



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL**

Clovis José Cavalcanti Lapa Neto

**Efeitos de uma dieta hiperlipídica associada ou não a melatonina
exógena durante a gestação e lactação sobre a histofisiologia dos
neonatos.**

**RECIFE
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

CLOVIS JOSÉ CAVALCANTI LAPA NETO

**“EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA ASSOCIADA OU NÃO A
MELATONINA EXÓGENA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO SOBRE
A HISTOFISIOLOGIA DOS NEONATOS”**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal. Área de Morfofisiologia.

Orientador:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira

Co-orientadores:

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira

Prof^a Dr^a.Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos Jordão

RECIFE

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C647e Lapa Neto, Clovis
Efeitos de uma dieta hiperlipídica associada ou não a melatonina exógena durante a gestação e lactação sobre a histofisiologia dos neonatos. / Clovis Lapa Neto. - 2020.
102 f. : il.
- Orientadora: Valeria Wanderley Teixeira.
Coorientadora: Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos Jordao.
Inclui referências, apêndice(s) e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2020.
1. dieta hiperlipídica. 2. histofisiologia. 3. morfometria. 4. antioxidante. 5. pineal. I. Teixeira, Valeria Wanderley, orient. II. Jordao, Ana Janaina Jeanine Martins de Lemos, coorient. III. Título

CDD 636.089

CLOVIS JOSÉ CAVALCANTI LAPA NETO

**“EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLIPÍDICA ASSOCIADA OU NÃO A
MELATONINA EXÓGENA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO SOBRE
A HISTOFISIOLOGIA DOS NEONATOS”**

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valéria Wanderley Teixeira - (Orientador)

Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira - UFRPE

Dr^a. Ismaela Maria Ferreira de Melo - UFRPE

Prof^a. Dr^a. Fernanda das Chagas Ângelo Mendes Tenório – UFPE

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza - UFRPE

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pois sem Ele nada seria possível, a Ele nossas vidas pertencem.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela estrutura e oportunidade fornecida para realização deste trabalho, e ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, tornando possível a obtenção do título de Doutor em Biociência Animal. A FACEPE pelo respaldo financeiro durante o decorrer do trabalho.

Aos meus orientadores Prof^a. Dr^a Valéria Wanderley Teixeira e Prof. Dr. Álvaro Aguiar Coelho Teixeira, por terem me guiado durante este trabalho e também na minha vida profissional, para que cada dia possa evoluir dentro da minha profissão, e um dia quem sabe, poder chegar perto da qualidade de professores e pesquisadores que são. Agradeço a Ana Janaina Jeanine por ter me acolhido e ensinado grande parte do que aprendi até hoje, e continua me ensinando como co-orientadora.

Agradeço também aos amigos funcionários do biotério, Marcos André e Renata Carneiro, sem eles, não apenas a minha pesquisa, como a de muitos outros não iriam para frente, devido ao cuidado e atenção dado aos animais.

A todos os amigos (as) / irmãos (ãs) do laboratório de Histologia da UFRPE. Solange Bezerra que foi a precursora deste trabalho, e me ajudou tirando dúvidas e me guiando durante a pesquisa. As meninas companheiras de sala e de laboratório, Carolline Guimarães, Cintia Giselle, sou grato a todas. Ismaela Melo, Ketsia Sabrina, Ilka Dayane, Cristiane Talita, Lais Santos, Aline Mariano. Aos meus grandes amigos Franklin Magliano, Tiago Alves, e Gyl Souza.

Minha querida esposa Cibele Alves, você que me aturou por todo esse tempo, sempre me guiando, me dando broncas, resolvendo problemas de estatística e gráficos, mas que no final sempre dava certo. Agradeço sempre a Deus pelo nosso casamento e por ter você ao meu lado, agradeço também a meus dois “filhos peludos”, Rengar e Niko, por serem uma fonte de alegria em casa e conseguir aliviar qualquer estresse gerado durante o dia.

Por último aos meus pais (Tânia Lapa e Ismael Lapa), pessoas escolhidas por Deus para serem meus guias, por todo apoio durante esta caminhada, tanto afetivo, moral, até mesmo financeiro, pelos sacrifícios de tantos anos de criação para que um

dia eu pudesse chegar onde estou, aos meus avós maternos Maria de Fátima e Ubirajara Felix, minha avó paterna Terezinha Lapa, por acreditarem que um dia seu neto seria um “DR.”. Fica aqui meu eterno obrigado.

RESUMO

A má-nutrição intra-uterina pode “programar” os tecidos fetais de maneira a torná-los mais vulneráveis a desordens relacionadas à alimentação tais como diabetes tipo 2, síndrome metabólica e doenças crônico-degenerativas na idade adulta. A melatonina, produto hormonal da glândula pineal, é a algum tempo utilizada com efeitos no tecido adiposo, melhorando a sensibilidade à insulina, este hormônio tem efeitos atenuadores da lesão celular induzida por radicais livres, sendo assim considerada um dos mais poderosos agentes antioxidantes naturais. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo investigar os efeitos de uma dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação sobre a histofisiologia renal e hepática de neonatos após desmame e como a melatonina exógena pode influenciar nesse processo. Foram utilizadas 40 ratas albinas, divididas em 4 grupos Grupo DC: ratas prenhes submetidas à dieta comum; Grupo DC+ Mel ratas prenhes submetidas à dieta comum e administradas com melatonina (5,0mg / kg); Grupo DH: ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica; Grupo DH+Mel: ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica e administradas com melatonina(5,0mg / kg).. Foram dosados: uréia, creatinina, proteínas totais, albumina e óxido nítrico, hemograma completo, contagem diferencial de leucócitos além de histopatologia, histoquímica e morfometria do rim e fígado. Os animais do grupo DH demonstraram glomerulonefrite e atrofia glomerular nos rins, tumefação celular em torno dos vasos, esteatose e alguns núcleos picnóticos nos hepatócitos no fígado, além de alterações bioquímicas e no hemograma. A melatonina normalizou os parâmetros bioquímicos hepáticos e renais, tanto como os valores do hemograma e alterações histoquímicas, e histopatológicas de ambos os órgãos. Assim, concluímos que a melatonina tem um grande potencial em reverter os danos na função hepática e renal da prole de ratos devido a uma dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação

Palavras-chave: dieta hiperlipídica; ratos; histofisiologia; morfometria; fígado; rim, antioxidante, pineal

ABSTRACT

Intrauterine malnutrition can “program” fetal tissues to make them more vulnerable to eating disorders such as type 2 diabetes, metabolic syndrome and chronic degenerative diseases in adulthood. Melatonin, a hormonal product of the pineal gland, has been used for some time with effects on adipose tissue, improving insulin sensitivity, this hormone has mitigating effects on cell damage induced by free radicals, thus being considered one of the most powerful antioxidant agents. natural. Thus, the present research aimed to investigate the effects of a high-fat diet during pregnancy and lactation on the renal and hepatic histophysiology of neonates after weaning and how exogenous melatonin can influence this process. Forty albino rats were used, divided into 4 groups DC Group: pregnant rats submitted to the common diet; DC + Honey Group pregnant rats submitted to the common diet and administered with melatonin (5.0mg / kg); DH group: pregnant rats submitted to a high-fat diet; DH + Mel Group: pregnant rats submitted to a high-fat diet and administered with melatonin (5.0mg / kg). The following were measured: urea, creatinine, total proteins, albumin and nitric oxide, complete blood count, differential leukocyte count in addition to histopathology, histochemistry and morphometry of the kidney and liver. The animals in the DH group showed glomerulonephritis and glomerular atrophy in the kidneys, cell swelling around the vessels, steatosis and some pycnotic nuclei in the hepatocytes in the liver, in addition to biochemical and blood cell changes. Melatonin normalized the hepatic and renal biochemical parameters, as well as the blood count and histochemical changes, and histopathological values of both organs. Thus, we conclude that melatonin has a great potential to reverse the damage in the liver and kidney function of the offspring of rats due to a hyperlipidic diet during pregnancy and lactation.

Keywords: hyperlipidic diet; rats; histophysiology; morphometry; liver; kidney, antioxidant, pineal

SUMÁRIO

Capítulos	Pág.
I	
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Obesidade.....	15
2.1.1 Obesidade e tecido adiposo.....	16
2.2 Dietas e Gestação	18
2.3 Comorbidades Associadas à Obesidade.....	20
2.3.1 Obesidade, Lesões Hepáticas e Renais.....	21
2.3.2 Obesidade e Danos Oxidativos.....	22
2.4 Síntese e Ação da Melatonina	24
2.5 Melatonina e Tecido Adiposo.....	25
3. REFERÊNCIAS	27
II	
EFEITOS DE DIETA HIPERLIPÍDICA ASSOCIADA OU NÃO A MELATONINA EXÓGENA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO SOBRE A HISTOFISIOLOGIA RENAL DOS NEONATOS.....	34
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS	37
RESULTADOS	42

	DISCUSSÃO.....	44
	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	46
III	EFEITOS DE DIETA HIPERLIPÍDICA ASSOCIADA OU NÃO A MELATONINA EXÓGENA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO SOBRE A HISTOFISIOLOGIA DO FÍGADO DE NEONATOS.....	56
	INTRODUÇÃO.....	58
	MATERIAL E MÉTODOS	60
	RESULTADOS	62
	DISCUSSÃO	70
	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	73

142

143

144

145

146

147

148

149

150

151

152

153

154

155

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1. Rins dos filhotes dos grupos experimentais: A) DH; B) DH + Mel; apresentando regiões com glomerulonefrite proliferativa (seta longa) e atrofia glomerular (seta curta). C). DC; D) DH + Mel; apresentando glomerulonefrite branda e glomérulos normais (*). Coloração H.E.....52

Gráfico 1. Média dos valores da quantificação de colágeno por Tricrômico de Mallory nos rins dos filhotes das ratas dos grupos experimentais.....53

Figura 2. Imunohistoquímica para o IL-1 nos rins dos filhotes dos grupos experimentais. A) DH; B) DH+Mel; C) DC; D) DC+Mel; E) Controle negativo; F) Quantificação em pixels do IL-1. Observar maior marcação (detalhes) no grupo DH. As médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P > 0,05$).....54

Capítulo III

Figura 1. Histopatologia do fígado dos filhotes dos grupos experimentais. A) DC – Dieta Comum e B) DC+Mel. Observar hepatócitos preservados (seta curta); C) DH e D) DH+Mel. Notar a presença de núcleo picnótico em hepatócitos (cabeça de seta), esteatose (seta longa nos detalhes I e II) e hepatócito com tumefação celular (detalhes I e II). Coloração HE.....64

Figura 2. Histoquímica do fígado dos filhotes dos grupos experimentais para a quantificação de glicogênio. A) DC – Dieta Comum; B) DC+Mel – Dieta Comum + Melatonina; C) DH – Dieta Hipercalórica; D) DH+Mel – Dieta Hipercalórica + Melatonina. Coloração PAS.....66

Gráfico 1. Média dos valores da quantificação de glicogênio por Ácido Periódico de Schiff (PAS) no fígado dos filhotes das ratas dos grupos experimentais.....67

Figura 3. Histoquímica dos fígados dos filhotes dos grupos experimentais para a quantificação de colágeno. A) DC – Dieta Comum; B) DC+Mel – Dieta Comum + Melatonina; C) DH – Dieta Hipercalórica; D) DH+Mel – Dieta Hipercalórica + Melatonina. Coloração Picrosirius.....68

Gráfico 2. Média dos valores da quantificação colágeno por picrosirius nos fígados dos filhotes das ratas dos grupos experimentais.....69

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos dos filhotes de 21 dias de idade dos ratos dos grupos experimentais.....62

Tabela 2. Valores médios de leucócitos (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLT) e proteínas plasmáticas totais (PPT) dos filhotes de 21 dias.....50

Tabela 3. Contagem diferencial de leucócitos de filhotes com 21 dias de nascidos.....51

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins dos filhotes das ratas dos grupos experimentais.....55

Capítulo III

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos dos filhotes de 21 dias de idade dos ratos dos grupos experimentais.....62

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do percentual do parênquima lobular e não lobular do fígado dos filhotes com 21 dias.....69

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

A ingestão excessiva de gorduras devido a mudanças no hábito alimentar e nutricional durante o século favorece o aparecimento de todas as comorbidades relacionadas a ela, como a hipertensão arterial, o diabetes mellitus, as hiperlipidemias e as doenças cardiovasculares (WHO, 2018). Além da relação entre gordura, peso corporal e lipoproteínas, os lipídios também podem tornar um organismo mais susceptível à danos oxidativos (FERNANDES, 2019).

Há evidências de que a má-nutrição intra-uterina pode “programar” os tecidos fetais de maneira a torná-los mais vulneráveis a desordens relacionadas à alimentação tais como diabetes tipo 2, síndrome metabólica e doenças crônico-degenerativas na idade adulta (LIMA 2018). Estudos experimentais que investigam a programação neonatal e doenças metabólicas em adultos têm se concentrado principalmente nos efeitos da restrição calórica ou protéica, cujos efeitos descritos na literatura passam por alterações no desenvolvimento somático, no consumo alimentar e alterações metabólicas (CREPALDI 2018). A presença de doenças como a obesidade, e consumo de dietas ricas em gorduras e/ou diabetes gestacional também tem sido foco desse tipo de trabalho (AMORIM et al., 2019).

Distintos trabalhos demonstram que a melatonina tem um papel no gasto energético, no ritmo circadiano da glicemia, na regulação da massa corporal e sobre a secreção e ação da insulina periférica (LIMA et al., 2018). A melatonina, produto hormonal da glândula pineal, é a algum tempo utilizada com efeitos no tecido adiposo, melhorando a sensibilidade à insulina. (LIMA et al., 2018). Este hormônio tem efeitos atenuadores da lesão celular induzida por radicais livres, devido à sua capacidade de reagir com radicais hidroxila (OH-) para formar (in vitro e in vivo) a 3-hidroximelatonina cíclica (3-OHM), metabólito estável da melatonina (REITER, 2016) sendo assim considerada um dos mais poderosos agentes antioxidantes naturais (TAN et al., 2015).

Estudos anteriores mostraram que durante o processo de envelhecimento, há uma correlação entre uma maior adiposidade visceral e diminuição dos níveis de melatonina (BJÖRNTORP, 1995). Rasmussen et al.

(2001) demonstraram que a administração diária de melatonina em ratos machos de meia-idade alimentados com dieta hiperlipídica, diminui o peso corporal, suprime a deposição de gordura visceral e restabelece os níveis plasmáticos normais de leptina e insulina.

Compreender o impacto da obesidade materna e alimentação excessiva está sendo considerado de grande importância, pois há uma correlação positiva entre o índice de massa corporal materno (IMC) durante a gravidez e o risco de obesidade na prole na vida adulta (BEZPALKO et al., 2015). Isto pode sugerir que alimentação excessiva materna seja um fator de programação para doenças futuras, semelhantemente às provocadas pela sub-nutrição (GREGORASZCZUK et al., 2016). No entanto, não há relatos na literatura sobre os possíveis efeitos benéficos da melatonina sobre a prole, em decorrência de um desequilíbrio alimentar materno durante a prenhez e período de lactação. Assim, a presente pesquisa teve o objetivo investigar os efeitos de uma dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação sobre a histofisiologia renal e hepática de neonatos após desmame e como a melatonina exógena pode influenciar nesse processo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OBESIDADE

A obesidade é definida como uma condição de acúmulo anormal ou excessivo de gordura saturadas no tecido adiposo, até níveis que podem trazer transtornos à saúde. O seu desenvolvimento resulta da hipertrofia e da hiperplasia dos adipócitos, onde o aumento do tamanho de tais células não é um processo ilimitado, eventualmente, seu crescimento atinge um grau máximo, e novas células são lentamente recrutadas para o tecido (FRUH, 2017). O excesso de gordura resulta, portanto, de sucessivos balanços energéticos positivos, em que a quantidade de energia ingerida é superior à quantidade de energia utilizada (WHO, 2018).

Trata-se de uma doença de proporções epidêmicas sendo considerada como um dos principais problemas de saúde pública. Cerca de 1,6 bilhões de adultos são considerados com sobrepeso e 400 milhões, obesos (GAO et al., 2016). Projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que em 2025, esse número aumentará consideravelmente, com cerca de 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso, e mais de 700 milhões obesos (WHO, 2018).

No Brasil, estima-se que cerca de 50% da população esteja acima do peso, ou seja, na faixa de sobrepeso e obeso. Em um levantamento oficial realizado pelo IBGE entre 2008/2009, a prevalência de tal condição cresceu continuamente. Em adultos, a taxa de sobrepeso aumentou cerca de três vezes no sexo masculino (de 18,5% para 50,1%) e cerca de duas vezes no sexo feminino (de 28,7% para 48,0%). No mesmo período, a prevalência da obesidade aumentou em mais de quatro vezes para homens (de 2,8% para 12,4%) e em mais de duas vezes para mulheres (de 8,0% para 16,9%) (VIGITEL, 2017; IBGE, 2019).

A distribuição geográfica dos indivíduos portadores desse excesso de peso e obeso é dependente de condições que geralmente podem estar associadas a diversas características, tais como; idade, sexo e situações socioeconômicas, além de fatores de riscos relacionados à saúde. Todos estes aspectos influenciam diretamente os percentuais característicos de crianças e

adultos (com faixas etárias distintas) observados nas diferentes regiões do Brasil (IBGE 2019)

A obesidade é classificada baseando-se no índice de massa corporal (IMC), que é calculado pela razão entre o peso em quilogramas, dividido pela altura (em metros) elevado ao quadrado ($IMC = Kg/m^2$), e também pelo risco de comorbidades associadas, em tipos I, II e III, sendo caracterizada quando o IMC se encontra acima de $30Kg/m^2$ (WHO, 1995). Apesar de ser utilizado pela OMS, são necessários outros indicadores que complementem a medição do IMC. As medidas de obesidade central, circunferência da cintura, e razão cintura-quadril trazem definições mais exatas da distribuição de gordura corporal, sendo tais medidas mais relacionadas à comorbidades e mortalidade subsequente (WHO, 2016).

São inúmeras as causas que podem levar ao desenvolvimento desta enfermidade. A facilidade de acesso e o baixo custo de alimentos altamente palatáveis e de grande densidade calórica, aliados ao menor requerimento de atividades físicas na vida diária, fizeram com que a prevalência da obesidade aumentasse em proporções alarmantes (SOUZA et al., 2018). Fatores genéticos também participam desse processo, porém acredita-se que apenas este não pode ser considerado como um fator conclusivo ao desenvolvimento da obesidade, uma vez que a carga genética humana não mudou tão drasticamente no curto período de tempo em que a obesidade se difundiu (VIVOLO e SARNO, 2018).

Outros fatores como distúrbios fisiológicos, metabólicos e psicológicos também parecem influenciar e, além disso, modificações no estilo de vida com o aumento do consumo de alimentos industrializados, ricos em gorduras e açúcares contribuíram grandiosamente para o desenvolvimento dessa patologia (COUTINHO; LINS, 2018).

2.1.1. Obesidade e Tecido Adiposo

As células adiposas se originam no embrião, a partir de células derivadas do mesênquima, os lipoblastos. São semelhantes a fibroblastos, porém logo acumulam gordura no seu citoplasma. O tecido adiposo (TA) é um tipo especial de tecido conjuntivo onde se observa a predominância de células adiposas (adipócitos). Estas células podem ser encontradas isoladas ou em pequenos

grupos no tecido conjuntivo comum, porém a maioria delas se agrupa no tecido adiposo espalhado pelo corpo. Este tecido é o maior depósito de energia (sob forma de triglicerídeos) do organismo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

Nos mamíferos existem dois tipos de TA: o tecido adiposo branco ou unilocular (TAB) e o tecido adiposo marrom ou multilocular (TAM). O TAM ou multilocular é formado por adipócitos caracterizados pela presença de várias gotículas lipídicas citoplasmáticas de tamanhos diferentes, núcleo esférico e excêntrico. Apresenta mitocôndrias que não sintetizam ATP, utilizando a energia liberada pela oxidação de ácidos graxos (AG) para gerar calor (PEDREIRA et al., 2018). Ao ser estimulado pela liberação de noradrenalina nas terminações nervosas abundantes em torno das suas células, o tecido adiposo multilocular acelera sua lipólise e oxidação dos AG. A oxidação dos AG produz calor e não ATP, porque as mitocôndrias do tecido multilocular apresentam nas suas membranas internas, uma proteína transmembrana chamada termogenina, também conhecida como proteína desacopladora-1 (UCP-1). Esta proteína permite a volta para a matriz mitocondrial dos prótons transportados para o espaço intermembranoso sem que eles passem pelo sistema de ATP sintetase existente nos corpúsculos elementares das mitocôndrias. Em consequência, a energia gerada pelo fluxo de prótons não é usada para sintetizar ATP, sendo dissipada como calor (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

O TAB, por sua vez, armazena os TAGs em uma única e grande gota lipídica que ocupa de 85-90% do citoplasma e empurra o núcleo e uma fina camada de citosol para a periferia da célula (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017). O armazenamento de lipídios e a sua incorporação em TAG dependem da captação de ácidos graxos (AG) contidos nos quilomícrons que estão fígado. Estes são transportados até o tecido adiposo onde sofrem a ação da enzima lipase de lipoproteínas que os degrada, liberando três moléculas de AG e uma de glicerol que são transferidas para o tecido adiposo constituindo seus triglicerídeos (LIMA, 2016). As células adiposas também sintetizam triglicerídeos a partir do AcetilCoA proveniente da glicólise (KATZUNG.; MASTERS; TREVOR, 2014).

