanto, os mecanismos pelos quais a obesidade materna interfere na saúde da prole, especificamente no metabolismo e na memória de longo-prazo, ainda são pouco claros. O objetivo deste trabalho foi investigar se a obesidade materna interfere no metabolismo e nos comportamentos relacionados à memória de longo-prazo de seus filhotes, e se há um efeito somatório com a exposição à dieta de cafeteria no decorrer da vida da prole. Ratas foram alimentadas com dieta controle (CON) ou de cafeteria (CAF) desde o desmame até os 210 dias de vida, no desmame de sua prole. A partir do desmame, seus filhotes machos foram divididos em 4 grupos (CON-CON, CON-CAF, CAF-CON e CAF-CAF) para que todas as ninhadas ingerissem CON ou CAF, independentemente da dieta materna. As mães foram decapitadas no dia seguinte ao desmame dos filhotes. Foi decapitada e analisada em tarefas comportamentais metade dos filhotes aos 30 dias de idade e, a outra metade, aos 120 dias. As mães CAF apresentaram maior peso corporal total e de tecido adiposo e maiores concentrações circulantes de colesterol total, insulina e leptina do que as mães CON. A ingestão calórica semanal dos filhotes que ingeriram CAF mostrou-se maior do que os que ingeriram CON, independentemente da dieta materna. As ninhadas apresentaram peso corporal igual no desmame e aos 30 dias, porém aos 120 dias, os filhotes que ingeriram CON-CAF tiveram aumento de peso em relação aos filhotes CON, independentemente da dieta materna destes. Porém, os filhotes CAF-CAF tiveram redução do peso corporal em relação aos CON-CAF na idade adulta. Aos 30 e 120 dias, os filhotes que ingeriram CAF apresentaram peso de tecido adiposo maior do que os que ingeriram CON, independentemente da dieta materna. Aos 30 e 120 dias, a trigliceridemia e a colesterolemia estavam iguais entre os grupos, assim como a glicemia aos 30 dias. Porém, aos 120 dias, os filhotes que ingeriram CAF apresentaram hiperglicemia, assim como hiperleptinemia e hiperinsulinemia, independentemente da dieta materna. Aos 30 dias, todos os grupos que foram expostos à dieta de cafeteria em alguma etapa da vida apresentaram declínio no desempenho em uma ou nas duas tarefas relacionadas à memória de longo-prazo (Reconhecimento de objetos e Esquiva Inibitória *step-down*). Já aos 120 dias, o grupo CAF-CAF foi o único que mostrou piora no desempenho na tarefa de Reconhecimento de Objetos, e todos os grupos mostraram capacidade de aprendizado e memória na tarefa de Esquiva Inibitória *step-down*. Esses dados sugerem que a dieta materna modula o peso corporal e comportamentos relacionados à memória de longo-prazo dos filhotes e que seus efeitos sofrem influência da dieta pós-natal da prole. Porém, novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessas alterações.

**Palavras-chave:** Obesidade materna; Programação metabólica; Aprendizado e memória; Comportamento; *Junk food*

## ABSTRACT

There is evidence that diets containing high levels of lipids and / or carbohydrates contribute to the development of chronic degenerative diseases and cognitive impairment. However, the mechanisms by which maternal obesity affects health of offspring, specifically in metabolism and long-term memory, are still unclear. The aim of this study was to investigate whether maternal obesity interferes with the metabolism and behavior related to long-term memory of their offspring, and if there is a summation effect with exposure to the cafeteria diet during the life of the offspring. Rats were fed a control diet (CON) or cafeteria (CAF) from weaning to 210 days old at weaning of their offspring. After weaning, their male offspring were divided into 4 groups (CON-CON, CON-CAF, CAF and CAF-CON-CAF) for all litters ingest CON or CAF, irrespective of maternal diet. Mothers were decapitated on the day following weaning of pups. Was decapitated and analyzed in behavioral tasks half the pups at 30 days of age and the other half at 120 days. CAF mothers had higher total body weight and adipose tissue and increased circulating concentrations of total cholesterol, insulin and leptin than mothers CON. The weekly caloric intake of pups that ingested CAF was higher than those who ate CON, regardless of maternal diet. Litters showed body weight equal to weaning and 30days, but the 120dias, puppies who ate CON-CAF had weight gain compared to CON offspring, regardless of maternal diet these. However, the pups CAF-CAF had reduced body weight compared to CON-CAF adulthood. At 30 and 120 days, the puppies that ingested CAF showed greater weight of adipose tissue than those who ate CON, irrespective of maternal diet. At 30 and 120dias, blood triglyceride and cholesterol were similar between groups, as well as blood glucose levels at 30 days. However, at 120 days, the puppies that ingested CAF showed hyperglycemia, as hiperleptinemia and hyperinsulinemia, irrespective of maternal diet. At 30 days, all groups were exposed to the cafeteria diet at some stage of life show a decline in performance in one or both tasks related to long-term memory (Recognition of objects and Dodge inhibitory step-down). Already at 120 days, the group CAF-CAF was the one who showed deterioration in performance in the task of Object Recognition, and all groups showed learning ability and memory in the inhibitory avoidance task step down. These data suggest that maternal diet modulates body weight and behaviors related to long-term memory of the puppies and their effects are influenced by postnatal diet offspring. However, further studies are needed to elucidate the mechanisms involved in the development of these changes.

**Key-words:** Maternal obesity; Metabolic programming; Learning and memory; Behavior; Junk food.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Composição nutricional dos alimentos oferecidos na dieta de cafeteria **31**

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Desenho experimental **35**

**Figura 2:** Sequência de tarefas comportamentais **39**

**Figura 3:** Peso corporal das mães no primeiro e no último dia do tratamento **49**

**Figura 4:** Evolução do peso corporal das mães durante o tratamento **50**

**Figura 5:** Peso do tecido adiposo das mães ao final do tratamento **51**

**Figura 6:** Concentração de lipídeos e glicose no soro das mães ao final do tratamento **51**

**Figura 7:** Concentração circulante de insulina e leptina das mães ao final do tratamento **52**

**Figura 8:** Evolução da ingestão energética por animal/dia ao longo de 14 semanas de experimento **54**

**Figura 9:** Peso corporal dos filhotes machos no primeiro dia de tratamento **55**

**Figura 10:** Peso corporal dos filhotes machos na puberdade e na idade adulta **56**

**Figura 11:** Evolução do peso corporal dos filhotes ao longo das 14 semanas de tratamento **57**

**Figura 12:** Peso do tecido adiposo visceral e retroperitoneal dos filhotes machos na puberdade e na idade adulta **59**

**Figura 13:** Concentração sérica de lipídeos e glicemia dos filhotes machos na puberdade **60**

**Figura 14:** Concentração sérica de lipídeos e glicemia dos filhotes machos na idade adulta **61**

**Figura 15:** Concentração sérica de insulina e plasmático de leptina dos filhotes machos na idade adulta **62**

**Figura 16:** Tempo e frequência de comportamentos no Campo Aberto na puberdade **64**

**Figura 17:** Tempo e frequência de comportamentos no Campo Aberto na idade adulta **65**

**Figura 18:** Tempo e frequência de comportamentos no Labirinto em Cruz Elevado na puberdade **67**

**Figura 19:** Tempo e frequência de comportamentos no Labirinto em Cruz Elevado na idade adulta **69**

**Figura 20:** Memória de reconhecimento dos filhotes machos na puberdade e na idade adulta **71**

**Figura 21:** Memória de esquiva inibitória *Step-Down* dos filhotes machos na puberdade e na idade adulta **72**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL: Ácidos graxos livres

ANOVA: Teste de análise de variância

CAF: Grupo de dieta cafeteria

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CGTRQ: Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos

cm: Centímetros

CON: Grupo de dieta controle

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CREAL: Biotério Central do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

ELISA: Ensaio Imunoabsorbante por Enzima Ligada

ICBS: Instituto de Ciências Básicas da Saúde

IMC: Índice de Massa Corporal

kcal: Quilocaloria

mA: Miliampère

MSG: Monoglutamato de sódio

NIH: *National Institutes of Health*

RCF: Força Centrífuga Relativa

SNC: Sistema Nervoso Central

UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

VIGITEL: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico

# SUMÁRIO

## 1. INTRODUÇÃO 14

- 1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE 14
- 1.2. OBESIDADE E RESPOSTAS METABÓLICAS 17
- 1.3. OBESIDADE E MEMÓRIA 19
- 1.4. OBESIDADE MATERNA E SAÚDE DA PROLE 22
- 1.5. INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE EM ANIMAIS 24

## 2. JUSTIFICATIVA 27

## 3. HIPÓTESE 28

## 4. OBJETIVOS 29

- 4.1. OBJETIVO GERAL 29
- 4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 29

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS 30

- 5.1. DELINEAMENTO 30
- 5.2. ANIMAIS 30
- 5.3. CONDIÇÕES AMBIENTAIS 30
- 5.4. TRATAMENTOS 30
  - 5.4.1. *Dieta padrão* 30
  - 5.4.2. *Dieta de cafeteria* 30
- 5.5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 32
- 5.6. INGESTÃO ALIMENTAR 35
- 5.7. PESO CORPORAL 36
- 5.8. DECAPITAÇÃO, COLETA DE AMOSTRAS E PESAGEM DE TECIDOS 36
- 5.9. ANÁLISES BIOQUÍMICAS 37
- 5.10. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS 38
  - 5.10.1. *Comportamentos relacionados à Exploração e à Ansiedade* 39
    - 5.10.1.1. *Tarefa de Campo Aberto* 39
    - 5.10.1.2. *Tarefa de Labirinto em Cruz Elevado* 40
  - 5.10.2. *Comportamentos relacionados à Memória de Longo-Prazo* 41
    - 5.10.2.1. *Tarefa de Reconhecimento de Objetos* 42
    - 5.10.2.2. *Tarefa de Esquiva Inibitória Step-Down* 43
- 5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA 44
- 5.12. DESCARTE DOS RESÍDUOS 46
- 5.13. ÉTICA 46
- 5.14. APOIO FINANCEIRO 46
- 5.15. LOCAL E INSTALAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA 47

## **6. RESULTADOS 48**

### **6.1. EFEITOS DA DIETA DE CAFETERIA NO METABOLISMO DAS MÃES 48**

*6.1.1. Peso Corporal 48*

*6.1.2. Peso do tecido adiposo 50*

*6.1.3. Análises bioquímicas 51*

### **6.2. EFEITOS DA DIETA DE CAFETERIA NO METABOLISMO DOS FILHOTES MACHOS 52**

*6.2.1. Ingestão energética 53*

*6.2.2. Peso corporal 55*

*6.2.3. Peso do tecido adiposo 58*

*6.2.4. Análises bioquímicas 60*

### **6.3. EFEITOS DA DIETA DE CAFETERIA NO COMPORTAMENTO DOS FILHOTES MACHOS 63**

*6.3.1. Comportamentos relacionados à Exploração e à Ansiedade 63*

*6.3.1.1. Tarefa de Campo Aberto 63*

*6.3.1.2. Tarefa de Labirinto em Cruz Elevado 66*

*6.3.2. Comportamentos relacionados à Memória de Longo-Prazo 70*

*6.3.2.1. Tarefa de Reconhecimento de Objetos 70*

*6.3.2.2. Tarefa de Esquiva Inibitória Step-Down 71*

## **7. DISCUSSÃO 73**

**7.1. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À DIETA DE CAFETERIA NAS MÃES 73**

**7.2. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À CAFETERIA NOS FILHOTES MACHOS 77**

## **8. CONCLUSÕES 91**

## **9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO 93**

## **10. PERSPECTIVAS 94**

## **11. REFERÊNCIAS 95**

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA OBESIDADE

A obesidade é definida como o estado em que o excesso de gordura corporal alcançou uma dimensão que pode afetar negativamente a saúde e diminuir a longevidade (Flegal *et al*, 2013; Haslam *et al*, 2005; Lancet, 2006; Mitchell *et al*, 2011; Peeters *et al*, 2003; Stevens *et al*, 1998). Para ser classificada como obesa, uma pessoa necessita apresentar o Índice de Massa Corporal (IMC, peso corporal em quilogramas dividido pela altura ao quadrado em metros) igual ou acima de 30. Entretanto, se um indivíduo possui o IMC entre 25 e 29,9, ele já é classificado com o sobrepeso (Organization, 2013; Pi-Sunyer, 2000).

O peso corporal de indivíduos obesos está acima do aceitável devido ao acúmulo de tecido adiposo no organismo, devido a um desequilíbrio entre a ingestão e o gasto energético. Entretanto, não é importante apenas a quantidade total de gordura, mas também a qualidade do tecido e onde ela se encontra em excesso no corpo. Muitos estudos apontam que a gordura localizada superior e centralmente no corpo é mais comprometidora para a saúde, pois ela é fator de risco para doenças crônicas não-transmissíveis prevalentes na população mundial (Despres *et al*, 2006; Haslam *et al*, 2005; Pi-Sunyer, 2000). A distribuição de gordura é tão importante que, junto com o cálculo do IMC, normalmente é feita a medida da circunferência abdominal dos sujeitos investigados. Valores maiores que 102 cm para homens, ou 88 cm para mulheres, são considerados anormalmente altos e complementam os dados sobre o risco de saúde dos indivíduos (Haslam *et al*, 2005; Janssen *et al*, 2004).

Considerada uma pandemia, pois já ocorre em uma ampla área geográfica afetando uma proporção excepcionalmente elevada da população (Wylie-Rosett, 2004), a expansão da obesidade foi observada pela primeira vez nos Estados Unidos, mas se espalhou por outros países industrializados e também em países em desenvolvimento, como o Brasil (B. Caballero, 2007). Atualmente, 65% da população mundial que habita a área urbana estão com sobrepeso ou obesidade, devido, em grande parte, à adoção de um estilo de vida com ingestão calórica aumentada e redução da prática de atividades físicas (Block *et al*, 1988; Haidar *et al*, 2011; WHO, 2002). Segundo a Organização Mundial da Saúde (Low *et al*, 2009; Organization, 2013), a obesidade mais que duplicou no mundo inteiro desde 1980 e, em 2008, mais de 1,4 bilhões de adultos acima de 20 anos estavam com sobrepeso, sendo que dentre esses, mais de 200 milhões de homens e quase 300 milhões de mulheres apresentavam obesidade.

Dados do Ministério da Saúde do Brasil informam que quase metade da população brasileira está com excesso de peso. De acordo com os dados do último levantamento realizado no Brasil (Brasil, 2012), a proporção de pessoas acima do peso no país avançou de 42,7% (47,2% dos homens e 38,5% das mulheres), em 2006, para 48,5% (52,6% dos homens e 44,7% das mulheres), em 2011. No mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11,4% para 15,8%.

Entretanto, o aumento da obesidade não está limitado aos adultos. Em 1980, somente 5% das crianças e dos adolescentes nos Estados Unidos eram classificados como obesos (Ogden *et al*, 2007; Strauss *et al*, 2001). Atualmente, aproximadamente 15% das pessoas menores de 18 anos de idade podem ser classificadas como obesas, com o adicional de que 30% dos indivíduos nessa idade são considerados como tendo so-

brepeso (Ogden *et al*, 2007; Strauss *et al*, 2001). Em 2010, mais de 40 milhões de crianças menores de cinco anos encontravam-se com sobrepeso (Organization, 2013). Através de uma pesquisa realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística entre 2008 e 2009 no Brasil (Brasil, 2010), o excesso de peso foi observado em 33,5% das crianças de cinco a nove anos, sendo que 16,6% dos meninos também eram obesos; entre as meninas, a obesidade apareceu em 11,8%.

A preocupação com a desenfreada expansão da obesidade ocorre porque, ultimamente, esse estado corporal é considerado o quinto maior fator de risco para doenças em todo o mundo (Dulloo *et al*, 2010; Keller *et al*, 2003; Organization, 2013). O excesso de gordura, principalmente na região central do corpo, está reconhecidamente relacionado aos mais prevalentes e onerosos problemas médicos atuais, como diabetes tipo 2, doença coronária arterial, problemas gastrointestinais, complicações respiratórias, osteoartrite, vários tipos de câncer e doenças psiquiátricas e neurodegenerativas (Haslam *et al*, 2005; Organization, 2003). Além disso, a obesidade está intimamente associada à síndrome metabólica, que é caracterizada por um grupo de distúrbios, como hiperinsulinemia, resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia aterogênica, hipertensão arterial e aumento da expressão de marcadores pró-trombóticos e pró-inflamatórios (Olufadi *et al*, 2008; Organization, 2013). Ademais, a obesidade infantil está associada a um maior risco de obesidade na idade adulta, dificuldades de respiração, aumento do risco de fraturas, hipertensão, marcadores precoces de doenças cardiovasculares, resistência à insulina e distúrbios psicológicos (Organization, 2013).

## 1.2. OBESIDADE E RESPOSTAS METABÓLICAS

Logo após a ingestão alimentar, observa-se aumento da captação dos nutrientes da circulação para os tecidos, particularmente para os tecidos sensíveis à insulina. Nos períodos de jejum, o movimento das moléculas faz-se no sentido oposto. Na obesidade, entretanto, esse fluxo energético bidirecional encontra-se alterado, devido à disfunção endócrina do tecido adiposo e à diminuição da eficácia dos mecanismos endócrinos no tecido adiposo, no fígado e no músculo (Caimari *et al*, 2010; Costa *et al*, 2006; S. E. Kahn *et al*, 2006; López *et al*, 2003).

O tecido adiposo é um órgão multicelular, com regulação humoral e hormonal e com inúmeras funções, por exemplo, isolamento térmico, barreira física ao trauma, estoque energético e secreção protéica com ação autócrina, parácrina e endócrina. As proteínas secretadas, também chamadas de adipocinas, podem ter impacto sobre vários aspectos biológicos, incluindo homeostasia energética, função imunológica, cardiovascular, neurológica e reprodutora (Bruce-Keller *et al*, 2009; Costa *et al*, 2006; Sethi *et al*, 2007).

O aumento dos ácidos graxos livres pela crescente ingestão alimentar e dos produtos secretados pelo tecido adiposo em expansão, incluindo hormônios, como a leptina, e citocinas, contribui para o aparecimento da resistência à insulina. Essa condição caracteriza-se pela redução da ação biológica da insulina nas células-alvo. Assim, há uma disfunção na captação, no metabolismo e no estoque de glicose em concentrações fisiológicas de insulina, especialmente nos tecidos adiposo branco e muscular (Cesaretti *et al*, 2006; B. B. Kahn *et al*, 2000). Essa disfunção pode ser resultado de uma altera-

ção na sinalização de insulina nos tecidos-alvo e, nos adipócitos, também ocorre uma regulação para baixo do GLUT4 (Transportador de glicose tipo 4), o principal transportador de glicose dependente de insulina. Em consequência da menor captação de glicose, torna-se necessária uma maior produção de insulina pelo pâncreas para a manutenção dos níveis glicêmicos normais, aumentando desta forma os níveis circulantes de insulina. Portanto, a situação de resistência à insulina se acompanha de hiperinsulinemia (Cesaretti *et al*, 2006). Em muitos casos, a entrada de lipídeos nas células das ilhotas pancreáticas prejudica a capacidade das células beta de manter a secreção de insulina demandada pela resistência à insulina. Neste caso, podem se desenvolver a intolerância à glicose e a diabetes tipo 2 (Haslam *et al*, 2005).

Como citado anteriormente, a leptina é um dos peptídeos secretados pelo tecido adiposo. A sua produção é regulada, dentre outras formas, pela ação da insulina no adipócito e os seus níveis circulantes correlacionam-se com a massa de tecido adiposo. Portanto, em indivíduos obesos, seus níveis circulantes encontram-se elevados (Costa *et al*, 2006). Fisiologicamente, a leptina liga-se a receptores hipotalâmicos, e transmite informação relativa à massa de tecido adiposo e ao depósito energético corporal existente, suprimindo a ingestão alimentar, e contribuindo para o aumento do gasto de energia, além de colaborar periféricamente na redução da síntese e secreção de insulina (Jung *et al*, 2013; Ricci *et al*, 2011). Na obesidade, os altos níveis circulantes de leptina não induzem a resposta esperada de diminuição do consumo alimentar e aumento do dispêndio energético, pois seu transporte através da barreira hematoencefálica e sua sinalização nos neurônios responsáveis pelo comportamento alimentar nos núcleos hipotalâmicos do sistema nervoso central (SNC) estão diminuídos, indicando que pesso-

as obesas estão resistentes à ação da leptina (Jéquier, 2002; Jung *et al*, 2013). Além disso, essa resistência à leptina pode facilitar o aparecimento da hiperinsulinemia e da diabetes tipo 2 (Costa *et al*, 2006; Mantzoros, 1999).

### **1.3. OBESIDADE E MEMÓRIA**

A obesidade está fortemente relacionada à vulnerabilidade cerebral e aos distúrbios cognitivos (Berg *et al*, 2009; Bruce-Keller *et al*, 2009; Galioto *et al*, 2013; Greenwood *et al*, 2001; Jj *et al*, 2010; Vangroen, 2010; Whitmer *et al*, 2005; G. Winocur *et al*, 1999; Gordon Winocur *et al*, 2005a; Wolf *et al*, 2007). Como mostram recentes investigações, homens e animais obesos e que consomem dietas hiperlipídicas e hipercalóricas apresentam pior desempenho em testes de aprendizado e memória, em comparação aos com peso adequado e que se alimentam de dietas mais equilibradas (Abildgaard *et al*, 2010; Benito-León *et al*, 2013; Goldbart *et al*, 2006; Greenwood *et al*, 2001; Halyburton *et al*, 2007; Heyne *et al*, 2009; Jurdak *et al*, 2008; Maniam *et al*, 2010a, b; Molteni *et al*, 2002; H. R. Park *et al*, 2010; G. Winocur *et al*, 1999). Além disso, estudos mostram que a gordura abdominal e o IMC elevado estão relacionados com redução de volume encefálico (Debette *et al*, 2010).

Existem muitas hipóteses para explicar a relação da obesidade com o declínio da capacidade de aprendizado e memória. Dentre as que mais impulsionam as investigações atualmente, encontram-se a morte neuronal devido à inflamação sistêmica e central e o prejuízo da comunicação entre os neurônios das regiões relacionadas às funções cognitivas. Acredita-se que esses fenômenos ocorram, principalmente, devido aos

produtos secretados pelo tecido adiposo (insulina e leptina) que, como discutido anteriormente, têm como consequência as resistências à insulina e à leptina.

Por um longo tempo, acreditou-se que o encéfalo não fosse dependente de insulina. Entretanto, foram encontrados insulina e receptores desse hormônio no bulbo olfatório, no hipotálamo e no hipocampo de homens e ratos (Huang *et al*, 2010; Stockhorst *et al*, 2004). Além disso, muitos estudos também revelaram uma relação entre a sinalização do receptor de insulina e a expressão de canais iônicos e receptores nas sinapses de várias regiões do SNC, sugerindo que a insulina pode estar regulando a plasticidade sináptica e as funções cognitivas. Ademais, foram encontradas evidências de que a insulina promove crescimento neuronal no hipocampo e que a destruição de receptores centrais de insulina está associada com déficits de aprendizado e memória (Stockhorst *et al*, 2004).

Contudo, esses benefícios promovidos centralmente pela insulina não são encontrados em situações de resistência a esse hormônio. Nessa condição, o metabolismo da glicose e a sinalização de insulina estão prejudicados em muitas regiões encefálicas (Pearce *et al*, 2012), incluindo as envolvidas no aprendizado e na memória, como o hipocampo e o lobo frontal (Gordon Winocur *et al*, 2005b). Além disso, a obesidade e a doença de Alzheimer, assim como o próprio envelhecimento, compartilham uma característica: há uma mudança na proporção de níveis centrais e periféricos de insulina, sendo que a concentração do hormônio na periferia é maior em comparação à de pessoas saudáveis e mais jovens (Stockhorst *et al*, 2004). Evidências também mostram que há um menor transporte de insulina periférica para o encéfalo nessas condições. Isso é sustentado por estudos que mostram que o consumo de dietas hiperlipídicas re-

duz o transporte de insulina periférica e sua captação para o encéfalo (Kloppenborg *et al*, 2008; Plum *et al*, 2006; Stockhorst *et al*, 2004). Segundo esses estudos, os neurônios tornar-se-iam menos capazes de utilizar a glicose, resultando em interrupções no transporte e na liberação de neurotransmissores. Esse distúrbio celular é considerado um impedimento para a transmissão neural, levando a prejuízos nas estruturas relacionadas ao aprendizado e à memória (Jurdak *et al*, 2008).

Da mesma forma que a insulina, a leptina apresenta funções importantes em regiões encefálicas relacionadas ao aprendizado e à memória (Farr *et al*, 2006; Gisou *et al*, 2009; Marwarha *et al*, 2012), além dos seus conhecidos efeitos metabólicos. São encontrados receptores de leptina no hipocampo em abundância, especialmente no giro denteado (Harvey *et al*, 2006). Estudos recentes mostram ainda que a leptina regula a excitabilidade e o disparo de neurônios do hipocampo, e que melhora o processamento e a retenção da memória quando administrada centralmente em roedores. Além disso, roedores deficientes do receptor de leptina apresentam grandes déficits na aprendizagem espacial e na memória (Farr *et al*, 2006). O prejuízo da memória encontrado em indivíduos obesos poderia ser explicado pela resistência à leptina nesses sujeitos (Farr *et al*, 2006), já que a leptina não seria capaz de facilitar o processamento e a retenção da memória.

Outro efeito da resistência à insulina e à leptina na obesidade, juntamente com as citocinas secretadas em excesso pelo tecido adiposo, é o desencadeamento da resposta inflamatória sistêmica e o crescente estresse oxidativo (E. Caballero, 2003). Juntos, esses fenômenos aumentam a morte neuronal e colaboram para o baixo desempenho cognitivo de indivíduos obesos (Parrott *et al*, 2007).

Além dos prejuízos induzidos por alterações hormonais, dietas hiperlipídicas e hipercalóricas que induzem à obesidade podem alterar o comportamento cognitivo através da diminuição direta da plasticidade neuronal. Em suporte a essa possibilidade, foi encontrado em vários estudos que o consumo prolongado dessas dietas resulta em declínio no aprendizado e na memória espacial e em redução da expressão e sinalização do fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) hipocampal (Davidson *et al*, 2012; Dinel *et al*, 2011; Gray *et al*, 2006; Kanoski *et al*, 2011; Kanoski *et al*, 2010; Molteni *et al*, 2002; Stranahan *et al*, 2008; Gordon Winocur *et al*, 2005a; A. Wu *et al*, 2003). Existem também evidências da relação entre declínio cognitivo, resistência à insulina e à leptina e redução da expressão e da sinalização de BDNF no SNC (Cai *et al*, 2012; Kohjima *et al*, 2010; Stranahan *et al*, 2008).

#### **1.4. OBESIDADE MATERNA E SAÚDE DA PROLE**

Mulheres tendem a ter IMC mais alto do que os homens e isto parece estar relacionado com a maior deposição corporal de tecido adiposo que a de tecido magro metabolicamente ativo (Lee *et al*, 2013; Organization, 2013). Além disso, um estudo mostrou que mais de 50% das mulheres não grávidas em idade fértil (entre 20 e 39 anos de idade) estão com sobrepeso e obesidade e mais de 30% das meninas (entre 12 e 19 anos de idade) têm o risco de já apresentarem sobrepeso e obesidade (Ogden *et al*, 2006). Estes resultados indicam que o número de crianças nascidas de mães obesas tende a aumentar durante os próximos anos.

A obesidade materna tornou-se o distúrbio mais comum na gravidez (Sebire *et al*, 2001). Na última década, a ocorrência de obesidade durante a gestação aumentou de 70 a 100%, repercutindo em quase todas as complicações maternas e fetais (Katarina Melzer *et al*, 2010b; Ogden *et al*, 2006).