Os adipócitos são as únicas células capazes de armazenar lipídios na forma de triacilglicerol (TAG). Essas células possuem todas as enzimas

necessárias para realização de lipogênese (síntese de ácidos graxos) e para estocar TAG quando a oferta energética é alta, bem como para mobilizá-lo quando ocorre escassez de energia (VALERO, MOSQUERA, 2017). As células hepáticas e o músculo esquelético também acumulam energia, mas sobre a forma de glicogênio. Os triglicerídeos são mais eficientes como reserva de energia porque fornecem 9,3 kcal/ g contra apenas 4,1 kcal/ g do glicogênio (LIMA, 2016).

Além dos adipócitos, o TA unilocular possui uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), nervos, vasos sanguíneos, nódulos linfáticos, células imunes, fibroblastos e pré-adipócitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017, VALERO, MOSQUERA, 2017).

Por apresentar diversas características, o tecido adiposo apresenta variadas funções, como auxiliar no isolamento térmico do organismo (na manutenção da temperatura corporal), servir como uma reserva energética além de atuar como amortecedor, protegendo o organismo contra choques mecânicos. Entretanto, o TA também produz várias substâncias com efeitos biológicos, como por exemplo: estrogênios, leptina, IL-6, TNF-alfa, adipnectina, estabelecendo uma atividade endócrina desse tecido. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017).

2.2. DIETAS E GESTAÇÃO

Experimentalmente diversos tipos de dietas disponíveis com o intuito de promover obesidade são observados. Em animais de laboratório, a gênese da obesidade está relacionada, em sua maioria, a mutações genéticas, porém esse modelo é muito distante do observado nos humanos (ROSINI; SILVA; MORAES, 2012).

A adoção de dietas hipercalóricas ou dietas hiperlipídicas tem sido muito utilizada como um modelo de indução de obesidade em animais de laboratório. Este modelo em particular é extremamente útil nas pesquisas de obesidade em animais devido a sua grande semelhança com a gênese e com as respostas metabólicas decorrentes da obesidade em humanos, ou seja, a obesidade é a causa de um balanço energético positivo gerado por fatores ambientais, como

por exemplo, o consumo em excesso de alimentos altamente calóricos e o sedentarismo (FRUH, 2017).

Alguns estudos têm demonstrado a eficácia da ingestão de dietas hipercalóricas ou dietas hiperlipídicas na gênese da obesidade e de suas comorbidades, os animais da linhagem Wistar são utilizados em estudos em que a obesidade é induzida por dietas, e os resultados mostram que o peso corporal encontra-se aumentado. Ratos Wistar tratados com dieta hipercalórica e hiperlipídica durante três meses aumentaram aproximadamente 1,4 vez a massa corporal quando comparados com animais-controle (NINAHUAMAN et al., 2017).

É bem sabido que a ingestão de dietas hiperlipídicas está relacionada ao desenvolvimento da obesidade. Pesquisadores observaram que ácidos graxos saturados de cadeia longa ligam-se a receptores do tipo Toll (TLR2 e TLR4) das micróglia, células protetoras do hipotálamo, estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, TNF- α , IL-1 β) e, conseqüentemente, destruindo os neurônios responsáveis pelo controle do apetite e da termogênese (ROMANATO et al. 2016).

O número de mulheres em idade reprodutiva consumidoras de dietas hiperlipídicas vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, despertando interesse sobre os efeitos na saúde da prole de mães consumidoras desse tipo de dieta (IBGE, 2019).

O ganho excessivo de peso materno pode induzir à diabetes gestacional, macrosomia fetal, dificuldades no parto e hipoglicemia do recém-nascido no período perinatal. Segundo Borengasser et al. (2014), a saúde, crescimento e desenvolvimento do recém-nascido estão relacionados com seu peso ao nascer e este é diretamente dependente do estado nutricional materno antes da concepção e gestação. Estudos têm demonstrado que a nutrição pré e pós-natal influenciam diretamente na predisposição de doenças crônicas associadas a alimentação, tais como obesidade, hipertensão e doenças cardiovasculares na vida adulta (GOHIR et al., 2019).

Segundo Mahany et al. (2018), o ambiente intrauterino rico em glicose (moderada ou severa hiperglicemia materna) induz hiperplasia nas células pancreáticas dos neonatos, bem como promove o aumento dos níveis de insulina no plasma.

2.3. COMORBIDADES ASSOCIADAS À OBESIDADE

A obesidade é um dos principais fatores de risco responsáveis pela maioria das mortes e doenças no mundo. Suas complicações incluem o diabetes mellitus tipo 2, a hipercolesterolemia, a hipertensão arterial, doenças cardiovasculares, apnéia do sono, problemas psico-sociais, doenças ortopédicas e diversos tipos de câncer. Recentemente, manifestações metabólicas como resistência à insulina, obesidade abdominal, dislipidemia e hipertensão foram agrupadas em uma única síndrome denominada Síndrome Metabólica (SM) (WHO, 2018).

A síndrome metabólica é definida como a associação de pelo menos três fatores de risco: obesidade abdominal, hipertensão arterial e hipertrigliceridemia, sendo essa associação considerada precursora de doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2 (OLIVEIRA, GUEDES, 2017). A diabetes tipo 2 pode ser resultado do excesso de tecido adiposo que pode gerar resistência à insulina. Essa resistência ocorre devido a algumas alterações como excesso de ácidos graxos livres na circulação, liberação de citocinas e acúmulo de ácidos graxos em outros tecidos como músculo, fígado e pâncreas (OSAIDA, FRIZZO, 2018).

As células β pancreáticas são aquelas responsáveis pela liberação de insulina de acordo com a glicemia plasmática. Em indivíduos obesos, estas células aumentam a secreção e liberação de insulina em resposta ao estado de resistência à insulina (RESENDE et al., 2016). A transição do estado de obesidade para diabetes tipo 2 ocorre no momento em que as células β pancreáticas perdem a capacidade de funcionar corretamente em resposta às concentrações glicêmicas (NEWGARD, 2017). Em modelos de obesidade, a resistência à insulina está associada à redução da expressão de transportador de glicose (GLUT4) e/ou prejuízo na via de sinalização da insulina em músculo esquelético e tecido adiposo, o que está associado a um quadro de inflamação subclínica característico da obesidade, resultante da maior circulação de fatores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-1b (IL-1 β), entre outros (PANVELOSKI-COSTA, et al., 2011).

2.3.1. Obesidade, lesões Hepáticas e renais

A doença do fígado gorduroso não-alcoólica (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) é considerada a manifestação hepática da síndrome metabólica (LOMBARDO et al., 2012). Engloba alterações como a esteatose, a cirrose e o carcinoma hepatocelular, e está intimamente associada a obesidade, diabetes e resistência à insulina (LOMBARDO et al., 2012). Os ácidos graxos que chegam ao fígado são provenientes de três fontes principais: os originários da dieta, absorvidos ao longo do intestino delgado e carreados como quilomícrons através da veia porta; os que derivam da hidrólise da gordura dos tecidos adiposos periféricos ou a partir da transformação de aminoácidos e, mais frequentemente, de carboidratos no interior do próprio fígado. Uma vez nos hepatócitos, esses ácidos graxos poderão ser transformados de três maneiras: a primeira ocorre ao nível das mitocôndrias e dos peroxissomas e envolve a β -oxidação dos ácidos graxos para fornecimento de energia alternativa, resultando na formação de gás carbônico, água e corpos cetônicos. Alternativamente, poderão ser esterificados para formar triglicérides, que junto com colesterol, fosfolípidos e apolipoproteínas irão compor as lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O VLDL formado é, então, secretado para a corrente sanguínea. Dessa forma, em condições normais o fígado não acumula gordura no interior do hepatócito (TILG et al., 2016).

Em várias populações, a elevação do IMC e a presença de síndrome metabólica se associam com diminuição da função renal e aparecimento de doença renal terminal, independentemente da presença de pressão arterial e diabetes (SCHELB et al., 2019). Mende et al. (2019) propõe que a deposição de gordura visceral poderia determinar compressão da cápsula renal, determinando retenção hidrossalina por ativação do sistema renina angiotensina aldosterona, além do aumento da atividade adrenérgica. Isso poderia causar alterações na hemodinâmica glomerular, ocasionando lesões e aparecimento de microalbuminúria.

Além disso, sabe-se que na patologia renal, a indução da obesidade utilizando-se dieta hipercalórica promove um aumento no inibidor ativador do plasmiogênio-1 (PAI-1), no fator de crescimento endotelial vascular (VEGF),

colágeno tipo IV e fibronectina resultando em glomeruloesclerose e proteinúria (RHEE et al., 2018).

O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas que inclui o fator de crescimento placentário (PLGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, e VEGF-F. Atua diretamente através dos receptores VEGFR-1 e VEGFR-2, expressos principalmente no endotélio vascular. A ligação do VEGF a esses receptores causa influxo de cálcio citoplasmático, aumentando sua concentração em até quatro vezes (SIMONS et al., 2016), promovendo também um aumento da permeabilidade das vênulas às macromoléculas, o que permite que proteínas plasmáticas extravasem, levando a coagulação do fibrinogênio e deposição de gel de fibrina que serve como matriz provisória para o crescimento de novos vasos sanguíneos, características que podem ser observadas em diversos processos fisiopatológicos, como nas alterações renais de diversos pacientes com obesidade (RAFII, CARMELIET, 2016).

2.3.2. Obesidade e danos oxidativos

Estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre antioxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs) a favor dos últimos. As EROs, que incluem radicais livres, são continuamente produzidas no corpo e têm importante papel fisiológico em baixas concentrações. Em altas concentrações, devido a sua alta reatividade, as EROs causam lesões irreversíveis através de alterações oxidativas em lipídios, proteínas e no DNA. Suspeita-se que alterações nestas estruturas estejam ligadas ao desenvolvimento de várias patologias humanas incluindo o câncer (SIES et al., 2017).

O estresse oxidativo é uma reação deletéria desencadeada por efeitos tóxicos causados por radicais livres no interior da célula (BARBOSA et al., 2010, SIES et al., 2017). As espécies reativas ao oxigênio (EROs) são átomos, íons ou moléculas que contém oxigênio com um elétron não-pareado em sua órbita externa. São caracterizados por grande instabilidade e elevada reatividade e tendem a ligar o elétron não-pareado com outros presentes em estruturas próximas de onde os EROs se formam, comportando-se como receptores (oxidantes) ou doadores (redutores) de elétrons. O potencial destrutivo do oxigênio é atribuído a sua possibilidade de desviar-se do estado

estável diradical (O₂) para um estado de forma ativa, tal como o oxigênio singlete (¹O₂) e no estado de radical livre conhecido como radical ânion superóxido (REIS et al., 2008, SIES et al., 2017). Os lipídios são as biomoléculas mais suscetíveis a reagir com EROs (SIES et al., 2017).

No fígado, a progressão da esteatose hepática está relacionada à ação de citocinas pró-inflamatórias, à disfunção mitocondrial e ao estresse oxidativo (LEITE; JAMAR; CARANTI, 2014). Stranahan et al. (2011) observaram, que a indução da alimentação rica em gordura saturada e açúcares simples em ratos aumentou o ganho de peso e as concentrações séricas de colesterol, assim como seu acúmulo no fígado e no hipocampo. Segundo os autores, o acúmulo de colesterol no hipocampo está relacionado ao maior estresse oxidativo, resultando em consequências na função neural.

Em pessoas obesas, existem vários fatores que interferem na suscetibilidade do indivíduo à presença de lesões oxidativas. Dentre eles merecem destaque a hiperglicemia, a atividade muscular aumentada, os elevados níveis de lipídios teciduais, a inflamação crônica, as defesas antioxidantes inadequadas e a hiperleptinemia (FRANÇA et al., 2013). A obesidade pode produzir peroxidação lipídica de três maneiras: aumentando a necessidade metabólica do miocárdio, o que aumenta o consumo de oxigênio e consequentemente a produção de EROS; através da lesão celular progressiva e cumulativa devido à pressão exercida pela grande massa corporal, levando a produção de citocinas e EROS; ou através de uma dieta hiperlipêmica, alterando o metabolismo do oxigênio, pois as moléculas dos ácidos graxos com duplas ligações são vulneráveis a reações oxidativas e consequentemente podem levar a peroxidação lipídica (NEVES, 2010). O processo de peroxidação lipídica pode iniciar-se em membranas celulares, especialmente na membrana interna da mitocôndria, quando o radical hidroxila busca abstrair o hidrogênio das ligações C-H da cadeia dos ácidos graxos poli-insaturados. Esta condição trará consequências homeostáticas severas para a membrana, refletindo, principalmente, na sua perda de integridade, permeabilidade e fluidez (KAGAN, 2018). Os produtos formados das oxidações dos lipídios (malondialdeídos) podem ser quantificados em espectrofotômetro por técnicas específicas laboratoriais (OLIVEIRA et al., 2015).

Dessa forma, como o dano oxidativo é uma condição presente observada no desenvolvimento da obesidade e das suas comorbidades, a administração de substâncias antioxidantes, que pudessem neutralizar os radicais livres ou elevar a defesa antioxidante nesses portadores poderia apresentar-se como uma alternativa aos diversos tipos de tratamentos já existentes. Um potente agente antioxidante produzido naturalmente pelo organismo é a melatonina, hormônio produzido e secretado pela glândula pineal, que desempenha diversas funções fisiológicas (MAGANHIN et al. 2013).

2.4. SÍNTESE E AÇÃO DA MELATONINA

Nos mamíferos, a integração entre a temporalidade externa e interna, ou seja, a percepção entre o claro e o escuro, é fornecida pelos núcleos supraquiasmáticos (NSQ) do hipotálamo (FUCHS et al., 2010), que recebem informações da luminosidade advindas diretamente do ambiente através do feixe nervoso retino-hipotalâmico (BUENO; WEY, 2012). A partir destas informações, os NSQ trabalham como um relógio fornecendo o sinal para a sincronização da ordem temporal interna com o ciclo claro/escuro dado pelo movimento de rotação da terra (PEREIRA; TUFIK; PEDRAZZOLI, 2009). As mensagens, que partem dos NSQ, são transmitidas para neurônios do segmento cervical da medula, e, em seguida, são enviadas para os gânglios simpáticos cervicais superiores, e destes para a glândula pineal (HIRIART, 2012).

Esta glândula, também conhecida como epífise, está localizada no teto do terceiro ventrículo entre os dois hemisférios cerebrais, originando-se do diencéfalo (MAGANHIN et al., 2013). É um órgão endócrino ativo, formado por células com função neurosecretora, os pinealócitos, e por células intersticiais semelhantes às células da glia (COMMENTZ; HELMKE, 1995). Seus produtos bioquimicamente específicos são indolaminas e peptídeos. A melatonina, uma indolamina, é o mais bem estudado dos produtos pineais (CALVO et al., 1995). Possui baixo peso molecular e característica anfifílica, ou seja, difunde-se tanto nos meios lipofílicos como hidrofílicos (CIPOLLA-NETO; AFECHÉ, 2008), permitindo sua entrada em qualquer compartimento do organismo.

Em humanos também é conhecida como N-acetil-5-metoxitriptamina, um composto orgânico de coloração amarelo-claro, que é transportada no plasma ligado a proteínas, em especial à albumina, tendo sua vida média variando entre 30 e 60 minutos (MAGANHIN et al., 2013).

A melatonina é sintetizada pelos pinealócitos a partir do neurotransmissor serotonina, o qual, por sua vez, tem como precursor o aminoácido triptofano (MAGANHIN et al., 2013). Esse processo ocorre quando a enzima triptofanhidroxilase (TH) converte o triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Posteriormente a 5-hidroxitriptofano descarboxilase (5-HTPD) remove o grupo alfa-carboxil terminal do 5-HTP e o transforma em serotonina. A N-acetiltransferase (NAT) catalisa a transferência do grupo acetil para a serotonina a partir do acetil-CoA, resultando na formação da N-acetilserotonina (NAS). Por fim, a enzima hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT) catalisa a reação de conversão do NAS em melatonina (MARONDE et al., 2011). Como a HIOMT só pode ser fabricada na ausência de luz, o mesmo ocorre com a melatonina, que é então denominada de agente endócrino da escuridão (HIRIART et al., 2012).

2.5. MELATONINA E TECIDO ADIPOSEO

A atividade funcional do tecido adiposo demonstra forte correlação com os ritmos circadianos, comprovando que existe um elo entre a glândula pineal e esse tecido. Os níveis circulantes de algumas citocinas como adiponectina, leptina, IL-6 e TNF- α , apresentam um perfil oscilatório num período de 24 horas, atestando essa correlação. A desregulação desse ritmo correlaciona-se com aumento do risco de obesidade, doenças cardiovasculares, diabetes, hipertensão, resistência à insulina, hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (SINGH; JADHAV, 2014).

Estudos apontam que a melatonina tem um importante papel na regulação da massa corpórea e balanço energético, podendo atuar de forma direta nos adipócitos, através de receptores MT1 e MT2 (TRUFAKIN et al., 2014). Segundo Alonso-Vale et al. (2004), a produção normal de leptina pelo TAB de ratos pinealectomizados se mostrou reduzida em relação aos animais intactos durante o jejum. Outros trabalhos confirmaram ainda que a

692 pinealectomia leva a um quadro de resistência à insulina devido a uma queda
693 de mais de 50% na quantidade de transportadores GLUT-4 nas células do
694 tecido adiposo e muscular, e que a reposição noturna de melatonina nesses
695 animais provocava a reversão completa do quadro (SANTOS, 2018).

696 Segundo Stenvers et al., (2019), o tratamento crônico com melatonina
697 induz aumento da sensibilidade à insulina acompanhada de regulação positiva
698 das etapas iniciais da ação do hormônio no hipotálamo, fígado, músculo
699 esquelético e tecido adiposo.

3. REFERÊNCIAS

- ALONSO-VALE, M.I.C; FORATO-ANHÊ, G.; BORGES-SILVA, C.N.; ANDREOTTI, S; PERES, S. B.; CIPOLLA-NETO, J.; LIMA, F.B.; Pinealectomy alters adipose tissue adaptability to fasting in rats. **Metabolism**. v. 53, p. 500-506, 2004.
- AMORIM, R. G.; GUEDES, G. S.; VASCONCELOS, S. M. L. Doença Renal do Diabetes: Cross-Linking entre Hiperglicemia, Desequilíbrio Redox e Inflamação. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*. v. 112, n. 5, p. 577-587, 2019.
- BALIKCIOGLU P.G., NEWGARD C.B. Metabolomic Signatures and Metabolic Complications in Childhood Obesity. *Pediatric Obesity. Contemporary Endocrinology*. P. 343-361. 2018.
- BEZPALKO L.; et al. Inflammatory response in visceral fat tissue and liver is prenatally programmed: Experimental research. **J Physiol Pharmacol**, v. 66, n. 1, p. 57-64, 2015
- BORENGASSER, S.J.; et al. High fat diet and in utero exposure to maternal obesity disrupts circadian rhythm and leads to metabolic programming of liver in rat offspring. **PLoS One**. v. 9, n. 1, p. 1-13, 2014
- BUENO, C.; WEY, D. Gênese e ontogênese do ritmo de sono/ vigília em humanos. **Rev. Biol**. v. 9, n. 3, p. 62-67, 2012.
- CALVO, J. R.; RAFII-EL-IDRISSI, M.; POZO, D.; GUERRERO, J. M.; Immunomodulatory role of melatonin: specific binding sites in human and rodent lymphoid cells (review). **J. Pineal Res**. v.18, p. 119-126, 1995.
- CIPOLLA-NETO, J.; AFECHE, S. C. Glândula pineal. In: Aires MM (Ed.) **Fisiol**. 3° ed. Rio de Janeiro: Editora Ganabara Koogan, p. 981-990, 2008.
- COMMENTZ, J. C.; HELMKE, K. Precocious puberty and decreased melatonin secretion due to a hypothalamic hamartoma. **Horm.Res.**, v.44, n. 6, p. 271-275, 1995.

746 CREPALDI, T. D. Goji Berry (*Lycium barbarum*) normaliza insulinemia e a
 747 sensibilidade hepática à insulina de ratos Wistar alimentados com dieta
 748 enriquecida com carboidratos simples. Dissertação apresentada ao Programa
 749 de Pós-graduação de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá,
 750 2018.

751 FERNANDES, M. S. S. Efeitos do treinamento físico na doença hepática
 752 gordurosa não alcoólica em camundongos: aspectos relacionados à biogênese
 753 mitocondrial, estresse oxidativo hepático e muscular. Dissertação apresentada
 754 à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Universidade de São
 755 Paulo, 2019

756 FRANÇA, B. K.; ALVES, M. R. M.; SOUTO, F. M. S.; TIZIANE, L.;
 757 BOAVENTURA, R. F.; GUIMARÃES, A.; ALVES, A. J. Peroxidação lipídica e
 758 obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos. **J. Port.**
 759 **Gastroenterol.**v.20, n.5, p. 199--206, 2013.

760 FRUH, S. Obesity: Risk factors, complications, and strategies for sustainable
 761 long-term weight management. **J Am Acad Nurse Pract**, v. 29, p. S3–S14,
 762 2017

763 FUCHS, L. F. P.; GUIMARAES, C. R.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. S.;
 764 BARACAT, M. C. P.; SMITH, J. M. J.; BARACAT, E. C. Melatonin action in
 765 apoptosis and vascular endothelial growth factor in adrenal cortex of
 766 pinealectomized female rats. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 32, p. 374-380,
 767 2010.

768 GOHIR W.; et al. High-fat diet intake modulates maternal intestinal adaptations
 769 to pregnancy and results in placental hypoxia, as well as altered fetal gut barrier
 770 proteins and immune markers. **J Physiol**, v. 597, n.12, p. 3029-3051, 2019.

771 GREGORASZCZUK, E.; et al. Maternal high-fat diet during pregnancy and
 772 lactation had gender difference effect on adiponectin in rat offspring. **J Physiol**
 773 **Pharmacol**, v. 67, n. 4, p. 543-553, 2016.

774 HIRIART, B. M.; MORFFIZ, Y. S.; TORRES, K. U.; MICHELL, Y. D. T.; SOSA,
 775 J. L. B. Hormona de la oscuridad. ÍNDICE CONTENTS. Hormona de
 776 la oscuridad. **Rev. Latinoamer. Patol. Clin.** v. 59, n. 4, p. 222-232 , 2012.

777 IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. IBGE dá
 778 início à Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) 2019. Disponível em <
 779 <https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 29 de out. 2019.

780 IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos
 781 Familiares, 2008-2009: Antropometria e estado nutricional de crianças,
 782 adolescentes e adultos do Brasil. Rio de Janeiro: **IBGE**, 2010.

783 JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histol. Bas.** 13ª edição – Editora
 784 Guanabara-Koogan, 2017.

785 KAGAN, E. V. Lipid peroxidation in biomembranes. 2º edição. Editor: CRC
 786 Press, 2018

787 KATZUNG, BERTRAM G.; MASTERS, SUSAN B.; TREVOR, Anthony J.
 788 **Fisiologia Médica de Ganong**.AMGH Editora, 2014.

789 LEITE, B. F.; JAMAR, G.; CARANTI, D. A. Efeito dos ácidos graxos na
 790 Síndrome Metabólica: uma revisão de literatura. **Nutrire: Rev. Soc. Bras.** v.
 791 39, n. 1, p. 113-129, São Paulo, 2014.

792 LIMA, B. S.; LUCCA, L. B.; MENEZES, C.; SIMINO, L. A. P.; TORSONI, M. A.;
 793 MILANSKI, M.; TORSONI, A. S.; IGNACIO-SOUZA, L. M. Relação entre
 794 metabolism materno e rescimento fetal na prole de camundongos alimentados
 795 com dieta hiperlipídica. *Rev. trab. Iniciaç. Cient.* n. 26, 2018.

796 LIMA, L. Obesidade: a arte de remover esse peso. 1º edição – Editora Haryon,
 797 2018

798 LOMBARDO, E.; VAN ROOMEN, C.P.A.A.; VAN PUIJVELDE, G.H.;
 799 OTTENHOFF, R.; VAN EIJK, M.; ATEN, J.; KUIPER, J.; OVERKLEEF, H.S.;
 800 GROEN, A.K.; VERHOEVEN, A.J.; AERTS, J.M.F.G.; BIETRIX, F. Correction of

801 Liver Steatosis by a Hydrophobic Iminosugar Modulating Glycosphingolipids
 802 Metabolism. **PLoS ONE**, v.7, n.10, p. 38520, 2012.

803 MAGANHIN, C. C.; CARBONEL, A. A. F.; HATTY, J. H.; FUCHS, L. F. P.;
 804 OLIVEIRA-JÚNIOR, I. S. D.; SIMÕES, M. D. J.; SOARES-JR, J. M. Melatonin
 805 effects on the female genital system: a brief review. **Rev. Assoc. Med. Bras.**
 806 v.54, n.3, p. 267-271, 2008.

807 MAGANHIN, C. C.; FUCHS, L. F. P.; SIMÕES, R. S.; OLIVEIRA-FILHO, R. M.;
 808 SIMÕES, M. J.; BARACAR, E. C.; SOARES-JR, J. M. Effects of melatonin on
 809 ovarian follicles. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and*
 810 *Reproductive Biology*. v. 166, p. 178-184, 2013.

811 MAHANY, E. B.; et al. Obesity and High-Fat Diet Induce Distinct Changes in
 812 Placental Gene Expression and Pregnancy Outcome. **Endocrinology**, v. 159,
 813 n. 4, p. 1718-1733, 2018

814 NEVES, C.F. Avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo e estado
 815 inflamatório em pacientes no pré e pós-operatório de cirurgia da obesidade
 816 **[Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição**
 817 **Humana; Faculdade de Ciências da Saúde, Departamento de**
 818 **nutrição]**.Brasília: Universidade de Brasília, 2010.

819 NINAHUAMAN, M. F.; CAMPOS, D.; DE MATOS, R.; DE ABREU, V.
 820 ELABORAÇÃO DE DIETA HIPERLIPÍDICA DE BAIXO CUSTO PARA
 821 INDUÇÃO DE HIPERCOLESTEROLEMIA EM RATOS. *Acta Scientiae*
 822 *Biological Research*, v. 2, n. 2, p. 55-67, 2018.

823 OLIVEIRA, G. R.; DARTAGNAN, R. P. G. Desempenho de diferentes critérios
 824 diagnósticos de sobrepeso e obesidade como produtores de syndrome
 825 metabólica em adolescents. *Jornal de Pediatria*, v. 93, n. 5, p. 525-531, 2017.

826 OLIVEIRA, T. W. S. Dieta hiperlipídica na gestação e lactação: efeitos sobre
 827 parâmetros metabólicos e do consumo alimentar em ratos adultos. Programa
 828 de Pós graduação em alimentos, nutrição e saúde. **[Dissertação de**
 829 **Mestrado]**. 2010. Disponível em:<http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/9676>

830 PANVELOSKI-COSTA, A. C.; PINTO, D. A. C. J.; BRANDÃO, B. B.; MOREIRA,
831 R. J.; MACHADO, U. F.; SERAPHIM, P. M. Treinamento resistido reduz
832 inflamação em músculo esquelético e melhora a sensibilidade à insulina
833 periférica em ratos obesos induzidos por dieta hiperlipídica. **Arq. Bras.**
834 **Endocrinol. Metab.** v. 55, n.2, 2011.

835 PEDREIRA, G. D. M.; FERNANDES, A. L. M.; BORBA, M. C. O.; BECHARA,
836 M. Z. Tecido Adiposo Marrom: Atualizações e Perspectivas. *International*
837 *journal of nutrology*. V. 11, n 1. P. 324-327

838 PEREIRA, D. S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. Moléculas que marcam o tempo:
839 implicações para os fenótipos circadianos, Timekeeping molecules: implications
840 for circadian phenotypes. **Rev. Brasileira de psiquiatria**.v. 31, n. 1, p. 63-71,
841 2009.

842 RASMUSSEN, D.D.; MITTON, D.R.; LARSEN, S.A.; YELLON, S.M. Aging
843 dependent changes in the effect of daily melatonin supplementation on rat
844 metabolic and behavioral responses. **J. Pineal Res.** v.1, p.89-94, 2001.

845 REITER, R. J.; et al. Melatonin as an antioxidant: under promises but over
846 delivers. **J Pineal Res**, v. 61, n. 3, p. 253-78, 2016

847 REZENDE, R.; SANTOS, C.; DUBOW, C.; VARGAS, S. C.; POHL, H. H.;
848 PAIVA, D. N. Efeitos do exercício físico na resistência à insulina em indivíduos
849 obesos. *CINERGIS*, v. 17, n. 3, p. 245-249, 2016.

850 RHEE, C. M.; AHMADI, S-F.; KOESDY, C. P.; KALANTAR-ZALDEH, K. Low-
851 protein diet for conservative management of chronic kidney disease: a
852 systematic review and meta-analysis of controlled trials. *Journal of cachexia,*
853 *sarcopenia and muscle*, v. 9, p. 235-245, 2018.

854 ROMANATTO, T.; ROMAN, E. A.; ARRUDA, A. P.; DENIS, R. G.; SOLON, C.;
855 MILANSKI, M.; MORAES, J. C.; BONFLEUR, M. L.; DEGASPERI, G. R.;
856 PICARDI, P. K.; HIRABARA, S.; BOSCHERO, A. C.; CURI, R.; VELLOSO, L. A.
857 Deletion of tumor necrosis factor- α receptor 1 (TNFR1) protects against diet-

858 induced obesity by means of increased thermogenesis. Journal of Biological
859 Chemistry, v. 284, p. 3613-3622, 2016.

860 ROSINI, T. C.; DA SILVA, A. S. R.; DE MORAES, C. Obesidade induzida por
861 consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios
862 relacionados com a obesidade. **Rev. As. Med. Bra.**, v.58, n.3, p. 383-387,2012.

863 SIES, H.; BERNT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. Annu. Rev. Biochem. V.
864 86, p. 715-748, 2017.

865 SINGH, M.; JADHAV, H. R. Melatonin: Functions and ligands. **Drug Discov**
866 **Today**. v. 19, n. 9, p. 1410-1418, 2014

867 STENVERS, D. J.; SCHEER, F. A. J. L.; SCHRAUWEN, P.; LA FLEUR, S.;
868 KALSBECK, A. Circadian clocks and insulin resistance. Nature Reviews:
869 Endocrinology, v. 15, p. 75-89, 2019.

870 STRANAHAN, A.M.; CUTLER, R.G.; BUTTON, C.; TELLJOHANN, R.;
871 MATTSON, M.P. Diet-induced elevations in serum cholesterol are associated
872 with alterations in hippocampal lipid metabolism and increased oxidative stress.
873 **J. Neurochem**. v. 118(4), p. 611-615, 2011.

874 TAN, D. X.; et al. Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant:
875 Synthesis and Metabolism. **Molecule**, v. 20, n. 10, p. 18886- 18906, 2015.

876 TILG, H.; MOSCHEN, A. R.; RODEN, M. NAFLD and diabetes mellitus. Nature
877 Reviews: Gastroenterology & hepatology. v. 14, p. 32-42, 2017.

878 TRUFAKIN, V. A.; et al. Effect of Melatonin on Cellular Composition of the
879 Spleen and Parameters of Lipid Metabolism in Rats with Alimentary Obesity. **B**
880 **Exp Biol Med**, v. 158, n. 1, p. 49-52, 2014

881 VALERO, N.; MOSQUERA, J. Adipocitos, peptídeos antimicrobianos e
882 imunidade. Investigacion Clinica, v. 58, n. 4, p. 319-321, 2017.

883 **VIGITEL Brasil 2011**: vigilância de fatores de risco e proteção para doenças
884 crônicas por inquerito telefonico. Brasília, 2012.

885 WHO. Obesity and overweight, 2018. Disponível em < <https://www.who.int/>>.
886 Acesso em: 23 de jul. 2018.

887 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Bod mass index classification – report of a
888 WHO consultation on obesity. Geneva: **WHO**, 1995. Technical Reports Series
889 854.

890

891

892

893

894

895

896

897

898

899

900

901

902

903

904

905

906

907

908

909

CAPÍTULO II

EFEITOS DE DIETA HIPERLIPÍDICA ASSOCIADA OU NÃO A MELATONINA EXÓGENA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO SOBRE A HISTOFISIOLOGIA RENAL DOS NEONATOS

Clovis José Cavalcanti Lapa Neto^a; Ismaela Maria Ferreira de Melo^a; Ana Janaina
Jeanine Lemos-Jordão^b; Leucio Duarte Vieira Filho^c; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^a;
Valéria Wanderley Teixeira^{a*}

^a Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife - PE,
Brasil

^b Departamento Medicina, Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), R.
Aprígio Veloso, 882- Universitário, 58428-830, Campina Grande - PB, Brasil

^c Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco
(UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, 50670-901, Recife - PE,
Brasil

***Autor para correspondência:** UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389.
E-mail: valeria.wanderley@ufrpe.br (Wanderley-Teixeira,V.)

RESUMO

A má-nutrição intra-uterina pode “programar” os tecidos fetais de maneira a torná-los mais vulneráveis a desordens relacionadas à alimentação tais como diabetes tipo 2, síndrome metabólica e também influenciam negativamente no desenvolvimento renal da prole. A melatonina, produto hormonal da glândula pineal, este hormônio tem efeitos atenuadores da lesão celular induzida por radicais livres, sendo assim considerada um dos mais poderosos agentes antioxidantes naturais. A presente pesquisa investigou os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação associada ou não à melatonina sobre os rins da prole. Utilizou-se 40 ratas albinas, divididas em quatro grupos: DC - ratas prenhes submetidas à dieta comum; DC+Mel - ratas prenhes submetidas à dieta comum, tratadas com melatonina (5,0mg / kg); DH - ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica; DH+Mel - ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica, tratadas com melatonina (5,0mg / kg). Foram dosados parâmetros bioquímicos, hemograma completo, contagem diferencial de leucócitos além da histopatologia, histoquímica e morfometria do rim. Os rins dos animais do grupo DH demonstraram glomerulonefrite e atrofia glomerular, além de alterações bioquímicas e no hemograma, porém no grupo que recebeu melatonina, a mesma foi capaz de normalizar praticamente todos os parâmetros mantendo estatisticamente semelhantes ao grupo controle (DC). Assim, concluímos que a melatonina tem um grande potencial em reverter os danos na função renal da prole de ratos devido a uma dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação.

Palavras-chave: rins, melatonina, hemograma, histopatologia, programação fetal

1. INTRODUÇÃO

Obesidade gestacional pode acarretar vários riscos maternos e fetais. Dentre estes, destacam-se a ocorrência do diabetes mellitus gestacional, síndromes hipertensivas (hipertensão crônica e pré-eclâmpsia), infecção urinária, parto induzido e cesarianas, hemorragia pós-parto, infecção puerperal e doença tromboembólica (ATHUKORALA et al., 2010; FONSECA; TRALDI, 2014).

A obesidade materna não causa apenas complicações em curto prazo, mas também têm efeitos em longo prazo na composição corporal, metabolismo, resistência à insulina e dislipidemia (WANKHADE et al., 2016). Há um foco crescente de estudos nos efeitos específicos da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica materna (DFC) na prole, onde a obesidade materna pode induzir efeitos na programação fisiológica e desenvolvimento de órgãos (ELLSWORTH et al., 2018; CHANG et al., 2019; FALL; KUMARAN 2019).

Nos fetos uma dieta hipercalórica pode levar a uma ativação inapropriada do sistema renina-angiotensina e um manuseio incorreto do sódio tubular, além disso, o relógio circadiano renal está envolvido no balanço de sódio e controle da pressão arterial, a desregulação deste relógio pode aumentar o risco de uma variedade de doenças metabólicas futuras (TOKONAMI et al., 2014, TAIN; JOLES, 2015, TAIN; HSU, 2017, TAIN et al., 2017).

Segundo Júnior et al. (2015), a participação de mecanismos inflamatórios tem sido cada vez mais apresentada nos processos fisiopatológicos da progressão da doença renal, incluindo fibrose glomerular e/ou túbulo intersticial progressiva, lesão capilar peritubular por hipóxia e perda da funcionalidade dos néfrons.

Essas alterações agem conjuntamente em muitos tecidos com o estresse oxidativo o qual induz a produção de citocinas inflamatórias promovendo a produção de radicais

livres (GUIMARÃES-SOUZA et al., 2015), apresentando-se, portanto, como um sério problema relacionado a obesidade e suas comorbidades.

Devido a esse fato tem-se buscado estratégias terapêuticas através do uso de antioxidantes, cujo objetivo é atenuar a superprodução das espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) (FORD; AJANI; MOKDAD, 2005). A melatonina, uma indolamina produzida durante a fase de escuro pela glândula pineal, é considerada um dos mais poderosos agentes antioxidantes naturais (TAN et al., 2002) e apresenta relações diretas com o tecido adiposo, sendo mediadora fundamental para a otimização do balanço de energia e regulação do peso corporal (CIPOLLA-NETO et al., 2014).

Assim, a presente pesquisa avaliou se a melatonina exógena associada ou não a uma dieta hiperlipídica em ratas prenhes pode prevenir danos na histofisiologia renal da prole.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção dos animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 40 ratas albinas (*Rattus norvegicus albinus*) com 90 dias de idade, com 200 ± 30g, linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética Institucional (CEUA), licença de número: 012/2014. Vinte fêmeas foram mantidas em gaiolas com alimentação comercial da marca (Labina®) e água à vontade e as outras vinte receberam dieta hipercalórica da empresa Prag Soluções Comercio e Servicos

Ltda Me (Pragsolutions[®]), previamente padronizada por Estadella (2001), e água à vontade, formando-se assim 4 grupos de matrizes:

- DC: ratas prenhes submetidas à dieta comum durante toda a gestação e lactação;
- DC+Mel: ratas prenhes submetidas à dieta comum e administradas com melatonina durante toda a gestação e período de lactação;
- DH: ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica durante toda a gestação e período de lactação;
- DH+Mel: ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica e administradas com melatonina durante toda a gestação e período de lactação.

2.2 Composição Nutricional Das Rações

As dietas possuem a composição estabelecida nas tabelas abaixo:

1 - Dieta (High Fat) Integral 60% 5205 cal/Kg - Peletes mais macios

	Composição (%)	Composição (cal/Kg)
Matéria mineral	5,00	0
Proteína bruta	26,00	1040
Extrato etéreo (gordura)	34,50	3105
Fibra bruta	8,00	0
Carboidratos	26,50	1060
	100,00	5205

2 - Dieta Controle Integral

	Composição (%)	Composição (cal/Kg)
Matéria mineral	6,00	0
Proteína bruta	22,00	880
Extrato etéreo (gordura)	4,00	360
Fibra bruta	7,00	0
Carboidratos	61,00	2440
	100,00	3680

1027

1028 **2.3. Diagnóstico de prenhez**

1029

1030 O diagnóstico da prenhez foi realizado através do exame colpocitológico, onde
1031 após confirmação da presença de espermatozoide no esfregaço vaginal, o animal era
1032 considerado prenhe.

1033 **2.4. Tratamento com Melatonina**

1034

1035 A administração de melatonina foi realizada nas ratas dos grupos DC+Mel e
1036 DH+Mel de acordo com o protocolo estabelecido por KIM et al, (1998). A dose de
1037 melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) administrada foi de 0,5 mg/Kg,
1038 dissolvida em 100 microlitros de álcool e acrescido de 300 microlitros de solução
1039 fisiológica (NaCl 0,9%) (Subramanian et al., 2007). A melatonina foi aplicada às 18:00
1040 horas por via intraperitoneal.

1041

1042 **2.5. Coletas de sangue, rim e análise bioquímica**

1043

A coleta de sangue dos filhotes foi feita por punção cardíaca no 21º dia, após anestesia com pentobarbital 40mg/kg por via intraperitoneal (LIMA et al., 2005). O sangue dos filhotes foi coletado em tubos com gel separador, os tubos foram centrifugados à 500 G durante 10 minutos para obtenção do soro. Este, foi acondicionado à -80°C até o momento das análises. Para isto foi utilizado kits da Labtest, segundo os catálogos referenciados: Uréia (cod: 104-4/50), Creatinina (cod: 96-300), Proteínas totais (cod: 99-250) e Albumina (cod: 19-1/250). Todas as amostras foram realizadas em triplicata. Após eutanásia dos animais, os rins foram coletados e fixados em formaldeído a 10% tamponado por 24 horas, para posterior inclusão em parafina e confecção das lâminas. Para a realização do hemograma foi utilizado 1 mL de sangue do filhote de cada grupo, coletado no 21º dia em microtubos contendo ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Após a coleta o sangue foi enviado ao hospital veterinário da UFRPE para realização do hemograma.