Existem estudos que indicam que em mulheres magras, quando grávidas, os ácidos graxos necessários para o crescimento fetal são facilmente armazenados e mobilizados em um depósito de gordura na parte inferior do corpo (Jarvie *et al*, 2010; Jensen, 2008; Snijder *et al*, 2005). Enquanto isso, nas mulheres obesas, já há um excesso de gordura nesta região, e há uma preferência de estocagem desta gordura extra na parte central do corpo. Nesse lugar, os ácidos graxos tornam-se lipotóxicos, provocando a disfunção endotelial materna, a redução na invasão trofoblástica e o prejuízo no metabolismo e na função da placenta (Jarvie *et al*, 2010). Com a obesidade gestacional, também surgem maiores riscos de alterações metabólicas adversas, como diabetes tipo II, além de pré-eclâmpsia e complicações do parto (Guelinckx *et al*, 2008; Huda *et al*, 2010; Khashan *et al*, 2009; King, 2006; K. Melzer *et al*, 2010a; Katarina Melzer *et al*, 2010b; Seabra *et al*, 2011; Sebire *et al*, 2001).

Além das graves complicações na saúde materna ao longo da gestação, a obesidade durante a gravidez também aumenta as chances de distúrbios em curto e longo prazo na saúde fetal, como anormalidades congênitas, alterações no tamanho e no peso corporal, parto prematuro, risco de obesidade e síndrome metabólica (Callaway *et al*, 2006; Chang *et al*, 2008; Crozier *et al*, 2010; Guelinckx *et al*, 2008; Heerwagen *et al*, 2010; Howie *et al*, 2009; Huda *et al*, 2010; Jarvie *et al*, 2010; Khashan *et al*, 2009; McGuire *et al*, 2010; K. Melzer *et al*, 2010a; Katarina Melzer *et al*, 2010b; Mitra *et al*,

2009; Ruager-Martin *et al*, 2010; Siega-Riz *et al*, 2006; Srinivasan *et al*, 2006; Stothard *et al*, 2009; Tozuka *et al*, 2010; Tozuka *et al*, 2009; Vasudevan *et al*, 2011). Essas numerosas evidências propõem a existência de um ciclo de obesidade entre gerações, sugerindo-se que a exposição a um ambiente com excesso de nutrientes durante o período pré-natal programe o desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica na infância e na idade adulta da prole (Barker, 2007; Desai *et al*, 2013; I. Caroline McMillen *et al*, 2009; Symonds *et al*, 2013; Wang, 2013), sendo a insulina e a leptina e suas resistências as principais protagonistas na modulação dessa programação (Ahlsson *et al*, 2012; Catalano, 2010; Catalano *et al*, 2003; I. C. McMillen *et al*, 2004; Tessier *et al*, 2013).

Estudos adicionais em animais indicam que a prole de fêmeas obesas apresenta anormalidades no neurodesenvolvimento (Tozuka *et al*, 2010; Tozuka *et al*, 2009). A obesidade materna pode alterar a sensibilidade do hipotálamo à leptina, e modificar a expressão de peptídeos que atuam na regulação do apetite, induzindo a prole a desenvolver alterações no comportamento alimentar e obesidade (Bentham *et al*, 2010; Chen *et al*, 2008; Crozier *et al*, 2010; Ikenasio-Thorpe *et al*, 2007; Page *et al*, 2009; Rajia *et al*, 2010b; Tamashiro *et al*, 2009; Q. Wu *et al*, 2006). Além disso, a prole de mães obesas ou que ingerem dietas hipercalóricas apresentam alterações na sinalização e na produção de BDNF e na neurogênese hipocampal (Bilbo *et al*, 2010; Niculescu *et al*, 2009; Tozuka *et al*, 2010; Walker *et al*, 2008), redução da capacidade de aprendizado espacial (Tozuka *et al*, 2009; White *et al*, 2010) e aumento na sinalização inflamatória e no estresse oxidativo hipocampal e cortical (Bilbo *et al*, 2010; White *et al*, 2009).

## **1.5. INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE OBESIDADE EM ANIMAIS**

Existe uma rica variedade de modelos que induzem obesidade em animais. Os modelos genéticos de obesidade, como os camundongos *ob/ob*, *db/db* e Agouti amarelo e os ratos *fa/fa* Zucker contribuem para o conhecimento das anormalidades genéticas envolvidas no controle da homeostase energética (Sampey *et al*, 2011). Outras investigações baseiam-se em lesões em regiões específicas do SNC, como no núcleo ventromedial do hipotálamo, induzindo hiperfagia (Peters *et al*, 2007). Entretanto, os modelos que mais se assemelham à principal causa da obesidade humana são os de obesidade exógena, onde é oferecido ao animal um maior aporte calórico, através de dietas com sobrecarga de carboidratos e/ou de gordura, isoladamente ou em associação (Cesaretti *et al*, 2006; Sampey *et al*, 2011).

Estudos que usam a indução de obesidade através da dieta de cafeteria têm sido cada vez mais documentados. Essa dieta reflete a variedade de alimentos palatáveis e hipercalóricos, compostos por níveis expressivos de carboidratos e lipídeos, que são prevalentes atualmente nas sociedades urbanas e que estão associados à pandemia da obesidade (Cesaretti *et al*, 2006; Sampey *et al*, 2011; Sclafani *et al*, 1976). A dieta de cafeteria é uma dieta que faz com que os animais substituam gradativamente a ingestão da dieta padrão, composta de água e ração, por essa dieta, em que à ração padrão são associadas substâncias altamente calóricas, como bacon ou banha, castanhas, leite condensado, refrigerantes, chocolate, amendoim e guloseimas, os quais variam de acordo com os diferentes grupos de pesquisa (De Schepper *et al*, 2000). Essa dieta produz aumento da ingestão calórica, incremento de peso corporal total, aumento significativo na quantidade de gordura visceral, resistência à insulina, hiperleptinemia e alterações no metabolismo da glicose e de lipídeos (Bailey *et al*, 1986; Goularte *et al*,

2012; Prada *et al*, 2005; Prats *et al*, 1989; Rothwell *et al*, 1979; Weisberg *et al*, 2003; Zhou *et al*, 1998). A ingestão da dieta de cafeteria por ratas prenhas produz também um quadro semelhante ao diabetes gestacional (Holemans *et al*, 2004).

## 2. JUSTIFICATIVA

O estilo de vida da população mundial atual, incluindo o das mulheres gestantes, é muito prejudicial à saúde, sendo a ingestão alimentar inadequada um de seus principais causadores. Além disso, existem evidências de que dietas compostas por níveis elevados de lipídeos e/ou carboidratos contribuem para o desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas e de déficit cognitivo. Entretanto, os mecanismos pelos quais a obesidade materna interfere na saúde da prole, especificamente na memória de longo-prazo, ainda são pouco claros.

Este trabalho, além de buscar evidências sobre os malefícios causados pela obesidade materna nos perfis bioquímicos e comportamentais relacionados com o metabolismo e a memória de longo-prazo dos filhotes machos, busca saber se há um efeito somatório da obesidade materna com a obesidade de seus filhotes nesses desfechos.

### **3. HIPÓTESE**

Com base nas evidências, este estudo propõe testar a hipótese de que a obesidade induzida das mães causa efeitos negativos no metabolismo e na memória de longo-prazo da prole, e que os filhotes dessas mães, que também são induzidos à obesidade, têm um maior comprometimento nesses desfechos.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar as implicações da obesidade materna induzida pela dieta de cafeteria sobre o metabolismo e a memória de longo-prazo dos filhotes machos e a possível somação dos efeitos da obesidade materna com a obesidade dos filhotes nesses desfechos.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Investigar se a obesidade induzida pela dieta de cafeteria em ratas Wistar causa efeitos deletérios no metabolismo de seus filhotes machos, e se a ingestão de dieta de cafeteria pelos filhotes pode intensificar esses efeitos, através da análise da evolução do peso corporal e da ingestão alimentar, durante todo o experimento, e do peso dos órgãos e de dosagens circulantes de glicose, colesterol total, triglicerídeos, insulina, leptina, no período da puberdade e da idade adulta.
- b) Investigar se a obesidade induzida pela dieta de cafeteria em ratas Wistar causa em efeitos negativos na memória de longo-prazo de seus filhotes machos, e se a ingestão de dieta de cafeteria pelos filhotes poderia intensificar esses efeitos através de análises comportamentais de aprendizado e memória no período da puberdade e na idade adulta.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. DELINEAMENTO

Estudo experimental em animais.

### 5.2. ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos (n=20) e fêmeas (n=44) da espécie *Rattus norvegicus* (Berkenhout, 1769), da variedade Wistar, provenientes do Biotério Central do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

### 5.3. CONDIÇÕES AMBIENTAIS

Os animais permaneceram nos biotérios setoriais do CREAL/ICBS/UFRGS, em ambiente com controle de temperatura (20°C a 24°C) e luminosidade (12h claro e 12h escuro). Os animais foram acomodados em 4 por caixa, separados por sexo.

### 5.4. TRATAMENTOS

#### 5.4.1. Dieta padrão

A dieta padrão foi ofertada *ad libitum* todos os dias aos grupos controle, sendo composta por água e ração padrão de biotério. A composição nutricional da ração padrão encontra-se na **Tabela 1**.

#### 5.4.2. Dieta de cafeteria

A dieta de cafeteria foi ofertada *ad libitum* todos os dias aos grupos de cafeteria, além de também receberem dieta padrão *ad libitum*. Os itens eram apresentados em 3 dias alternados, nomeados A, B e C, para ocorrer variação alimentar a cada dia. Nos dias A, foram ofertados os seguintes itens: ração padrão de biotério, salame, pão bisnaguinha, salgadinho Yokitos sabor queijo, bala *Deliket Jelly Bean*, água e refrigerante. Nos dias B, foram ofertados: ração padrão de biotério, linguiça defumada, bolo de chocolate, biscoito doce Maisena, *marshmallow* sabor baunilha, água e refrigerante. Nos dias C, foram apresentados os itens: ração padrão de biotério, presunto gordo com capa de gordura, salgadinho Fritello, biscoito *waffer* sabor chocolate, bala de goma Gometts, água e refrigerante. Se no dia posterior à oferta não houvessem sobras de algum item, a oferta desse item era aumentada no próximo dia correspondente. A composição nutricional dos alimentos que compuseram a dieta de cafeteria encontra-se na **Tabela 1**.

Alimento	Energia (kJ/100g)	Carboidratos (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Lipídeos (g/100g)	Sódio (mg/100g)
Ração de biotério (Nuvilab® CR-1, Brasil)	1234	55	22	4	270
Salame (Majestade®, Brasil)	1414	0	32	24	1248
Pão bisnaguinha (Seven Boys®, Brasil)	1234	53	9	4	470
Salgadinho Yokitos Queijo (Yoki®, Brasil)	2008	60	6	24	1104
Bala <i>Deliket</i> (Dori Alimentos®, Brasil)	1590	95	0	0	20
Linguiça defumada (Perdigão®, Brasil)	1331	1	18	32	1573
Bolo de chocolate (Nutrella®, Brasil)	1360	50	5	12	618
Biscoito doce Maizena (Isabela®, Brasil)	1799	73	7	12	433
<i>Marshmallow</i> baunilha (Fini®, Brasil)	1423	80	5	0	46
Presunto gordo (Sadia®, Brasil)	649	0	17	9	833
Salgadinho Fritello (Pavioli®, Brasil)	2125	52	8	29	640
Biscoito <i>waffer</i> (Bauducco®, Brasil)	2176	63	5	27	113
Bala Gometts (Dori Alimentos®, Brasil)	1506	90	0	0	50
Refrigerante (Coca-Cola®, Brasil)	178	11	0	0	5

**Tabela 1. Composição nutricional dos alimentos oferecidos na dieta de cafeteria.**

### **5.5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

Ao chegarem do Biotério Central do CREAL/UFRGS, 44 ratas Wistar com 21 dias de vida, correspondente ao seu desmame, foram pesadas e separadas aleatoriamente, permanecendo 4 animais por caixa. Esses animais foram divididos em dois grupos de tratamento: **CON** (n=20), que receberam apenas dieta padrão desde o seu desmame até o desmame de seus filhotes, e **CAF** (n=24), que receberam dieta de cafeteria e dieta padrão desde o seu desmame até o desmame de seus filhotes.

Aos 120 dias de vida dessas fêmeas, iniciou-se a verificação do ciclo estral, através do esfregaço vaginal. A coleta de material deu-se com auxílio de um conta-gotas contendo solução salina 70%. O epitélio vaginal da fêmea foi lavado com a solução, e a secreção coletada foi imediatamente analisada ao microscópio óptico, determinando-se a fase do ciclo estral em que o animal se encontrava.

As fêmeas que se apresentavam na fase do proestro foram individualmente acomodadas em caixas com um macho (n=10), alimentado com dieta padrão e sexualmente apto, na seguinte fase escura do biotério (17h). Se as fêmeas apresentavam postura de lordose com a presença do macho, eram consideradas sexualmente receptivas e os dois animais pernoitavam juntos. Na manhã seguinte, era feito novamente o esfregaço vaginal, e, se encontrados espermatozóides ou tampão vaginal, as fêmeas eram consideradas possíveis prenhas. Dezoito dias após a cópula, as fêmeas eram colocadas em caixas individualizadas para construir seu ninho e parir a ninhada. Se, 25 dias após cópula, alguma fêmea ainda não houvesse parido, considerava-se fracas-

so de prenhez. A duração da gestação foi igual entre os grupos, assim como o número de filhotes nascidos de cada rata (dados não mostrados).

O tratamento com as diferentes dietas durou 21 semanas antes de as ratas engravidarem, permanecendo durante as semanas de gestação e lactação e terminando na faixa de 210 dias de idade, correspondente ao primeiro dia após o desmame das ninhadas. Portanto, o tratamento durou em torno de 27 semanas ou 189 dias. A idade não está precisamente determinada devido às diferentes datas de confirmação de prenhez e de parto entre os animais.

Após o desmame da prole dessas fêmeas, seus filhotes machos foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: **CON-CON** (n=36), filhotes de mães CON que também receberam apenas dieta padrão após o desmame; **CON-CAF** (n=38), filhotes de mães CON que receberam dieta de cafeteria após o desmame; **CAF-CON** (n=46), filhotes de mães CAF que receberam apenas dieta padrão após o desmame; **CAF-CAF** (n=39), filhotes de mães CAF que também receberam dieta de cafeteria após o desmame. Na maioria dos gráficos que ilustram os resultados desta Dissertação, os grupos de filhotes estão divididos em **CON** e **CAF**, que receberam, respectivamente, apenas dieta padrão e dieta de cafeteria desde o seu desmame. Nesses mesmos gráficos, as mães estão divididas em **CON** e **CAF**, recebendo, respectivamente, apenas dieta padrão e dieta de cafeteria desde o seu desmame até o desmame de seus filhotes. As ratas fêmeas das ninhadas foram destinadas a outro projeto de pesquisa.

A partir do 16º dia de lactação até o dia posterior ao desmame de sua ninhada, as mães CAF que tiveram seus filhotes selecionados para o grupo CAF-CON receberam

dieta padrão a fim de evitar que os filhotes tivessem acesso à dieta de cafeteria, conforme mencionado em trabalhos de Tozuka e colaboradores (Tozuka *et al*, 2010; Tozuka *et al*, 2009).

Na manhã após o desmame de seus filhotes, todas as mães CON e CAF foram decapitadas, o soro, plasma e encéfalo inteiro coletados e os tecidos adiposos visceral e retroperitoneal pesados.

Ao completarem 30 dias de vida, correspondendo à puberdade e a 9 dias de tratamento com as dietas, um quarto dos filhotes machos dos grupos CON-CON (n=8), CON-CAF (n=8), CAF-CON (n=9) e CAF-CAF (n=9) foi decapitado, sendo coletados soro, plasma, hipotálamo e hipocampo e pesados tecido adiposo visceral (inguinal e perigonadal) e retroperitoneal. Outro quarto dos filhotes machos dos grupos CON-CON (n=9), CON-CAF (n=9), CAF-CON (n=10) e CAF-CAF (n=9) foi analisado em tarefas comportamentais de exploração, ansiedade e memória de longo-prazo.

A metade restante dos filhotes machos seguiu no tratamento de seus grupos experimentais até os 120 dias de vida, correspondendo à idade adulta e a 14 semanas ou 99 dias de tratamento. Ao completarem essa idade, um quarto dos filhotes machos dos grupos CON-CON (n=8), CON-CAF (n=8), CAF-CON (n=12) e CAF-CAF (n=9) foi decapitado, sendo coletados soro, plasma, hipotálamo e hipocampo e pesados tecido adiposo visceral (inguinal e perigonadal) e retroperitoneal. Outro quarto dos filhotes machos dos grupos CON-CON (n=10), CON-CAF (n=13), CAF-CON (n=15) e CAF-CAF (n=12) foi analisado em tarefas comportamentais de exploração, ansiedade e memória de longo-prazo. Esta descrição pode ser analisada abaixo (**Figura 1**).

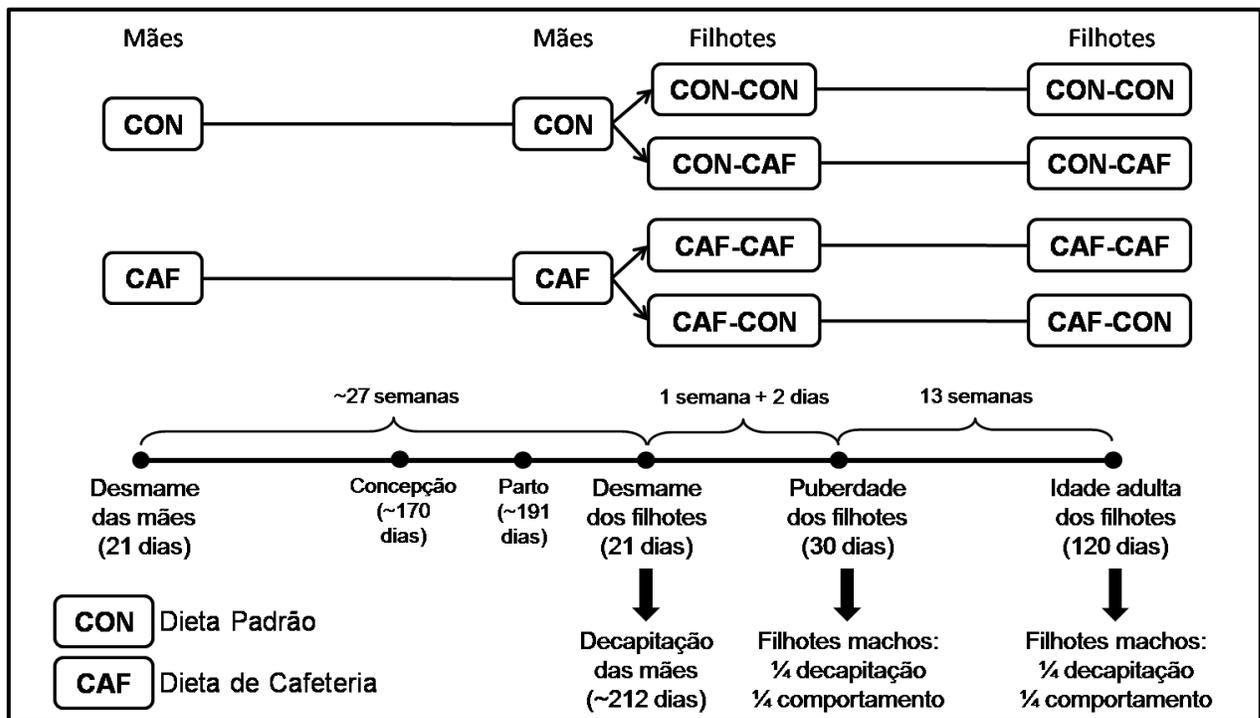


Figura 1: Desenho experimental

## 5.6. INGESTÃO ALIMENTAR

A ingestão alimentar das mães foi registrada durante todo o período, do início (21 dias de vida) do tratamento até a confirmação de prenhez (faixa dos 170 dias de vida). Já o registro da ingestão dos filhotes iniciou na 5ª semana de tratamento (49 dias de vida) perdurando até o final do tratamento (120 dias de vida), sendo realizado a cada dois dias. A avaliação do consumo deu-se por meio da pesagem das quantidades ofertadas e restantes de cada item das dietas padrão e cafeteria. O valor calórico consumido foi avaliado com base na composição nutricional dos itens (**Tabela 1**). Os resultados obtidos foram expressos como consumo semanal. Nesta Dissertação, foram apresentados apenas os resultados de ingestão dos filhotes.

### 5.7. PESO CORPORAL

Tanto as mães como os filhotes machos foram pesados uma vez por semana, com o peso representado em gramas. Os resultados obtidos foram mostrados como o peso no dia do desmame e no dia das decapitações e, também, como a evolução do peso semanal.

### 5.8. DECAPITAÇÃO, COLETA DE AMOSTRAS E PESAGEM DE TECIDOS

Após 12h a 14h de jejum, os animais foram mortos individualmente por meio de decapitação em guilhotina, em uma sala adequada para o procedimento, separada de onde se encontravam os outros ratos. A decapitação ocorreu sempre entre as 8h30min e 12h.

O encéfalo inteiro das mães foi coletado, rapidamente congelado em isopentano e acondicionado em plástico *parafilm* e papel alumínio no gelo seco até ser levado ao freezer -80°C. O hipotálamo e o hipocampo dos filhotes machos, tanto púberes quanto adultos, foram dissecados e acondicionados em microtubos no gelo seco até serem levados ao freezer -80°C. Não houve nenhuma análise bioquímica realizada e nenhum resultado obtido até o momento com esses materiais biológicos.

O sangue das mães e dos filhotes machos púberes e adultos foi coletado para obtenção de soro e plasma sanguíneo por meio de centrifugação. Os tubos de ensaio para obtenção do plasma das mães e dos filhotes adultos receberam 45µL de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e os tubos para obtenção do plasma dos filhotes ma-

chos púberes receberam 11,5µL de EDTA. Após a coleta do sangue, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 2.000 RCF (Força Centrífuga Relativa), a 4°C. O sobrenadante correspondente ao plasma foi distribuído em microtubos, que foram acondicionados no gelo seco até serem levados ao freezer -80°C, onde permaneceram até o dia das análises. Os tubos para obtenção do soro das mães, dos filhotes adultos e dos filhotes púberes, após a coleta de sangue, foram deixados em decantação em temperatura ambiente por, no mínimo 30 minutos e, no máximo, 120 minutos. Ao completar esse tempo, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 2.000 RCF a 4°C. O sobrenadante correspondente ao soro foi distribuído em microtubos, que foram acondicionados no gelo seco até serem levados ao freezer -80°C, onde permaneceram até o dia das análises.

Os tecidos adiposos visceral e retroperitoneal, tanto das mães, quanto dos filhotes machos púberes e adultos, foram dissecados seguindo a sequência descrita a seguir. O tecido adiposo visceral foi dissecado através da separação do tecido adiposo ao redor do estômago, do baço, do pâncreas, do intestino delgado e grosso e do aparelho reprodutor. Já o tecido adiposo retroperitoneal correspondeu à gordura ao redor e abaixo dos rins. Os tecidos citados foram pesados logo após sua dissecação em balança com precisão de 3 casas decimais e, então, descartados.

## **5.9. ANÁLISES BIOQUÍMICAS**

As concentrações séricas de colesterol total, triglicerídeos e glicose foram quantificadas pelo método colorimétrico, utilizando-se reagentes dos respectivos kits comerci-

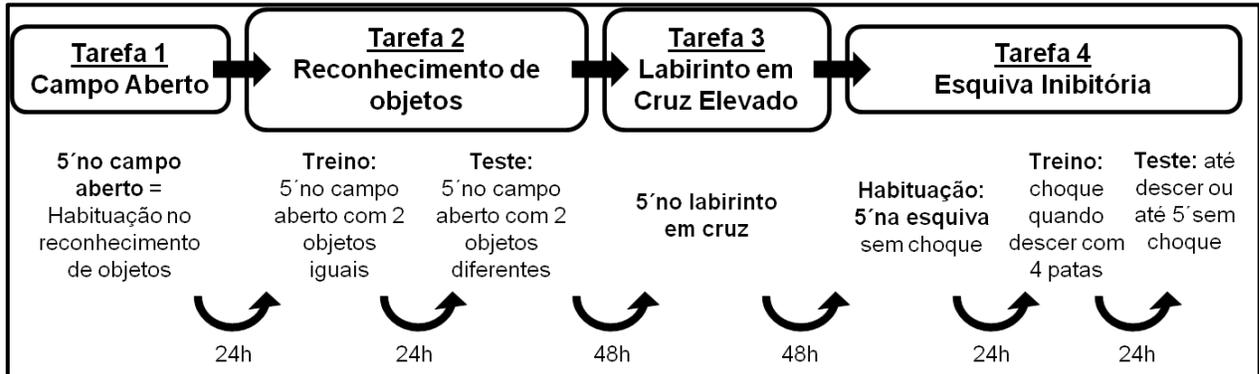
ais: Colesterol Liquiform, Triglicérides Liquiform e Glicose PAP Liquiform, todos da marca Labitest®, Minas Gerais, Brasil. As concentrações séricas de insulina e as plasmáticas de leptina foram quantificadas pelo Ensaio Imunoabsorbante por Enzima Ligada (ELISA), utilizando-se reagentes dos respectivos kits comerciais: *Rat/Mouse Insulin ELISA Kit* e *Rat Leptin ELISA Kit*, sendo os dois da marca Millipore®, Massachusetts, EUA. Em todas as análises, foram seguidas as instruções dos fabricantes.

#### 5.10. ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

Para análise de comportamentos relacionados à memória de longo-prazo, foram filmadas e analisadas as seguintes tarefas comportamentais dos filhotes machos púberes e adultos: Reconhecimento de Objetos e Esquiva Inibitória *Step-down*. A fim de serem excluídos possíveis fatores falsos positivos e/ou negativos que mascaram os resultados mnemônicos, foram realizadas duas tarefas comportamentais complementares (Quillfeldt, 2010): Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado, os quais revelam comportamentos relacionados à exploração e à ansiedade.

A sequência de tarefas comportamentais, representada na **Figura 2**, foi estabelecida seguindo uma ordem crescente de complexidade e exposição do animal a intervenções ambientais, de modo que uma tarefa não interferisse na análise das outras tarefas. Os primeiros comportamentos registrados foram de exploração e ansiedade no Campo Aberto. Passadas 24h, foi registrado o treino da tarefa de Reconhecimento de Objetos e, após 24h, filmou-se o teste dessa tarefa. Após 48h, registrou-se o animal em exposição à tarefa do Labirinto em Cruz Elevado. Passadas 48h, o animal foi filmado

sendo habituado na Esquiva Inibitória; após 24h, realizou-se o treino dessa tarefa e, 24h depois, realizou-se o teste. Maiores detalhes sobre as tarefas comportamentais são descritos a seguir (**Figura 2**).



**Figura 2: Sequência de tarefas comportamentais.**

### 5.10.1. Comportamentos relacionados à Exploração e à Ansiedade

#### 5.10.1.1. Tarefa de Campo Aberto

A tarefa do campo aberto foi desenvolvida para medir respostas comportamentais como a atividade motora, hiperatividade e comportamentos exploratórios (Tremml, 1998). A interpretação da atividade locomotora centra-se principalmente no medo e na exploração, pois ambos os comportamentos motivam a atividade do animal (Markel *et al*, 1989). Sendo assim, o Campo Aberto também pode ser utilizado, secundariamente, como uma medida de ansiedade (Belzung *et al*, 2003).

Os filhotes machos púberes, aos 30 dias de vida, e os adultos, aos 120 dias de vida, foram transferidos à sala de observação iluminada com luz branca duas horas antes do início do teste para que houvesse habituação ao local. Os testes ocorreram entre 12h e 18h no ciclo claro. O Campo Aberto consiste em uma caixa de madeira medindo

45x40x60cm com a parede frontal constituída por vidro. Seu assoalho é demarcado por três linhas verticais e duas linhas horizontais, formando 12 quadrantes, sendo 10 periféricos e 2 centrais. Houve o cuidado para que a iluminação na caixa fosse homogênea, ou seja, sem a presença de sombras no assoalho. Antes de cada animal ser colocado no Campo Aberto, o espaço foi higienizado com álcool 70%. Individualmente, os animais foram colocados no centro do assoalho, com o corpo e a cabeça voltados para a parede de vidro, e permaneceram no Campo Aberto durante 5 minutos. A filmagem ocorreu durante todo o tempo de exploração.