2.6 Estresse Oxidativo Plasmático

Foi utilizado 1 mL de sangue dos filhotes de 21 dias de cada grupo experimental. As amostras foram submetidas à centrifugação em uma temperatura de 4°C com velocidade de 3000 RPM por 10 minutos para obtenção do plasma, que foi mantido em -80°C até o momento da análise. Os níveis de óxido nítrico foram determinados pelo método baseado na reação colorimétrica de Griess (GREEN et al. 1982), que envolve a detecção do nitrito (NO^{2-}) e a oxidação do Óxido Nítrico (NO) no plasma. Em duplicatas, 50 microlitros de plasma foram colocados em uma placa de 96 poços, onde o mesmo volume de reagente de Griess foi adicionado. Após 10 minutos de incubação a

leitura foi realizada em espectrofotômetro regulado para 490 nm de comprimento de onda.

2.7 Análise histopatológica, morfométrica e histoquímica (colágeno) dos rins

Para a análise histopatológica foram feitos cortes do tecido e foram corados pela Hematoxilina-Eosina (H.E.). A análise histoquímica foi realizada através da coloração do Tricrômico de Mallory, onde o resultado da quantificação de colágeno foi expresso através de quantificação de pixels. Para análise morfométrica foram mensurados os seguintes parâmetros: Diâmetro do glomerular (DG), volume do glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman seguindo a metodologia de Akaoka et al. (1994).

2.8 Análise imunohistoquímica

Secções dos rins dos animais de todos os grupos foram usadas para análise imunohistoquímica. Inicialmente, as secções foram desparafinizadas com xilol e hidratadas com etanol. Os cortes foram incubados com anticorpo anti-IL-1(Santa Cruz Biotechnology, 1:50), overnight, e posteriormente incubados com streptavidina-peroxidase, sendo então revelados com substrato cromógeno 3, 3'diaminobenzidina (DAB) e contra-coradas com Hematoxilina de Harris. O controle negativo foi realizado na ausência do anticorpo primário. A quantificação em pixels da marcação foi realizada utilizando o programa GIMP 2.8.

1093

1094 **2.9. Análise Estatística**

1095

1096 Os dados obtidos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis,
1097 onde as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon Mann-Whitney ($p <$
1098 0,05).

1099 **RESULTADOS**

1100 **3.1 Avaliação Bioquímica**

1101 As dosagens de albumina, creatinina e proteína não demonstraram diferença
1102 estatística entre os grupos experimentais. As dosagens de óxido nítrico e ureia foram
1103 elevadas no grupo DH. (Tabela 1).

1104

1105 **3.2 Hemograma**

1106 Foi possível observar que não houve alterações nos valores de hematócrito
1107 (HCT) e hemoglobina (HGB) em nenhum dos grupos experimentais. Já para os valores
1108 de hemoglobina corpuscular média (CHCM), plaquetas (PLT), proteínas plasmáticas
1109 totais (PPT), eritrócitos (RBC) e leucócitos (WBC), a melatonina administrada no grupo
1110 DH+Mel foi capaz de manter os valores estatisticamente semelhantes aos do grupo
1111 controle (DC), entretanto os valores do volume corpuscular médio (VCM) se mostraram
1112 estatisticamente reduzido em relação aos demais grupos (DC). O grupo DH só
1113 apresentou média elevada para os valores de PLT (Tabela 2).

1114 A contagem diferencial de leucócitos revelou que não houve diferença estatística
1115 em relação a quantidade de basófilos, eosinófilos, metamielócitos, monócitos e
1116 neutrófilos bastonetes entre os grupos experimentais. No entanto, sobre o número de
1117 linfócitos, a melatonina administrada no grupo DH+Mel foi capaz de manter os valores

estatisticamente semelhantes ao do grupo controle (DC). A menor média de linfócito foi verificada para o grupo DH. Para os neutrófilos segmentados o maior valor foi observado para o grupo DH, entretanto a melatonina restabeleceu a valores similares aos demais grupos. Apenas a contagem de neutrófilos bastonetes foi reduzida no grupo DH+Mel em relação ao grupo controle (DC) (Tabela 3).

3.3 Análise Histopatológica, Histoquímica e Imunohistoquímica dos Rins

Os rins dos animais dos grupos experimentais apresentaram todos os seus componentes estruturais bem definidos, constituindo-se de cápsula fibrosa, região cortical e medular. Nos animais dos grupos DC e DC+Mel observou-se cápsula de Bowman, espaço capsular e glomérulos bem preservados.

Os rins dos animais do grupo DH apresentaram glomerulonefrite proliferativa com desaparecimento do espaço de Bowman e atrofia glomerular, sem sinais de necrose. Já os rins dos filhotes do grupo DH + Mel revelaram glomérulos sem atrofia, porém com a presença de glomerulonefrite proliferativa discreta (inflamação discreta nos glomérulos), mostrando que a melatonina foi capaz de amenizar efeitos causados pela dieta (Figura 1).

A análise histoquímica para quantificação do colágeno revelou a potencial eficácia da melatonina exógena em diminuir os níveis de colágeno presente nos rins dos filhotes ao comparar a significativa diminuição no grupo DH+Mel em relação ao grupo DH, sendo assim, semelhante ao grupo DC e DC + Mel. (Gráfico 1).

Houve imunomarcagem para a interleucina IL-1, entretanto, a análise quantitativa dessa citocina revelou aumento significativo nos rins dos filhotes cujas matrizes foram alimentadas com a dieta hiperlipídica (Figura 2)

3.4 Análise da Morfometria dos Rins

Os dados obtidos revelam que o grupo tratado com dieta hiperlipídica associada à melatonina (DH+MEL) apresentou aumento do diâmetro e volume glomerular, além do aumento do diâmetro e volume da cápsula de Bowman, se igualando aos demais grupos que receberam a dieta comum (DC) e dieta comum associada à melatonina (DC+Mel) (Tabela 4).

6. DISCUSSÃO

A não alteração dos valores de creatinina e albumina e proteínas demonstra que a função renal não foi alterada a ponto de causar danos aos animais, tendo em vista que essas substâncias são indicadoras de patologias renais (AL-HABORI et al., 2002). Já os níveis da uréia se mostraram elevados no grupo DH, o que pode indicar o início de uma patologia renal crônica, levando a uma deficiência de filtração dos rins (VIANNA et al. 2011). Porém a melatonina foi capaz de normalizar estes valores mantendo-os semelhantes ao do grupo DC.

O aumento da dosagem de NO no grupo DH demonstra uma situação de estresse oxidativo, já que é uma molécula potencialmente tóxica. Em casos de glomerulonefrite é comum observar uma quantidade elevada de NO (BACHMANN; MUNDEL, 1994), que foi revertido pela melatonina devido a sua capacidade antioxidante (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000)

O hemograma é um exame que traz informações importantes para o diagnóstico de doenças (ROSENFELD, 2012). Os resultados obtidos na pesquisa demonstraram que os animais do grupo DH+Mel, não apresentaram quadro de anemia, tendo em vista que a melatonina pode ter protegido a produção hormonal de eritropoietina, por ter apresentado valores dentro da normalidade em todos os grupos (DOS ANJOS;

BARBOSA, 2015). Um aumento plaquetário foi observado no grupo DH, isso pode estar relacionado com eventos vasculares agudos ligados a obesidade, como a aterosclerose, já que após erosão ou ruptura de uma placa aterosclerótica, a ativação plaquetária é necessária na realização de eventos pró-trombóticos. (DO PRADO JUNIOR et al., 2015).

Segundo Dos Anjos; Barbosa (2015) a obesidade interfere diminuindo a função imune do animal, porém, esta influência depende do tempo de exposição da dieta hiperlipídica. Este curto período pode ser o responsável pela não alteração da maioria dos parâmetros analisados na contagem diferencial leucocitária. Já a quantidade de neutrófilos foi menor no grupo DH+Mel que no grupo DC, por se tratarem de células que associadas a doenças autoimunes e inflamatórias, mostra o efeito da melatonina em promover uma diminuição dessas células (CALVO; GONZÁLES-YANES; MALDONADO, 2013).

Os resultados da histopatologia demonstraram que a dieta hipercalórica promoveu glomerulonefrite proliferativa, atrofia glomerular e desaparecimento do espaço de Bowman, resultado que é confirmado pela análise morfométrica do rim onde foi visto a redução do diâmetro e volume glomerular além do volume e diâmetro da capsula de Bowman, mostrando que esta dieta promoveu um efeito nocivo ao funcionamento renal muito provavelmente pelo aumento de danos oxidativos no tecido e possíveis células pré apoptóticas podendo causar uma redução da massa nefrótica e dificuldade na filtração glomerular. (MUNHFELD et al, 2004; PRAGA; MORALES, 2016)

Já ao comparar os resultados do grupo DH+Mel, foi visto que, a melatonina, exerceu a normalização histopatológica dos glomérulos, e também dos valores de diâmetro e volume tanto da capsula de Bowman quanto dos glomérulos se igualando

aos do grupo DC. Esse efeito provavelmente se dá pelas propriedades antioxidantes da melatonina (GOUDARZI et al, 2017).

A quantificação histoquímica também demonstrou um aumento nos níveis de colágeno, levando a uma possível fibrose, tendo em vista que em estudos com ratas pinealectomizadas os níveis de colágeno foram aumentados e nos animais que receberam melatonina, esses níveis de colágeno foram reduzidos, se igualando ao do grupo controle (ATIK et al, 2011). O mesmo efeito foi visto no nosso trabalho, onde a melatonina reduziu os níveis de colágeno no grupo DH+Mel em relação ao grupo DH, diminuindo assim os riscos de fibrose renal. (YURT et al, 2013).

O aumento significativo na expressão da citocina IL-1 β do grupo submetido a dieta hiperlipídica (DH) pode ser explicado pelo processo inflamatório associado a ingestão de dietas ricas em gorduras e a obesidade, dessa forma, se sabe que a IL-1 está diretamente relacionada com o aumento da TNF- α , e de modo que juntas estimulam a síntese de IL-6. (VOLP, 2008.; MONTES, 2013). Essa relação entre as citocinas pró-inflamatórias também pode ser associada a fibrogênese observada no grupo DH, pois de acordo com Silva (2016) durante esse processo a IL-6 e TNF- α estão atuando como promotores desse encadeamento. Enquanto a redução para a quantificação da IL-1 nos grupos tratados com melatonina em relação ao grupo DH pode ser explicada pela capacidade inibidora de citocinas pró-inflamatórias desse hormônio. (HARDELAND, 2018).

7. CONCLUSÃO

É possível concluir que a melatonina exerceu efeito protetor em alguns dos parâmetros estudados, em filhotes provenientes de mães alimentadas com dieta

1216 hiperlipídicas durante a gravidez e lactação, mantendo a função renal normalizada, e
1217 diminuindo os riscos de patologias renais, relacionadas à obesidade, na idade adulta.

1218

1219 **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1220 AKAOKA, K.; WHITE, R.H.; RAAFAT, F. Human glomerular growth during
1221 childhood: a morphometric study. **J. Pathol.** v. 173, p. 261-268, 1994.

1222 AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological
1223 evaluation of Catha edulis leaves: a long term feeding experiment in animals. *J*
1224 *Ethnopharmacol*, v. 83, n. 3, p. 209- 217, 2002.

1225 ATHUKORALA, C.; RUMBOLD, A.R.; WILLSON, K.J.; CROWTHER, C.A. The risk of
1226 adverse pregnancy outcomes in women who are overweight or obese. *BMC Pregnancy and*
1227 *Childbirth*. v. 10(56). p.2-8, 2010.

1228 ATIK, B. et al. The Effects of Exogenous Melatonin on Peripheral Nerve Regeneration
1229 and Collagen Formation in Rats. *Journal of Surgical Research*, v. 166. n. 2, p. 330-336,
1230 2011.

1231 Bachmann S, Mundel P. Nitric oxide in the kidney: synthesis, localization and
1232 function. *American J Kidney Dis*. v. 24, p. 112-129, 1994.

1233 BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al . Estresse oxidativo: conceito, implicações e
1234 fatores modulatórios. *Rev. Nutr.*, Campinas , v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010 .

1235 BLOCH, K, V.; et al. ERICA: Prevalences of hypertension and obesity in Brazilian
1236 adolescents. *Revista de Saúde Pública*, p. 1-9, 2016

1237 CALVO, J.R. et al. The role of melatonin in the cells of the innate immunity: a review.
1238 *J. Pineal Res*. v. 55, p. 103–120, 2013.

1239 CHANG, E.; HAFNER, H.; VARGHESE, M.; GRIFFIN, C.; CLEMENTE, J.,
1240 ISLAM, M.; CARLSON, Z.; ZHU, A.; HAK, L., ABRISHAMI, S., GREGG, B.;
1241 SINGER, K. Programming effects of maternal and gestational obesity on offspring
1242 metabolism and metabolic inflammation. *Scientific Reports*. V. 9, n. 16027, p. 1-15,
1243 2019.

1244 CIPOLLA-NETO, J.; AMARAL, F. G.; AFECHÉ, S. C.; TAN, D. X.; REITER, R. J.
1245 Melatonin, energy metabolism, and obesity: a review. *Journal of pineal research*. v.56(4), p.
1246 371-381, 2014.

1247 DO PRADO JUNIOR, P. P.; DE FARIA, F. R.; DE FARIA, E. R.; FRANCESCHINI,
1248 3806 S. D. C. C.; PRIORE, S. E. Leucócitos como marcadores de risco para doenças
1249 3807 cardiovasculares na adolescência: associação com características de nascimento,
1250 3808 situação nutricional e exames bioquímicos. *Revista Paulista de Pediatria*, 2015.

1251 DOS ANJOS, C. S.; BARBOSA, A. F. S. Avaliação da agregação plaquetária em 3815
1252 pacientes diabéticos em um laboratório de análises clínicas em belém-pa1. *Revista* 3816
1253 *Paraense de Medicina*, v. 29, n. 1, p. 17, 2015.

1254 ELLSWORTH, L., HARMAN, E., PADMANABHAN, V. & GREGG, B. Lactational
1255 programming of glucose homeostasis: a window of opportunity. *Reproduction* 156,
1256 R23–R42, 2018.

1257 ESTADELLA, D. Efeitos da dieta de cafeteria e de ciclos alternados de dieta padrão
1258 com dieta de cafeteria sobre o metabolismo de ratos sedentários ou exercitados.
1259 Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Nutrição da Escola Paulista
1260 de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2001.

1261 FALL, C. H. D. & KUMARAN, K. Metabolic programming in early life in humans.
1262 *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 374, 1-9, 2019.

1263 FERREIRA, A., SILVA, C., ANTUNES, D., SOUSA, F., LOBO, A. C., MOURA, P.,
1264 Diabetes Gestacional: Serão os Atuais Critérios de Diagnóstico Mais Vantajosos? *Acta*
1265 *Med Port*, v. 31 n. 7, p.416 – 424, 2018.

1266 FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B.. Óxido nítrico: o simples mensageiro
1267 percorrendo a complexidade. *Metabolismo, síntese e funções. Rev. Assoc. Med. Bras.*,
1268 São Paulo , v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

1269 FONSECA, M. R. C. C.; TRALDI, M. C. Sobrepeso e obesidade pré-gestacionais:
1270 Repercussões sobre a gestação e parto. *Revista Saúde-UnG*, v. 8, n. 3-4, p. 26-36, 2015.

1271 FORD, E.S.; AJANI, U.A.; MOKDAD, A.H. Brief communication: The prevalence of high
1272 intake of vitamin E from the use of supplements among U.S. adults. *Annals of internal*
1273 *medicine*.v.143(2). p.116-20, 2005.

1274 GOUDARZI, M. et al. Pretreatment with melatonina protects against
1275 cyclophosphamide-induced oxidative stress and renal damage in mice. *Fundamental &*
1276 *Clinical Pharmacology*, v. 31, p. 625-635, 2017.

1277 GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J.
1278 3840 S.; TANNENBAUM, S. R. "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in
1279 biological 3841 fluids," *Analytical Biochemistry*, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

1280 GUIMARÃES-SOUZA, N. K.; YAMALEYEVA, L. M.; LU, B.; DE SOUZA RAMOS, A.
1281 C. M.; BISHOP, C. E.;ANDERSSON, K. E. Produção aumentada de superóxido e fibrose
1282 renal: novo modelo animal. *Einstein*, v.13(1), 2015.

1283 HARDELAND, R. Melatonin and inflammation-Story of a double-edged blade. *J Pineal*
1284 *Res*, v. 65, n. 4, p. e12525, 2018.

1285 HULL, H.R.; DINGER, M.K.; KNEHANS, A.W.et al. Impact of maternal body mass
1286 index on neonate birth- weight and body composition.*Am J ObstetGynecol*. 198;416.e1-
1287 e6, 2008.

1288 JÚNIOR, O.; SABINO, A. D. P.; FIGUEIREDO, R. C.; RIOS, D. R. A. Inflammation
1289 3867 and poor response to treatment with erythropoietin in chronic kidney 3868 disease.
1290 *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. v. 37(2). p. 255-263, 2015.

1291 JÚNIOR, O.; SABINO, A. D. P.; FIGUEIREDO, R. C.; RIOS, D. R. A. Inflammation and
1292 poor response to treatment with erythropoietin in chronic kidney disease. *Jornal Brasileiro*
1293 *de Nefrologia*. v. 37(2). p. 255-263, 2015.

1294 KIM, H.P.; LEE, E.J.; KIM, S.H.; HAN, H.M.; KIM, Y.C. Cell death and cytoskeletal
1295 alterations incultured hepatc fat-storing cells induced by 6-hydroxydopamine. *Res.*
1296 *Commun. Mol. Pahol. Pharmacol*. v. 107, n. 1, p.59-68, 1998.

1297 KONING, S.H., ZANDEN, J. J., HOOGENBERG, K., et al., New diagnostic criteria for
1298 gestational diabetes mellitus and their impact on the number of diagnoses and
1299 pregnancy outcomes. *Diabetologia*, v.61, p.800 – 809, 2018.

1300 LEDDY, M.A.; POWER, M.L.; SCHULKIN. J. The impact of maternal obesity on
1301 maternal and fetal health. *Rev Obstet Gynecol.* 1(4):170-178, 2008.

1302 LIMA, E.; SOARES J.R.; GARRIDO, Y. C.S.; VALENTE S.G.; PRIELA, M.R.;
1303 BARACAT, E.C.; CAVALHEIRO, E.A.; NAFFAH-MAZZACORATTIC, M.G.;
1304 AMADO, D. Effects of pinealectomy and the treatment with melatonin on the temporal
1305 lobe epilepsy in rats. *Brain Res.* v. 1043, p. 24 – 31, 2005.

1306 MONTES, E. G. O Efeito da Esplenectomia sobre a Obesidade Induzida por Glutamato
1307 Monossódico (MSG). 2013. Dissertação (Mestrado em Biologia Evolutiva) –
1308 Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.

1309 MÜHNFELD, A. S. et al. Hyperlipidemia aggravates renal disease in B6.ROP Os/+
1310 mice. *Kidney International*, v. 66, p. 1393-1402, 2004.

1311 NAKAOKA, V. Y. E. S.; PEREIRA, A.M.O.; KASHIWABARA, T. G . B. Qualidade
1312 de sono e melatonina: Relato de caso. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical*
1313 *Research.* 4(1): 32-36; 2013.

1314 PEREIRA, L. O.; et al. Obesidade e suas Implicações – Ação da Atividade Física e
1315 Controle Nutricional. *Rev Bras Nutr Clin*, v. 14, p. 9-17, 1999.

1316 POSSIGNOLO, L.F. Effect of high fat diet chronic ingestion on the metabolism of
1317 female rats, and on the sr-bi and abca1 expression in the placenta, small intestine, liver
1318 and kidney of the offspring. Dissertação de Mestrado, p. 176, 2012.

1319 PRAGA, M.; MORALES, E. The Fatty Kidney: Obesity and Renal Disease. *Nephron*
1320 *Clinical Practice.* 2016.

1321 REITER, R. J.; et al. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and
1322 pathophysiological implications in humans. *Acta Biochim Pol*, v. 50, n. 4, p. 1129-46,
1323 2003

1324 REITER, R. J.; et al. Obesity and metabolic syndrome: Association with
1325 chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin suppression. *Ann Med.* v. 44, n. 6, p.
1326 564-577, 2012.

1327 ROSENFELD, R. Hemograma-Complete blood count. *J Bras Patol Med Lab.* v.48,
1328 3913 n.4, 2012.

1329 SEWELL, M.F.; HUSTON-PRESLEY, L.; SUPER, D.M. et al. Increased neonatal fat
1330 mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. *Am J Obstet Gynecol.*
1331 195: 1100-1103, 2006.

1332 SILVA, S. B. Influência da melatonina exógena sobre parâmetros sanguíneos,
1333 hormonais, metabólicos e inflamatórios em ratas alimentadas com dieta hipercalórica
1334 durante a prenhez. Recife, 2016. Tese (Doutorado em Biociência Animal) -
1335 Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

1336 SIMEONI, U.; BARKER, D. J. Offspring of diabetic pregnancy: Long-term outcomes.
1337 *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine*, v.14, p. 119–124, 2009.