Um observador que desconhecia os grupos dos animais (“cego”) avaliou as filmagens dos filhotes púberes e adultos utilizando o programa livre *OpenFLD* 1.0 (disponível em <http://blog.sbneec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>). A percentagem de tempo que o rato permanece nos quadrantes periféricos ou centrais é uma forma de se avaliar o comportamento relacionado à ansiedade. Mais tempo passado no centro do Campo Aberto pode indicar um efeito ansiolítico dos tratamentos, enquanto que menos tempo no centro do Campo Aberto pode refletir um comportamento ansioso. Quanto maiores os níveis de ansiedade, menos frequentes são os comportamentos de locomoção, como levantamentos, esticadas e autolimpezas.

#### **5.10.1.2. Tarefa de Labirinto em Cruz Elevado**

Os filhotes machos púberes, aos 30 dias de vida, e os adultos, aos 120 dias de vida, foram transferidos à sala de observação iluminada com luz branca duas horas antes do início do teste para que houvesse habituação ao local. Os testes ocorreram entre 12h e 18h no ciclo claro. O Labirinto em Cruz Elevado consiste em um aparato de ma-

deira elevado 50cm do solo, formado por dois braços opostos fechados por paredes sem cobertura e dois braços opostos abertos. Antes de cada animal ser colocado no labirinto, o espaço foi higienizado com álcool 70%. Os filhotes machos púberes e adultos foram colocados no quadrado central do Labirinto com o corpo e a cabeça voltados para um dos braços fechados e permaneceram no Labirinto durante 5 min. A filmagem ocorreu durante todo o tempo de exploração.

Um observador que desconhecia os grupos dos animais (“cego”) avaliou as filmagens dos filhotes púberes e adultos utilizando o programa livre *PlusMZ* 1.1 (disponível em <http://blog.sbneec.org.br/2010/07/software-gratuitos-para-analise-do-labirinto-em-cruz-elevado-e-campo-aberto/>). A frequência de entradas e o tempo gasto em cada tipo de braço (abertos ou fechados), e a frequência de levantamentos, esticadas, autolimpezas e mergulhos com a cabeça foram analisados. Habitualmente, o animal explora os dois tipos de braço, mas entra mais e permanece mais tempo nos braços fechados. Considera-se a porcentagem da preferência (entradas e tempo gasto) pelos braços abertos e pelos fechados um índice fidedigno de ansiedade; quanto maiores os níveis de ansiedade, menor a porcentagem de entradas nos braços abertos e de tempo gasto nos mesmos e vice-e-versa (Morato, 2006). Um número maior de entradas nos braços está também relacionado com uma atividade locomotora aumentada. Além disso, quanto maior a ansiedade, menos frequentes são os comportamentos de mobilidade, como levantamentos, esticadas, autolimpezas e mergulhos com a cabeça.

### **5.10.2. Comportamentos relacionados à Memória de Longo-Prazo**

### **5.10.2.1. Tarefa de Reconhecimento de Objetos**

Os filhotes machos púberes, aos 30 dias de vida, e os adultos, aos 120 dias de vida, foram transferidos à sala de observação iluminada com luz branca 2 horas antes do início do teste para que houvesse habituação ao local. Os testes ocorreram entre 12h e 18h no ciclo claro. Essa tarefa foi realizada na mesma caixa de madeira onde ocorreu a tarefa do Campo Aberto, que serviu de habituação à tarefa de Reconhecimento de Objetos. Após 24h da habituação, foi realizada a sessão treino, que consistiu em colocar dois objetos idênticos (duas garrafas azuis de vidro ou duas latas vermelhas de alumínio) no assoalho da caixa, equidistantes em relação às paredes, e os animais puderam explorá-los individualmente durante 5 min. Passadas 24h, ocorreu a sessão teste, na qual o animal foi colocado novamente na mesma caixa, porém um dos objetos familiares utilizados na sessão do treino foi substituído por um objeto novo, diferente do familiar (garrafa ou lata), tomando-se o cuidado para que os dois objetos ocupassem exatamente o mesmo espaço da sessão anterior. Os animais permaneceram na caixa por 5 minutos. Metade dos animais foi treinada com duas latas e testada com a garrafa, e, a outra metade, treinada com duas garrafas e testada com a lata. Houve o cuidado para que a iluminação na caixa fosse homogênea, ou seja, sem a presença de sombras no assoalho e, antes de cada animal ser colocado na caixa, esta foi higienizada com álcool 70%. Tanto nos dias de treino quanto nos dias de teste, o animal foi colocado no meio da caixa, com a cabeça e o corpo voltados para a parede de vidro, de costas para os objetos. Considerou-se exploração do objeto o cheirar ou o tocar com as vibrissas no objeto. A filmagem ocorreu durante todo o tempo de exploração.

Para análise dos vídeos, foi utilizado o *OpenFLD* 1.0, mesmo programa com que se analisou os vídeos da tarefa de Campo Aberto. Foram adaptadas algumas funções do programa para que, através da análise de um observador que desconhecia os grupos dos animais e o tipo de objeto familiar (“cego”), fosse contabilizado o tempo de exploração em cada objeto, tanto na sessão do treino, quanto na sessão do teste. Um índice de preferência, que consiste na razão entre o tempo gasto na exploração de qualquer um dos objetos, na sessão de treino, ou do objeto novo, na sessão de teste, sobre o tempo total gasto explorando ambos os objetos, foi utilizado como uma medida de memória de reconhecimento. Assim, a proporção do tempo total que o animal gastou investigando o objeto novo é o Índice de Reconhecimento, expresso pela fórmula  $T_N/(T_F+T_N)$ , sendo “ $T_N$ ” o tempo gasto explorando o objeto da esquerda, na sessão de treino, ou o objeto novo, na sessão de teste, e “ $T_F$ ” o tempo gasto explorando o objeto da direita, na sessão de treino, ou objeto familiar, na sessão de teste (McGaugh *et al*, 2000). É considerado como um índice de memória para a tarefa o aumento significativo no tempo de exploração do objeto novo em relação ao objeto familiar.

#### **5.10.2.2. Tarefa de Esquiva Inibitória Step-Down**

Os filhotes machos púberes, aos 30 dias de vida, e os adultos, aos 120 dias de vida, foram transferidos à sala de observação iluminada com luz branca 2 horas antes do início do teste para que houvesse habituação ao local. Os testes ocorreram entre 12h e 18h, no ciclo claro. Essa tarefa foi realizada em uma caixa de vidro de 50x25x25cm, em cuja extremidade esquerda encontra-se uma plataforma de vidro de 8cm de largura e 25cm de comprimento, situada a 5 cm do chão da caixa. No restante da caixa, o assoalho é formado por uma grade de barras metálicas, apresentando 0,1cm de diâmetro e

se encontram separadas umas das outras por um espaço de 1 cm. Na sessão de habituação, os ratos foram colocados individualmente sobre a plataforma e puderam explorar a caixa durante 5 min. Na sessão de treino, 24h após a habituação, os animais foram colocados da mesma forma sobre a plataforma, e, ao descerem dela, apoiando as quatro patas na grade, receberam um choque com duração de 2s, de intensidade 0,2mA, se filhotes na puberdade, ou 0,8mA, se filhotes na idade adulta, sendo retirados da caixa imediatamente após o choque. Todos os animais desceram da plataforma até os 30 segundos iniciais da sessão de treino. Na sessão de teste, 24h pós-treino, os procedimentos foram iguais àqueles da sessão de treino, exceto pela omissão do choque ao descer da plataforma, e os animais permaneceram na caixa até que descessem, ou até completar 300s (ou 5 min) de exposição. Em todas as sessões, antes de cada animal ser colocado na caixa, a caixa foi higienizada com álcool 70%, e a filmagem ocorreu durante todo o tempo de exploração.

Um observador que desconhecia os grupos dos animais (“cego”) avaliou as filmagens dos filhotes púberes e adultos utilizando cronômetro. A diferença entre a latência de descida da plataforma na sessão teste e na sessão treino foi tomada como medida da memória (Quillfeldt, 2010).

### **5.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para comparação de um fator entre dois grupos com distribuição paramétrica dos dados, utilizou-se o teste estatístico t de Student. Para a avaliação dos efeitos da dieta dos filhotes e da dieta das mães e a interação entre eles, utilizou-se o teste de análise

de variância (ANOVA) de duas vias com pós-teste de Bonferroni. Para avaliação do efeito do tempo, do tratamento das mães e do tratamento dos filhotes sobre a evolução do peso corporal e da ingestão calórica, assim como a interação entre tempo e tratamento sobre a variável estudada, utilizou-se o teste de análise multivariada (MANOVA) de medidas repetidas. Os dados foram expressos em média e erro padrão da média (E.P.M.).

Os dados referentes aos Índices de Reconhecimento de Objetos e às latências de descida da plataforma na Esquiva Inibitória e aos comportamentos expressos no Labirinto em Cruz Elevado e no Campo Aberto foram expressos em mediana  $\pm$  intervalos interquartis. Primeiramente, necessitaram passar por um teste de normalidade (teste de Kolmogorov-Smirnov). Constatando a existência de dados não-paramétricos, as diferenças entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn. A comparação entre treino e teste dentro de um mesmo grupo nas tarefas de Reconhecimento de Objetos e Esquiva Inibitória foi feita com o teste Wilcoxon.

Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas com a utilização dos programas *GraphPad Prism*® 5.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, EUA) e *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS)® 19.0 para Windows (SPSS Inc., IBM Company, Chicago, EUA).

### **5.12. DESCARTE DOS RESÍDUOS**

Os resíduos biológicos (carcaças e tecidos dos animais) foram acondicionados em sacos plásticos de coloração branca, identificados, congelados e enviados ao Biotério Central do CREAL/UFRGS.

Os resíduos químicos foram separados, identificados e armazenados em galões e, posteriormente, enviados ao CGTRQ (Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos) do Instituto de Química/UFRGS.

### **5.13. ÉTICA**

Todos os experimentos envolvendo os animais foram realizados de acordo com o Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do *National Institutes of Health* (NIH) e após a aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA – projeto 21224).

### **5.14. APOIO FINANCEIRO**

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através de uma bolsa de Mestrado, e da Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UFRGS e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através da compra dos alimentos da dieta padrão e de cafeteria, kits e equipamentos para análises bioquímicas e comportamentais (recursos PROAP).

### **5.15. LOCAL E INSTALAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO DA PESQUISA**

A pesquisa até a morte dos animais foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia do Comportamento (Laboratório 11), Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500, Bairro Centro, Porto Alegre/RS. As análises bioquímicas ocorreram no Laboratório de Pediatria Translacional (LPT), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos, 2350, Largo Eduardo Zaccaro Faraco, Bairro Santana, Porto Alegre/RS. Esses laboratórios possuem as condições necessárias para o desenvolvimento dos métodos de pesquisa usados neste trabalho.

## 6. RESULTADOS

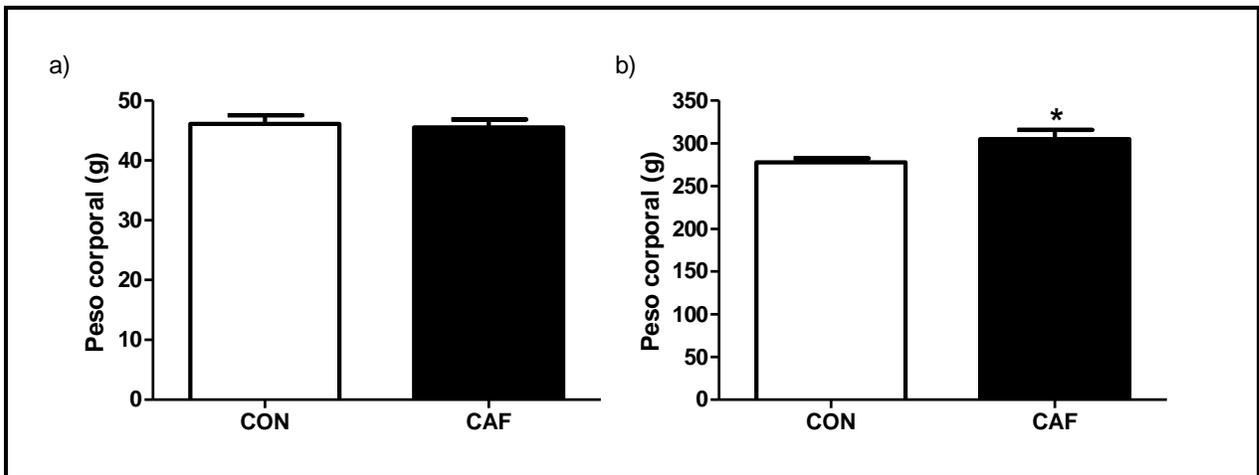
### 6.1. EFEITOS DA DIETA DE CAFETERIA NO METABOLISMO DAS MÃES

As fêmeas destinadas a serem as mães dos filhotes machos objetos de estudo foram recebidas do Biotério Central do CREAL/UFRGS no dia do seu desmame, aos 21 dias de idade, correspondendo ao primeiro dia de tratamento com as diferentes dietas. O tratamento durou 21 semanas antes de engravidarem, permaneceu durante as semanas de gestação e lactação e terminou na faixa de 210 dias de idade, correspondente ao primeiro dia após o desmame das ninhadas. A idade não está precisamente determinada devido às diferentes datas de confirmação de prenhez e de parto entre os animais.

Para a confirmação de que a dieta de cafeteria induziu obesidade nas mães, foram avaliados peso corporal, peso do tecido adiposo, perfil lipídico, glicemia, insulínemia e leptinemia desses animais.

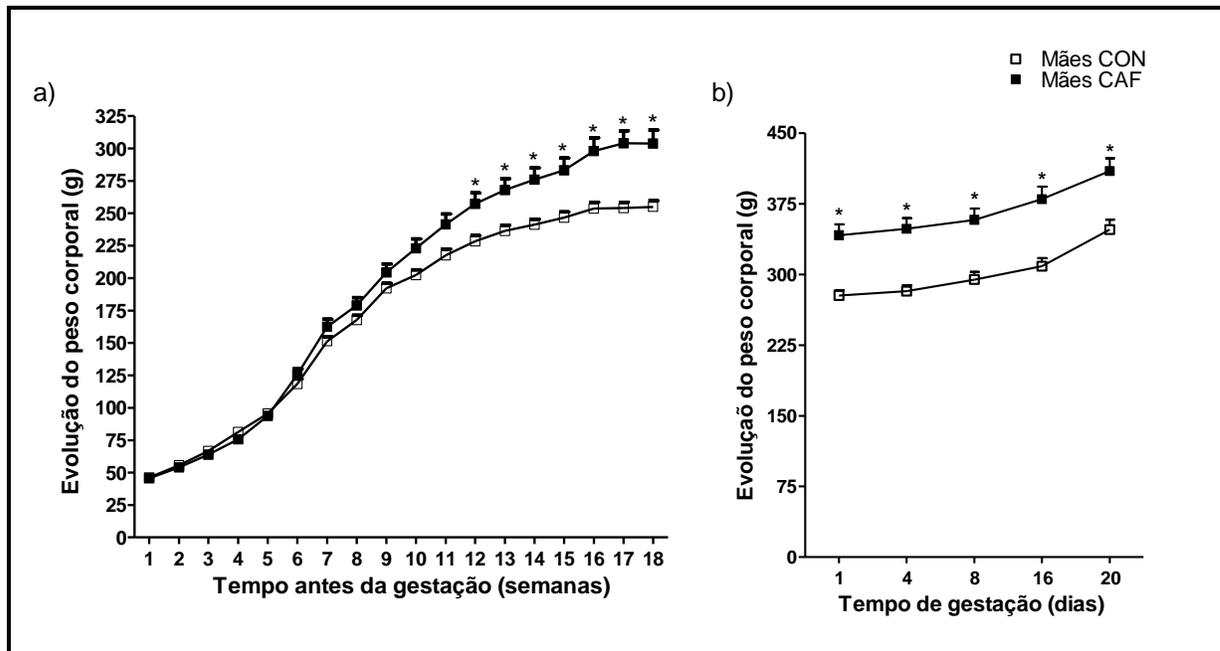
#### **6.1.1. *Peso corporal***

As fêmeas iniciaram o tratamento aos 21 dias de idade, com pesos corporais iguais ( $P=0,7708$ ; **Figura 3a**). Na faixa de 210 dias de vida, as mães CAF apresentavam peso corporal significativamente maior do que as mães CON ( $P=0,0150$ ; **Figura 3b**).



**Figura 3: Peso corporal das mães no primeiro e no último dia do tratamento.** Dados expressos em média + E.P.M. **a)** Peso corporal no dia do desmame, aos 21 dias de vida; CON (controle, n=19) e CAF (cafeteria, n=23). **b)** Peso corporal na faixa de 210 dias de vida; CON (n=15) e CAF (n=9). No último dia de tratamento, o peso corporal das mães CAF foi significativamente maior (\* $P < 0,05$ ) do que o das mães CON pelo Teste t de *Student*.

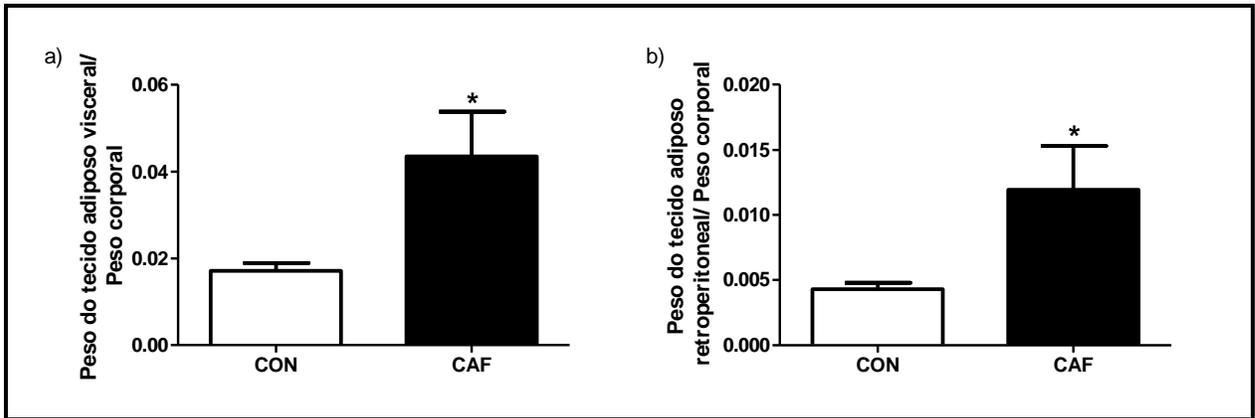
A evolução do peso corporal das mães antes de engravidarem teve influência significativa da interação entre tempo e tipo de tratamento ( $P < 0,05$ ; **Figura 4a**), assim como sofreu influência significativa somente do tipo de tratamento ( $P = 0,0102$ ) e somente do tempo ( $P < 0,05$ ). Durante a prenhez, a evolução do peso corporal das mães sofreu influência significativa do tipo de tratamento ( $P = 0,0002$ ; **Figura 4b**) e do tempo ( $P < 0,05$ ) separadamente, porém não houve interação entre tempo e tratamento ( $P = 0,5415$ ). A partir da 12ª semana de tratamento, as mães CAF apresentaram peso corporal significativamente maior do que as mães CON e assim permaneceram durante toda a gestação ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4: Evolução do peso corporal das mães durante o tratamento.** Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. **a)** Peso corporal durante as 18 semanas de tratamento, antes do acasalamento e da prenhez; CON (controle, n=16) e CAF (cafeteria, n=18). **b)** Peso corporal durante a gestação, apresentado em um intervalo de 4 dias (o tratamento com as diferentes dietas continuou durante a gestação); CON (n=11) e CAF (n=11). O peso das mães CAF mostrou-se significativamente maior ( $*P<0,05$ ) do que o das mães CON a partir da 12ª semana de tratamento antes da gestação e assim permaneceu até o final do período gestacional ( $*P<0,05$ ) pela ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido de pós-teste de Bonferroni.

### 6.1.2. Peso do tecido adiposo

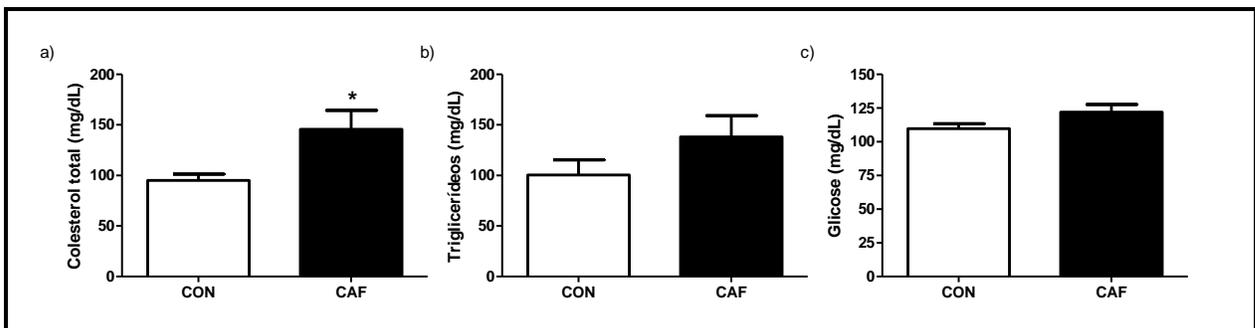
Ao final do tratamento, o peso do tecido adiposo visceral das fêmeas CAF apresentou-se significativamente maior ( $P=0,0024$ ; **Figura 5a**) do que o das fêmeas CON. Da mesma forma, o peso do tecido adiposo retroperitoneal mostrou-se maior nas fêmeas CAF ( $P=0,0051$ ; **Figura 5b**) do que no das fêmeas CON.



**Figura 5: Peso do tecido adiposo das mães ao final do tratamento.** Dados expressos em média + E.P. Os valores são expressos como peso do tecido adiposo/peso corporal total. **a)** Peso do tecido adiposo visceral; CON (controle, n=14) e CAF (cafeteria, n=7). **b)** Peso do tecido adiposo retroperitoneal; CON (n=14) e CAF (n=7). O peso das gorduras visceral e retroperitoneal das mães CAF mostrou-se significativamente maior (\* $P < 0,05$ ) do que o das mães CON, pelo Teste t de *Student*.

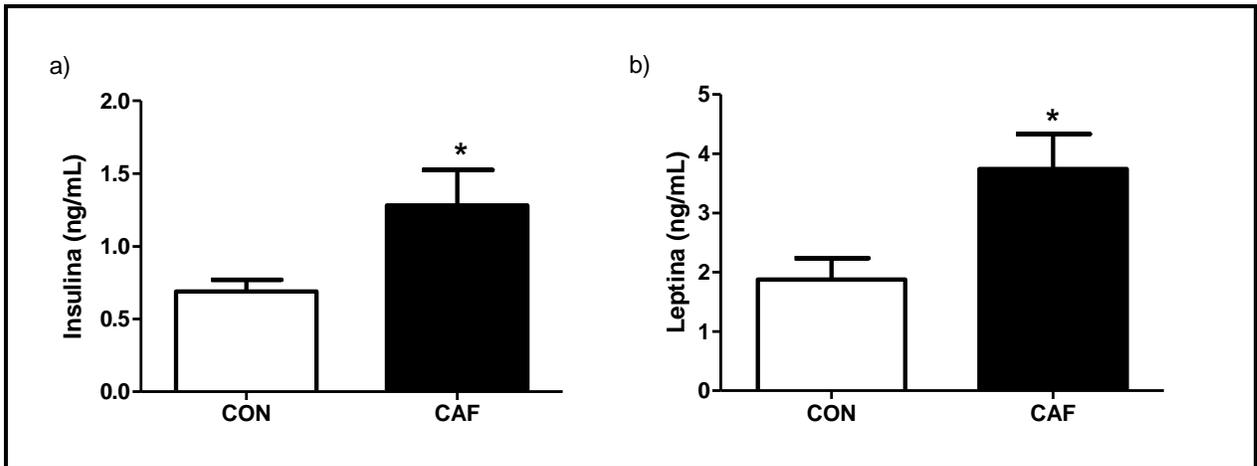
### 6.1.3. Análises bioquímicas

Ao final do tratamento, a concentração sérica de colesterol total das fêmeas CAF foi mais elevada ( $P=0,0138$ ; **Figura 6a**) do que a das fêmeas CON. Já as concentrações séricas de triglicérides e glicose não apresentaram diferença significativa entre os grupos ( $P=0,1522$ ,  $P=0,0801$ , respectivamente; **Figura 6b-c**).



**Figura 6: Concentração de lipídeos e glicose no soro das mães ao final do tratamento.** Dados expressos em média + E.P.M. **a)** Concentração sérica de colesterol total; CON (controle, n=9) e CAF (cafeteria, n=7). **b)** Concentração sérica de triglicérides; CON (n=9) e CAF (n=7). **c)** Concentração sérica de glicose; CON (n=9) e CAF (n=7). A concentração sérica de colesterol total das mães CAF mostrou-se significativamente maior (\* $P < 0,05$ ) do que a das mães CON, pelo Teste t de *Student*.

Ao final do tratamento, as fêmeas CAF apresentaram concentração sérica de insulina e concentração plasmática de leptina significativamente maiores ( $P=0,0231$ ,  $P=0,0155$ , respectivamente; **Figura 7a-b**) do que as fêmeas CON.



**Figura 7: Concentração circulante de insulina e leptina das mães ao final do tratamento.** Dados expressos em média + E.P.M. **a)** Concentração sérica de insulina; CON (controle, n=8) e CAF (cafeteria, n=6). **b)** Concentração plasmática de leptina; CON (n=8) e CAF (n=6). As concentrações circulantes de insulina e de leptina das mães CAF mostraram-se significativamente maiores ( $*P<0,05$ ) do que as das mães CON, pelo Teste t de *Student*.

## 6.2. EFEITOS DA DIETA DE CAFETERIA NO METABOLISMO DOS FILHOTES MACHOS

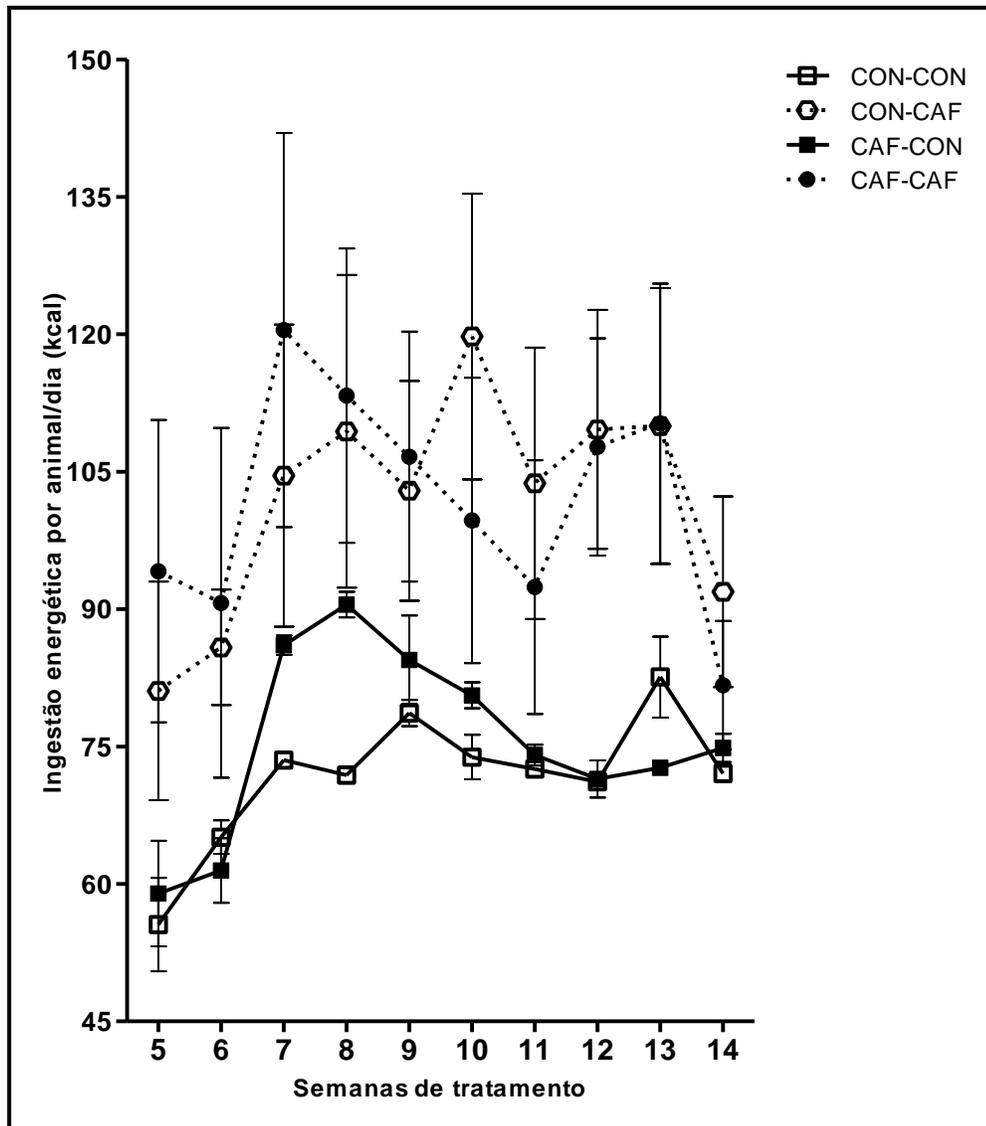
Ao completarem 30 dias de vida, correspondendo à puberdade, um quarto dos filhotes machos de cada grupo de tratamento foi decapitado, sendo coletados soro, plasma, hipotálamo e hipocampo e pesado tecido adiposo visceral e retroperitoneal. Outro quarto dos filhotes machos foi analisado em tarefas comportamentais de exploração, ansiedade e memória de longo-prazo.

A metade restante dos filhotes machos seguiu no tratamento de seus grupos de tratamento até os 120 dias de vida, correspondendo à idade adulta. Ao completarem

essa idade, um quarto dos filhotes machos foi decapitado, sendo coletados soro, plasma, hipotálamo e hipocampo e pesado tecido adiposo visceral e retroperitoneal. Outro quarto dos filhotes machos foi analisado em tarefas comportamentais de exploração, ansiedade e memória de longo-prazo.

### **6.2.1. Ingestão energética**

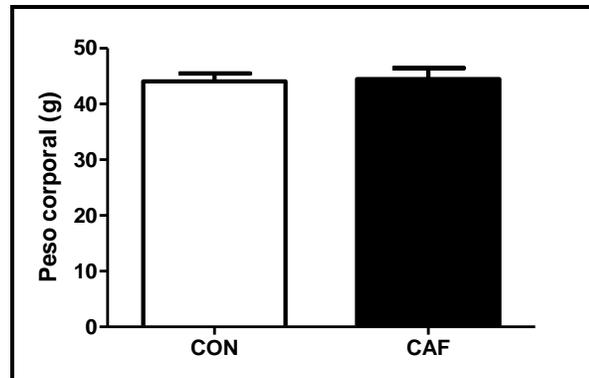
A análise multivariada revelou que a evolução da ingestão energética sofreu influência significativa do tempo ( $P < 0,05$ ) e da interação entre tempo e dieta materna ( $P = 0,019$ ), sem haver interação entre tempo e dieta do filhote ( $P = 0,074$ ) e entre tempo, dieta materna e dieta do filhote ( $P = 0,057$ ) (**Figura 8**). Além disso, os testes de efeitos entre as dietas mostraram que a dieta do filhote teve influência sobre o consumo calórico ( $P < 0,05$ ), enquanto que não houve efeito da dieta materna ( $P = 0,336$ ), tampouco houve influência da interação entre a dieta materna e a do filhote ( $P = 0,276$ ) sobre a ingestão calórica.



**Figura 8: Evolução da ingestão energética por animal/dia ao longo de 14 semanas de experimento.** Dados expressos em média  $\pm$  E.P.M. O tratamento iniciou na Semana 1, aos 21 dias de vida dos filhotes machos. Contudo, apenas a partir da Semana 5, aos 49 dias de idade, os dados de ingestão foram registrados. O registro ocorreu até o final do tratamento, na Semana 14, aos 120 dias de idade; CON-CON (filhotes controle provenientes de mães controle, n= 36), CAF-CON (filhotes controle provenientes de mães cafeteria, n=46), CON-CAF (filhotes cafeteria provenientes de mães controle, n=38) e CAF-CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria, n=39). A ingestão calórica sofreu influência da dieta do filhote e da interação entre tempo e dieta materna, segundo análise multivariada de medidas repetidas (mais detalhes no texto).

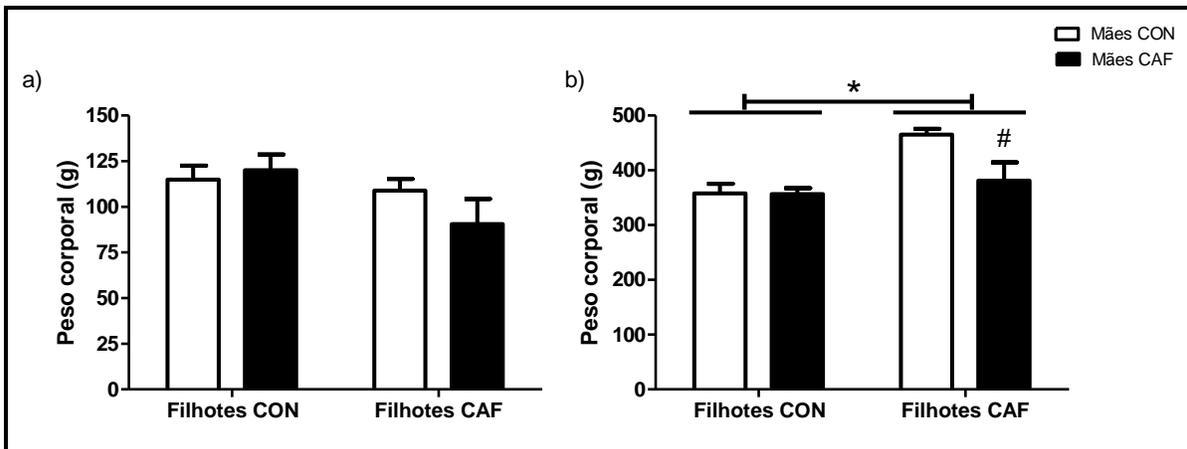
### 6.2.2. Peso Corporal

No dia do desmame, aos 21 dias de vida, correspondente ao primeiro dia de tratamento com as diferentes dietas, os filhotes machos das mães CAF e CON apresentaram pesos corporais iguais ( $P=0,8570$ ; **Figura9**).



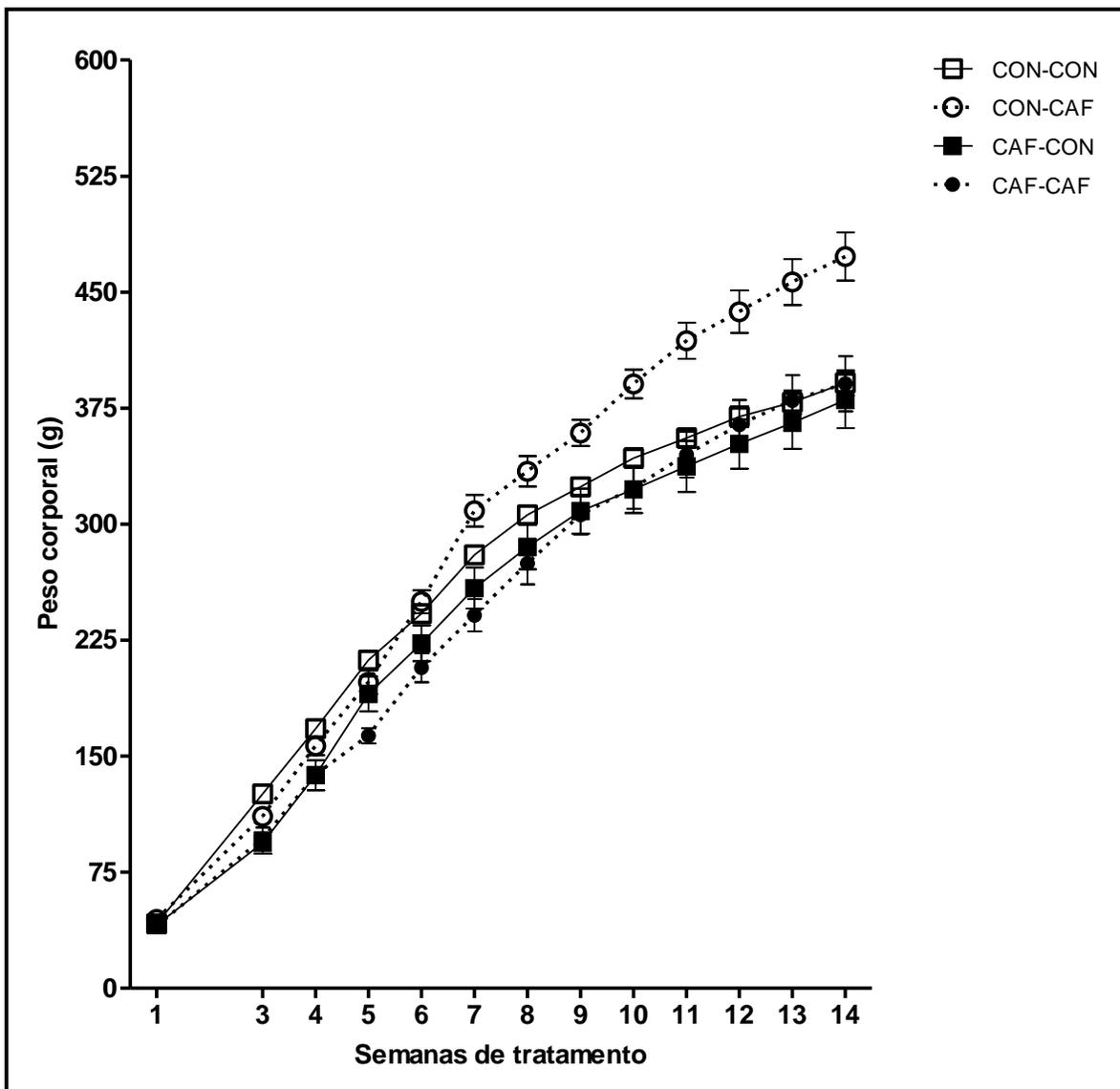
**Figura 9: Peso corporal dos filhotes machos no primeiro dia de tratamento.** Dados expressos em média + E.P.M. CON (filhotes provenientes de mães controle, n=25) e CAF (filhotes provenientes de mães cafeteria, n=26).

Aos 30 dias de vida, os filhotes dos quatro grupos de tratamento apresentaram pesos corporais iguais (**Figura 10a**), não havendo influência do tratamento dos filhotes ( $P=0,0655$ ) e do das mães ( $P=0,4768$ ), nem tampouco interação entre os tratamentos dos filhotes e das mães ( $P=0,2142$ ). Aos 120 dias de vida, o peso corporal dos filhotes CAF mostrou-se significativamente maior ( $P=0,0007$ ; **Figura 10b**) do que os filhotes CON; entretanto, os filhotes CAF provenientes de mães CAF apresentaram peso corporal significativamente menor ( $P<0,05$ ) do que os filhotes CAF provenientes de mães CON. Além disso, aos 120 dias de vida, houve efeito da dieta materna ( $P=0,0212$ ) e da interação entre o tratamento dos filhotes e o das mães ( $P=0,0247$ ).



**Figura 10: Peso corporal dos filhotes machos na puberdade e na idade adulta.** Dados expressos em média + E.P.M. **a)** Peso corporal, aos 30 dias de vida; filhotes CON mães CON (filhotes controle provenientes de mães controle, n= 8), filhotes CON mães CAF (filhotes controle provenientes de mães cafeteria, n= 8), filhotes CAF mães CON (filhotes cafeteria provenientes de mães controle, n=8) e filhotes CAF mães CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria, n=7). **b)** Peso corporal, aos 120 dias de vida; filhotes CON mães CON (n= 8), filhotes CON mães CAF (n= 12), filhotes CAF mães CON (n=8) e filhotes CAF mães CAF (n=6). Na idade adulta, o peso corporal dos filhotes CAF mães CON foi significativamente maior (\* $P < 0,05$ ) do que o dos filhotes CON (ANOVA de duas vias), e o pós-teste de Bonferroni mostrou que o peso corporal dos filhotes CAF mães CAF é significativamente menor (# $P < 0,05$ ) do que o dos filhotes CAF mães CON.

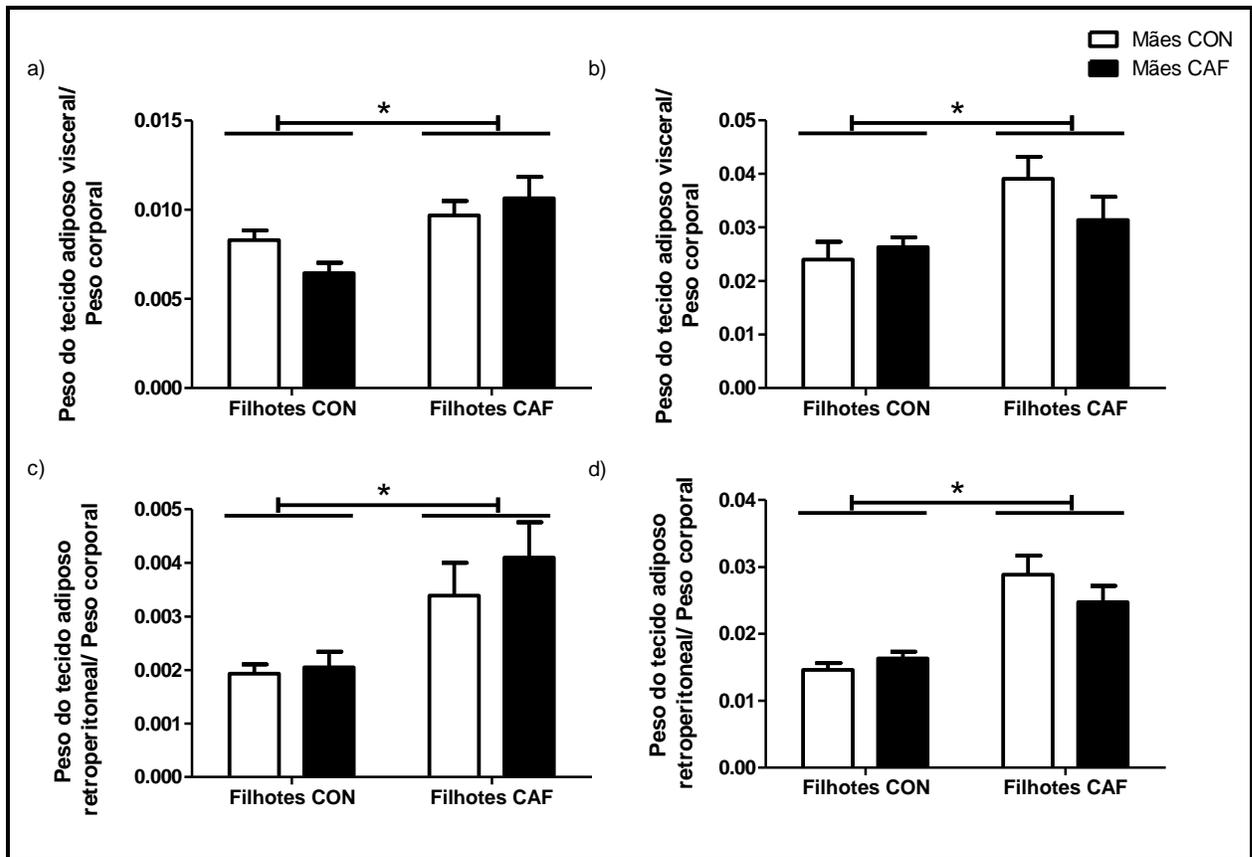
A evolução do peso corporal sofreu influência significativa do tempo ( $P < 0,05$ ), da interação entre tempo e dieta materna ( $P = 0,004$ ), entre tempo e dieta da prole ( $P < 0,05$ ) e entre tempo, dieta materna e dieta da prole ( $P = 0,002$ ) (**Figura 11**). Além disso, os testes de efeitos entre as dietas mostraram que a dieta materna teve influência sobre o peso corporal dos filhotes ( $P < 0,05$ ), enquanto que não houve efeito da dieta do filhote ( $P = 0,110$ ), nem tampouco da interação entre a dieta materna e a do filhote ( $P = 0,071$ ).



**Figura 11: Evolução do peso corporal dos filhotes ao longo das 14 semanas de tratamento, exceto a Semana 2.** Dados expressos em média + E.P.M. CON-CON (filhotes controle provenientes de mães controle, n= 36), CAF-CON (filhotes controle provenientes de mães cafeteria, n=46), CON-CAF (filhotes cafeteria provenientes de mães controle, n=38) e CAF-CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria, n=39). O teste estatístico utilizado foi análise multivariada de medidas repetidas (mais detalhes no texto).

### **6.2.3. Peso do tecido adiposo**

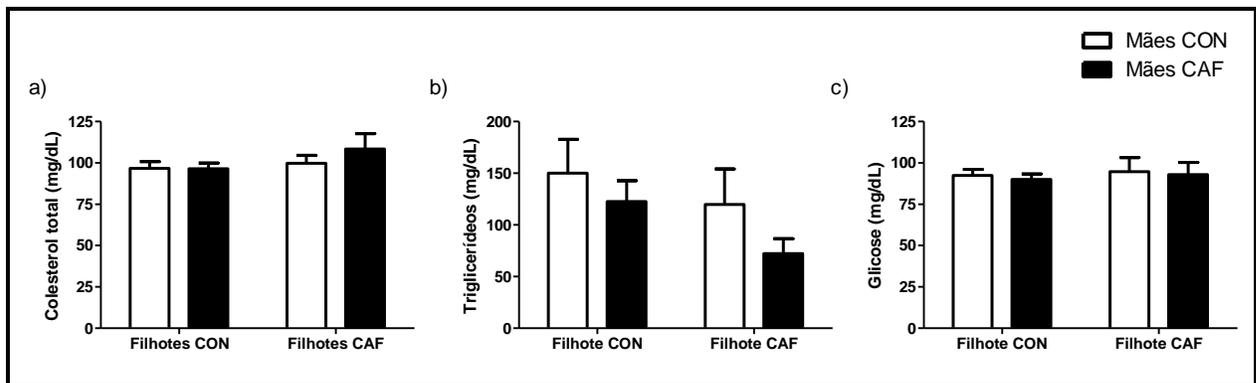
Aos 30 dias de vida, os pesos dos tecidos adiposos visceral e retroperitoneal apresentaram-se maiores nos filhotes CAF ( $P=0,001$ ,  $P=0,0006$ , respectivamente; **Figura 12a,c**) em comparação aos filhotes CON, independentemente do tratamento das mães ( $P=0,5650$ ,  $P=0,3635$ , respectivamente), e não houve interação entre os tratamentos dos filhotes e os das mães ( $P=0,0746$ ,  $P=0,5149$ , respectivamente). Da mesma forma, aos 120 dias de vida, os filhotes CAF tiveram os pesos dos tecidos adiposos visceral e retroperitoneal maiores ( $P=0,0045$ ,  $P<0,05$ , respectivamente; **Figura 12b,d**) do que os filhotes CON, independentemente do tratamento das mães ( $P=0,4223$ ,  $P=0,5302$ , respectivamente), não havendo interação entre os tratamentos dos filhotes e os das mães ( $P=0,1385$ ,  $P=0,1326$ , respectivamente).



**Figura 12: Peso do tecido adiposo visceral e do retroperitoneal dos filhotes machos na puberdade e na idade adulta.** Dados expressos em média + E.P.M. **a)** Peso do tecido adiposo visceral, aos 30 dias de vida; filhotes CON mães CON (filhotes controle provenientes de mães controle, n=8), filhotes CON mães CAF (filhotes controle provenientes de mães cafeteria, n=8), filhotes CAF mães CON (filhotes cafeteria provenientes de mães controle, n=8) e filhotes CAF mães CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria, n=5). **b)** Peso do tecido adiposo visceral, aos 120 dias de vida; filhotes CON mães CON (n=8), filhotes CON mães CAF (n=12), filhotes CAF mães CON (n=8) e filhotes CAF mães CAF (n=6). **c)** Peso do tecido adiposo retroperitoneal, aos 30 dias de vida; filhotes CON mães CON (n= 8), filhotes CON mães CAF (n=9), filhotes CAF mães CON (n=8) e filhotes CAF mães CAF (n=5). **d)** Peso do tecido adiposo retroperitoneal, aos 120 dias de vida; filhotes CON mães CON (n=7), filhotes CON mães CAF (n=12), filhotes CAF mães CON (n=8) e filhotes CAF mães CAF (n=6). Em todas as análises, os pesos do tecido adiposo dos filhotes CAF foram significativamente maiores (\* $P < 0,05$ ) do que os dos filhotes CON, independentemente do tratamento das mães analisada por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni.

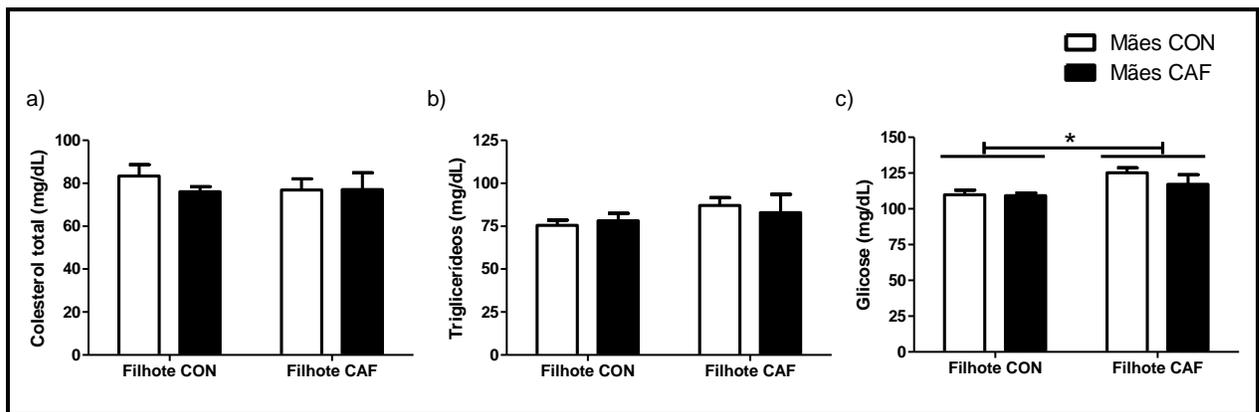
### 6.2.4. Análises bioquímicas

Aos 30 dias de vida, não houve diferença significativa nas concentrações de colesterol total, triglicerídeos e glicose (**Figura 13 a-c**), não tendo o tratamento dos filhotes ( $P=0,2130$ ,  $P=0,1430$ ,  $P=0,6605$ , respectivamente) e o das mães ( $P=0,4838$ ,  $P=0,1697$ ,  $P=0,7255$ , respectivamente) afetado os resultados, nem tampouco a interação entre eles ( $P=0,4659$ ,  $P=0,7063$ ,  $P=0,9549$ ).



**Figura 13: Concentração sérica de lipídeos e glicose dos filhotes machos na puberdade.** Dados expressos em média + E.P.M. **a)** Concentração sérica de colesterol total, aos 30 dias de vida; filhotes CON mães CON (filhotes controle provenientes de mães controle,  $n=8$ ), filhotes CON mães CAF (filhotes controle provenientes de mães cafeteria,  $n=12$ ), filhotes CAF mães CON (filhotes cafeteria provenientes de mães controle,  $n=7$ ) e filhotes CAF mães CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria,  $n=8$ ). **b)** Concentração sérica de triglicerídeos, aos 30 dias de vida; filhotes CON mães CON ( $n=8$ ), filhotes CON mães CAF ( $n=8$ ), filhotes CAF mães CON ( $n=6$ ) e filhotes CAF mães CAF ( $n=7$ ). **c)** Concentração sérica de glicose, aos 30 dias de vida; filhotes CON mães CON ( $n=8$ ), filhotes CON mães CAF ( $n=8$ ), filhotes CAF mães CON ( $n=7$ ) e filhotes CAF mães CAF ( $n=8$ ). Não houve efeito da dieta das mães e dos filhotes, tampouco da interação entre eles nas concentrações de colesterol total, triglicerídeos e glicose analisados nos grupos na puberdade.

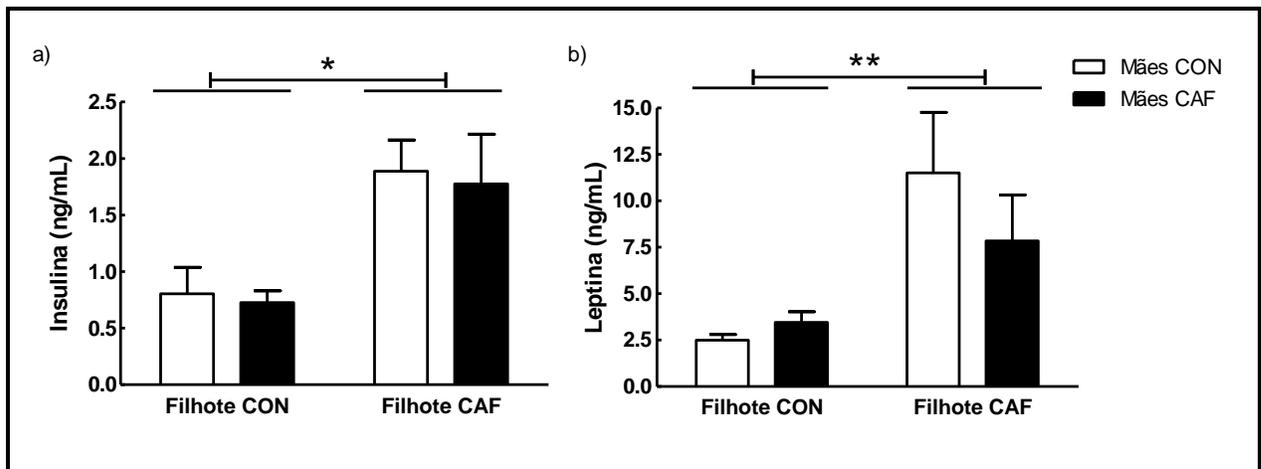
Aos 120 dias de vida, a concentração sérica de glicose apresentou-se mais elevada nos filhotes CAF ( $P=0,0041$ , **Figura 14c**), sem influência do tratamento das mães ( $P=0,2484$ ), e sem interação entre o tratamento dos filhotes e o das mães ( $P=0,3269$ ). Já as concentrações de colesterol total e triglicerídeos mostraram-se iguais entre os grupos na idade adulta (**Figura 14a,b**), não tendo o tratamento dos filhotes ( $P=0,5941$ ,  $P=0,1692$ , respectivamente) e o das mães ( $P=0,4951$ ,  $P=0,8926$ , respectivamente) influenciado os resultados, tampouco a interação entre eles ( $P=0,4625$ ,  $P=0,5554$ ).