1338 SINGH, M.; JADHAV, H. R. Melatonin: Functions and ligands. *Drug Discov Today*. v.
1339 19, n. 9, p. 1410-1418, 2014

1340 TAIN Y. L., HSU C. N. Developmental origins of chronic kidney disease: Should we
1341 focus on early life? *Int. J. Mol. Sci.* v. 18, e. 381, 2017.

1342 TAIN Y. L., JOLES J. A. Reprogramming: A preventive strategy in hypertension
1343 focusing on the kidney. *Int. J. Mol. Sci.* v. 17, e. 23, 2015.

1344 TAIN, Y. L., LIN, Y. J., SHEEN, J. M., YU, H. R., TIAO, M. M., CHEN, C. C., TSAI,
1345 C. C., HUANG, L. T., HSU, C. N. High Fat Diets Sex-Specifically Affect the Renal
1346 Transcriptome and Program Obesity, Kidney Injury, and Hypertension in the
1347 Offspring. *Nutrients*, v. 9, e. 4, p. 357-376, 2017.

1348 TAN, D.; REITER, R. J.; MANCHESTER, L. C.; YAN, M.; EL-SAWI, M.; SAINZ, R. M.;
1349 MAYO, J.C.; KOHEN, R.; ALLEGRA, M.C.; HARDELAND, R. Chemical and physical
1350 properties and potential mechanisms: melatonin as a broad spectrum antioxidant and free
1351 radical scavenger. *Curr. Top. Med. Chem.* v.2, n.2, p.181-197, 2002.

1352 TIMPER, K.; BRÜNING, J.C. Hypothalamic circuits regulating appetite and energy
1353 homeostasis: pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms*, v. 10, p. 679-689,
1354 2017

1355 TOKONAMI N., MORDASINI D., PRADERVAND S., CENTENO G., JOUFFE C.,
1356 MAILLARD M., BONNY O., GACHON F., GOMEZ R.A., SEQUEIRA-LOPEZ M.L.,

1357 Local renal circadian clocks control fluid-electrolyte homeostasis and BP. J. Am. Soc.
1358 Nephrol. v. 25, p.1430–1439, 2014.

1359 VIANNA, H. R.; SOARES, C. M. B. M.; TAVARES, M. S.; TEIXEIRA, M. M.; 3942
1360 SILVA, A. C. S. Inflammation in chronic kidney disease: the role of cytokines. Jornal
1361 Brasileiro de Nefrologia. v. 33(3). p.351-364, 2011.

1362 VOLP, A. C. P.; et al. Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em predizer a
1363 síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic
1364 syndrome. Arq Bras Endocrinol Metab, v. 52, n. 3, p. 537-549, 2008.

1365 WANKHADE, U. D., TAKALI, K. M. & SHANKAR, K. Persistent influence of
1366 maternal obesity on offspring health: Mechanisms from animal models and clinical
1367 studies. Mol Cell Endocrinol 435, 7–19, 2016.

1368 WHO. Obesity and overweight, 2018. Disponível em < <https://www.who.int/>>. Acesso
1369 em: 23 de jul. 2018.

1370

1371

1372

1373

1374 Tabela 1. Análise bioquímica de filhotes com 21 dias de nascidos.

Variáveis	Grupos			
	DC	DC+Mel	DH	DH+Mel
Albumina (mg/dL)	2,52 ± 0,04 a	2,51 ± 0,11 a	2,45 ± 0,06 a	2,54 ± 0,10 a
Creatinina (mg/dL)	0,49 ± 0,03 a	0,43 ± 0,07 a	0,45 ± 0,02 a	0,40 ± 0,04 a
NO	5,95 ± 1,82 b	5,56 ± 1,50 b	11,78 ± 3,02 a	4,42 ± 0,39 b
Proteínas (mg/dL)	6,11 ± 0,07 a	5,77 ± 0,19 a	5,85 ± 0,22 a	6,36 ± 0,46 a
Ureia (mg/dL)	33,94 ± 3,36 b	18,98 ± 1,77 c	65,44 ± 9,86 a	36,97 ± 4,51 b

1375 Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de
 1376 probabilidade. (0) não detectado

1377

1378

1379 Tabela 2. Valores médios de leucócitos (WBC), eritrócitos (RBC), hemoglobina (HGB),
 1380 hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média
 1381 (CHCM), plaquetas (PLT) e proteínas plasmáticas totais (PPT) dos filhotes de 21 dias.

Variáveis	Grupos			
	DC	DC+Mel	DH	DH+Mel
CHCM (%)	32,49 ± 0,87 b	34,02 ± 0,46 a	33,46 ± 0,31 ab	32,59 ± 0,53 b
HCT (%)	34,75 ± 3,30 a	32,75 ± 2,63 a	30,00 ± 4,32 a	34,00 ± 1,41 a
HGB (g/dL)	11,47 ± 1,02 a	11,00 ± 1,15 a	10,10 ± 1,34 a	10,75 ± 0,42 a
VCM (fL)	64,29 ± 5,67 a	61,50 ± 2,19 a	63,80 ± 4,52 a	55,47 ± 0,41 b
PLT (10 ³ mm ³)	283,07 ± 24,15 b	310,75 ± 4,34 b	400,63 ± 47,13 a	324,94 ± 38,39 b
PPT (g/dL)	5,95 ± 0,10 a	5,40 ± 0,16 b	5,85 ± 0,19 a	5,67 ± 0,15 ab
RBC (10 ³ µL)	5,09 ± 0,98 ab	5,92 ± 0,41 ab	4,55 ± 0,91 b	6,13 ± 0,27 a
WBC (10 ³ µL)	3,65 ± 0,79 b	6,32 ± 0,34 a	2,42 ± 0,47 c	3,07 ± 0,31 bc

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (0) não detectado

Tabela 3. Contagem diferencial de leucócitos de filhotes com 21 dias de nascidos.

Variáveis	Grupos			
	DC	DC+Mel	DH	DH+Mel
Basófilos	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
Eosinófilos	1,00 ± 1,15 a	0,00 ± 0,00 a	1,00 ± 1,15 a	1,25 ± 0,95 a
Linfócitos	63,25 ± 6,39 a	68,25 ± 4,92 a	56,00 ± 2,44 b	65,00 ± 3,55 a
Metamielócitos	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
Monócitos	1,25 ± 0,50 a	1,75 ± 0,50 a	1,50 ± 0,57 a	2,00 ± 0,00 a
Neutrófilos Bastonetes	2,50 ± 1,00 a	0,50 ± 1,00 a	1,75 ± 0,50 a	0,50 ± 1,00 a
Neutrófilos Segmentados	32,25 ± 7,50 b	24,50 ± 6,40 b	40,00 ± 3,83 a	31,00 ± 2,16b

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. (0) não detectado

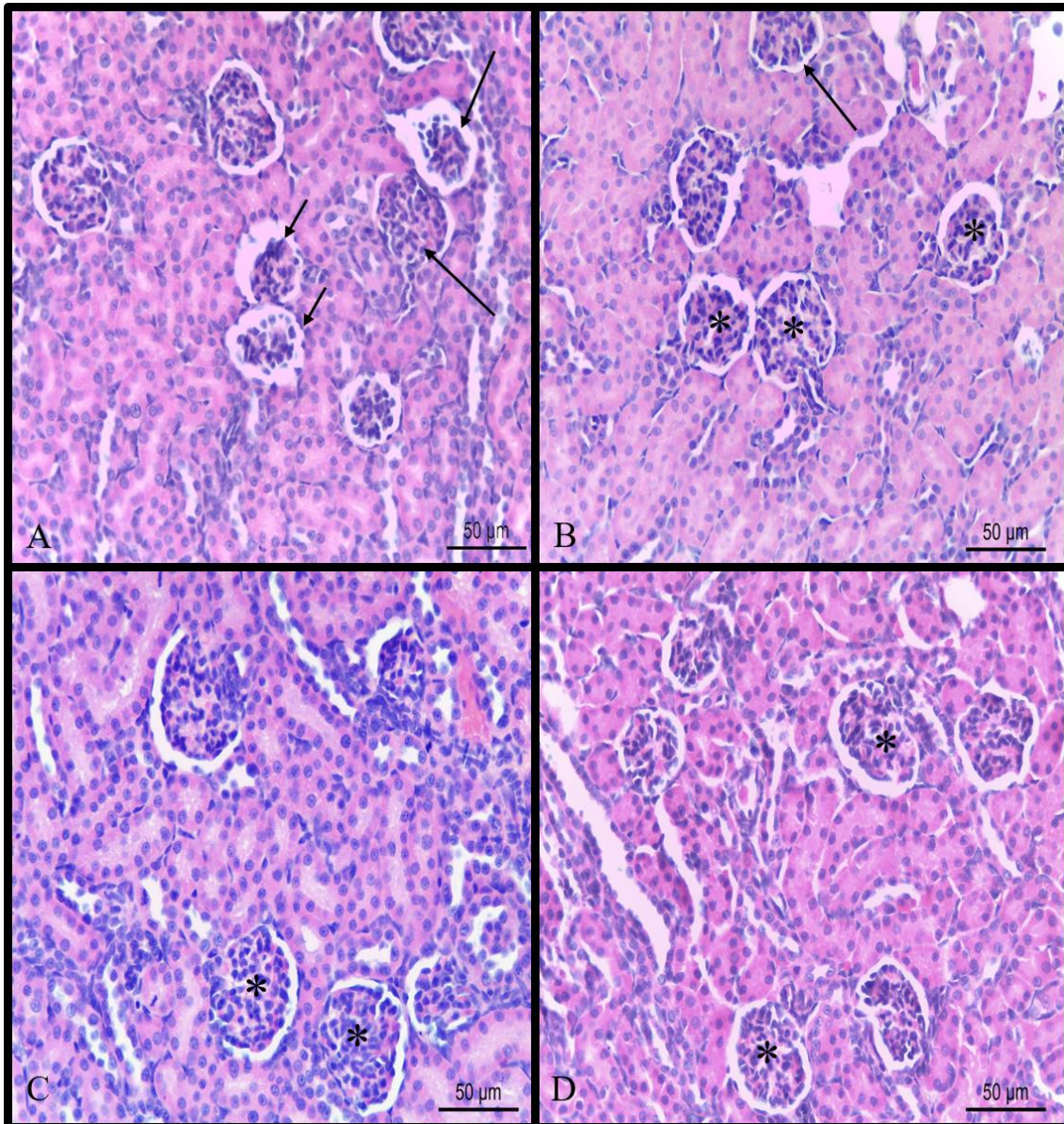


Figura 1. Rins dos filhotes dos grupos experimentais: A) DH; B) DH + Mel; apresentando regiões com glomerulonefrite proliferativa (seta longa) e atrofia glomerular (seta curta). C). DC; D) DH + Mel; apresentando glomerulonefrite branda e glomérulos normais (*). Coloração H.E.

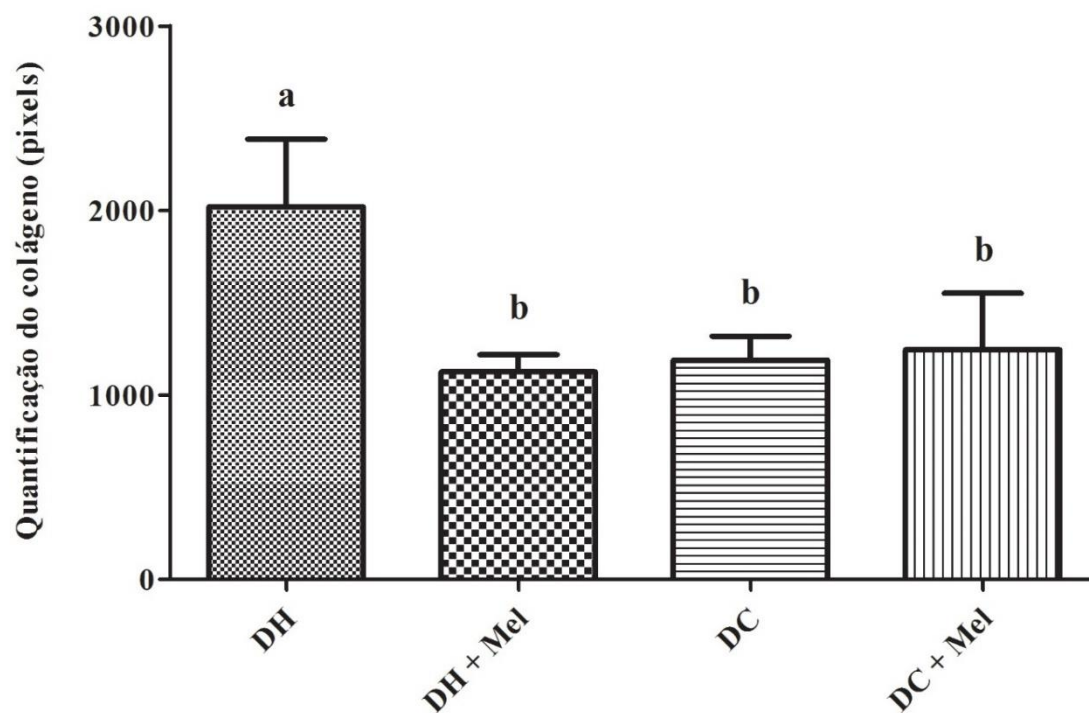


Gráfico 1. Média dos valores da quantificação de colágeno por Tricrômico de Mallory nos rins dos filhotes das ratas dos grupos experimentais.

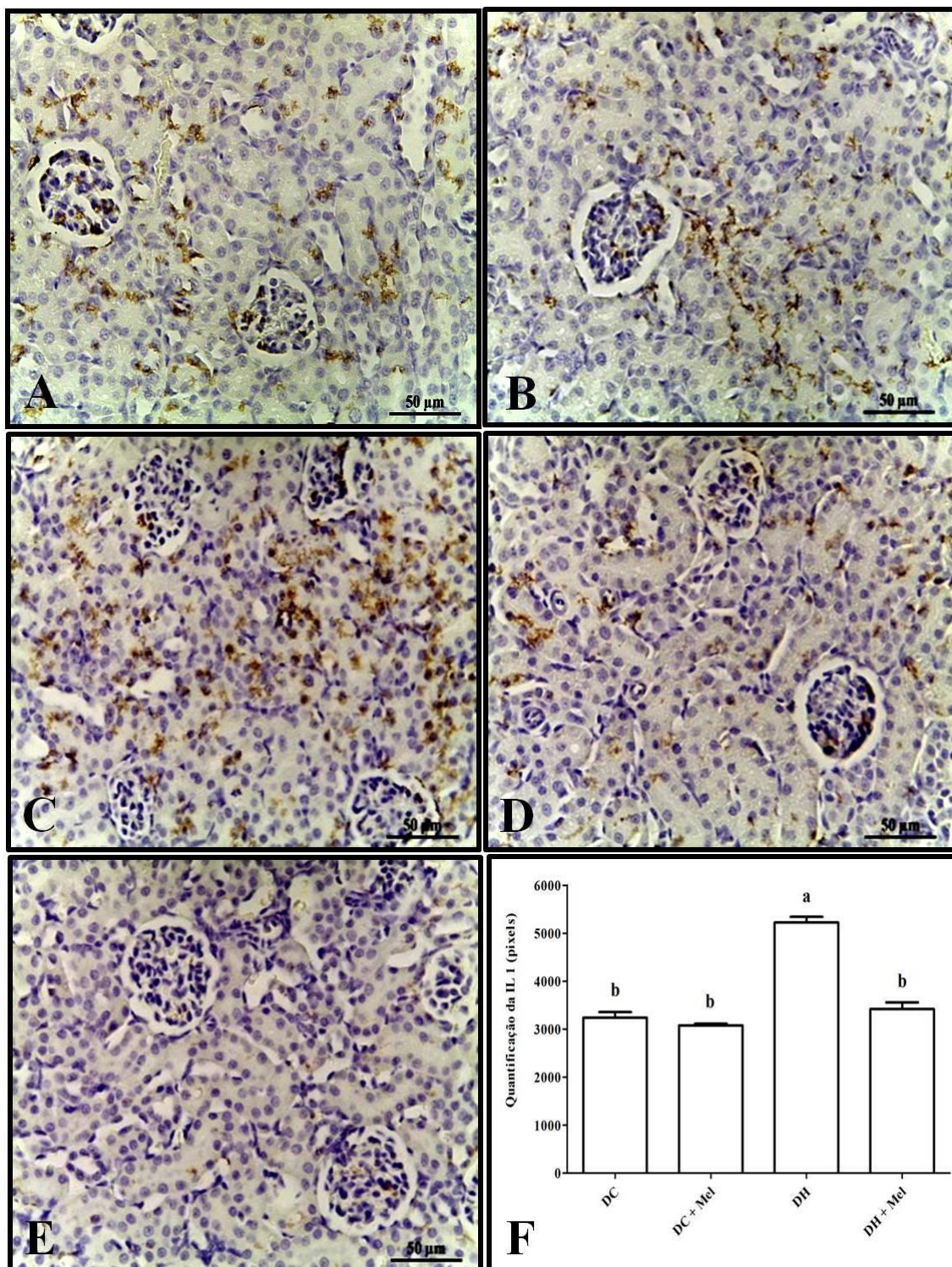


Figura 2. Imunohistoquímica para o IL-1 nos rins dos filhotes dos grupos experimentais. A) DH; B) DH+Mel; C) DC; D) DC+Mel; E) Controle negativo; F) Quantificação em pixels do IL-1. Observar maior marcação (detalhes) no grupo DH. As médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P > 0,05$).

1431 Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão do diâmetro do glomerular (DG), volume do
 1432 glomérulo (VG) e diâmetro (DCB) e volume (VCB) da cápsula de Bowman dos rins
 1433 dos filhotes das ratas dos grupos experimentais.

Grupos	DH	DH + Mel	DC	DC + Mel	P
DG (μm)	52,25 $\pm$ 3,13b	68,11 $\pm$ 1,90a	66,06 $\pm$ 3,52a	67,18 $\pm$ 2,07a	0,0022
VG (μm^3)	60,73 $\pm$ 1,35b	71,44 $\pm$ 3,41a	69,46 $\pm$ 2,46a	68,89 $\pm$ 2,76a	0,0103
DCB (μm)	61,48 $\pm$ 1,11b	74,30 $\pm$ 3,74a	68,06 $\pm$ 2,57a	70,47 $\pm$ 3,60a	0,0217
VCB (μm^3)	67,01 $\pm$ 2,41b	76,59 $\pm$ 4,97a	73,93 $\pm$ 3,71a	75,12 $\pm$ 3,36a	0,0045

1434 Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de
 1435 Wilcoxon-Mann-Whitney ($P > 0,05$).

1436

1437

1438

1439

1440

1441

1442

1443

1444

1445

1446

1447

1448

1449

1450

1451

1452

1453

1454

1455

1456

1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475
1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484

CAPÍTULO III

EFEITOS DE DIETA HIPERLIPÍDICA ASSOCIADA OU NÃO A MELATONINA EXÓGENA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO SOBRE A HISTOFISIOLOGIA DO FÍGADO DE NEONATOS

Clovis José Cavalcanti Lapa Neto^a; Ismaela Ferreira de Melo^a; Paloma Karen Bandeira
de Melo Alpiovezza^a; Valéria Wanderley Teixeira^a; Álvaro Aguiar Coelho Teixeira^{a*}

^aDepartamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de
Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Recife - PE,
Brasil

***Autor para correspondência** UFRPE-DMFA. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos, Recife, PE, Brasil. CEP 52171-900. Tel. +55 81 33206389.
E-mail: cjc.lapa@hotmail.com (LAPA-NETO, C J C)

RESUMO

A exposição a uma dieta rica em gorduras saturadas durante a gestação e a lactação pode causar distúrbios metabólicos na prole, devido a indução ao estresse oxidativo. A melatonina é um potente antioxidante, exercendo efeitos diretos na eliminação de radicais livres. A presente pesquisa investigou os efeitos do consumo de dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação associada ou não à melatonina sobre os fígados da prole. Utilizou-se 40 ratas albinas, divididas em quatro grupos: DH - ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação; DH+Mel - ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação, tratadas com melatonina (5,0mg / kg); DC - ratas prenhes submetidas à dieta comum durante a gestação e lactação e DC+Mel - ratas prenhes submetidas à dieta comum durante a gestação e lactação, tratadas com melatonina (5,0mg / kg). Nos fígados dos animais dos grupos DH e DH+Mel observou-se tumefação celular em torno dos vasos, esteatose e alguns núcleos picnóticos nos hepatócitos. Entretanto, a melatonina normalizou os parâmetros bioquímicos hepáticos, teor de glicogênio e de fibras colágenas. O aumento do parênquima lobular foi observado no fígado dos grupos DH e DH+Mel. Assim, concluímos que a melatonina tem um grande potencial em reverter os danos na função hepática da prole de ratos devido a uma dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação.