**Figura 14: Concentração sérica de lipídeos e glicose dos filhotes machos na idade adulta.** Dados expressos em média + E.P.M. **a)** Concentração sérica de colesterol total, aos 120 dias de vida; filhotes CON mães CON (filhotes controle provenientes de mães controle,  $n=8$ ), filhotes CON mães CAF (filhotes controle provenientes de mães cafeteria,  $n=9$ ), filhotes CAF mães CON (filhotes cafeteria provenientes de mães controle,  $n=8$ ) e filhotes CAF mães CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria,  $n=6$ ). **b)** Concentração sérica de triglicerídeos, aos 120 dias de vida; filhotes CON mães CON ( $n=7$ ), filhotes CON mães CAF ( $n=9$ ), filhotes CAF mães CON ( $n=8$ ) e filhotes CAF mães CAF ( $n=6$ ). **c)** Concentração sérica de glicose, aos 120 dias de vida; filhotes CON mães CON ( $n=8$ ), filhotes CON mães CAF ( $n=9$ ), filhotes CAF mães CON ( $n=8$ ) e filhotes CAF mães CAF ( $n=6$ ). A concentração de glicose dos filhotes CAF foi significativamente maior ( $*P<0,05$ ) do que a dos filhotes CON independentemente do tratamento das mães, analisado por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni.

Não foi possível dosar os níveis circulantes de insulina e leptina dos filhotes de 30 dias de vida devido ao limite inferior de detecção dos kits ELISA utilizados ser maior do que a concentração das amostras.

Aos 120 dias de vida, os filhotes CAF apresentaram concentrações séricas de insulina ( $P=0,0005$ , **Figura 15a**) e de leptina ( $P=0,0020$ , **Figura 15b**) mais elevadas do que os filhotes CON, sem ter efeito da dieta materna ( $P=0,7231$  e  $P=0,4902$ , respectivamente) e sem ter interação entre os tratamentos dos filhotes e os das mães ( $P=0,9509$  e  $P=0,2411$ , respectivamente).



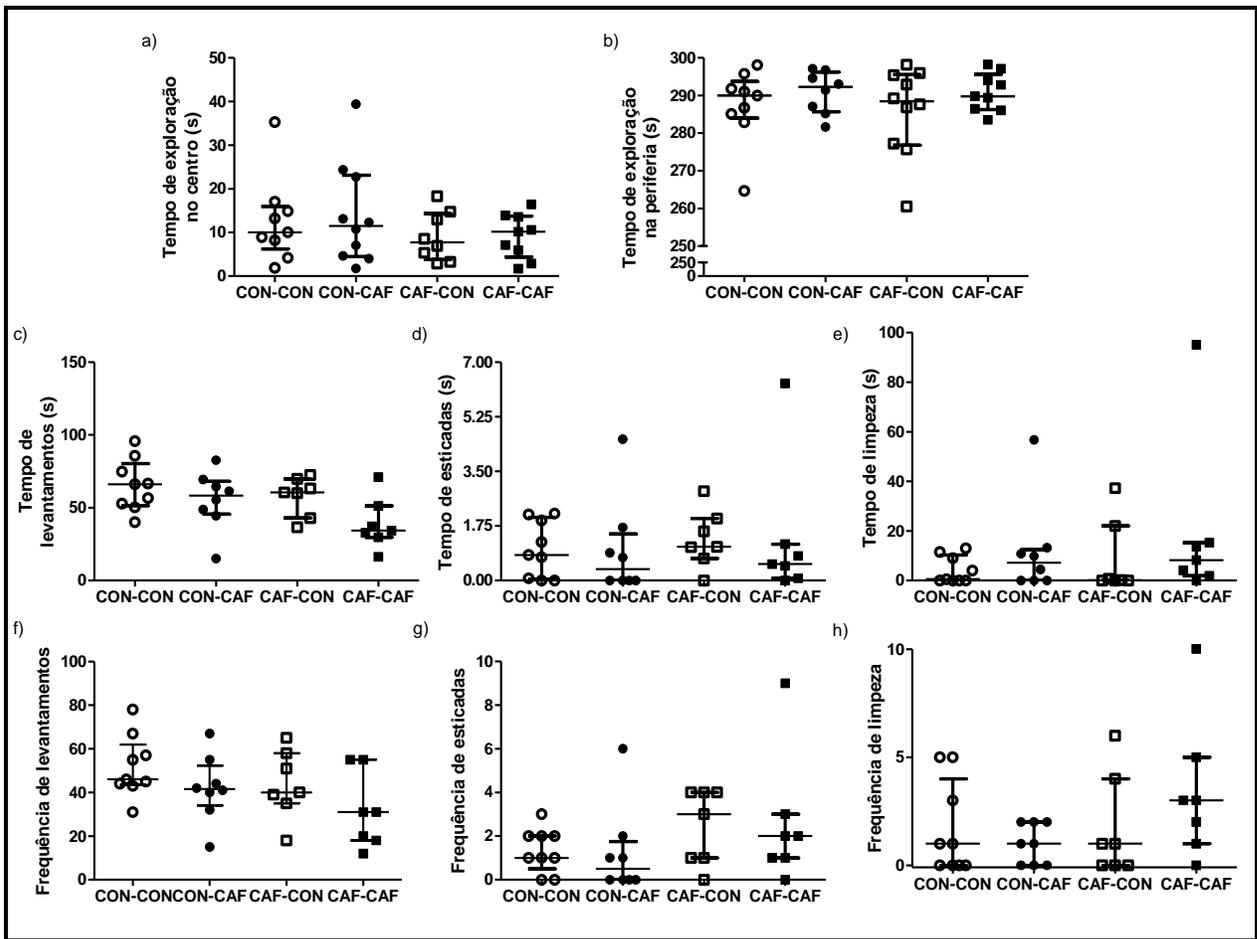
**Figura 15: Concentração sérica de insulina e plasmático de leptina dos filhotes machos na idade adulta.** Dados expressos em média + E.P.M. **a)** Concentração sérica de insulina, aos 120 dias de vida; filhotes CON mães CON (filhotes controle provenientes de mães controle,  $n=8$ ), filhotes CON mães CAF (filhotes controle provenientes de mães cafeteria,  $n=9$ ), filhotes CAF mães CON (filhotes cafeteria provenientes de mães controle,  $n=8$ ) e filhotes CAF mães CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria,  $n=7$ ). **b)** Concentração plasmática de leptina, aos 120 dias de vida; filhotes CON mães CON ( $n=5$ ), filhotes CON mães CAF ( $n=10$ ), filhotes CAF mães CON ( $n=6$ ) e filhotes CAF mães CAF ( $n=6$ ). As concentrações de insulina e de leptina dos filhotes CAF foram significativamente maiores ( $*P<0,05$ ) do que as dos filhotes CON independentemente do tratamento das mães (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

### 6.3. EFEITOS DA DIETA DE CAFETERIA NO COMPORTAMENTO DOS FILHOTES MACHOS

#### 6.3.1. *Comportamentos relacionados à Exploração e à Ansiedade*

##### 6.3.1.1. *Tarefa de Campo Aberto*

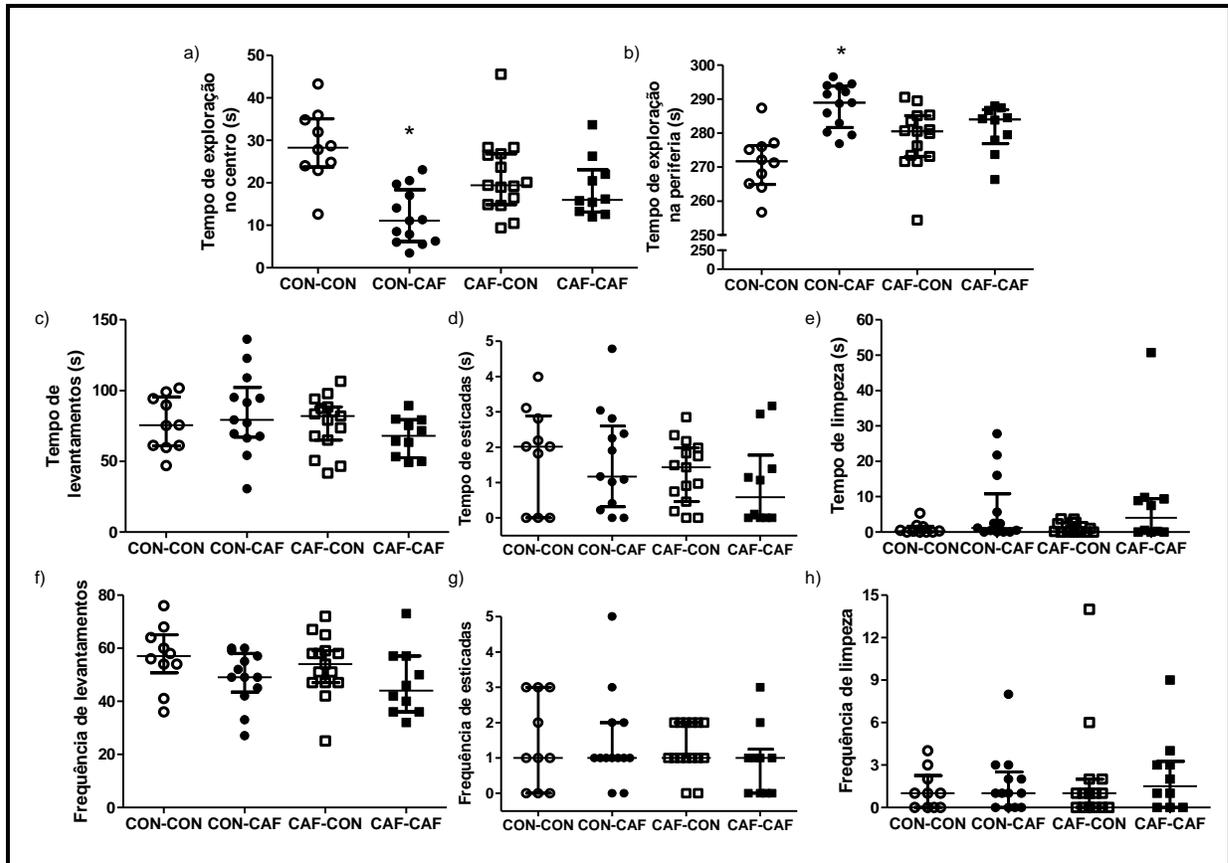
Aos 30 dias de vida, não houve diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento na frequência e no tempo dos comportamentos observados no Campo Aberto (**Figura 16a-h**). Não houve diferença entre os grupos no tempo gasto explorando os quadrantes centrais ( $P=0,8136$ ), no tempo gasto explorando os quadrantes periféricos ( $P=0,8136$ ), no tempo gasto para levantamentos ( $0,0718$ ), para esticadas ( $P=0,5805$ ) e para autolimpeza ( $P=0,4563$ ), na frequência de levantamentos ( $P=0,1207$ ), de esticadas ( $P=0,2926$ ) e de autolimpeza ( $P=0,3535$ ).



**Figura 16: Tempo e frequência de comportamentos no Campo Aberto na puberdade.** Dados expressos em mediana ± intervalos interquartis. CON-CON (filhotes controle provenientes de mães controle, n=9), CON-CAF (filhotes cafeteria provenientes de mães controle, n=8), CAF-CON (filhotes controle provenientes de mães cafeteria, n=10) e CAF-CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria, n=9). **a)** Tempo gasto explorando os quadrantes centrais. **b)** Tempo gasto explorando os quadrantes periféricos. **c)** Tempo gasto para levantamentos. **d)** Tempo gasto para esticadas. **e)** Tempo gasto para autolimpeza. **f)** Frequência de levantamentos. **g)** Frequência de esticadas. **h)** Frequência de autolimpeza. Através de análise estatística pela ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, não houve diferença entre os grupos de filhotes aos 30 dias de vida no tempo e na frequência dos comportamentos observados no Campo Aberto.

Aos 120 dias de vida, houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo gasto nos quadrantes centrais e nos periféricos ( $P=0,0003$ ). Os filhotes CON-CAF permaneceram significativamente mais tempo nos quadrantes periféricos, e, consequentemente, menos nos centrais, quando comparados com os CON-CON e CAF-CAF ( $P<0,05$ ) (**Figura 17a-b**). Não houve diferença entre os grupos no tempo gasto para

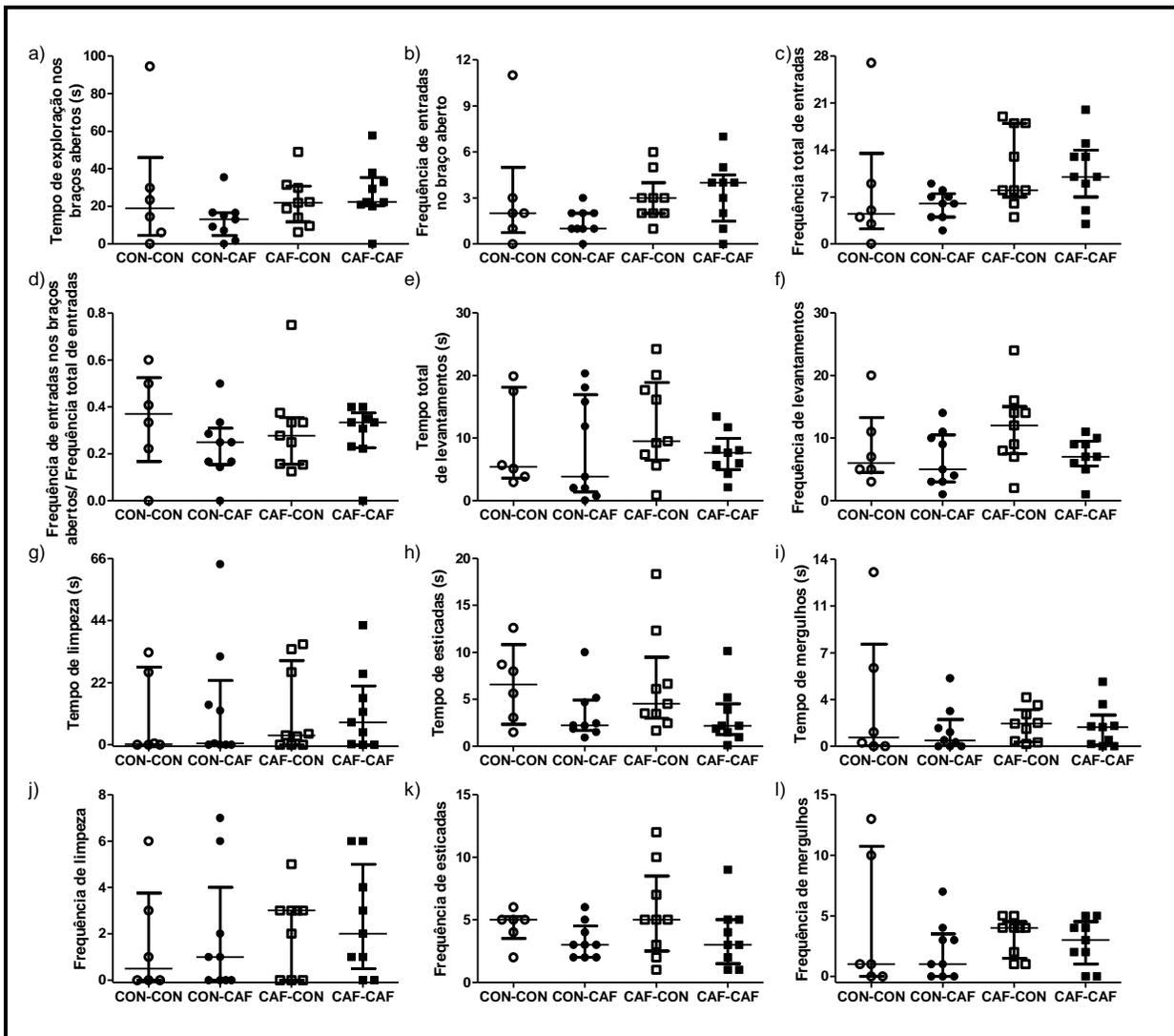
levantamentos ( $P=0,3420$ ), no tempo gasto para esticadas ( $P=0,4838$ ), no tempo gasto para autolimpeza ( $P=0,3531$ ), na frequência de levantamentos ( $P=0,1700$ ), na frequência de esticadas ( $P=0,6051$ ) e na frequência de autolimpeza ( $P=0,7444$ ) (**Figura 17c-h**).



**Figura 17: Tempo e frequência de comportamentos no Campo Aberto na idade adulta.** Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalos interquartis. CON-CON (filhotes controle provenientes de mães controle,  $n=10$ ), CON-CAF (filhotes cafeteria provenientes de mães controle,  $n=13$ ), CAF-CON (filhotes controle provenientes de mães cafeteria,  $n=15$ ) e CAF-CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria,  $n=10$ ). **a)** Tempo gasto explorando os quadrantes centrais. **b)** Tempo gasto explorando os quadrantes periféricos. **c)** Tempo gasto para levantamentos. **d)** Tempo gasto para esticadas. **e)** Tempo gasto para autolimpeza. **f)** Frequência de levantamentos. **g)** Frequência de esticadas. **h)** Frequência de autolimpeza. Através de análise estatística pela ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, os filhotes CON-CAF exploraram significativamente por mais tempo os quadrantes periféricos do Campo Aberto do que os centrais em comparação aos filhotes adultos CON-CON e CAF-CON ( $*P<0,05$ ) aos 120 dias de vida. Não houve diferença entre os grupos de filhotes nessa idade no tempo e na frequência dos demais comportamentos observados no Campo Aberto.

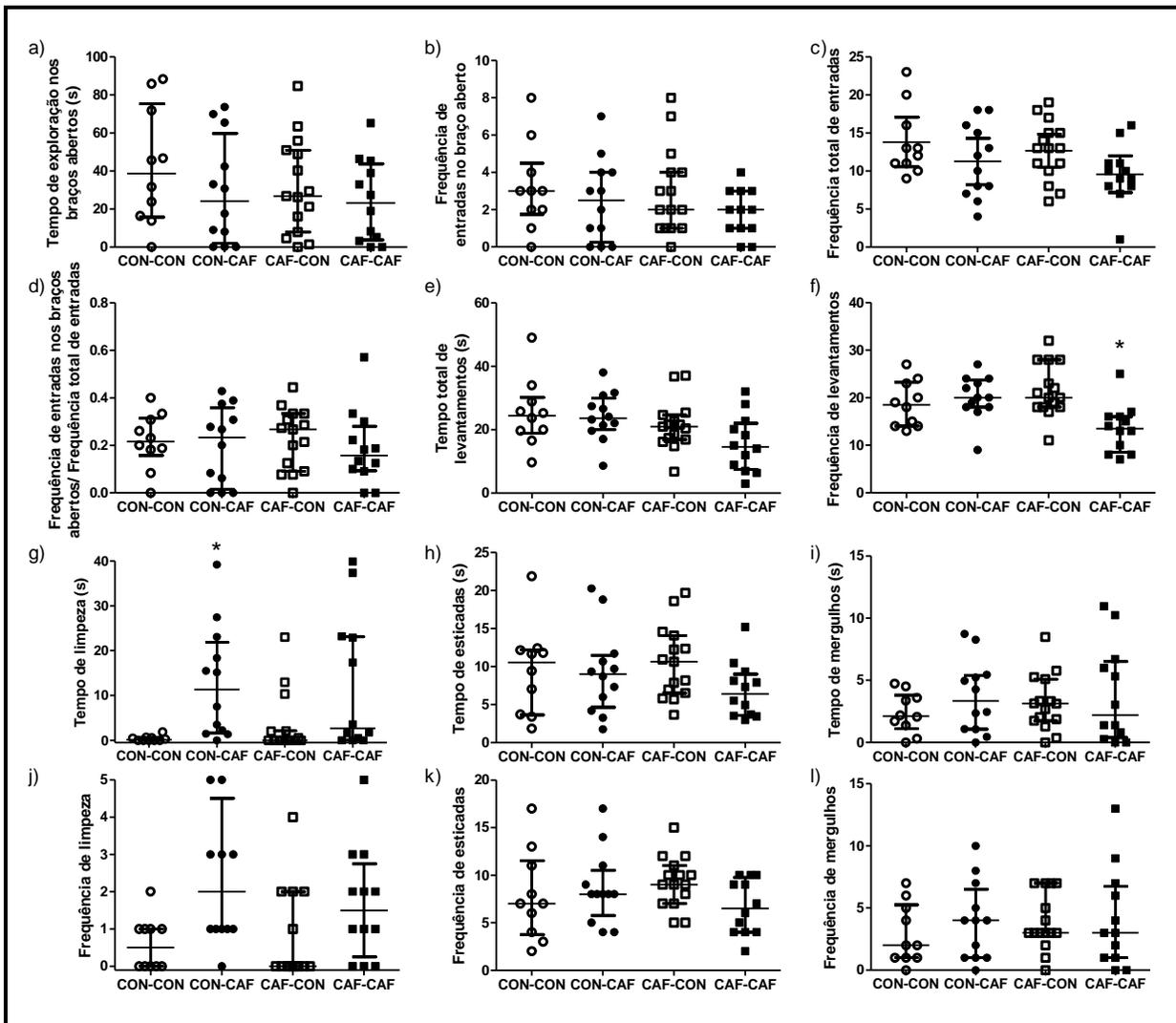
### **6.3.1.2. Tarefa de Labirinto em Cruz Elevado**

Aos 30 dias de vida, não foi encontrada diferença significativa entre os diferentes grupos de tratamento na frequência e no tempo dos comportamentos observados no Labirinto em Cruz Elevado(**Figura 18a-h**). Não houve diferença entre os grupos no tempo gasto explorando os braços abertos ( $P=0,1643$ ), na frequência de entradas nos braços abertos ( $P=0,0936$ ), na frequência total de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e na área central ( $P=0,0647$ ), na razão entre a frequência de entradas nos braços abertos e a frequência total de entradas ( $P=0,4890$ ), no tempo gasto para levantamentos ( $0,4911$ ), para esticadas ( $P=0,1028$ ), para mergulhos ( $P=0,7034$ ), para autolimpeza ( $P=0,8806$ ), na frequência de levantamentos ( $P=0,2282$ ), de esticadas ( $P=0,3165$ ), de mergulhos ( $P=0,4730$ ) e de autolimpeza ( $P=0,7499$ ).



**Figura 18: Tempo e frequência de comportamentos no Labirinto em Cruz Elevado na puberdade.** Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalos interquartis. CON-CON (filhotes controle provenientes de mães controle, n=6), CON-CAF (filhotes cafeteria provenientes de mães controle, n=9), CAF-CON (filhotes controle provenientes de mães cafeteria, n=9) e CAF-CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria, n=9). **a)** Tempo gasto explorando os braços abertos. **b)** Frequência de entradas nos braços abertos. **c)** Frequência total de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e na área central. **d)** Razão entre a frequência de entradas nos braços abertos e a frequência total de entradas. **e)** Tempo gasto para levantamentos. **f)** Frequência de levantamentos. **g)** Tempo gasto para autolimpeza. **h)** Tempo gasto para esticadas. **i)** Tempo gasto para mergulhos. **j)** Frequência de autolimpeza. **k)** Frequência de esticadas. **l)** Frequência de mergulhos. Através de análise estatística pela ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, não houve diferença entre os grupos aos 30 dias de vida no tempo e na frequência dos comportamentos observados no Labirinto em Cruz Elevado Aberto.

Aos 120 dias de vida, houve diferença significativa entre os tratamentos no tempo gasto para autolimpeza ( $P=0,0026$ ), na frequência de levantamentos ( $P=0,0020$ ), e na frequência de autolimpeza ( $P=0,0312$ ) no Labirinto em Cruz Elevado (**Figura 19**). Os filhotes CAF-CAF tiveram significativamente menos levantamentos, quando comparado com os filhotes CON-CAF e CAF-CON ( $P<0,05$ ), e os filhotes CON-CAF gastaram menos tempo limpando-se, ao serem comparados com os filhotes CON-CON e CAF-CON (**Figura 19f-g**). Não houve diferença entre os grupos no tempo gasto explorando os braços abertos ( $P=0,5389$ ), na frequência de entradas nos braços abertos ( $P=0,5267$ ), na frequência total de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e na área central ( $P=0,1384$ ), na razão entre a frequência de entradas nos braços abertos e a frequência total de entradas ( $P=0,8013$ ), no tempo gasto para levantamentos ( $P=0,0545$ ), para esticadas ( $P=0,2495$ ) e para mergulhos ( $P=0,8507$ ) e na frequência de esticadas ( $P=0,2093$ ) e de mergulhos ( $P=0,7828$ ).



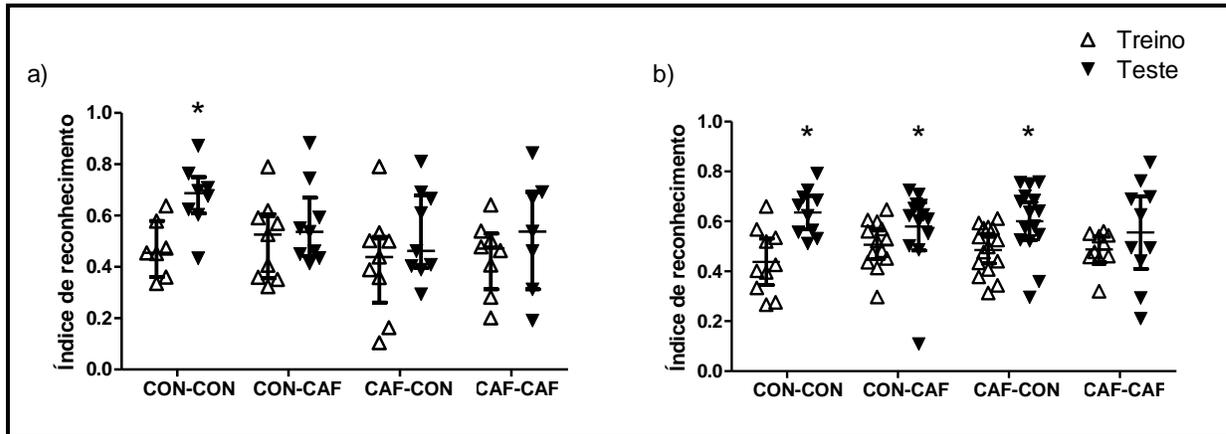
**Figura 19: Tempo e frequência de comportamentos no Labirinto em Cruz Elevado na idade adulta.**

Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalos interquartis. CON-CON (filhotes controle provenientes de mães controle,  $n=10$ ), CON-CAF (filhotes cafeteria provenientes de mães controle,  $n=12$ ), CAF-CON (filhotes controle provenientes de mães cafeteria,  $n=15$ ) e CAF-CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria,  $n=12$ ). **a)** Tempo gasto explorando os braços abertos. **b)** Frequência de entradas nos braços abertos. **c)** Frequência total de entradas nos braços abertos, nos braços fechados e na área central. **d)** Razão entre a frequência de entradas nos braços abertos e a frequência total de entradas. **e)** Tempo gasto para levantamentos. **f)** Frequência de levantamentos. **g)** Tempo gasto para autolimpeza. **h)** Tempo gasto para esticadas. **i)** Tempo gasto para mergulhos. **j)** Frequência de autolimpeza. **k)** Frequência de esticadas. **l)** Frequência de mergulhos. Pela ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, houve diferença significativa na frequência de autolimpeza ( $P=0,0026$ ). Através dos mesmos testes estatísticos, os filhotes adultos CAF-CAF tiveram frequência de levantamentos significativamente menor ( $*P<0,05$ ) do que os filhotes CON-CAF e CAF-CON. Através de análise estatística pela ANOVA Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn, os filhotes CON-CAF apresentaram tempo de autolimpeza significativamente maior ( $*P<0,05$ ) do que os filhotes CON-CON e CAF-CON. Não houve diferença entre os grupos no tempo e na frequência nos demais comportamentos observados no Labirinto em Cruz Elevado aos 120 dias de vida.

### **6.3.2. Comportamentos relacionados à Memória de Longo-Prazo**

#### **6.3.2.1. Tarefa de Reconhecimento de Objetos**

Aos 30 dias de vida, não houve diferença no índice de reconhecimento dos objetos entre os grupos experimentais, tanto no dia do treino ( $P=0,8505$ ; **Figura 20a**), quanto no dia do teste ( $P=0,3513$ ). Não houve diferença entre o índice de reconhecimento dentro dos grupos CON-CAF, CAF-CON e CAF-CAF ( $P=0,8438$ ,  $P=0,2754$ ,  $P=0,3750$ , respectivamente), quando comparados os dias de treino e de teste, com exceção dos filhotes CON-CON ( $P=0,0156$ ). Aos 120 dias de vida, não houve diferença no índice de reconhecimento dos objetos entre os grupos experimentais, tanto no dia do treino ( $P=0,4451$ ; **Figura 20b**), quanto no dia do teste ( $P=0,7986$ ). Houve diferença entre o índice de reconhecimento dentro dos grupos CON-CON, CON-CAF e CAF-CON ( $P=0,0098$ ,  $P=0,0215$ ,  $P=0,0103$ , respectivamente), quando comparados os dias de treino e de teste, e não houve diferença no grupo CAF-CAF ( $P=0,4922$ ).

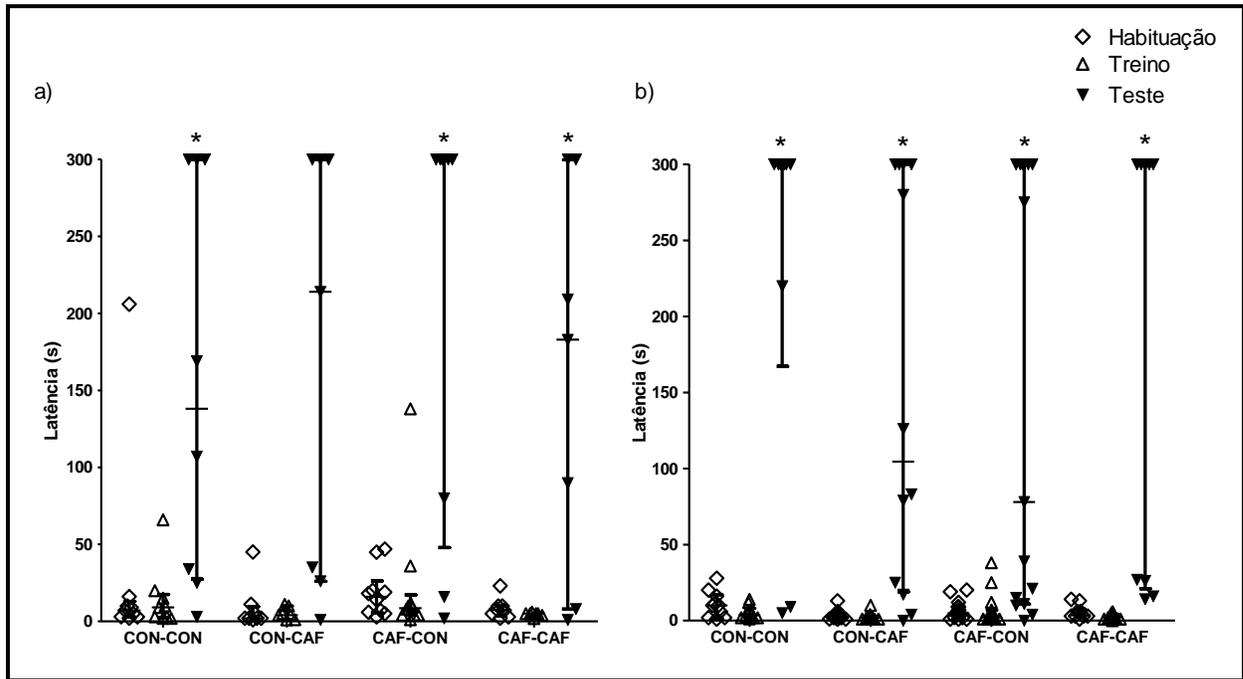


**Figura 20: Memória de reconhecimento dos filhotes machos na puberdade e na idade adulta.** Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalos interquartis. **a)** Memória de reconhecimento, aos 30 dias de vida; CON-CON (filhotes controle provenientes de mães controle,  $n=9$ ), CON-CAF (filhotes cafeteria provenientes de mães controle,  $n=9$ ), CAF-CON (filhotes controle provenientes de mães cafeteria,  $n=10$ ) e CAF-CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria,  $n=7$ ). **b)** Memória de reconhecimento, aos 120 dias de vida; CON-CON ( $n=10$ ), CON-CAF ( $n=13$ ), CAF-CON ( $n=15$ ) e CAF-CAF ( $n=9$ ). Através de análise estatística pela ANOVA Kruskal-Wallis, não houve diferença no índice de reconhecimento entre os grupos nos dias de treino e de teste em ambas as idades. Na puberdade, o índice de reconhecimento dos filhotes CON-CON no dia do treino foi significativamente diferente ( $*P<0,05$ ) do que no dia do teste com o teste de Wilcoxon. Na idade adulta, o mesmo teste estatístico mostrou que todos os grupos apresentaram diferença significativa no índice de reconhecimento entre o dia do treino e o do teste ( $*P<0,05$ ), com exceção dos filhotes CAF-CAF.

### 6.3.2.2. Tarefa de Esquiva Inibitória Step-Down

Aos 30 dias de vida, não houve diferença nas latências de descida da plataforma da esquiva inibitória entre os grupos experimentais no dia da habituação ( $P=0,0822$ ), no dia do treino ( $P=0,4867$ ) e no dia do teste ( $P=0,7456$ ). Houve diferença entre as latências de descida da plataforma dentro dos grupos CON-CON, CAF-CON e CAF-CAF ( $P=0,0156$ ,  $P=0,0078$ ,  $P=0,0313$ ), quando comparados os dias de treino e de teste, com exceção dos filhotes CON-CAF ( $P=0,0625$ , **Figura 21a**). Aos 120 dias de vida, as latências de descida da plataforma da esquiva inibitória não apresentaram diferença entre os grupos experimentais no dia da habituação ( $P=0,1760$ ), no dia do treino ( $P=0,2676$ ) e no dia do teste ( $P=0,4785$ ). Houve diferença entre as latências de descida da platafor-

ma dentro de todos os grupos CON-CON, CON-CAF, CAF-CON e CAF-CAF ( $P=0,0039$ ,  $P=0,0010$ ,  $P=0,0003$ ,  $P=0,0078$ ), quando comparados os dias de treino e de teste (**Figura 21b**).



**Figura 21: Memória de esquiva inibitória *Step-Down* dos filhotes machos na puberdade e na idade adulta.** Dados expressos em mediana  $\pm$  intervalos interquartis. **a)** Memória de esquiva inibitória, aos 30 dias de vida; CON-CON (filhotes controle provenientes de mães controle,  $n=8$ ), CON-CAF (filhotes cafeteria provenientes de mães controle,  $n=7$ ), CAF-CON (filhotes controle provenientes de mães cafeteria,  $n=9$ ) e CAF-CAF (filhotes cafeteria provenientes de Mães cafeteria,  $n=7$ ). **b)** Memória de esquiva inibitória, aos 120 dias de vida; CON-CON ( $n=10$ ), CON-CAF ( $n=12$ ), CAF-CON ( $n=15$ ) e CAF-CAF ( $n=9$ ). Através de análise estatística pela ANOVA Kruskal-Wallis, não houve diferença na latência de descida entre os grupos nos dias de habituação, treino e teste em ambas as idades. Em ambas as idades, a latência de descida da plataforma da esquiva inibitória foi maior no dia do teste do que as dos dias da habituação e do treino em todos os grupos ( $*P<0,05$ ) analisados pelo teste de Wilcoxon, com exceção dos filhotes CON-CAF aos 30 dias de vida.

## 7. DISCUSSÃO

Confirmando a hipótese proposta, a obesidade materna modulou alguns comportamentos (prejuízo na memória de longo-prazo) da prole na puberdade. Entretanto, a ingestão de dieta de cafeteria feita diretamente pelos filhotes, independentemente da dieta da mãe, provocou mais alterações bioquímicas (maior glicemia, insulinemia e leptinemia na idade adulta) e comportamentais (menor ansiedade e locomoção e prejuízo na memória de longo-prazo na puberdade). Além disso, pode-se observar efeito cumulativo da exposição à dieta de cafeteria no período pré e pós-natal (alteração do peso corporal total e maior comprometimento da memória de longo-prazo nos filhotes CAF-CAF na idade adulta).

### 7.1. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À DIETA DE CAFETERIA NAS MÃES

As fêmeas que ingeriram dieta de cafeteria desenvolveram um perfil corporal e metabólico característico de obesidade. Isso pode ser observado pelo aumento significativo do peso corporal, do tecido adiposo e das concentrações circulantes de colesterol total, insulina e leptina das ratas tratadas com dieta de cafeteria, em comparação às ratas controle. Entretanto, não houve diferença significativa nas concentrações circulantes de glicose e triglicerídeos entre os dois grupos de tratamento.

A indução à obesidade através da ingestão de dieta de cafeteria influenciou notavelmente o peso corporal dos animais, pois houve aumento com o decorrer do experimento, e tornou-se significativo a partir da 12<sup>a</sup> semana até o final do tratamento, na 27<sup>a</sup> semana de tratamento, quando os animais apresentaram um peso corporal 9,79%

maior do que os animais controle. Esse acréscimo sustentado do peso corporal foi acompanhado pelo aumento de peso do tecido adiposo visceral e retroperitoneal nos animais submetidos à dieta de cafeteria. Mesmo que não tenha sido analisada, acredita-se que as fêmeas do grupo cafeteria tenham tido uma ingestão calórica aumentada, em comparação ao grupo controle, como está bem fundamentado em estudos de indução de obesidade por meio de dietas hipercalóricas (Sampey *et al*, 2011; Sclafani *et al*, 1976). Os mesmos estudos também relatam que a ingestão excessiva de energia implica aumento do peso corporal e aumento do peso do tecido adiposo, como foi observado neste trabalho. Esse efeito pode ser explicado por uma hipertrofia nos adipócitos como resultado do aumento da deposição de lipídeos e carboidratos advindos da dieta hipercalórica (Goularte *et al*, 2012).

Embora os níveis de triglicerídeos das fêmeas do grupo cafeteria tenham se apresentado iguais aos das fêmeas controle, os níveis de colesterol total apresentaram-se significativamente maiores. O valor da trigliceridemia de mães obesas é muito contraditório entre os trabalhos existentes até o momento. Assim como este trabalho, alguns autores não encontraram diferença em seus níveis (Akyol *et al*, 2009; Nivoit *et al*, 2009; Samuelsson *et al*, 2008; Vanzela *et al*, 2010), enquanto que outros estudos relataram aumento significativo de triglicerídeos em fêmeas obesas, em comparação aos de controles (Chen *et al*, 2008; Jones *et al*, 2009; Rajia *et al*, 2010a; Shankar *et al*, 2008). Uma possível explicação é porque a combinação de alimentos que compõem a dieta de cafeteria é muito distinta entre os trabalhos. Alguns estudos que relataram diferença na trigliceridemia utilizaram uma dieta de cafeteria composta por pouca variedade de itens altamente ricos em carboidratos, como leite condensado e sacarose, porém, não tão abundante em lipídeos (Chen *et al*, 2008; Jones *et al*, 2009; Rajia *et al*, 2010a;

Shankar *et al*, 2008). É bem documentado que o excesso de carboidratos é convertido em triglicerídeos (Macdonald, 1973), justificando o achado de trigliceridemia elevada nos trabalhos citados. Neste trabalho, assim como alguns estudos em que não foi encontrada elevação da trigliceridemia (Akyol *et al*, 2009; Vanzela *et al*, 2010), utilizou-se uma dieta de cafeteria rica em variedade e com altos níveis de carboidratos e de lipídeos. Pode-se supor, portanto, que as mães do grupo cafeteria deste trabalho tenham ingerido menos alimentos ricos em carboidratos e mais em lipídeos. Outro dado que endossa essa sugestão é o aumento da colesterolemia nas fêmeas obesas. Uma possível razão para o aumento da colesterolemia é a existência de alimentos palatáveis de origem animal na dieta de cafeteria oferecida neste estudo, como presunto, salame e linguiça, e, conseqüentemente, pela maior absorção de colesterol pelo intestino, que permanece circulante no plasma, além de se acumular nos adipócitos e em outros tecidos corporais. Outro trabalho que também encontrou aumento dos níveis de colesterol utilizou bacon como um item da dieta de cafeteria ofertada aos animais (Bouanane *et al*, 2009). Os trabalhos que não relataram diferença da colesterolemia utilizaram gordura animal saturada misturada aos outros alimentos (Chen *et al*, 2008; Jones *et al*, 2009; Nivoit *et al*, 2009; Shankar *et al*, 2008), o que provavelmente não os tornou palatáveis, ou não utilizaram itens ricos em lipídeos (Vanzela *et al*, 2010), o que possivelmente justifica a ausência de aumento de colesterol. Portanto, acredita-se que as fêmeas do grupo cafeteria deste trabalho consumiram mais os alimentos ricos em colesterol do que os ricos em triglicerídeos e carboidratos. Contudo, isso não pode ser afirmado, pois não foi feita a análise de preferência alimentar desses animais.

As concentrações de glicose de jejum foram mantidas em valores semelhantes aos animais controle, porém a insulinemia de jejum apresentou-se elevada ao final do

tratamento. Essa elevação na concentração plasmática de insulina de jejum provavelmente tenha sido um mecanismo compensatório encontrado pelo organismo para manter as concentrações de glicose adequadas em um estado de menor sensibilidade à insulina (Funk, 2007), sendo possível inferir que esses animais apresentavam uma resistência à insulina (Matthaei *et al*, 2000), como evidenciado em outros estudos (Holemans *et al*, 2004). A ingestão de alimentos de elevado índice glicêmico e lipídico, como os componentes da dieta de cafeteria, estimula a maior liberação de insulina no momento pós-prandial devido ao aumento da glicemia (Goularte *et al*, 2012; Siraj, 2010). Ademais, a hiperinsulinemia diminui a sensibilidade à insulina, e o aumento do tecido adiposo observado nesses animais que ingeriram dieta de cafeteria, pode também ter influenciado na provável resistência à insulina, já que este é reconhecido por secretar moléculas reguladoras da homeostase energética, como a leptina (Shuldiner *et al*, 2001). Logo, tanto a ingestão de alimentos hipercalóricos quanto o tecido adiposo em excesso podem ter contribuído para a resistência insulínica observada nas fêmeas tratadas por dieta de cafeteria.

Os níveis de leptina também se mostraram maiores nas fêmeas do grupo cafeteria do que nas controles. Isso pode ser explicado pela quantidade maior de tecido adiposo encontrado nas mães do grupo cafeteria, já que é o local do corpo que mais secreta esse hormônio. Esse achado vai ao encontro dos resultados encontrados por vários pesquisadores, mostrando que, em indivíduos obesos, a leptina aumentada não induz o gasto da energia acumulada nos depósitos corporais, pois o organismo encontra-se resistente à sua ação (Shuldiner *et al*, 2001), justificando o aumento de gordura ao longo do tempo (Ricci *et al*, 2011). Além disso, mesmo não tendo sido registrado

neste experimento, sabe-se que o comportamento alimentar dos sujeitos com obesidade e resistentes à leptina, com o passar do tempo, encontra-se cada vez mais desregulado, apresentando consumo energético aumentado e colaborando para o ganho de peso corporal (Jung *et al*, 2013; Ricci *et al*, 2011).

Mesmo que a insulina e a leptina tenham sido dosadas em um período pós-gestação, exatamente no dia posterior ao desmame das ninhadas, acredita-se que já se encontravam elevadas no período da prenhez, pois a gestação é uma condição em que fisiologicamente ocorrem mudanças metabólicas que promovem resistência a esses hormônios, como encontrado em estudos realizados em humanos e em outros animais (Dahlgren, 2006; Grattan *et al*, 2007; Trujillo *et al*, 2008; Trujillo *et al*, 2011). Além disso, estudos realizados com fêmeas obesas com ingestão de dietas hipercalóricas constataram hiperinsulinemia e hiperleptinemia durante a gestação (Jones *et al*, 2009; Nivoit *et al*, 2009; Samuelsson *et al*, 2008). Com essas evidências, pode-se sugerir que as fêmeas do grupo cafeteria já apresentavam, pelo menos, hiperinsulinemia e hiperleptinemia quando prenhas e, por isso, seus filhotes provavelmente foram expostos no período fetal a um ambiente metabolicamente alterado.

## **7.2. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO À CAFETERIA NOS FILHOTES MACHOS**

Os filhotes iniciaram seus tratamentos aos 21 dias de idade com pesos corporais iguais, mostrando que a ingestão de dieta de cafeteria pelas mães antes de engravidarem e durante a gestação e a lactação não afetou o peso corporal total dos filhotes. Esse dado também foi encontrado em outros estudos (Akyol *et al*, 2011; Bayol *et al*, 2005;

Samuelsson *et al*, 2008; Wright *et al*, 2011b). Contudo, não se pode afirmar que a composição corporal dos filhotes encontrava-se igual nessa idade, pois estudos evidenciaram que já no desmame os ratos de mães alimentadas pela dieta de cafeteria exibem atrofia muscular acompanhada de acúmulo lipídico intramuscular e aumento do peso do tecido adiposo, além de alterações na secreção e expressão de marcadores de crescimento envolvidos na sensibilidade à insulina, caracterizando uma modificação da estrutura corpórea (Bayol *et al*, 2005; Benkalfat *et al*, 2011). Neste trabalho, porém, esses fatores não foram investigados no desmame dos filhotes. Além disso, os dados de peso corporal e do tecido adiposo coletados na puberdade, que serão discutidos a seguir, sugerem que as prováveis alterações estruturais e metabólicas da época do desmame não permaneceram até a puberdade, pois, possivelmente, a dieta que o próprio filhote ingeriu tenha interagido com essas modificações que a dieta da mãe provavelmente provocou.

A ingestão calórica total dos filhotes que ingeriram dieta controle e que eram filhotes de mães que ingeriram dieta de cafeteria (CAF-CON) se mostrou semelhante, desde o início até o final do registro, à dos filhotes que ingeriram dieta controle e que eram descendentes de mães controle (CON-CON). Na literatura, vários foram os estudos que tentaram investigar a influência da alimentação hipercalórica materna no comportamento alimentar dos filhotes e os resultados encontrados são contraditórios. Há os que não encontram diferenças na ingestão calórica (Akyol *et al*, 2011; Bayol *et al*, 2007; Shankar *et al*, 2008; Wright *et al*, 2011a), como foi observado neste trabalho, porém há os que registraram um consumo energético maior nos filhotes controles procedentes de mães que ingeriram dietas hipercalóricas (Nivoit *et al*, 2009; Samuelsson *et al*, 2008).

Os procedimentos metodológicos de cada um dos trabalhos citados e deste trabalho possuem muitas diferenças. Por exemplo, na idade dos animais e na duração do tratamento, na idade das mães no início do tratamento e na composição da dieta de cafeteria, o que impede que sejam feitas comparações muito rigorosas entre eles. Além disso, nenhum dos trabalhos citados tomou a precaução de evitar a exposição desses filhotes à dieta da mãe durante a lactação, diferentemente deste trabalho. Entretanto, os dois trabalhos que conseguiram evidenciar diferença na quantidade de calorias ingeridas utilizaram uma dieta de cafeteria composta apenas por leite condensado e *pellet* enriquecido com gordura e açúcar (Nivoit *et al*, 2009; Samuelsson *et al*, 2008), enquanto que a dieta hipercalórica dos estudos que não encontraram essa diferença possuía uma grande variedade de alimentos (Akyol *et al*, 2011; Bayol *et al*, 2007; Wright *et al*, 2011a), assim como neste trabalho.

Acredita-se que os filhotes que foram expostos à dieta de cafeteria (CAF-CAF) apenas no período pré-natal e lactação não apresentaram uma ingestão aumentada de calorias pelo fato de não terem sido expostos a alimentos ricos em gordura e carboidratos no período pós-desmame. Esse dado contradiz evidências de que filhotes de mães que ingeriram dietas hipercalóricas pelo menos no período da gestação apresentam preferência a alimentos hiperlipídicos e ricos em carboidratos (Bayol *et al*, 2007; Ong *et al*, 2011). Uma possível explicação para o achado deste trabalho é que os alimentos palatáveis que promoveriam o aumento de ingestão energética foram removidos nos animais do grupo controle e que eram descendentes de mães cafeteria (tiveram acesso apenas à ração), apresentando ingestão calórica reduzida em comparação aos filhotes das mesmas mães obesas, mas que também tiveram acesso à dieta de cafeteria (CAF-

CAF), e igual aos filhotes controle de mãe controle. Isso indica que a palatabilidade é influenciada pela ingestão e pelo estado metabólico materno durante o período pré-natal e é um fator muito importante para determinar o consumo energético da prole ao longo da vida (Mennella, 2006; Trabulsi *et al*, 2012).

Desde o início do registro, o consumo energético dos filhotes que ingeriram dieta de cafeteria e que vieram de mães controle (CON-CAF) apresentou-se maior do que o dos filhotes controle de mãe controle (CON-CON). A diferença se deve ao fato de a dieta de cafeteria ser composta por itens hipercalóricos e de o consumo de ração padrão reduzir-se progressivamente nos animais alimentados por essa dieta, conforme mostrado em outros trabalhos (Bayol *et al*, 2007; Goularte *et al*, 2012; Prats *et al*, 1989; Shafat *et al*, 2009). Os filhotes que tiveram exposição à dieta de cafeteria desde o período fetal até a idade adulta apresentaram uma ingestão calórica sempre superior aos filhotes controle, porém também sempre igual aos filhotes que ingeriram dieta de cafeteria a partir do desmame, da mesma forma que em alguns estudos (Akyol *et al*, 2011; Ong *et al*, 2011; Shankar *et al*, 2008). Uma justificativa para tal achado é que a leptina materna aumentada, principalmente no leite materno, contribuiu para um não aumento de ingestão calórica significativo, em relação aos filhotes que passaram a ingerir dieta de cafeteria a partir do desmame, como evidenciado em alguns trabalhos (Picó *et al*, 2007; Sánchez *et al*, 2008). Mesmo que a qualidade do leite materno não tenha sido analisada, existe a possibilidade de que a provável hiperleptinemia durante a gestação e lactação e no leite materno das mães do grupo cafeteria tenha contribuído para o não aumento de consumo energético desses animais, em comparação aos filhotes que ingeriram dieta de cafeteria a partir do desmame (CON-CAF).

Supõe-se, também, que seja em consequência da não elevação do consumo calórico nos animais que foram expostos à dieta de cafeteria apenas no período pré-natal e de lactação (CAF-CON) que os pesos corporal e do tecido adiposo tenham se mostrado iguais aos dos filhotes controle, tanto na puberdade quanto na idade adulta. Esses dados estão de acordo aos encontrados em alguns trabalhos (Akyol *et al*, 2011; Wright *et al*, 2011a).

O peso corporal total dos filhotes que foram expostos à dieta de cafeteria somente a partir do desmame apresentou-se igual ao dos controles na puberdade, sugerindo que a ingestão calórica nessa fase talvez ainda não estivesse alta o bastante para influenciar na massa corporal total. Contudo, ainda na puberdade, o peso do tecido adiposo já se apresentava significativamente maior do que o dos filhotes controle, e, assim permaneceu na idade adulta. Esse resultado sugere que, pelo menos na puberdade, embora o corpo tenha um peso total igual, a sua composição não é a mesma, o que está de acordo com estudos que encontraram aumento da massa gorda e diminuição da massa magra em indivíduos com hábitos alimentares hipercalóricos (Bayol *et al*, 2005; Benkalfat *et al*, 2011). Além disso, mostra a rápida velocidade com que o tecido adiposo cresceu (em apenas 9 dias de tratamento, entre o desmame e a puberdade) influenciado pela ingestão da dieta de cafeteria, o que provavelmente não tenha ocorrido da mesma forma no tecido muscular, justificando a semelhança no peso corporal total. Porém, não é possível afirmar tal diferença entre peso de massa magra e peso de massa gorda, pois não foi feita a comparação entre elas neste trabalho. Nesse mesmo grupo, na idade adulta, o peso corporal total e o peso do tecido adiposo mostraram-se maiores do que o dos filhotes que ingeriram dieta controle, também descendentes de

mães controle, evidenciando que a dieta de cafeteria teve um efeito obesogênico nesses animais (Rothwell *et al*, 1979; Shafat *et al*, 2009).

No grupo que foi exposto à dieta de cafeteria desde o período pré-natal até a idade adulta (CAF-CAF), o peso corporal total na puberdade foi igual aos outros três grupos de tratamento. Entretanto, ainda nessa idade, já apresentavam maior peso de tecido adiposo do que os dos filhotes que ingeriram dieta controle, independentemente da dieta das mães, e igual aos dos filhotes que ingeriram dieta de cafeteria apenas a partir do desmame (CON-CAF), evidenciando, novamente, que a composição corporal dos grupos que ingerem dieta de cafeteria não é a mesma dos controles, mesmo que o peso corporal total seja igual. Na idade adulta, o peso corporal total apresentou-se igual ao dos filhotes que ingeriram dieta controle, independentemente da ingestão materna, e menor do que o dos filhotes que ingeriram dieta de cafeteria a partir do desmame (CON-CAF). Porém, o peso do tecido adiposo apresentaram-se maiores do que os dos filhotes controle, independentemente da dieta das mães, e iguais ao dos filhotes que ingeriram dieta de cafeteria apenas a partir do desmame.

Esses dados surpreendentes na idade adulta dos filhotes que foram expostos à dieta de cafeteria desde o período fetal até a idade adulta (CAF-CAF) podem ser comentados de várias formas. A primeira teoria, como discutido anteriormente, é que a provável leptina materna aumentada, principalmente no leite materno, contribuiu para uma resistência à obesidade, impedindo um aumento significativo de ingestão calórica (Picó *et al*, 2007; Sánchez *et al*, 2008), em relação aos filhotes que passaram a ingerir dieta de cafeteria a partir do desmame (CON-CAF), e evitando que ocorresse um aumento significativo de peso corporal total em relação a todos os grupos de tratamen-

to. Porém, o dado de aumento de tecido adiposo nesses animais reforça ainda mais a conclusão de que a composição corporal dos sujeitos com ingestão calórica aumentada não é a mesma que a dos animais controle. Mais importante, porém, é que sugere que a dieta materna hipercalórica tem um efeito que se soma ao da ingestão hipercalórica de sua prole sobre a estrutura corporal, aumentando ainda mais a massa gorda em relação à massa magra e possivelmente reduzindo ainda mais a massa magra (Bayol *et al*, 2005; Ong *et al*, 2011).

Esses dados se opõem aos resultados de muitos estudos que observaram que a dieta materna hipercalórica aumenta a suscetibilidade da prole à obesidade (Bayol *et al*, 2007; Samuelsson *et al*, 2008; Shankar *et al*, 2008), porém são consistentes com descobertas de estudos recentes (Howie *et al*, 2009; Ong *et al*, 2011). Esses estudos, da mesma forma que este trabalho, descreveram que proles nascidas de mães que consumiram dieta hipercalórica são, de certa forma, protegidas contra a indução à obesidade. Esses resultados sugerem que a exposição à dieta hipercalórica *in utero* pode estar conferindo uma maior habilidade para lidar com um ambiente também rico em calorias após o nascimento, sendo uma forma de resposta preditiva adaptativa a essa exposição a níveis altos de lipídeos e carboidratos durante a vida fetal e pós-natal (Gluckman *et al*, 2004a, b).

Os níveis circulantes de colesterol total, triglicerídeos e glicose dos filhotes que foram expostos à dieta de cafeteria apenas durante o período fetal e a lactação (CAF-CON) encontram-se semelhantes aos do grupo que ingeriram dieta controle e que eram descendentes de mães controle (CON-CON) nas duas idades analisadas, além de não haver diferença na insulinemia e leptinemia entre os dois grupos na idade adulta. Até o

presente momento, resultados semelhantes foram encontrados em poucos estudos (Akyol *et al*, 2011; Nivoit *et al*, 2009; Samuelsson *et al*, 2008) e, mesmo assim, em nem todas as condições dos trabalhos citados foram relatados os mesmos dados. Porém, essas descobertas evidenciam ainda mais que, mesmo sendo filhos de mães induzidas à obesidade e provavelmente tendo sofrido programação metabólica para se tornarem obesos, a ingestão de dieta padrão impediu a expressão de um fenótipo metabólico característico da obesidade.