Palavras-chave: Dieta hipercalórica; ratos; histofisiologia; morfometria; fígado; antioxidante.

1. INTRODUÇÃO

Obesidade é uma complexa condição que envolve uma gama de fatores, como históricos, socioeconômico, psicossociais, biológicos e culturais, caracterizada pelo acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal em um nível capaz de comprometer a saúde dos indivíduos (WHO, 2018). Essa está relacionada com o balanço energético positivo, ou seja, o valor calórico ingerido é superior ao gasto, promovendo aumento na reserva de energia e peso corporal, e por sua vez pode estar associado a um acréscimo na ingestão calórica, como a redução no total calórico gasto, ou ambos fatores (PEREIRA et al., 2003). Ao contrário do suposto, a epidemia da obesidade não está restrita aos países industrializados; nos países em desenvolvimento é estimado que mais de 115 milhões de pessoas sofram de problemas relacionados a obesidade (WHO, 2018).

Atualmente, a obesidade tem sido considerada a mais importante desordem nutricional em países desenvolvidos e em desenvolvimento, devido ao aumento em sua incidência (TIMPER; BRÜNING, 2017; WHO, 2018). Previsões supõem que abundância de alimentos hipercalóricos e o sedentarismo irão tornar a obesidade um provável cenário para a maioria da população mundial adulta dentro de duas décadas (KELLY et al., 2008; WANG et al., 2008; REITER et al., 2012).

O consumo de uma dieta hiperlipídica durante a gestação quanto na lactação pode predispor o surgimento de uma sequência de alterações na prole como maior susceptibilidade em apresentar obesidade, resistência à insulina, hipertensão, dislipidemias, resistência hipotalâmica à leptina e até mesmo mudanças comportamentais como ansiedade (POSSIGNOLO, 2012; FERREIRA et al.; 2018). Macrossomia fetal em mulheres obesas não está apenas relacionada com o aumento do

tamanho absoluto do feto, como também, a mudanças na composição corporal (SEWELL et al., 2006; HULL et al., 2008; LEDDY et al., 2008; KONING et al., 2018).

Hipóteses propõem que a doença hepática gordurosa não alcoólica aconteceria por uma sequência de dois fatores: o primeiro sendo o acúmulo de triglicerídeos nos hepatócitos (esteatose); seguido pelo segundo fator ao desencadear a progressão para patologias hepáticas mais graves, como esteatohepatite e fibrose/cirrose. Os fatores que compõem essa patologia hepática possui a capacidade de induzir o estresse oxidativo, em parte por defeito no processo de oxidação mitocondrial, sugerindo que esses promova a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BHUPATHIRAJU; HU, 2016; YOUNOSSI et al., 2018). Em consequência da esteatose, o fígado se torna mais sensível aos efeitos do estresse oxidativo (MANTENA et al., 2008; FRANÇA et al., 2013, YOUNOSSI et al., 2018).

A melatonina é uma indolamina, conhecida como N-acetil-5-metoxitriptamina, sintetizada principalmente pela glândula pineal pelas células parenquimatosas em resposta as informações luminosas recebidas pelo trato retino-hipotalâmico (SINGH, 2014). Apresentando o papel de potente antioxidante, pois seus metabolitos exercem efeitos diretos através da eliminação de radicais e pela estimulação a síntese de outro antioxidante, a glutathione, capaz de reduzir a perda de elétrons da cadeia de elétrons mitocondrias (REITER et al., 2003; NAKAOKA et al., 2013; SINGH et al., 2014).

Assim, em virtude da possibilidade de desenvolvimento de desordens hepáticas em filhotes causadas pela dieta hipercalórica, a presente pesquisa tem o objetivo investigar os efeitos da melatonina exógena sobre o fígado da prole de matrizes submetidas a uma dieta hipercalórica durante a gestação e lactação.

3.MATERIAL E METODOS

3.1 Obtenção dos Animais

O experimento foi realizado no Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Foram utilizadas 40 ratas albinas *Rattus norvegicus albinus* com 90 dias de idade, com 200±20g, linhagem Wistar, procedentes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE. O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética Institucional (CEUA), licença de número: 012/2014. Vinte fêmeas foram mantidas em gaiolas com alimentação comercial Labina e água “*ad libitum*” e as outras vinte receberam dieta hiperlipídica, previamente padronizada por Estadella (2001), e água “*ad libitum*”, formando-se assim 4 grupos de matrizes:

DC: ratas prenhes submetidas à dieta comum durante toda a gestação e lactação;

DC+Mel: ratas prenhes submetidas à dieta comum e administradas com melatonina durante toda a gestação e período de lactação;

DH: ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica durante toda a gestação e período de lactação;

DH+Mel: ratas prenhes submetidas à dieta hiperlipídica e administradas com melatonina durante toda a gestação e período de lactação.

3.2 Diagnóstico de Prenhez

Após a realização de exames colpocitológicos, as fêmeas que apresentaram três ciclos estrais regulares foram acasaladas na proporção de um macho para três fêmeas sempre no início da noite (19:00 horas). Pela manhã (7:00 horas), o diagnóstico da prenhez foi feito através do exame colpocitológico.

3.3 Tratamento com Melatonina

A administração de melatonina foi realizada nas ratas dos DH+Mel e DC+Mel de acordo com o protocolo estabelecido por Kim et al. (1998). A dose de melatonina (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA) administrada foi de 5,0 mg/Kg, dissolvida diariamente em 100 microlitros de álcool, diluída em 300 microlitros de soro e aplicada sempre no início da noite (18:00 horas).

3.4 Coletas de Sangue

A coleta de sangue dos filhotes foi feita por punção cardíaca, após anestesia com Tiopental 40mg/kg por via intraperitoneal (LIMA et al., 2005). O plasma dos filhotes foi acondicionado à -20°C, até o momento das dosagens. Posteriormente, foi coletado dos filhotes o fígado para análise histológica, histoquímica e morfométrica. Após a coleta do órgão foi realizada a eutanásia utilizando-se o aprofundamento da anestesia associado com Tiopental (100 mg/kg) por via intraperitoneal até a dose letal, de acordo com a resolução do CFMV 714/2002.

3.5 Bioquímicas Hepática

Foram utilizados kits comerciais específicos da Labtest (Lagoa Santa, Minas Gerais, Brasil) para dosagem de: ALT, AST, Fosfatase Alcalina, Amilase, Ureia, Albumina, Creatinina, Proteínas totais, Glicose, Lipase, Colesterol, Triglicerídeos, HDL, LDL e Frutosaminas.

3.6 Histoquímica e Morfometria Hepática

O fígado dos filhotes foi fixado em formol a 10% tamponado por 48 horas. Após esse período, fragmentos foram processados para inclusão em parafina e os cortes foram submetidos à técnica de coloração pelo ácido periódico de Schiff (PAS), Picrosirius e Hematoxilina-Eosina (HE). O estudo morfométrico do fígado foi realizado segundo a

metodologia descrita por Engelman et al. (2001), sendo quantificado o parênquima lobular e não lobular.

3.7 Análise Estatística

Os dados obtidos dos parâmetros bioquímicos, bem como os dados morfométricos do fígado dos neonatos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, onde as médias obtidas foram comparadas pelo teste de Wilcoxon Mann-Whitney ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 Análise Bioquímica

O grupo experimental tratado com dieta hiperlipídica (DH) apresentou um aumento significativo nas taxas bioquímicas de ALT, AST, fosfatase alcalina, ureia, creatina, glicose, lipase, colesterol, triglicerídeos, LDL e frutossamina, e redução nos níveis de HDL. Enquanto o grupo tratado com dieta hiperlipídica associada à melatonina (DH+MEL) exibiu valores semelhantes ao grupo controle e o grupo DC + Mel. Os níveis de Amilase, Albumina e Proteínas totais não apresentaram diferenças significativas entre os grupos experimentais (Tabela 1).

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão dos parâmetros bioquímicos dos filhotes de 21 dias de idade dos ratos dos grupos experimentais.

Grupos	DC	DC + Mel	DH	DH + Mel	P
ALT (U/L)	27,63 $\pm$ 5,30b	22,72 $\pm$ 0,65b	48,85 $\pm$ 9,79a	27,75 $\pm$ 2,66b	0,0050
AST (U/L)	10,56 $\pm$ 1,91b	10,17 $\pm$ 3,17b	22,17 $\pm$ 2,78a	12,55 $\pm$ 2,52b	0,0309
Fosfatase Alcalina (U / L)	320,70 $\pm$ 28,11b	369,70 $\pm$ 42,65b	780,50 $\pm$ 109,00a	388,60 $\pm$ 40,73b	0,0439
Amilase (U / L)	114,40 $\pm$ 8,76a	101,20 $\pm$ 19,63a	99,60 $\pm$ 20,91a	97,80 $\pm$ 10,13a	0,3624
Ureia (mg / dL)	35,76 $\pm$ 4,74b	31,07 $\pm$ 4,91b	60,73 $\pm$ 13,57a	35,77 $\pm$ 5,01b	0,0111
Albumina (g / dL)	2,47 $\pm$ 0,11a	2,43 $\pm$ 0,20a	2,48 $\pm$ 0,09a	2,70 $\pm$ 0,36a	0,2609
Creatinina (mg / dL)	0,33 $\pm$ 0,03b	0,35 $\pm$ 0,03b	0,48 $\pm$ 0,01a	0,34 $\pm$ 0,01b	0,0312
Proteínas totais (g / dL)	6,03 $\pm$ 0,20a	6,12 $\pm$ 0,78a	5,93 $\pm$ 0,26a	6,55 $\pm$ 0,58a	0,2827
Glicose (mg / dL)	123,50 $\pm$ 10,47b	126,20 $\pm$ 6,35b	146,20 $\pm$ 7,23a	128,40 $\pm$ 13,23b	0,0079
Lipase (U / L)	18,00 $\pm$ 9,27b	20,60 $\pm$ 8,64b	41,40 $\pm$ 5,12a	27,20 $\pm$ 6,49b	0,0007
Colesterol (mg / dL)	111,70 $\pm$ 9,31b	117,40 $\pm$ 10,95b	160,20 $\pm$ 22,40a	124,30 $\pm$ 5,51b	0,0147
Triglicerídeos (mg / dL)	68,03 $\pm$ 9,25b	73,04 $\pm$ 12,54b	175,70 $\pm$ 26,92a	83,89 $\pm$ 14,28b	0,0261
HDL (mg / dL)	59,00 $\pm$ 3,00a	55,00 $\pm$ 5,74a	30,60 $\pm$ 8,38b	59,20 $\pm$ 4,76a	0,0023
LDL (mg / dL)	18,83 $\pm$ 3,43b	21,97 $\pm$ 5,89b	42,76 $\pm$ 9,06a	27,31 $\pm$ 5,74b	0,0101
Frutosaminas (μ mol / L)	76,20 $\pm$ 3,42b	78,00 $\pm$ 5,78b	126,80 $\pm$ 14,20a	82,60 $\pm$ 5,17b	0,0227

As médias seguidas pela mesma letra não diferiram significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-

Whitney (P> 0,05).

4.2 Análise Histopatológica do Fígado

O fígado dos filhotes dos grupos DC e DC + Mel apresentaram hepatócitos bem preservados, sem maiores alterações no parênquima (Figura 1A-B). Entretanto no fígado dos filhotes dos grupos DH e DH + Mel verificamos a ocorrência de tumefação celular nas áreas ao redor dos vasos, esteatose e alguns núcleos picnóticos (Figura 1C-D).

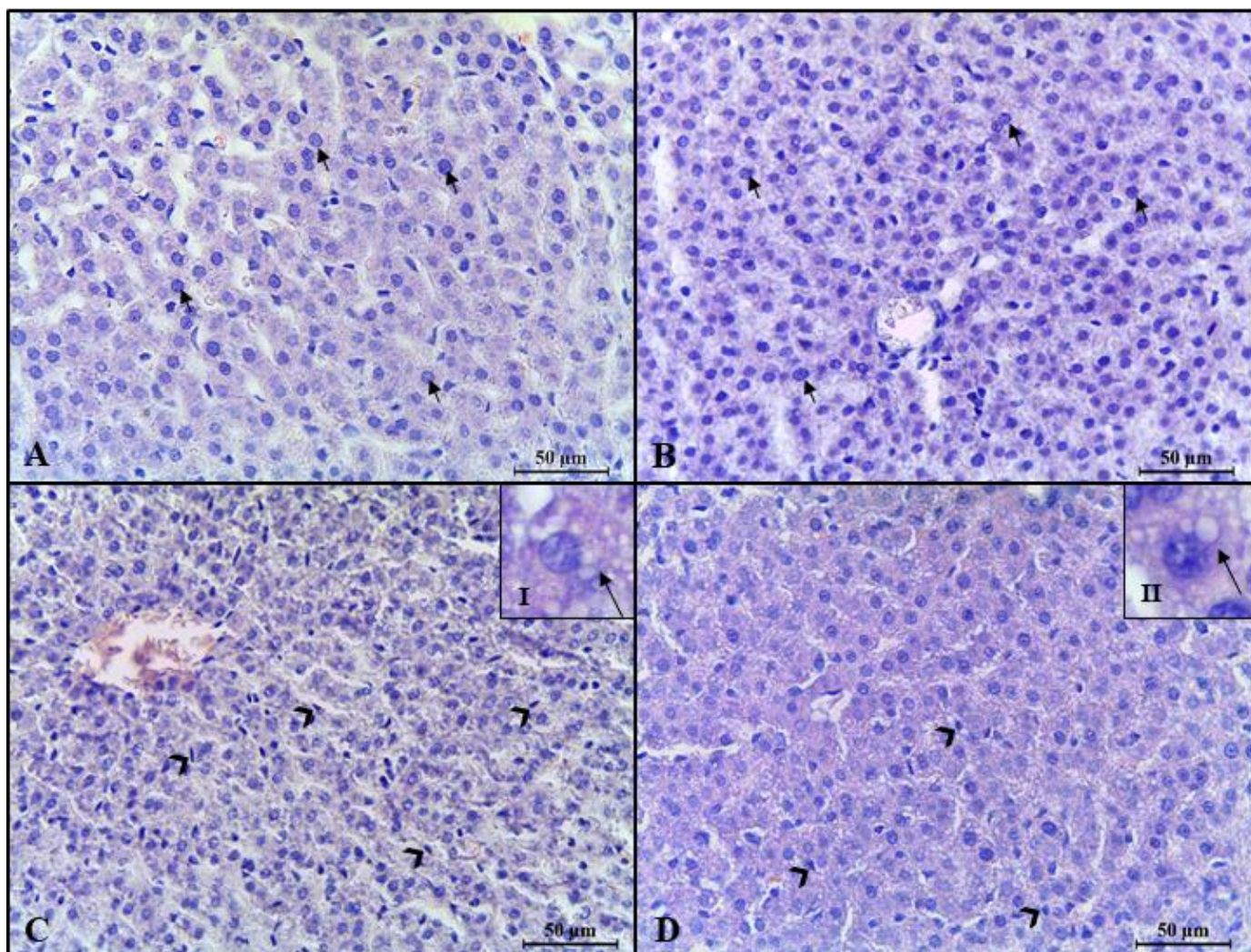
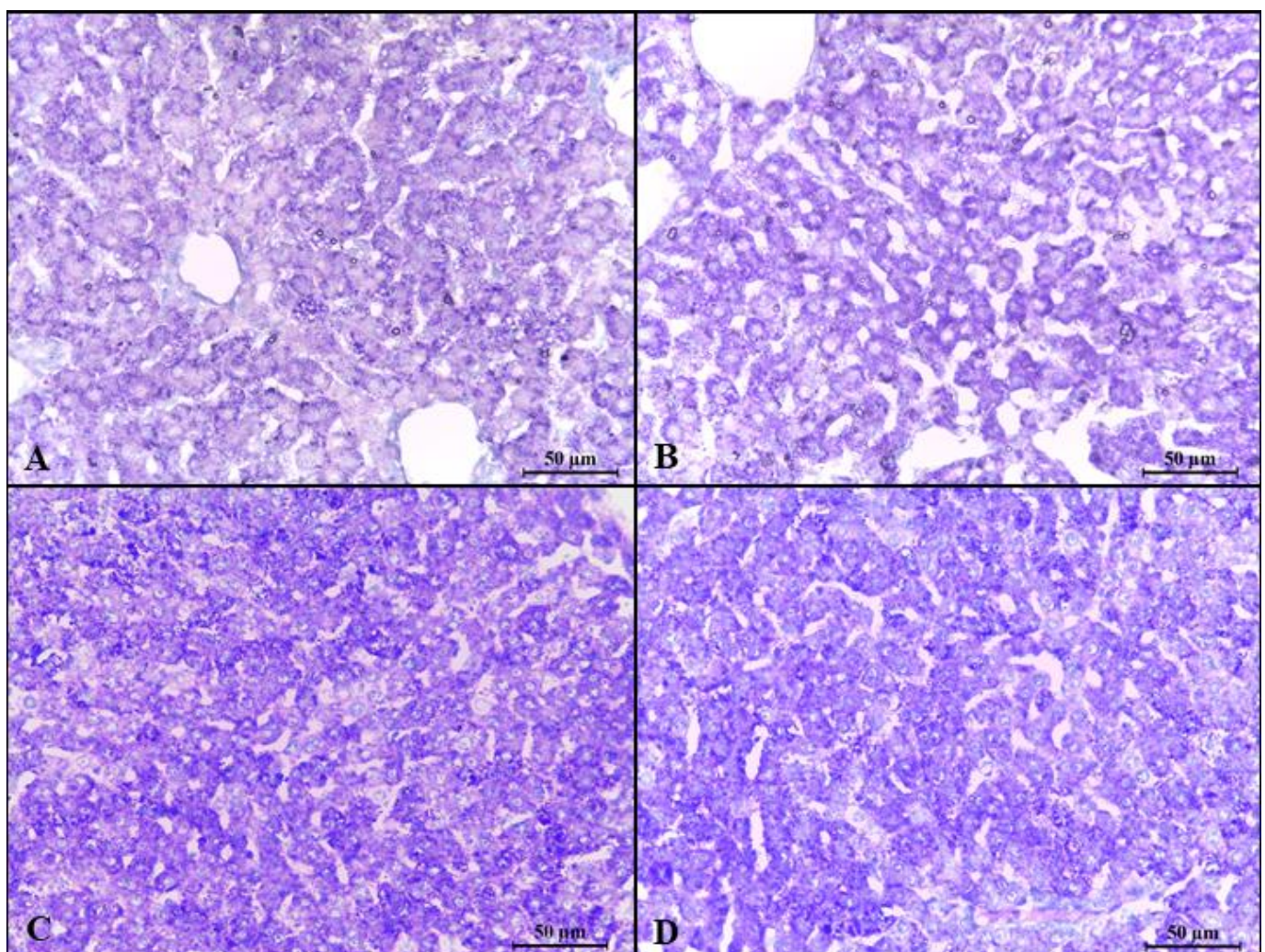


Figura 1. Histopatologia do fígado dos filhotes dos grupos experimentais. A) DC – Dieta Comum e B) DC+Mel. Observar hepatócitos preservados (seta curta); C) DH e D) DH+Mel. Notar a presença de núcleo picnótico em hepatócitos (cabeça de seta), esteatose (seta longa nos detalhes I e II) e hepatócito com tumefação celular (detalhes I e II). Coloração HE

Histoquímica do Fígado

A quantificação de glicogênio por meio de PAS revelou um aumento significativo no fígado dos filhotes do grupo dieta hiperlipídica (DH) em relação aos demais grupos experimentais. O grupo dieta hiperlipídica + Melatonina (DH + Mel), revelou uma redução significativa em relação ao grupo DH. Entretanto o menor valor foi observado no grupo dieta comum associada a melatonina (DC+Mel), diferindo do controle (DC) (Figura 2 e Gráfico1).

Os dados obtidos através da quantificação com picrosirius mostraram um aumento significativo no percentual de colágeno no grupo experimental tratado com dieta hiperlipídica (DH) quando comparado aos demais grupos experimentais (Figura 3 e Gráfico 2).



1673 **Figura 2.** Histoquímica do fígado dos filhotes dos grupos experimentais para a
1674 quantificação de glicogênio. A) DC – Dieta Comum; B) DC+Mel – Dieta Comum +
1675 Melatonina; C) DH – Dieta Hipercalórica; D) DH+Mel – Dieta Hipercalórica +
1676 Melatonina. Coloração PAS.

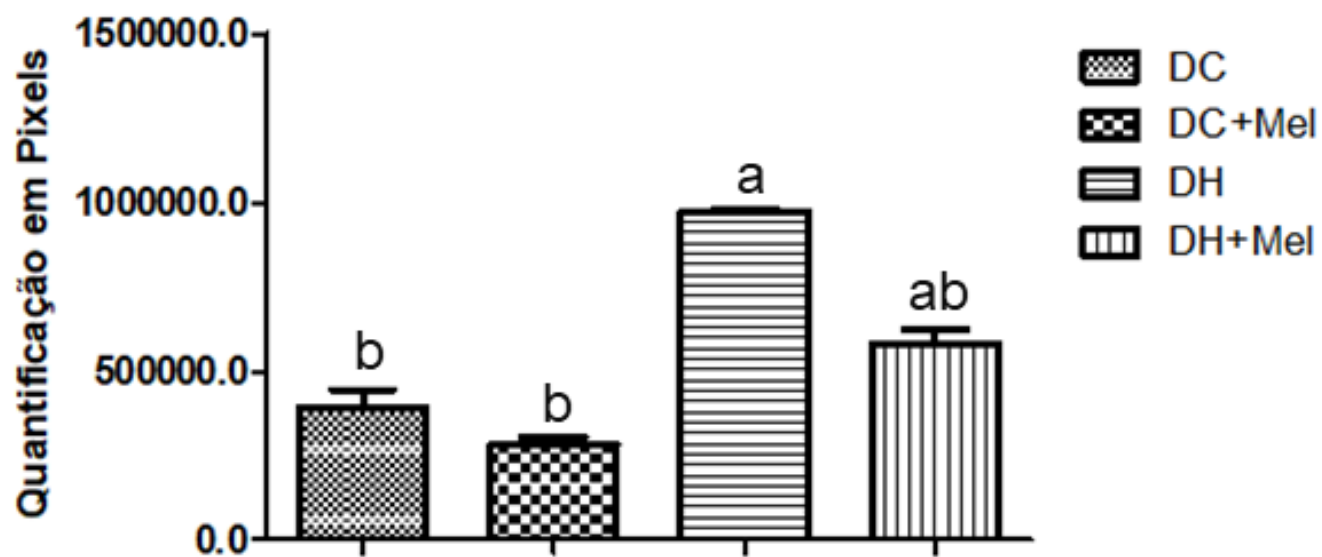


Gráfico 1. Média dos valores da quantificação de glicogênio por Ácido Periódico de Schiff (PAS) no fígado dos filhotes das ratas dos grupos experimentais.

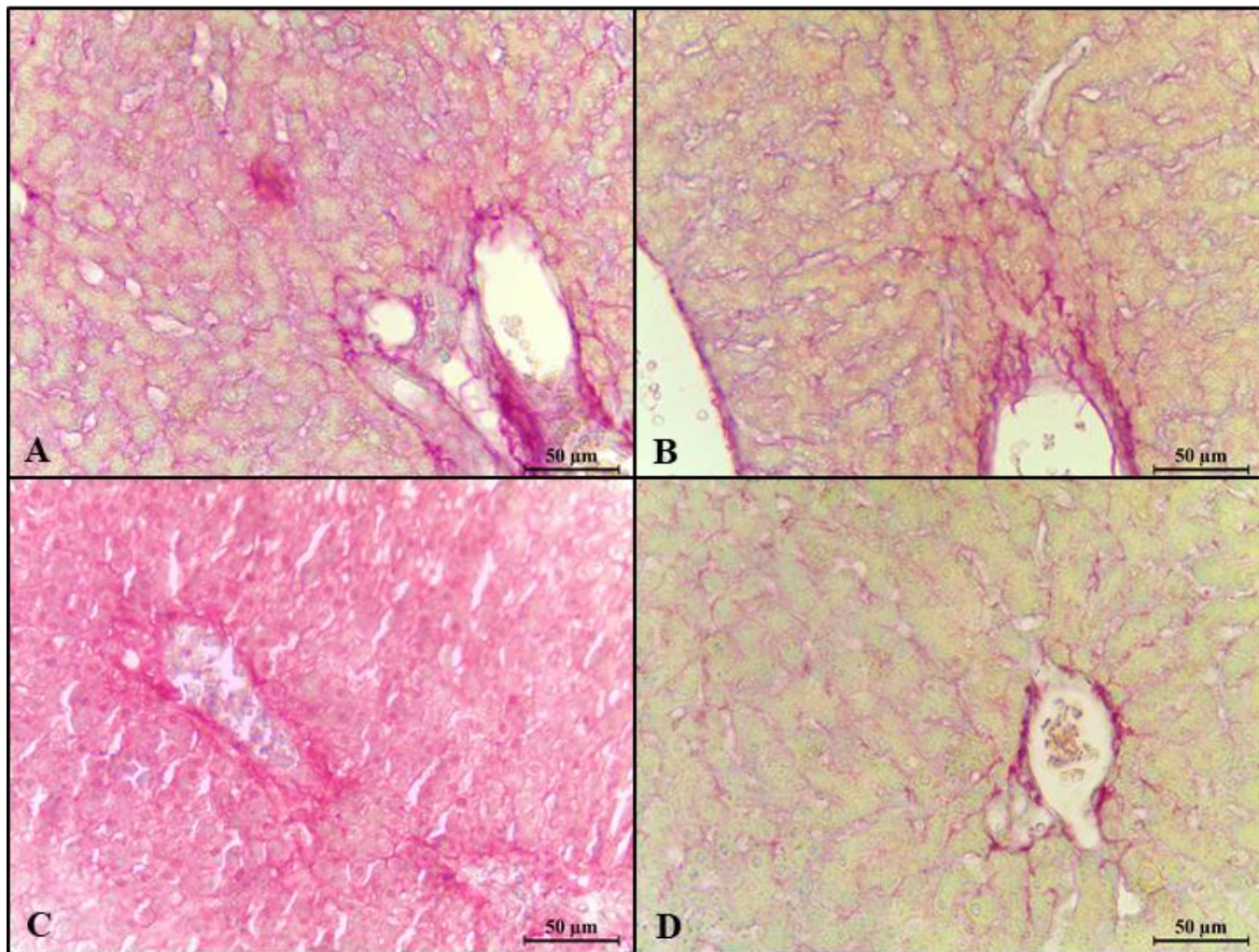


Figura 3. Histoquímica dos fígados dos filhotes dos grupos experimentais para a quantificação de colágeno. A) DC – Dieta Comum; B) DC+Mel – Dieta Comum + Melatonina; C) DH – Dieta Hipercalórica; D) DH+Mel – Dieta Hipercalórica + Melatonina. Coloração Picrosirius.

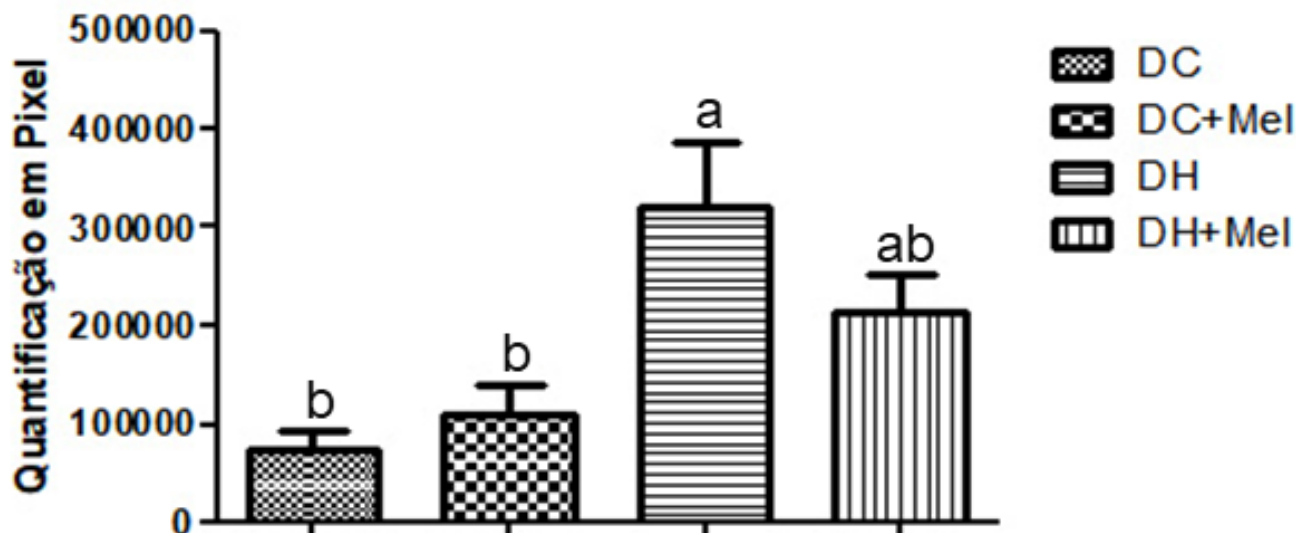


Gráfico 2. Média dos valores da quantificação colágeno por picrosirius nos fígados dos filhotes das ratas dos grupos experimentais.

4.4 Análise da Morfometria do Fígado

A análise morfométrica revelou um aumento na porcentagem do parênquima lobular nos grupos experimentais dieta hiperlipídica (DH) e dieta hiperlipídica com melatonina (DH+Mel) em relação aos grupos controles (DC e DC+Mel), enquanto os mesmos grupos tratados com dieta hiperlipídica associada ou não a melatonina, apresentaram uma redução significativa no parênquima não lobular (Tabela 2).

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do percentual do parênquima lobular e não lobular do fígado dos filhotes com 21 dias.

Groups	DC	DC+Mel	DH	DH+Mel	P
Parênquima Lobular	68,90 $\pm$ 3,62 b	67,35 $\pm$ 2,84 b	79,35 $\pm$ 2,53 a	76,09 $\pm$ 3,91 a	0,0129
Parênquima não Lobular	31,10 $\pm$ 1,50 b	32,65 $\pm$ 3,87 b	20,65 $\pm$ 2,96 a	23,91 $\pm$ 2,87 a	0,0422

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Wilcoxon-Mann-Whitney ($P > 0,05$).

5. DISCUSSÃO

A mudança de hábitos alimentares, associada, principalmente, ao processo de globalização vem agravando a ingestão de dietas ricas em gordura e açúcares, promovendo, assim, um aumento na incidência de patologias associadas a obesidade. Estudos mostram que a prevalência nos índices de obesidade por mulheres em idade reprodutiva durante a gestação e lactação pode inferir uma predisposição ao surgimento de perturbações no desenvolvimento fetal e saúde da prole durante a sua vida, como obesidade e disfunções metabólicas, que podem levar a distúrbios hepáticos (LEDDY et al., 2008; MOURALIDARANE et al., 2013).

Os resultados obtidos a partir da análise bioquímica do perfil lipídico, incluindo colesterol, triglicerídeos e LDL, mostraram elevações significativas nas taxas do grupo DH em relação aos demais grupos experimentais, enquanto o grupo DH+Mel apresentou índices satisfatoriamente próximos aos grupos DC e DC + Mel. Dessa forma, nosso trabalho indica uma ação da melatonina em reduzir taxas como: colesterol, triglicerídeos e LDL, corroborando com considerações realizadas por Pan et al. (2006) e Hatzis et al. (2013) os quais relataram que a melatonina apresenta potencial papel em restabelecer atividade hepática, em casos de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) e dietas hiperlipídicas, sendo capaz de reduzir significativamente taxas de AST e ALT, utilizadas na mensuração da função do fígado.

De acordo com Seraphinet al. (2000) e Silva (2010), a melatonina exibe papel sobre a regulação do metabolismo de carboidratos, promovendo um aumento na concentração de uma proteína transportadora de glicose, resultando em um aumento da sensibilidade tecidual com a glicose. Assim sendo, nossos resultados mostram uma diminuição na taxa de glicose por parte do grupo DH+Mel na análise bioquímica em comparação ao DH, enquanto a quantificação de mucopolissacarídeos apresenta um

aumento significativo no percentual do grupo DH+Mel quando comparado ao grupo controle.

Segundo Koopman et al. (2014) e Parry; Hodson (2017) tanto o consumo de açúcar como de gordura têm sido implicados como causa de esteatose hepática aumentando a taxa de obesidade e conseqüentemente promovendo injúrias hepáticas como por exemplo a doença hepática gordurosa não alcoólica. Este fato foi observado nos filhotes dos grupos DH e DH + Mel. Embora a melatonina seja relatada com hepatoprotetora, não foi capaz de reverter o quadro de esteatose. Talvez isso esteja relacionado com a dose administrada ou o tempo de tratamento, pois de acordo com Hatziset al. (2013) ratos submetidos a uma dieta hipercalórica e tratados concomitante com melatonina na mesma dosagem utilizada em nosso experimento, também não apresentaram reversão da esteatose hepática. No entanto, a melatonina foi capaz de melhorar a funcionalidade hepática como ficou demonstrado na análise bioquímica.

Estudos realizados por Helge et al. (2001), em humanos, demonstraram que o consumo de dietas hipercalóricas contribuiu para uma maior oxidação de gorduras, limitando o uso de carboidratos como substrato energético no trabalho celular. Ainda de acordo com Carvalho et al. (2006), dietas hiperlipídicas, ricas em gordura fazem com que os ácidos graxos, depositem-se no fígado na forma de triacilgliceróis. Isso pode levar a um “clearance” hepático de insulina, aumentando a produção hepática de glicose, uma vez que a insulina é o principal hormônio que inibe a produção desse carboidrato. Isso poderia explicar o aumento do glicogênio nos fígados dos filhotes do grupo dieta hiperlipídica. Com relação à redução do glicogênio no fígado dos filhotes dos grupos DC + Mel, em relação ao DC, DH + Mel e DH, pode ser devido ao tratamento crônico prolongado (gestação e lactação) que os filhotes foram submetidos (MARKOVÁ et al., 2004). Isso sugere que a melatonina pode desempenhar um papel indireto,

possivelmente através de alterações na fisiologia da insulina, na regulação do metabolismo de carboidratos (SOENGAS et al., 1998).

Segundo Rosa et al. (2010), em pesquisas semelhantes, avaliando o potencial de ação da melatonina sobre patologia hepáticas, observou-se no grupo experimental não tratado com melatonina um aumento de colágeno, sugerindo a presença de fibrose hepática, enquanto o grupo tratado com melatonina apontou uma diminuição nos níveis de colágeno. A literatura tem reportado os efeitos antifibróticos da melatonina, bem como suas propriedades em controlar níveis de colágeno nos tecidos (OGETURK et al. 2008). A ativação de células estreladas hepáticas e a iniciação da síntese de colágeno desequilibrada são os principais componentes na patogénese que conduz a fibrose. Dados atuais indicam que estresse oxidativo, peroxidação lipídica e liberação de MDA estão relacionados com a ativação destas células e esta ativação é bloqueada por antioxidantes (SVEGLIATI et al., 1998; TAHAN et al., 2004). Rosa et al. (2010) induziram cirrose em ratos e avaliaram a integridade hepática dos animais quando estes eram tratados com melatonina. Os resultados mostraram que este hormônio diminuiu o estresse oxidativo atuando como removedor de radicais livres e fornecendo proteção antioxidante de biomoléculas. Também reduziu significativamente os níveis de lipoperoxidação hepática, prevenindo significativamente a deposição de colágeno no fígado. Assim, corroborando com nosso trabalho que exibiu um aumento de colágeno na quantificação por picosírus no grupo DH, enquanto o grupo tratado com melatonina DH+Mel apresentou índices reduzido.

O aumento da proporção do parênquima lobular no fígado da prole das ratas dos grupos de DH e DH + Mel poderia estar relacionado à tumefação dos hepatocitos ou o que é mais provável, a presença da esteatose fator preponderante em decorrências de dietas hipercalóricas (BAYRAKTAR; VAN THIEL 1997), uma vez que, como relatado

anteriormente, a melatonina não foi capaz de reverter essa injúria hepática, isso poderia explicar a não diferença entre os parênquimas lobulares desses grupos. Assim, concluímos que a melatonina apresenta um grande potencial em reverter os danos na função hepática da prole de ratas em decorrência de uma dieta hiperlipídica administrada durante a gestação e lactação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIL, A. *et al.* **Beneficial effects of melatonin on obesity and lipid profile in young Zucker diabetic fatty rats.** *J Pineal Res.* 50(2):207-212, 2011.
- ALFARADHI, M.Z. *et al.* **Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity.** *AJP Regul Integr Comp Physiol.* 307(1):R26-R34, 2014.
- ANDRADE Z, A. **Regression of hepatic fibrosis.** *Rev Soc Bras Med Trop.* 38(6):514-520, 2005.
- ANGULO, P. **Nonalcoholic fatty liver disease.** *N Engl J Med.* 346: 1221-1231, 2002
- ASHINO, N.G.; SAITO, K.N.; SOUZA, F.D. *et al.* **Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver.** *J Nutr Biochem.* 23(4):341-348, 2012.
- AZEVEDO, F.R.; BRITO C.B. **Influência das variáveis nutricionais e da obesidade sobre a saúde e o metabolismo.** *Rev Assoc Med Bras.* 58(6):714-723, 2012.
- BAIRD, D.T.; CNATTINGIUS, S.; COLLINS, J. *et al.* **Nutrition and reproduction in women.** *Hum Reprod Update.* 12(3):193-207, 2006.
- BAYOL, S.A.; FARRINGTON, S.J.; STICKLAND, N.C. **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(4):843-851, 2007.
- BAYOL, S.A.; SIMBI, B.H.; FOWKES, R.C. *et al.* **A maternal “junk food” diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic fatty liver disease in rat offspring.** *Endocrinology.* 151(4):1451-1461, 2010.
- BAYRAKTAR, M.; VAN THIEL, D.H. **Abnormalities in measures of liver function and injury in thyroid disorders.** *Hepatogastroenterology,* 44:614-618, 1997.
- BAZWINSKY-WUTSCHEK, I.; BIESEKE, L.; MÜHLBAUER, E. *et al.* **Influence of melatonin receptor signalling on parameters involved in blood glucose regulation.** *J. Pineal Res.* 56, 82–96, 2014.
- BEGRICHE, K.; IGOUDJIL, A.; PESSAYRE, D. *et al.* **Mitochondrial dysfunction in NASH: causes, consequences and possible means to prevent it.** *Mitochondrion* 6:1–28; 2006.
- BERALDO, F.C., VAZ, I.M.F., NAVES, M.M.V. **Nutrição, atividade física e obesidade em adultos: aspectos atuais e recomendações para prevenção e tratamento.** *Rev Med Minas Gerais.* 14(1):57-62, 2004.

1818 BLEIL, S.I. **O Padrão Alimentar Ocidental: considerações sobre a mudança de**
1819 **hábitos no Brasil.** *Revista Cadernos de Debate.* VI:1-25, 1998.

1820 BOO, H.A.; HARDING, J.E. **The developmental origins of adult disease (Barker)**
1821 **hypothesis.** *Aust N Z J ObstetGynaecol.* 46:4-14, 2006 .

1822 BORENGASSER, S.J.; KANG, P.; FASKE, J. *et al.* **High fat diet and in utero**
1823 **exposure to maternal obesity disrupts circadian rhythm and leads to metabolic**
1824 **programming of liver in rat offspring.** *PLoS One.* 9(1), 1-13, 2014.

1825 BORENGASSER, S.J.; ZHONG, Y.; KANG, P. *et al.* **Maternal obesity enhances**
1826 **white adipose tissue differentiation and alters genome-scale DNA methylation in**
1827 **male rat offspring.** *Endocrinology.* 154(11):4113-4125, 2013.

1828 BORENGASSER, S.J., LAU, F.; KANG, P. *et al.* **Maternal obesity during gestation**
1829 **impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring**
1830 **at weaning.** *PLoS One.* 6(8), 1-9, 2011.

1831 BOUANANE, S.; MERZOUK, H.; BENKALFAT, N.B. *et al.* **Hepatic and very low-**
1832 **density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams.** *Metabolism.*
1833 59(12):1701-1709, 2010.

1834 BROWNING, J.D.; HORTON, J.D. **Molecular mediators of hepatic steatosis and**
1835 **liver injury.** *JCI.* 114(2), 147-152, 2004.

1836 BUBENIK, G.A. **Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical**
1837 **relevance.** *Dig. Dis. Sci.* 47, 2336–2348, 2002.

1838 CARVALHO, M.H.C.; COLAÇO, A.L.; FORTES, Z.B. **Citocinas, disfunção**
1839 **endotelial e resistência à insulina.** *Arq Bras EndocrinolMetab.* 50(2), 304-12, 2006.

1840 CATALANO, P.M.; EHRENBERG, H.M. **The short- and long-term implications of**
1841 **maternal obesity on the mother and her offspring.** *BJOG AnInt J ObstetGynaecol.*
1842 113(10):1126-1133, 2006.

1843 CUZZOCREA, S.; REITER, R.J. **Pharmacological action of melatonin in shock,**
1844 **inflammation and ischemia/reperfusion injury.** *Eur J Pharmacol.* 426(1-2):1-10,
1845 2001.