Os filhotes que passaram a consumir a dieta de cafeteria a partir do desmame tiveram resultados semelhantes na puberdade, pois não foram encontradas alterações de colesterol, triglicerídeos e glicose circulantes. Já na idade adulta, embora as concentrações de triglicerídeos e colesterol estivessem iguais às dos filhotes controle, a glicemia apresentou-se elevada em relação aos filhotes controle, assim como a insulinemia e a leptinemia, confirmando o achado de resistência à leptina e à insulina e de intolerância à glicose em animais através da ingestão da dieta de cafeteria (Castell-Auví *et al*, 2012; Sampey *et al*, 2011). Esses dados refutam a hipótese de uma interferência da obesidade materna e sua interação com a dieta do filhote no estado metabólico da descendência, dando maior importância às escolhas alimentares da própria geração nos parâmetros bioquímicos analisados.

A exposição à dieta de cafeteria apenas durante a gestação e a lactação (CAF-CON) comprometeu o desempenho em tarefas relacionadas à memória de longo-prazo na puberdade, mas não na idade adulta. Os filhotes desse grupo não apresentaram modificações de comportamento nas tarefas relacionadas à exploração e à ansiedade em nenhuma das fases observadas (puberdade e idade adulta), mostrando que prova-

velmente apenas a capacidade de aprendizado e memória ficou comprometida. Esse comprometimento foi evidenciado durante a puberdade apenas na tarefa de Reconhecimento de Objetos, e não de Esquiva Inibitória, sugerindo que a região encefálica mais comprometida pela obesidade materna provavelmente tenha sido o hipocampo (Baker *et al*, 2002; Clark *et al*, 2000), mas não tanto a amígdala e outras áreas também envolvidas com a memória aversiva (Coelho *et al*, 2011).

Até o momento, este é o primeiro estudo divulgando que filhotes que ingeriram dieta controle e que eram descendentes de mães obesas não apresentam alterações de ansiedade e exploração. O trabalho de Bilbo, 2010 (Bilbo *et al*, 2010) mostrou que os filhotes adultos de mães que ingeriram dieta rica em gordura saturada eram mais ansiosos do que os de mães que ingeriram dieta pobre em gordura. Por outro lado, Wright, 2011 (Wright *et al*, 2011b) encontrou um efeito ansiolítico na prole de mães que ingeriram dieta de cafeteria, tanto na pré-gestação, quanto durante a prenhez e a lactação. As possíveis explicações para os diferentes achados são que, no estudo de Bilbo (2010) a dieta hipercalórica oferecida para as mães era de diferente composição da dieta deste estudo. Além disso, não há comparação com um grupo controle e sim com um grupo que ingeriu uma dieta pobre em lipídeos. Já em Wright, 2011, mesmo que a composição da dieta hipercalórica e outros procedimentos experimentais sejam muito semelhantes aos deste estudo, não é apresentada a análise dos dados entre os grupos de filhotes controle descendentes de mãe de dieta padrão e os descendentes de mãe de dieta cafeteria. O que Wright e colaboradores (2011) comparam é a influência da dieta de cafeteria em três diferentes fases (pré-gestação, gestação e lactação), porém em nenhum momento fazem a comparação da interação entre as fases. Por isso, os

grupos dieta padrão e dieta cafeteria “puros”, ou seja, os filhotes cujas mães não tiveram alteração de dieta na gestação e lactação, não foram analisados entre si, o que impossibilita serem feitas comparações com os resultados deste trabalho. Trabalhos sobre o comportamento exploratório de prole de mães submetidas a dietas indutoras de obesidade também são escassos e mostram resultados que contrariam os desse estudo. Wright e Tozuka (Tozuka *et al*, 2010; Wright *et al*, 2011b) mostraram que, na idade adulta, os filhotes de mães obesas apresentaram atividade locomotora maior do que os filhotes de mães controle. Esse comportamento foi avaliado também na puberdade por Tozuka, 2010, que não encontrou diferença entre os grupos. Entretanto, esses dois trabalhos também possuem diferenças metodológicas em relação a este estudo. Sobre Wright, 2011, foi discutido anteriormente. Já Tozuka, 2010 apresentou uma dieta com razão hiperlipídica para induzir obesidade nas mães. Acredita-se que a condição metabólica das mães do grupo de dieta de cafeteria provavelmente não tenha causado alterações nas regiões encefálicas relacionadas à ansiedade e à locomoção dos filhotes, pelo menos não na magnitude de ser percebida alguma modificação comportamental, como ocorreu no aprendizado e memória.

Os resultados encontrados em relação à memória de longo-prazo na puberdade em filhotes que ingeriram dieta controle e que eram descendentes de mães obesas (CAF-CON) vão ao encontro de descobertas recentes que mostram o comprometimento de funções cognitivas e da neurogênese desses animais (Niculescu *et al*, 2009; Tozuka *et al*, 2010; Tozuka *et al*, 2009; White *et al*, 2009). Neste trabalho, os filhotes de mães obesas não identificaram o novo objeto na tarefa de Reconhecimento de Objetos aos 30 dias de vida, porém, na idade adulta passaram a distingui-lo. Acredita-se que, na

puberdade, o efeito do estado metabólico materno ainda cause prejuízos nas áreas encefálicas relacionadas à memória de longo-prazo dos filhotes. Já na idade adulta, possivelmente, as alterações causadas pela dieta da mãe sejam superadas, e a capacidade de memória e aprendizado seja restaurada com a ingestão de dieta padrão a longo-prazo.

As regiões encefálicas que modulam os comportamentos de locomoção e ansiedade provavelmente não foram afetadas pela dieta de cafeteria na puberdade, pois os filhotes que a ingeriram a partir do desmame (CON-CAF) não apresentaram modificações nesses comportamentos nas tarefas de Campo Aberto e Labirinto em Cruz Elevado em relação aos filhotes controle nessa idade. Porém, na idade adulta, os filhotes que ingeriram dieta de cafeteria apresentaram mais comportamentos relacionados à ansiedade, mesmo que os relacionados à locomoção tenham permanecido inalterados. Esses ratos permaneceram menos tempo nos quadrantes centrais do Campo Aberto, assim como gastaram mais tempo na autolimpeza no Labirinto em Cruz Elevado, sugerindo que a ingestão de dieta de cafeteria tenha um efeito ansiogênico. Essa descoberta contradiz muitos estudos que mostram que a dieta hipercalórica e hiperpalatável, com a chance de escolha dos alimentos pelos animais, causa efeito ansiolítico nos animais que a ingerem (Dallman *et al*, 2005; Maniam *et al*, 2010b; Muller *et al*, 2010; Wright *et al*, 2011b; Zeeni *et al*, 2013), mas vai ao encontro de estudos populacionais e experimentais que relatam que indivíduos obesos e/ou diabéticos possuem maior chance de desenvolver ansiedade e depressão (Asato *et al*, 2012; Boeka *et al*, 2008; Capuron *et al*, 2010; Dinel *et al*, 2011; Elias *et al*, 2005; Mobbs *et al*, 2010).

As áreas do SNC relacionadas com a memória de longo-prazo, entretanto, possivelmente sofreram prejuízo pela ingestão de dieta de cafeteria na puberdade, mas não na idade adulta. Isso é sugerido porque, nessa idade, os filhotes que ingeriram dieta de cafeteria a partir do desmame exploraram com o mesmo tempo o objeto novo e o objeto familiar no dia do teste da tarefa de Reconhecimento de Objetos, além de as latências para descer na plataforma da Esquiva Inibitória serem estatisticamente semelhantes no dia do treino e do teste. Esse achado é confirmado por uma série de estudos que revelam o declínio cognitivo em animais com ingestão hipercalórica (Goldbart *et al*, 2006; Greenwood *et al*, 2001; Jurdak *et al*, 2008; Molteni *et al*, 2002; Muller *et al*, 2010; H. R. Park *et al*, 2010; G. Winocur *et al*, 1999; Gordon Winocur *et al*, 2005a). Porém, não foi encontrado comprometimento de aprendizado e memória nesses ratos quando analisados na idade adulta, mostrando que, possivelmente, o SNC na puberdade seja mais vulnerável a agentes externos, como a dieta de cafeteria, o que é proposto por alguns pesquisadores (Adriani *et al*, 2004; Andersen, 2003; Sturman *et al*, 2011).

A exposição à dieta de cafeteria desde o período pré-natal até a idade adulta ocasionou um prejuízo percebido tanto na puberdade quanto na idade adulta na tarefa de Reconhecimento de Objetos, mas não na da Esquiva Inibitória. Além disso, enquanto que na puberdade os animais não mostraram alterações nos comportamentos de exploração e ansiedade, na idade adulta, os filhotes de mães obesas e que também ingeriram dieta de cafeteria apresentaram maior número de levantamentos na tarefa de Labirinto em Cruz Elevado, mesmo que na tarefa de Campo Aberto nenhum comportamento tenha se mostrado diferente em relação aos outros grupos. Os dados de ansiedade e locomoção nesses animais estão de acordo com de estudos que relatam que a

ingestão de dieta hipercalórica possui efeito ansiolítico (Wright *et al*, 2011b), porém nenhum, até o momento, havia descrito alteração exclusiva na frequência de levantamentos. Estudos mais detalhados são necessários para elucidar o papel da dieta de cafeteria e da dieta materna na modulação de comportamentos relacionados à exploração e à ansiedade.

Em ambas as idades, os filhotes que ingeriram dieta de cafeteria e que eram descendentes de mãe cafeteria não foram capazes de identificar o novo objeto no dia do teste da tarefa de Reconhecimento de Objetos, porém apresentaram latência para descer da plataforma significativamente maior no dia do teste do que no dia do treino da Esquiva Inibitória. Resultados semelhantes foram descritos (White *et al*, 2009) na tarefa de Labirinto Aquático de Morris, no qual o grupo de filhotes que foi exposto à dieta hiperlipídica durante o período pré-natal e na idade adulta teve menor capacidade de retenção de memória em comparação aos outros grupos do estudo. Esse achado sugere que a combinação da ingestão da dieta de cafeteria nas mães e nos filhotes pode piorar a função de aprendizado e memória da prole, já que o prejuízo estendeu-se até a idade adulta, diferentemente dos grupos que foram expostos apenas no período pré-natal ou no período pós-desmame. O trabalho de White e colaboradores (2009) também encontrou que o grupo exposto à dieta de cafeteria desde o desenvolvimento fetal até a idade adulta apresentou piora na neurogênese e na defesa contra o estresse oxidativo e o inflamatório no SNC, especificamente no hipocampo e no córtex. Seguindo recentes estudos que apontam que a insulina e a leptina sejam importantes colaboradoras para a estabilidade imunológica no SNC (Beccano-Kelly *et al*, 2012; Farr *et al*, 2006; Huang *et al*, 2010; Oomura *et al*, 2010; Plum *et al*, 2006; Schubert *et al*, 2004; Stockhorst *et al*,

2004; Gordon Winocur *et al*, 2005b), acredita-se que as resistências à insulina e à leptina dos filhotes que ingeriram dieta de cafeteria, associadas às resistências à insulina e à leptina das mães obesas, tenham desencadeado um maior prejuízo no neurodesenvolvimento da prole, com conseqüente déficit de aprendizado e memória. Porém, como foi encontrado também um aumento da atividade exploratória na idade adulta, outra possibilidade é de que a hiperatividade tenha mascarado a real retenção de memória nessa idade, conforme relatam alguns autores (Quillfeldt, 2010).

## 8. CONCLUSÕES

Dentro das condições deste estudo, pode-se concluir que a dieta de cafeteria induziu as fêmeas à obesidade e que essa condição não promoveu alterações nos parâmetros metabólicos analisados nas duas idades dos filhotes machos, porém modificou o peso corporal desses animais na idade adulta quando estava associada à ingestão de dieta de cafeteria pelos filhotes. Além disso, a obesidade materna induzida pela dieta de cafeteria alterou comportamentos relacionados à memória de longo-prazo dos filhotes machos nas duas idades analisadas, sendo que na idade adulta houve comprometimento da memória de reconhecimento de longo-prazo apenas quando associada à ingestão de dieta de cafeteria pelos filhotes. Contudo, a alteração de locomoção apresentada na idade adulta desses filhotes pode estar encoberto a interpretação dos resultados de memória dessa idade.

Para explicar os efeitos da obesidade materna sobre a composição corporal dos filhotes, foram propostas algumas teorias. Pode-se sugerir que houve um impedimento para o desenvolvimento de obesidade nos filhotes expostos à dieta de cafeteria desde o período pré-natal até a idade adulta. Contudo, é possível propor também que a associação da ingestão de dieta de cafeteria pelas mães e pelos filhotes aumentou a proporção de massa gorda em relação à massa magra nos filhotes. Entretanto, novos estudos sobre a composição corporal desses animais são necessários para elucidar os resultados.

A obesidade materna induzida pela dieta de cafeteria não provocou alterações metabólicas quando não estava associada à ingestão de dieta de cafeteria pelos filho-

tes, entretanto, foram observadas modificações comportamentais relacionadas à memória de reconhecimento na puberdade dos filhotes dessas mães e que ingeriram dieta controle. Pode-se sugerir que a dieta materna hipercalórica teve um efeito negativo na capacidade de aprendizado e memória de longo-prazo na puberdade, mas que essa habilidade foi recuperada na idade adulta, com a ingestão da dieta controle.

A ingestão de dieta de cafeteria feita diretamente pelos filhotes gerou mais modificações significativas no metabolismo e nos comportamentos, independentemente da dieta das mães. Nas avaliações comportamentais, a obesidade materna associada à dieta hipercalórica dos filhotes pareceu influenciar negativamente a capacidade de aprendizado e memória desses animais, tanto na puberdade (memória de reconhecimento e aversiva), quanto na idade adulta (apenas de reconhecimento). Além disso, a ingestão de dieta de cafeteria feita apenas pelos filhotes prejudicou a memória de reconhecimento na puberdade. Todavia, as alterações de ansiedade apresentadas na idade adulta por esses animais podem estar mascarando a interpretação dos resultados de memória desta idade.

Este trabalho enfatiza a importância das preferências alimentares ao longo da vida, sugerindo que a dieta possa reverter os efeitos de um ambiente materno metabolicamente alterado e programador. Entretanto, comportamentos relacionados à memória de longo-prazo parecem ser comprometidos pela dieta materna na puberdade, independentemente da dieta dos filhotes. Portanto, os resultados deste trabalho aumentam as evidências de que tanto a ingestão alimentar materna quanto a de seus descendentes necessitam ser apropriadas para garantir uma qualidade de vida adequada às gerações seguintes.

## 9. LIMITAÇÕES DO ESTUDO

- O número de filhotes por ninhada não foi controlado.
- As ninhadas não foram pesadas no nascimento e no desmame.
- A puberdade foi estabelecida em 30 dias de idade, não sendo observadas as características morfológicas que a determinam.
- Não há dados de perfil lipídico, glicemia, insulinemia e leptinemia circulantes durante a gestação.
- Não foi possível dosar a insulinemia e a leptinemia dos filhotes na puberdade.
- A composição da dieta e o tempo de exposição a ela é diferente de muitos trabalhos citados.

## **10. PERSPECTIVAS**

Investigar os mecanismos envolvidos com as alterações metabólicas e comportamentais encontradas, correlacionando-as com as concentrações circulantes de corticosterona, fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF), leptina e insulina e suas rotas de sinalização no hipocampo e no hipotálamo de filhotes machos controle e induzidos à obesidade com dieta de cafeteria, descendentes de mães controle e induzidas à obesidade com dieta de cafeteria.

## 11. REFERÊNCIAS

- Abildgaard, A., Solskov, L., Volke, V., Harvey, B. H., Lund, S., & Wegener, G. (2010). A high-fat diet exacerbates depressive-like behavior in the Flinders Sensitive Line (FSL) rat, a genetic model of depression. *Psychoneuroendocrinology*.
- Adriani, W., & Laviola, G. (2004). Windows of vulnerability to psychopathology and therapeutic strategy in the adolescent rodent model. *Behav Pharmacol*, *15*(5-6), 341-352.
- Ahlsson, F., Diderholm, B., Ewald, U., Jonsson, B., Forslund, A., Stridsberg, M., & Gustafsson, J. (2012). Adipokines and their relation to maternal energy substrate production, insulin resistance and fetal size. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*.
- Akyol, A., Langley-Evans, S. C., & McMullen, S. (2009). Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. *The British journal of nutrition*, *102*(11), 1601-1610.
- Akyol, A., McMullen, S., & LangleyEvans, S. C. (2011). Glucose intolerance associated with earlylife exposure to maternal cafeteria feeding is dependent upon postweaning diet. *Br J Nutr*, *107*(7), 964-978.
- Andersen, S. L. (2003). Trajectories of brain development: point of vulnerability or window of opportunity? *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *27*(1-2), 3-18.
- Asato, M., Ikeda, H., & Kamei, J. (2012). Effects of diabetes and obesity on the higher brain functions in rodents. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*, *32*(5-6), 251-255.
- Bailey, C., Flatt, P., Kwasowski, P., Powell, C., & Marks, V. (1986). Immunoreactive gastric inhibitory polypeptide and K cell hyperplasia in obese hyperglycaemic

- (ob/ob) mice fed high fat and high carbohydrate cafeteria diets. *European Journal of Endocrinology*, 112(2), 224.
- Baker, K. B., & Kim, J. J. (2002). Effects of Stress and Hippocampal NMDA Receptor Antagonism on Recognition Memory in Rats. *Learning & Memory*, 9, 58-65.
- Barker, D. J. P. (2007). Obesity and early life. *Obes Rev*, 8(1), 45-49.
- Bayol, S. A., Farrington, S. J., & Stickland, N. C. (2007). A maternal 'junk food' diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for 'junk food' and a greater propensity for obesity in rat offspring. *Br J Nutr*, 98, 843-851.
- Bayol, S. A., Simbi, B. H., & Stickland, N. C. (2005). A maternal cafeteria diet during gestation and lactation promotes adiposity and impairs skeletal muscle development and metabolism in rat offspring at weaning. *J Physiol*, 567(3), 951-961.
- Beccano-Kelly, D., & Harvey, J. (2012). Leptin: A novel therapeutic target in Alzheimer's Disease? *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2012.
- Belzung, C., & Prut, L. (2003). The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *European journal of pharmacology*, 463, 3-33.
- Benito-León, J., Mitchell, A. J., Hernández-Gallego, J., & Bermejo-Pareja, F. (2013). Obesity and impaired cognitive functioning in the elderly: a population-based cross-sectional study (NEDICES). *Eur J Neurol*.
- Benkalfat, N. B., Merzouk, H., Bouanane, S., Merzouk, S.-A., Bellenger, J., Gresti, J., Tessier, C., & Narce, M. (2011). Altered adipose tissue metabolism in offspring of dietary obese rat dams. *Clin Sci (Lond)*, 121, 19-28.

- Bentham, J., Michell, A. C., Lockstone, H., Andrew, D., Schneider, J. E., Brown, N. a., & Bhattacharya, S. (2010). Maternal high-fat diet interacts with embryonic Cited2 genotype to reduce Pitx2c expression and enhance penetrance of left-right patterning defects. *Human molecular genetics*, 19(17), 3394-3401.
- Berg, E. v. d., Kloppenborg, R. P., Kessels, R. P. C., Kappelle, L. J., & Biessels, G. J. (2009). Type 2 diabetes mellitus, hypertension, dyslipidemia and obesity: A systematic comparison of their impact on cognition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1792(5), 470-481.
- Bilbo, S. D., & Tsang, V. (2010). Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(6), 2104-2115.
- Bliss, M. (1982). *The Discovery of Insulin*. Chicago: University of Chicago Press.
- Block, G., Rosenberger, W. F., & Patterson, B. H. (1988). Calories, fat and cholesterol: intake patterns in the US population by race, sex and age. *Am J Public Health*, 78(9), 1150-1155.
- Boeka, A. G., & Lokken, K. L. (2008). Neuropsychological performance of a clinical sample of extremely obese individuals. *Archives of clinical neuropsychology : the official journal of the National Academy of Neuropsychologists*, 23(4), 467-474.
- Bouanane, S., Benkalfat, N. B., Baba ahmed, F.-Z., Merzouk, H., Mokhtari, N. S., Merzouk, S.-A., Gresti, J., Tessier, C., & Narce, M. (2009). Time course of changes in serum oxidant/antioxidant status in overfed obese rats and their offspring. *Clinical Science*, 116(8), 669-680.
- Brasil. (2010). *Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009 Despesas, Rendimentos e Condições de Vida*. Rio de Janeiro.

- Brasil. (2012). *Vigitel Brasil 2011: Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico*. Brasília: Ministério da Saúde.
- Bruce-Keller, A. J., Keller, J. N., & Morrison, C. D. (2009). Obesity and vulnerability of the CNS. *Biochim Biophys Acta*, 1792(5), 395-400.
- Caballero, B. (2007). The global epidemic of obesity: an overview. *Epidemiologic reviews*, 29(7), 1-5.
- Caballero, E. (2003). Endothelial dysfunction in obesity and insulin resistance: a road to diabetes and heart disease. *Obesity research*, 11(11), 1278-1289.
- Cai, H., Cong, W.-n., Ji, S., Rothman, S., Maudsley, S., & Martin, B. (2012). Metabolic Dysfunction in Alzheimers Disease and Related Neurodegenerative Disorders. *Current Alzheimer Research*, 9(1), 5-17.
- Caimari, A., Oliver, P., Rodenburg, W., Keijer, J., & Palou, A. (2010). Feeding conditions control the expression of genes involved in sterol metabolism in peripheral blood mononuclear cells of normoweight and diet-induced (cafeteria) obese rats. *J Nutr Biochem*, 21(11), 1127-1133.
- Callaway, L. K., Prins, J. B., Chang, A. M., & McIntyre, H. D. (2006). Australian obstetric population. *Ethics*, 184(2).
- Capuron, L., Poitou, C., Machaux-Tholliez, D., Frochot, V., Bouillot, J. L., Basdevant, a., Layé, S., & Clément, K. (2010). Relationship between adiposity, emotional status and eating behaviour in obese women: role of inflammation. *Psychological medicine*, 1-12.
- Castell-Auví, A., Cedó, L., Pallarès, V., Blay, M., Ardévol, A., & Pinent, M. (2012). The effects of a cafeteria diet on insulin production and clearance in rats. *Br J Nutr*, 108(07), 1155-1162.

- Catalano, P. M. (2010). Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *Reproduction*, *140*(3), 365-371.
- Catalano, P. M., Kirwan, J. P., Mouzon, S. H.-d., & King, J. (2003). Gestational diabetes and insulin resistance: role in short- and long-term implications for mother and fetus. *J Nutr*, *133*(5 - 2), 1674S-1683S.
- Cesaretti, M. L. R., & Junior, O. K. (2006). Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: Lições Aprendidas. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, *50*(2), 190-197.
- Chang, G.-Q., Gaysinskaya, V., Karatayev, O., & Leibowitz, S. F. (2008). Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci*, *28*(46), 12107-12119.
- Chen, H., Simar, D., Lambert, K., Mercier, J., & Morris, M. J. (2008). Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*, *149*(11), 5348-5356.
- Clark, R. E., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory rats after damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, *20*(23), 8853-8860.
- Coelho, V. R., Giancesini, J., Borowski, R. V., Mazzardo-Martins, L., Martins, D. F., Picada, J. N., Santos, A. R. S., Brum, L. F. S., & Pereira, P. (2011). (-)-Linalool, a naturally occurring monoterpene compound, impairs memory acquisition in the object recognition task, inhibitory avoidance test and habituation to a novel environment in rats. *Phytomedicine*, *18*(10), 896-901.
- Costa, J. V., & Duarte, J. S. (2006). Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Med Port*, *19*, 251-256.

- Crozier, S. R., Inskip, H. M., Godfrey, K. M., Cooper, C., Harvey, N. C., & Cole, A. (2010). Weight gain in pregnancy and childhood body composition: findings from the Southampton Women's Survey. *Am J Clin Nutr*, *91*(6), 1745-1751.
- Dahlgren, J. (2006). Pregnancy and insulin resistance. *Metab Syndr Relat Disord*, *4*(2), 149-152.
- Dallman, M. F., Pecoraro, N. C., & Fleur, S. E. I. (2005). Chronic stress and comfort foods: Self-medication and abdominal obesity. *Brain, Behavior, and Immunity*, *19*, 275-280.
- Davidson, T. L., Monnot, A., Neal, A. U., Martin, A. A., Horton, J. J., & Zheng, W. (2012). The effects of a high-energy diet on hippocampal-dependent discrimination performance and blood-brain barrier integrity differ for diet-induced obese and diet-resistant rats. *Physiol Behav*, *107*(1), 26-33.
- De Schepper, J., Zhou, X., De Bock, S., Smitz, J., Louis, O., Hooghe-Peters, E., & Vandenplas, Y. (2000). Study of Serum Leptin in Cafeteria-Diet-Overfed Rats. *Hormone Research in Paediatrics*, *50*(5), 271-275.
- DeBette, S., Beiser, A., Hoffmann, U., DeCarli, C., O'Donnell, C. J., Massaro, J. M., Au, R., Himali, J. J., Wolf, P. A., Fox, C. S., & Seshadri, S. (2010). Visceral fat is associated with lower brain volume in healthy middle-aged adults. *Annals of Neurology*, *68*(2), 136-144.
- Desai, M., Beall, M., & Ross, M. G. (2013). Developmental Origins of Obesity: Programmed Adipogenesis. *Curr Diab Rep*, *13*, 27-33.
- Despres, J.-P., & Lemieux, I. (2006). Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*, *444*(7121), 881-887.

- Dinel, A. L., André, C., Aubert, A., Ferreira, G., Layé, S., & Castanon, N. (2011). Cognitive and emotional alterations are related to hippocampal inflammation in a mouse model of metabolic syndrome. *PloS one*, 6(9).
- Dulloo, A. G., Jacquet, J., Solinas, G., Montani, J. P., & Schutz, Y. (2010). Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. *Obes Rev*, 13(S2), 1-5.
- Elias, M. F., Elias, P. K., Sullivan, L. M., Wolf, P. a., & D'Agostino, R. B. (2005). Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. *Neurobiology of Aging*, 26 Suppl 1, 11-16.
- Farr, S. A., Banksa, W. A., & Morleya, J. E. (2006). Effects of leptin on memory processing. *Peptides*, 27(6), 1420-1425.
- Flegal, K. M., Kit, B. K., Orpana, H., & Graubard, B. I. (2013). Association of all-cause mortality with overweight and obesity using standard body mass index categories: A systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 309(1), 71-82.
- Funk, J. L. (2007). Distúrbios do pâncreas endócrino. In S. J. McPhee, V. R. Lingappa & W. F. Ganong (Eds.), *Fisiopatologia da doença: Uma introdução à medicina clínica* (5 ed., pp. 437-462). Rio de Janeiro: McGraw-Hill.
- Galioto, R. M., Alosco, M. L., Spitznagel, M. B., Stanek, K. M., & Gunstad, J. (2013). Cognitive reserve preserves cognitive function in obese individuals. *Aging, Neuropsychology, and Cognition: A Journal on Normal and Dysfunctional Development*.
- Gisou, M., Soheila, R., & Nasser, N. (2009). Evaluation of the effect of intrahippocampal injection of leptin on spatial memory. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 3(9), 443-448.

- Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2004a). Living with the past: Evolution, Development, and Patterns of Disease. *Science*, *305*, 1733-1736.
- Gluckman, P. D., & Hanson, M. A. (2004b). Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonatal Med*, *9*(5), 419-425.
- Goldbart, a. D., Row, B. W., Kheirandish-Gozal, L., Cheng, Y., Brittan, K. R., & Gozal, D. (2006). High fat/refined carbohydrate diet enhances the susceptibility to spatial learning deficits in rats exposed to intermittent hypoxia. *Brain research*, *1090*(1), 190-196.
- Goularte, J. F., Ferreira, M. B. C., & Sanvitto, G. L. (2012). Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J Nutr*, *108*(8), 1511-1518.
- Grattan, D. R., Ladyman, S. R., & Augustine, R. A. (2007). Hormonal induction of leptin resistance during pregnancy. *Physiol Behav*, *91*(4), 366-374.
- Gray, J., Yeo, G. S. H., Cox, J. J., Morton, J., Adlam, A.-L. R., Keogh, J. M., Yanovski, J. A., Gharbawy, A. E., Han, J. C., Tung, Y. C. L., Hodges, J. R., Raymond, F. L., O'Rahilly, S., & Farooqi, I. S. (2006). Hyperphagia, Severe Obesity, Impaired Cognitive Function, and Hyperactivity Associated With Functional Loss of One Copy of the Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Gene. *Diabetes*, *55*(12), 3366-3371.
- Greenwood, C. E., & Winocur, G. (2001). Glucose treatment reduces memory deficits in young adult rats fed high-fat diets. *Neurobiology of learning and memory*, *75*(2), 179-189.

- Guelinckx, I., Devlieger, R., Beckers, K., & Vansant, G. (2008). Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. *Obes Rev*, *9*(2), 140-150.
- Haidar, Y. M., & Cosman, B. C. (2011). Obesity Epidemiology. *Clinics in Colon and Rectal Surgery*, *24*(04), 205-210.
- Halyburton, A. K., Brinkworth, G. D., Wilson, C. J., Noakes, M., Buckley, J. D., Keogh, J. B., & Clifton, P. M. (2007). Low- and high-carbohydrate weight-loss diets have similar effects on mood but not cognitive performance. *The American journal of clinical nutrition*, *86*(3), 580-587.
- Harvey, J., Solovyova, N., & Irving, A. (2006). Leptin and its role in hippocampal synaptic plasticity. *Progress in Lipid Research*, *45*(5), 369-378.
- Haslam, D. W., & James, W. P. T. (2005). Obesity. *Lancet*, *366*(9492), 1197-1209.
- Heerwagen, M. J., Miller, M. R., Barbour, L. A., & Friedman, J. E. (2010). Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, *299*(3), 711-722.
- Heyne, A., Kiesselbach, C., Sahún, I., McDonald, J., Gaiffi, M., Dierssen, M., & Wolffgramm, J. (2009). An animal model of compulsive food-taking behaviour. *Addiction biology*, *14*(4), 373-383.
- Holemans, K., Caluwaerts, S., Poston, L., & Assche, F. A. V. (2004). Diet-induced obesity in the rat: a model for gestational diabetes mellitus. *Am J Obstet Gynecol.*, *190*(3), 858-865.
- Howie, G. J., Sloboda, D. M., Kamal, T., & Vickers, M. H. (2009). Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol*, *587*(Pt 4), 905-915.

- Huang, C.-C., Lee, C.-C., & Hsu, K.-S. (2010). The Role of Insulin Receptor Signaling in Synaptic Plasticity and Cognitive Function. *Chang Gung Med J*, 33(2), 115-125.
- Huda, S. S., Brodie, L. E., & Sattar, N. (2010). Obesity in pregnancy: prevalence and metabolic consequences. *Semin Fetal Neonatal Med*, 15(2), 70-76.
- Ikenasio-Thorpe, B. a., Breier, B. H., Vickers, M. H., & Fraser, M. (2007). Prenatal influences on susceptibility to diet-induced obesity are mediated by altered neuroendocrine gene expression. *The Journal of endocrinology*, 193(1), 31-37.
- Janssen, I., Katzmarzyk, P. T., & Ross, R. (2004). Waist circumference and not body mass index explains obesity-related health risk. *The American journal of clinical nutrition*, 79(3), 379-384.
- Jarvie, E., Hauguel-de-Mouzon, S., Nelson, S. M., Sattar, N., Catalano, P. M., & Freeman, D. J. (2010). Lipotoxicity in obese pregnancy and its potential role in adverse pregnancy outcome and obesity in the offspring. *Clin Sci (Lond)*, 119(3), 123-129.
- Jensen, M. D. (2008). Role of body fat distribution and the metabolic complications of obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 93(11 Suppl 1), S57-63.
- Jéquier, E. (2002). Leptin signaling, adiposity, and energy balance. *Ann N Y Acad Sci*, 967, 379-388.
- Jj, C., Robbins, H. A., Roitman, J. D., & Roitman, M. F. (2010). Consumption of high-fat diet and Neurosystem. *Appetite*, 54(3), 631-631.
- Jones, H. N., Woollett, L. a., Barbour, N., Prasad, P. D., Powell, T. L., & Jansson, T. (2009). High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation

- of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J*, 23(1), 271-278.
- Jung, C., & Kim, M.-S. (2013). Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. *Arch Pharm Res*, 36(2), 201-207.
- Jurdak, N., Lichtenstein, A. H., & Kanarek, R. B. (2008). Diet-induced obesity and spatial cognition in young male rats. *Nutritional neuroscience*, 11(2), 48-54.
- Kahn, B. B., & Flier, J. S. (2000). Obesity and insulin resistance. *J Clin Invest*, 106(4), 473-481.
- Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 444.
- Kanoski, S. E., & Davidson, T. L. (2011). Western diet consumption and cognitive impairment: links to hippocampal dysfunction and obesity. *Physiol Behav*, 103(1), 59-68.
- Kanoski, S. E., Zhang, Y., Zheng, W., & Davidson, T. L. (2010). The effects of a high-energy diet on hippocampal function and blood-brain barrier integrity in the rat. *J Alzheimers Dis*, 21(1), 207-219.
- Keller, K. B., & Lemberg, L. (2003). Obesity and the metabolic syndrome. *Am J Crit Care*, 12(2), 167-170.
- Khashan, A. S., & Kenny, L. C. (2009). The effects of maternal body mass index on pregnancy outcome. *Eur J Epidemiol*, 24, 697-705.
- King, J. C. (2006). Maternal obesity, metabolism and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr*, 26, 271-291.

- Kloppenborg, R. P., Berg, E. v. d., Kappelle, I. J., & Biessels, G. J. (2008). Diabetes and other vascular risk factors for dementia: which factor matters most? A systematic review. *Eur J Pharmacol*, *585*(1), 87-108.
- Kohjima, M., Sun, Y., & Chan, L. (2010). Increased Food Intake Leads to Obesity and Insulin Resistance in the Tg2576 Alzheimer's Disease Mouse Model. *Endocrinology*, *151*(4).
- Lancet, T. (2006). Curbing the obesity epidemic. *Lancet*, *367*(9522), 1549.
- Lawson, M. A. (2009). Lipoatrophic diabetes: a case report with a brief review of the literature. *J Adolesc Health*, *44*(1), 94-95.
- Lee, M.-J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular Aspects of Medicine*, *34*(1), 1-11.
- López, I. P., Marti, A., Milagro, F. I., Zulet, F. I., Mde, L. M., Moreno-Aliaga, M. J., Martinez, J. A., & Miguel, C. D. (2003). DNA microarray analysis of genes differentially expressed in diet-induced (cafeteria) obese rats. *Obes Res*, *11*(2).
- Low, S., Chin, M. C., & Deurenberg-Yap, M. (2009). Review on epidemic of obesity. *Ann Acad Med Singapore*, *38*(1), 57-65.
- Macdonald, I. (1973). Diet and triglyceride metabolism. *J. clin. Path*, *26*(5), 22-25.
- Maniam, J., & Morris, M. J. (2010a). Long-term postpartum anxiety and depression-like behavior in mother rats subjected to maternal separation are ameliorated by palatable high fat diet. *Behavioural brain research*, *208*(1), 72-79.
- Maniam, J., & Morris, M. J. (2010b). Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology*, *35*(5), 717-728.

- Mantzoros, C. (1999). The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidence. *Ann Intern Med*, 130(8), 671-680.
- Markel, A. L., Galaktionov, Y. K., & Efimov, V. M. (1989). Factor analysis of rat behavior in an open field test. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova*, 38 (5), 855-863.
- Marwarha, G., & Ghribi, O. (2012). Leptin signaling and Alzheimer's disease. *Am J Neurodegener Dis*, 1(3), 245-265.
- Matthaei, S., Stumvoll, M., Kellerer, M., & Häring, H.-U. (2000). Pathophysiology and Pharmacological Treatment of Insulin Resistance. *Endocr Rev*, 21(6), 585-618.
- McGaugh, J. L., & Izquierdo, I. (2000). The contribution of pharmacology to research on the mechanisms of memory formation. *Science*(21), 1467-1465.
- McGuire, W., Dyson, L., & Renfrew, M. (2010). Maternal obesity: consequences for children, challenges for clinicians and carers. *Semin Fetal Neonatal Med*, 15(2), 108-112.
- McMillen, I. C., Muhlhausler, B. S., Duffield, J. A., & Yuen, B. S. J. (2004). Prenatal programming of postnatal obesity: fetal nutrition and the regulation of leptin synthesis and secretion before birth. *Proc Nutr Soc*, 63, 405-412.
- McMillen, I. C., Rattanatrav, L., Duffield, J. A., Morrison, J. L., MacLaughlin, S. M., Gentili, S., & Muhlhausler, B. S. (2009). The Early Origins of Later Obesity: Pathways and Mechanisms. *Adv Exp Med Biol*, 646, 71-81.
- Melzer, K., & Schutz, Y. (2010a). Pre-pregnancy and pregnancy predictors of obesity. *Int J Obes (Lond)*, 34 Suppl 2(S2), S44-52.
- Melzer, K., Schutz, Y., Soehnchen, N., Veronique, Begona, Pichard, C., Irion, O., Boulvain, M., & Kayser, B. (2010b). Prepregnancy body mass index and resting metabolic rate during pregnancy. *Ann Nutr Metab*, 57(3-4), 221-227.

- Mennella, J. A. (2006). Development of food preferences: Lessons learned from longitudinal and experimental studies. *Food Qual Prefer*, 17(7-8), 635-637.
- Mitchell, N. S., Catenacci, V. A., Wyatt, H. R., & Hill, J. O. (2011). Obesity: Overview of an epidemic. *Psychiatr Clin North Am*, 34(4), 717-732.
- Mitra, A., Alvers, K. M., Crump, E. M., & Rowland, N. E. (2009). Effect of high-fat diet during gestation, lactation, or postweaning on physiological and behavioral indexes in borderline hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296(1), R20-28.
- Mobbs, O., Crépin, C., Thiéry, C., Golay, A., & Martial. (2010). Obesity and the four facets of impulsivity. *Patient education and counseling*, 79(3), 372-377.
- Molteni, R., Barnard, R. J., Ying, Z., Roberts, C. K., & Gómez-Pinilla, F. (2002). A high-fat, refined sugar diet reduces hippocampal brain-derived neurotrophic factor, neuronal plasticity, and learning. *Neuroscience*, 112(4), 803-814.
- Morato, S. (2006). O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. *Psicologia USP*, 17(L), 159-174.
- Muller, A. P., Tort, A. H., Gnoatto, J., Moreira, J. D., Vinadé, E. R., Perry, M. L., Souza, D. O., Lara, D. R., & Portela, L. V. (2010). Metabolic and behavioral effects of chronic olanzapine treatment and cafeteria diet in rats. *Behavioural pharmacology*, 21(7), 668-675.
- Niculescu, M. D., & Lupu, D. S. (2009). High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci.*, 27(7), 627-633.
- Nivoit, P., Morens, C., Assche, F. A. V., Jansen, E., Poston, L., Remacle, C., & Reusens, B. (2009). Established diet-induced obesity in female rats leads to

- offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*, 52, 1133-1142.
- Ogden, C. L., Carroll, M. D., Curtin, L. R., McDowell, M. A., Tabak, C. J., & Flegal, K. M. (2006). Prevalence of Overweight and Obesity in the United States , 1999-2004. *JAMA*, 295(13), 1999-2004.
- Ogden, C. L., Yanovski, S. Z., Carroll, M. D., & Flegal, K. M. (2007). The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*, 132(6), 2087-2102.
- Olufadi, R., & Byrne, C. D. (2008). Clinical and laboratory diagnosis of the metabolic syndrome. *J Clin Pathol*, 61(6), 697-706.
- Ong, Z. Y., & Muhlhausler, B. S. (2011). Maternal “junk-food” feeding of rat dams alters food choices and development of the mesolimbic reward pathway in the offspring. *FASEB J*, 25, :2167-2179.
- Oomura, Y., Shuji, A., & Kouji, F. (2010). Prandial increase of leptin in the brain activates spatial learning and memory. *Pathophysiology*, 17.
- Organization, W. H. (2003). Obesity and overweight facts: how do we define obesity and global strategy on physical activity. *World Health Organization, WHO*. Retrieved 23 feb 2013, 2013
- Organization, W. H. (2013). Obesity and overweight. Retrieved 23 feb 2013, 2013, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
- Page, K. C., Malik, R. E., Ripple, J. a., & Anday, E. K. (2009). Maternal and postweaning diet interaction alters hypothalamic gene expression and modulates response to a high-fat diet in male offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 297(4), R1049-1057.

- Park, H. R., Park, M., Choi, J., Park, K.-Y., Chung, H. Y., & Lee, J. (2010). A high-fat diet impairs neurogenesis: Involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience letters*, *482*(3), 235-239.
- Park, S. W., Goodpaster, B. H., Lee, J. S., Kuller, L. H., Boudreau, R., Rekeineire, N., Harris, J. P., Kritchevsky, S., Tylavsky, F. A., Nevitt, M., Cho, Y., & Newman, A. B. (2009). Excessive Loss of Skeletal Muscle Mass in Older Adults With Type 2 Diabetes. *Diabetes Care*, *32*(11), 1993-1997.
- Park, S. W., Goodpaster, B. H., Strotmeyer, E. S., Rekeineire, N., Harris, T. B., Schwartz, A. V., Tylavsky, F. A., & Newman, A. B. (2006). Decreased muscle strength and quality in older adults with type 2 diabetes: the health, aging, and body composition study. *Diabetes*, *55*(6), 1813-1818.
- Parrott, M. D., & Greenwood, C. E. (2007). Dietary influences on cognitive function with aging: from high-fat diets to healthful eating. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1114*, 389-397.
- Pearce, K. L., Noakes, M., Wilson, C., & Clifton, P. M. (2012). Continuous glucose monitoring and cognitive performance in type 2 diabetes. *Diabetes Technol Ther*, *14*(12), 1126-1133.
- Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J. P., Mamun, A. A., & Bonneux, L. (2003). Obesity in Adulthood and Its Consequences for Life Expectancy: A Life-Table Analysis. *Ann Intern Med*, *138*(1), 24-32.
- Peters, A., Pellerin, L., Dallman, M. F., Oltmanns, K. M., Schweiger, U., Born, J., & Fehm, H. L. (2007). Causes of obesity: Looking beyond the hypothalamus. *Progress in neurobiology*, *81*, 61-88.

- Pi-Sunyer, F. X. (2000). Obesity: criteria and classification. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 59(4), 505-509.
- Picó, C., Oliver, P., & Sánchez, J. (2007). The intake of physiology doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes*, 31, 1199-1209.
- Plum, L., Schubert, M., & Brüning, J. C. (2006). The role of insulin receptor signaling in the brain. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism*, 16(2).
- Prada, P. O., Zecchin, H. G., Gasparetti, A. L., Torsoni, M. A., Ueno, M., Hirata, A. E., Esméria, M., Höer, N. F., Boschero, A. C., & Saad, M. J. A. (2005). Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*, 146(3), 1576-1587.
- Prats, E., Monfar, M., Castell, J., Iglesias, R., & Alemany, M. (1989). Energy intake of rats fed a cafeteria diet. *Physiol Behav*, 45(2), 263-272.
- Quillfeldt, J. A. (2010). Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats. In M. L. Andersen (Ed.), *Animal models as tools in ethical biomedical research*. (Vol. 1, pp. 340-383). São Paulo, SP: CLR Balieiro Editores.
- Rajia, S., Chen, H., & Morris, M. J. (2010a). Maternal overnutrition impacts offspring adiposity and brain appetite markers-modulation by postweaning diet. *Journal of Neuroendocrinology*, 22(8), 905-914.
- Rajia, S., Chen, H., & Morris, M. J. (2010b). Maternal Overnutrition Impacts Offspring Adiposity and Brain Appetite Markers-Modulation by Postweaning Diet Neuroendocrinology. *Journal of Neuroendocrinology*(7), 905-914.
- Ricci, R., & Bevilacqua, F. (2011). The potential role of leptin and adiponectin in obesity - a comparative review. *Vet J*.

- Rothwell, N. J., & Stock, M. J. (1979). Regulation of energy balance in two models of reversible obesity in the rat. *J Comp Physiol Psychol*, 93(6), 1024-1034.
- Ruager-Martin, R., Hyde, M. J., & Modi, N. (2010). Maternal obesity and infant outcomes. *Early Hum Dev*, 86(11), 715-722.
- Sampey, B. P., Vanhooose, A. M., Winfield, H. M., Freemerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., Newgard, C. B., & Makowski, L. (2011). Cafeteria Diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation - Comparison to high-fat diet. *Obesity*, 19(6), 1109-1117.
- Samuelsson, A.-M., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H. J. M., Piersma, A. H., Ozanne, S. E., Twinn, D. F., Remacle, C., Rowlerson, A., Poston, L., & Taylor, P. D. (2008). Hypertension, and Insulin Resistance : A Novel Murine Model of Developmental. *Hypertension*, 2007, 383-392.
- Sánchez, J., Priego, T., & Paulou, M. (2008). Oral supplementation with physiological doses of leptin during lactation in rats improves insulin sensitivity and affects food preferences. *Endocrinology*, 149, 733-740.
- Schubert, M., Gautam, D., Surjo, D., Ueki, K., Baudler, S., Schubert, D., Kondo, T., Alber, J., Galldiks, N., Küstermann, E., Arndt, S., Jacobs, A. H., Krone, W., Kahn, C. R., & Brüning, J. C. (2004). Role for neuronal insulin resistance in neurodegenerative diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9), 3100-3105.
- Sclafani, A., & Springer, D. (1976). Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. *Physiology & behavior*, 17(3), 461-471.

- Seabra, G., Padilha, P. d. C., Queiroz, J. A. d., & Saunders, C. (2011). Sobrepeso e obesidade pré-gestacionais: prevalência e desfechos associados à gestação. *Rev Bras Ginecol Obstet*, 33(11), 348-353.
- Sebire, N. J., Jolly, M., Harris, J. P., Wadsworth, J., Joffe, M., Beard, R. W., Regan, L., & Robinson, S. (2001). Maternal obesity and pregnancy outcome: a study of 287,213 pregnancies in London. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 25(8), 1175-1182.
- Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. J. (2007). Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*, 48(6), 1253-1262.
- Shafat, A., Murray, B., & Rumsey, D. (2009). Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite*, 52(1), 34-38.
- Shankar, K., Harrell, A., Liu, X., Gilchrist, J. M., Ronis, M. J. J., & Badger, T. M. (2008). Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294(2), 528-538.
- Shuldiner, A. R., Yang, R., & Gong, D.-W. (2001). Resistin, Obesity, and Insulin Resistance — The Emerging Role of the Adipocyte as an Endocrine Organ. *New England Journal of Medicine*, 345(18), 1345-1346.
- Siega-Riz, A.-M., & Laraia, B. (2006). The implications of maternal overweight and obesity on the course of pregnancy and birth outcomes. *Matern Child Health J*, 10(5 Suppl), S153-156.
- Siraj, E. S. (2010). Diabetes melito. In E. Rubin & F. Gorstein (Eds.), *Rubin patologia: Bases clinicopatológicas da medicina* (4 ed., pp. 1198-1208). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

- Snijder, M. B., Visser, M., Dekker, J. M., Goodpaster, B. H., Harris, T. B., Kritchevsky, S. B., N., Kanaya, a. M., Newman, a. B., Tylavsky, F. a., & Seidell, J. C. (2005). Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study. *Diabetologia*, *48*(2), 301-308.
- Srinivasan, M., Katewa, S. D., Palaniyappan, A., Pandya, J. D., & Patel, M. S. (2006). Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, *291*(4), E792-799.
- Stevens, J., Cai, J., Pamuk, E. R., Williamson, D. F., Thun, M. J., & Wood, J. L. (1998). The Effect of Age on the Association between Body-Mass Index and Mortality. *N Engl J Med*, *338*(1), 1-7.
- Stockhorst, U., Friesa, D. d., Steingruebera, H.-J., & Scherbaumb, W. A. (2004). Insulin and the CNS: effects on food intake, memory, and endocrine parameters and the role of intranasal insulin administration in humans. *Physiology & behavior*, *83*(1), 47-54.
- Stothard, K. J., Tennant, P. W. G., Bell, R., & Rankin, J. (2009). Maternal overweight and obesity and the risk of congenital anomalies: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, *301*(6), 636-650.
- Stranahan, A. M., Norman, E. D., Lee, K., Cutler, R. G., Telljohann, R., Egan, J. M., & Mattson, M. P. (2008). Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. *Hippocampus*, *18*(11).
- Strauss, R. S., & Pollack, H. a. (2001). Epidemic increase in childhood overweight, 1986-1998. *JAMA*, *286*(22), 2845-2848.

- Sturman, D. A., & Moghaddam, B. (2011). The neurobiology of adolescence: changes in brain architecture, functional dynamics, and behavioral tendencies. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(8), 1704-1712.
- Symonds, M. E., Mendez, M. A., Meltzer, H. M., Koletzko, B., Godfrey, K., Forsyth, S., & Beek, E. M. v. d. (2013). Early Life Nutritional Programming of Obesity: Mother-Child Cohort Studies. *Ann Nutr Metab*, 62, 137–145.
- Tamashiro, K. L. K., Terrillion, C. E., Hyun, J., Koenig, J. I., & Moran, T. H. (2009). Prenatal Stress or High-Fat Diet Increases Susceptibility to Diet-Induced Obesity in Rat Offspring. *Blood*, 58(May).
- Tessier, D. R., Ferraro, Z. M., & Gruslin, A. (2013). Role of leptin in pregnancy: Consequences of maternal obesity. *Placenta*, 34(3), 205-211.
- Tozuka, Y., Kumon, M., Wada, E., Onodera, M., Mochizuki, H., & Wada, K. (2010). Maternal obesity impairs hippocampal BDNF production and spatial learning performance in young mouse offspring. *Neurochem Int*, 57(3), 235-247.
- Tozuka, Y., Wada, E., & Wada, K. (2009). Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J*, 23(6), 1920-1934.
- Trabulsi, J. C., & Mennella, J. A. (2012). Diet, sensitive periods in flavour learning, and growth. *Int Rev Psychiatry*, 24(3), 219-230.
- Tremml, P. (1998). Neurobehavioral development, adult openfield exploration and swimming navigation learning in mice with a modified beta-amyloid precursor protein gene. *Behavioural brain research*, Sep;95(1), 65-76.

- Trujillo, M. L., Casas, L., Dieguez, C., & Senaris, R. (2008). *Pregnancy in the rat is a physiological state of leptin resistance*. Paper presented at the European Congress of Endocrinology 2008, Berlin, Germany.
- Trujillo, M. L., Spuch, C., Carro, E., & Señarís, R. (2011). Hyperphagia and Central Mechanisms for Leptin Resistance during Pregnancy. *Endocrinology*, *152*(4), 1355-1365.
- Vangroen, T. (2010). The effects of obesity on cognition in adult Sprague–Dawley rats. *Appetite*, *54*(3), 647-647.
- Vanzela, E. C., Ribeiro, R. A., Oliveira, C. A. M. d., Rodrigues, F. B., Bonfleur, M. L., Carneiro, E. M., Souza, K. L. A., & Boschero, A. C. (2010). Pregnancy restores insulin secretion from pancreatic islets in cafeteria diet-induced obese rats. *Am J Physiol Integr Com Physiol*, *298*.
- Vasudevan, C., Renfrew, M., & McGuire, W. (2011). Fetal and perinatal consequences of maternal obesity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, *96*(378-382).
- Walker, C. D., Naef, L., d'Asti, E., Long, H., Xu, Z., Moreau, A., & Azeddine, B. (2008). Perinatal maternal fat intake affects metabolism and hippocampal function in the offspring: a potential role for leptin. *Ann N Y Acad Sci*, *1144*, 189-202.
- Wang, X.-M. (2013). Early life programming and metabolic syndrome. *World J Pediatr*, *8*(1), 5-8.
- Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation. *Journal of Clinical Investigation*, *112*(12).
- White, C. L., Pistell, P. J., Purpera, M. N., Gupta, S., Hise, T. L., Keller, J. N., Ingram, D. K., & Morrison, C. D. (2009). Effects of High Fat Diet on Morris Maze

- Performance, Oxidative Stress, and Inflammation in Rats: Contributions of Maternal Diet. *Neurobiol Dis*, 35(1), 3-13.
- White, C. L., Pistell, P. J., Purpera, M. N., Gupta, S., Hise, T. L., Keller, J. N., Ingram, D. K., & Morrison, C. D. (2010). NIH Public Access. *Biomedical Research*, 35(1), 3-13.
- Whitmer, R. A., Gunderson, E. P., Barrett-Connor, E., Quesenberry, C. P. J., & Yaffe, K. (2005). Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *BMJ*, 330(7504).
- WHO, W. H. O. (2002). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation*
- Winocur, G., & Greenwood, C. E. (1999). The effects of high fat diets and environmental influences on cognitive performance in rats. *Behavioural brain research*, 101(2), 153-161.
- Winocur, G., & Greenwood, C. E. (2005a). Studies of the effects of high fat diets on cognitive function in a rat model. *Neurobiology of Aging*, 26 Suppl 1, 46-49.
- Winocur, G., Greenwood, C. E., Piroli, G. G., Grillo, C. A., Reagan, L. P., Reznikov, L. R., & McEwen, B. S. (2005b). Memory Impairment in Obese Zucker Rats: An Investigation of Cognitive Function in an Animal Model of Insulin Resistance and Obesity. *Behavioral Neuroscience*, 119(5), 1389-1395.
- Wolf, P. A., Beiser, A., Elias, M. F., Au, R., Vasan, R. S., & Seshadri, S. (2007). Relation of Obesity to Cognitive Function: Importance of Central Obesity and Synergistic Influence of Concomitant Hypertension. The Framingham Heart Study. 4(2), 111-116.

- Wright, T. M., Fone, K. C. F., Langley-Evans, S. C., & Voigta, J. P. W. (2011a). Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *Int J Dev Neurosci*, *29*, 785-793.
- Wright, T. M., Langley-Evans, S. C., & Voigt, J. P. W. (2011b). The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behaviour and exploration in the offspring. *Physiol Behav*, *103*, 164-172.
- Wu, A., Molteni, R., Ying, Z., & Gomez-Pinilla, F. (2003). A saturated-fat diet aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience*, *119*(2), 365-375.
- Wu, Q., & Suzuki, M. (2006). Parental obesity and overweight affect the body-fat accumulation in the offspring: the possible effect of a high-fat diet through epigenetic inheritance. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, *7*(2), 201-208.
- Wylie-Rosett, J. (2004). Paradigm shifts in obesity research and treatment: introduction. *Obesity research*, *12 Suppl 2*(November 2004), 85S-87S.
- Zeeni, N., Daher, C., Fromentin, G., Tome, D., Darcel, N., & Chaumontet, C. (2013). A cafeteria diet modifies the response to chronic variable stress in rats. *Stress*, *16*(2), 211-219.
- Zhou, X., Smitz, J., Louis, O., Hooghe-Peters, E., & Vandenplas, Y. (1998). Study of serum leptin in cafeteria-diet-overfed rats. Influence of diet, insulin and corticosterone. *Hormone research*, *50*(5), 271-275.



**ANEXOS**