1846 DAY, C.P.; JAMES, O.F. **Steatohepatitis: a tale of two “hits”?** *Gastroenterology*
1847 114:842–845, 1998.

1848 DOUGLAS, C.R. **Tratado de fisiologia aplicada às ciências médicas.** 2006. 6 ed. Rio
1849 de Janeiro: Guanabara Koogan.

1850 DULLOO, A.G.; ANTIC, V.; MONTANI, J.P. **Ectopic fat stores: housekeepers that**
1851 **can overspill into weapons of lean body mass destruction.** *Int J Obesity.*
1852 28(suppl):S1-S2, 2004.

1853 FABBRINI, E.; SULLIVAN, S.; KLEIN, S. **Obesity and nonalcoholic fatty liver**
1854 **disease: Biochemical, metabolic, and clinical implications.** *Hepatology.* 51(2):679-
1855 689, 2010.

1856 FARRELL, G.C.; LARTER, C.Z. **Nonalcoholic fatty liver disease: from steatosis to**
1857 **cirrhosis.** *Hepatology* 43:S99–S112; 2006.

1858 FELDSTEIN, A.E.; WERNEBURG, N.W.; CANBAY, A. *et al.* **Free fatty acids**
1859 **promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal**
1860 **pathway.** *Hepatology,* 40:185–194; 2004.

1861 FELDSTEIN, A.E.; WERNEBURG, N.W.; LI, Z. *et al.* **Bax inhibition protects against**
1862 **free fatty acid-induced lysosomal permeabilization.** *Am. J. Physiol.: Gastrointest.*
1863 *Liver Physiol.* 290:G1339–G1346; 2006.

1864 FÉRÉZOU-VIALA, J.; ROY, A.F.; SEROUGNE, C. *et al.* **Long-term consequences of**
1865 **maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced**
1866 **obesity in the offspring.** *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293, R1056–
1867 R1062, 2007.

1868 FLEGAL, K.M.; CARROLL, M.D.; KIT, B.K. *et al.* **Prevalence of obesity and trends**
1869 **in the distribution of body mass index among US adults, 1999– 2010.** *JAMA*
1870 307:491–497, 2012.

1871 FURUKAWA, S.; FUJITA, T.; SHUMABUKURO, M. *et al.* **Increased oxidative**
1872 **stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** *J Clin Invest.* 114(12):1752–
1873 1761, 2004.

1874 GARN, S.M.; CLARK, D.C. **Trends in fatness and the origins of obesity.** *Pediatrics*
1875 57:443–56, 1976.

1876 GARN, S.M.; COLE, P.E.; BAILEY, S.M. **Living together as a factor in family line**
1877 **resemblances.** *Hum Biol* 51:565–87, 1979.

1878 HARDELAND, R.; TAN, D.X.; REITER, R.J. **Kynuramines, metabolites of**
1879 **melatonin and other indoles: the resurrection of an almost forgotten class of**
1880 **biogenic amine.** *J. Pineal Res.* 47, 109–126, 2009.

1881 HATZIS, G.; ZIAKAS, P.; KAVANTZAS, N. *et al.* **Melatonin attenuates high fat**
1882 **diet-induced fatty liver disease in rats.** *World J Hepatol.* 27; 5(4): 160–169, 2013.

1883 HAYES, E.K.; LECHOWICZ, A.; PETRIK, J.J. **Adverse Fetal and Neonatal**
1884 **Outcomes Associated with a Life-Long High Fat Diet: Role of Altered**
1885 **Development of the Placental Vasculature.** *Plos one.* 7(3):e33370, 2012.

1886 HEIMBERG M, FIZETTE NB. **The action of norepinephrine on the transport of**
1887 **fatty acids and triglycerides by the isolated perfused rat liver.** *Biochem Pharmacol.*
1888 1963;12(4):392–394.

1889 HELGE, J.W.; WATT, P.W.; RICHTER, E.A. *et al.* **Utilization during exercise:**
1890 **adaptation to a fat-rich diet increases utilization of plasma fatty acids and very**
1891 **low density lipoprotein-triacylglycerol in humans.** *J Physiol.* 537(3), 1009–1020,
1892 2001.

1893 HULL, H.R.; DINGER, M.K.; KNEHANS, A.W. *et al.* **Impact of maternal body mass**
1894 **index on neonate birth- weight and body composition.** *Am J Obstet Gynecol.*
1895 198:416.e1–e6, 2008.

1896 ILONA, I.; CEGIELSKI, M.; GEBAROWSKA, E. *et al.* **Effect of melatonin on human**
1897 **keratinocytes and fibroblasts subjected UVA and UVB radiation in vitro.** *In Vivo,*
1898 23, 739–746. 2009.

1899 JAMES, P.T.; LEACH, R.; KALAMARA, E. *et al.* **The Worldwide Obesity**
1900 **Epidemic.** *Obes Res.* 9(4), 228S–233S, 2001.

1901 KANG, J.W.; KOH, E.J.; LEE, S.M. **Melatonin protects liver against ischemia and**
1902 **reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway.** *J*
1903 *Pineal Res.* 50(4):403–411, 2011.

- 1904 KELLY, T.; WANG, W.; CHEN, C.S. *et al.* **Global burden of obesity in 2005 and**
1905 **projections to 2030.***Int J Obes.* 32:1431 – 1437, 2008.
- 1906 KHAN, I.Y.; DEKOU, V.; DOUGLAS, G. *et al.* **A high-fat diet during rat pregnancy**
1907 **or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring.***Am J*
1908 *PhysiolRegulIntegr Comp Physiol.* 288(1):R127- R133, 2005.
- 1909 KIRK, S.L.; SAMUELSSON, A.M.; ARGENTON, M.*et al.* **Maternal obesity induced**
1910 **by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in**
1911 **offspring.***PLoS One.*4(6), 1-13, 2009.
- 1912 KOOPMAN, K.E.; CAAN, M.W.A.; NEDERVEEN, A.J. *et al.* **Hypercaloric diets**
1913 **with increased meal frequency, but not meal size, increase intrahepatic**
1914 **triglycerides: a randomized controlled trial.** *Hepatology*, 60 (2): 545-553, 2014.
- 1915 LANDAR, A.; SHIVA, S.; LEVONEN, A.L. *et al.* **Induction of the permeability**
1916 **transition and cytochrome c release by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in**
1917 **mitochondria.** *Biochem. J.* 394:185–195, 2006.
- 1918 LANDAR, A.; ZMIJEWSKI, J. W.; DICKINSON, D.A. *et al.* **Interaction of**
1919 **electrophilic lipid oxidation products with mitochondria in endothelial cells and**
1920 **formation of reactive oxygen species.***Am. J. Physiol., Heart Circ. Physiol.*
1921 290:H1777–H1787, 2006.
- 1922 LEDDY, M.A.; POWER, M.L.; SCHULKIN, J. **The impact of maternal obesity on**
1923 **maternal and fetal health.** *Rev Obstet Gynecol.* 1(4):170-178, 2008.
- 1924 LI, M.; SLOBODA, D.M.; VICKERS, M.H. **Maternal obesity and developmental**
1925 **programming of metabolic disorders in offspring: Evidence from animal**
1926 **models.***Exp Diabetes Res.* 2011, 1-9, 2011.
- 1927 LIANG, R.; NICKKHOLGH, A.;HOFFMANN, K.*et al.* **Melatonin protects from**
1928 **hepatic reperfusion injury through inhibition of IKK and JNK pathways and**
1929 **modification of cell proliferation.***J Pineal Res;* 46:8–14, 2009.
- 1930 MANTENA, S.K.; KING, A.L.; ANDRINGA, K.K. *et al.* **Mitochondrial dysfunction**
1931 **and oxidative stress in the pathogenesis of alcohol- and obesity-induced fatty liver**
1932 **diseases.***Free RadicBiol Med.* 44(7):1259-1272,2008.
- 1933 MARKOVÁ, M.; ADÁMEKOVÁ, E.; BOJKOVÁ, B.; KUBATKA, P.;
1934 KASSAYOVÁ, M.; AHLERSOVÁ, E.; AHLERS, I. **Effect of Low-dose Chronic**
1935 **Melatonin Administration on Metabolic and Hormonal Variables in Young**
1936 **Laboratory Rats.***Acta Vet. Brno*, 73: 445–453, 2004.
- 1937 MATEOS, S.S.; ALONSO-GONZALEZ, C.;GONZALEZ, A.*et al.* **Melatonin and**
1938 **estradiol effects on food intake body weight and leptin in ovariectomized**
1939 **rats.***Maturitas* 58, 91–101. 2007.
- 1940 MCCURDY, C.E.; BISHOP, J.M.; WILLIAMS, S.M. *et al.* **Maternal high-fat diet**
1941 **triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates.***J ClinInvest*, 119: 323–
1942 335. 2009.
- 1943 MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; SOUZA, A.L.M. *et al.* **Da desnutrição para a**
1944 **obesidade – a transição nutricional no Brasil.** Velhos e novos males da Saúde Pública
1945 no Brasil: a evolução do país e de suas doenças. São Paulo: Huci- tec; 1995.

- 1946 MOURALIDARANE, A.; SOEDA, J.; SUGDEN, D.*et al.* **Maternal obesity programs**
 1947 **offspring non-alcoholic fatty liver disease through disruption of 24-h rhythms in**
 1948 **mice.***Int J Obes.* 39(9):1339-1348, 2015.
- 1949 MOURALIDARANE, A.; SOEDA, J.; VISCONTI-PUGMIRE, C.*et al.* **Maternal**
 1950 **obesity programs offspring nonalcoholic fatty liver disease by innate immune**
 1951 **dysfunction in mice.** *Hepatology.* 58(1):128-138, 2013.
- 1952 NISHIDA, S.; SATO, R.; MURAI, I.*et al.* **Effect of pinealectomy on plasma levels of**
 1953 **insulin and leptin.** *J Pineal Res.* 35(4):251-256, 2003.
- 1954 NISHIDA, S.; SEGAWA, T.; MURAI, I. *et al.* **Long-term melatonin administration**
 1955 **reduces hyperinsulinemia and improves the altered fatty-acid compositions in**
 1956 **type-2 diabetic rats via the restoration of Delta-5 desaturase activity.***J. Pineal Res.*
 1957 32, 26–33. 2002.
- 1958 OBEN, J.A.; MOURALIDARANE, A.; SAMUELSSON, A.M.*et al.* **Maternal obesity**
 1959 **during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-**
 1960 **alcoholic fatty liver disease in mice.***J Hepatol.* 52(6):913-920, 2010.
- 1961 OBEN, J.A.; ROSKAMS, T.; YANG, S.*et al.* **Norepinephrine induces hepatic**
 1962 **fibrogenesis in leptin deficient ob/ob mice.** *BiochemBiophys Res Commun.*
 1963 308(2):284-292, 2003.
- 1964 OBEN, J.A.; ROSKAMS, T.; YANG, S. *et al.* **Hepatic fibrogenesis requires**
 1965 **sympathetic neurotransmitters.** *Gut,* 53:438–445, 2004.
- 1966 OGETURK, M.; KUS, I.; PEKMEZ, H. *et al.* **Inhibition of carbon tetrachloride–**
 1967 **mediated apoptosis and oxidative stress by melatonin in experimental liver**
 1968 **fibrosis.***Toxicology and industrial health.* 24(4), 201-208, 2008.
- 1969 OKEN, E.; GILLMAN, M.W. **Fetal origins of obesity.** *Obes Res,* 11:496– 506, 2003.
- 1970 OZTURK, G.; COSKUN, S.; ERBAS, D.*et al.* **The effect of melatonin on liver**
 1971 **superoxide dismutase activity, serum nitrate and thyroid hormone levels.***Jpn J*
 1972 *Physiol.* 50(1):149-153, 2000.
- 1973 PAN, M., SONG, Y. L., XU, J. M., & GAN, H. Z. **Melatonin ameliorates**
 1974 **nonalcoholic fatty liver induced by high-fat diet in rats.** *J Pineal Res.* 41(1), 79–84,
 1975 2006.
- 1976 PARRY, S.A.; HODSON, L. **Influence of dietary macronutrients on liver fat**
 1977 **accumulation and metabolism.** *J Investig Med.* 65(8):1102-1115, 2017.
- 1978 PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P.; LANCHI JR. AH. **Obesidade: hábitos**
 1979 **nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina.***ArqBrasEndocrinolMetabol.*
 1980 47(2):111-127, 2003.
- 1981 PEREIRA, L.O.; FRANCISCHI, R.P.; KLOPFER, M. *et al.* **Obesidade e sua**
 1982 **Implicações – Ação da Atividade Física e Controle Nutricional.***Rev Bras*
 1983 *NutrClin* 14:9-17, 1999.
- 1984 POSSIGNOLO, L.F. Effect of high fat diet chronic ingestion on the metabolism of
 1985 female rats, and on the sr-bi and abca1 expression in the placenta, small intestine, liver
 1986 and kidney of the offspring. **Dissertação de Mestrado,** p. 176, 2012.
- 1987 POSTON, L. **Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of**
 1988 **offspring long term health.***Best Pract Res ClinEndocrinolMetab.* 26(5):627-639, 2012.

- 1989 REITER, J.R.; MANCHESTER, C.L.; TAN, D.X. **Neurotoxins: Free Radical**
1990 **Mechanisms and Melatonin Protection.***CurrNeuropharmacol.* 8(3):194-210, 2010.
- 1991 REITER, R.J.; TAN, D.X.; KORKMAZ, A.; M.A.S. **Obesity and metabolic**
1992 **syndrome: Association with chronodisruption, sleep deprivation, and melatonin**
1993 **suppression.***Ann Med.* 44(6):564-577, 2012.
- 1994 REITER, R.J. *et al.* **Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and**
1995 **pathophysiological implications.** *ActaBiochim. Pol.* 50, 1129–1146. 2003.
- 1996 REYNOLDS, J.R.M. **The risk of maternal obesity to the long-term health of the**
1997 **offspring.***ClinEndocrinol (Oxf).* 78: 9-16, 2013.
- 1998 ROSA, D.P.; BONA, S.; SIMONETTO, D. *et al.* **Melatonin protects the liver and**
1999 **erythrocytes against oxidative stress in cirrhotic rats.***ArqGastroenterol.* 47(1):72-78,
2000 2010.
- 2001 ROSINI, T.C.; DA SILVA, A.S.R.; MORAES, C.D.E. **Obesidade induzida por**
2002 **consumo de dieta: modelo em roedores para o estudo dos distúrbios relacionados**
2003 **com a obesidade.***Rev Assoc Med Bras.* 58(3):383-387, 2012.
- 2004 SCHEER, F.A.J.L. *et al.* **Adverse metabolic and cardiovascular consequences of**
2005 **circadian misalignment.***Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 4453–4458. 2009.
- 2006 SERAPHIM, P.M.; SUMIDA, D.H.; NISHIDE, F.T. *et al.* **A glândula pineal e o**
2007 **metabolismo de carboidratos.** *ArqBrasEndocrinolMetabol.* 44(4):331-338,2000.
- 2008 SEWELL, M.F.; HUSTON-PRESLEY, L.; SUPER, D.M. *et al.* **Increased neonatal fat**
2009 **mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity.** *Am J Obstet Gynecol.*
2010 195: 1100-1103, 2006.
- 2011 SHIMOZUMA, M. *et al.* **Expression and cellular localization of melatonin**
2012 **synthesizing enzymes in rat and human salivary glands.***Histochem. Cell. Biol.* 135,
2013 389–396. 2011.
- 2014 SILVA, F.C.A. **Efeito do fotoperíodo no disco placentário e o impacto sobre o**
2015 **fígado da prole.** 2010. Dissertação (Mestrado em Morfofisiologia) - Universidade
2016 Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.
- 2017 SINGH, M.; JADHAV, H.R. **Melatonin: Functions and ligands.** *Drug Discov Today.*
2018 19(9):1410-1418, 2014.
- 2019 SRINIVASAN, M.; KATEWA, S.D.; PALANIYAPPAN, A. *et al.* **Maternal high- fat**
2020 **diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of**
2021 **metabolic syndrome-like phenotype in adulthood.***Am J PhysiolEndocrinolMetab.*
2022 291(4):E792-9, 2006;
- 2023 SOENGAS, J.L.; STRONG, E.F.; ANDRÉS, M.D.*et al.* **Dose-dependent effects of**
2024 **acute melatonin treatments on brain carbohydrate metabolism of rainbow trout.**
2025 *Fish Physiol. Biochem.* 18, (4), 311–319, 1998.
- 2026 SULLIVAN, E.L.; SMITH, M.S.; GROVE, K.L. **Perinatal exposure to high-fat diet**
2027 **programs energy balance, metabolism and behavior in**
2028 **adulthood.***Neuroendocrinology.* 93(1):1-8,2011;
- 2029 SULLIVAN, E.L.; GRAYSON, B.; TAKAHASHI, D. *et al.* **Chronic Consumption of**
2030 **a High-Fat Diet during Pregnancy Causes Perturbations in the Serotonergic**
2031 **System and Increased Anxiety-Like Behavior in Nonhuman Primate Offspring.***J*
2032 *Neuro.* 30(10): 3826-3830, 2011.

2033 SVEGLIATI, B.G.; D'AMBROSIO, L.; FERRETTI, G. *et al.* **Fibrogenic effect of**
2034 **oxidative stress on 3006 rat hepatic stellate cells.** *Hepatology*.27(3), 720-726, 1998.

2035 TAHAN, V.; OZARAS, R.; CANBAKAN, B. *et al.* **Melatonin reduces**
2036 **dimethylnitrosamine-induced liver 3018 fibrosis in rats.** *Journal of Pineal*
2037 *Research*.v. 37(2), p.78-84, 2004.

2038 TAIN, Y.L.; HUANG, L.T.; HSU, C.N. *et al.***Melatonin therapy prevents**
2039 **programmed hypertension and nitric oxide deficiency in offspring exposed to**
2040 **maternal caloric restriction.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1-21, 2014.

2041 TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; FUENTES-BROTO, L. *et al.***Significance and**
2042 **application of melatonin in the regulation of brown adipose tissue metabolism:**
2043 **Relation to human obesity.***Obes Rev.* 12(3):167-188,2011.

2044 TERRON, M.P. *et al.* **Melatonin reduces body weight gain and increase nocturnal**
2045 **activity in male Wistar rats.** *PhysiolBehav.* 118, 8–13. 2013.

2046 WANDERLEY, E.N.; FERREIRA, V.A. **Obesidade: uma perspectiva plural.***Ciênc.*
2047 *Saúde Coletiva*.15(1), 185-194, 2010.

2048 WANG, Y.; BEYDOUN, M.A.; LIANG, L. *et al.***Will all Americans become**
2049 **overweight or obese? Estimating the progression and cost of the US obesity**
2050 **epidemic.***Obesity*.16:2323 – 2330,2008.

2051 WEHR, T.A. *et al.***A circadian signal of change of season in patients with seasonal**
2052 **affective disorder.***Arch. Gen. Psychiatry* 58, 1108–1114. 2001.

2053 WEI, Y.; WANG, D.; PAGLIASSOTTI, M. J. **Saturated fatty acid-mediated**
2054 **endoplasmic reticulum stress and apoptosis are augmented by trans-10, cis-12-**
2055 **conjugated linoleic acid in liver cells.***Mol. Cell. Biochem.* 303:105–113; 2007.

2056 WEI, Y.; WANG, D.; TOPCZEWSKI, F.; PAGLIASSOTTI, M. J. **Saturated fatty**
2057 **acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of**
2058 **ceramide in liver cells.***Am. J. Physiol: Endocrinol. Metab.* 291: E275–E281; 2006.

2059 WHITE, C.L.; PURPERA, M.N.; MORRISON, C.D. **Maternal obesity is necessary**
2060 **for programming effect of high-fat diet on offspring.** *AJP RegulIntegr Comp Physiol.*
2061 296(5):R1464-R1472, 2009.

2062 WHITE, P.A.S.; CERCATO, L.M.; ARAÚJO, J.M.D. *et al.* **Modelo de obesidade**
2063 **induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e**
2064 **intolerância à glicose.***ArqBras EndocrinolMetabol.* 57(5):339-345, 2013.

2065 WHO.**Obesity : Preventing And Managing The Global Epidemic** Report of a. 2000.

2066 WILLIAMS, C.B.; MACKENZIE, K.C.; GAHAGAN, S.**The effect of maternal**
2067 **obesity on the offspring.***ClinObstet Gynecol.* 57(3):508-15, 2014.

2068 YAGI, K. **Assay for blood plasma or serum.***Methods in Enzymology*, v. 105, p. 328–
2069 331, 1984.

2070 YONEI, Y. *et al.* **Effects of melatonin: basic studies and clinical applications.** *Anti-*
2071 *Ageing Med.* 7, 85–91. 2010.

2072 YOSHIDA, Y. **Melatonin receptor MT1 is expressed in mouse skin and In vitro**
2073 **treatment enhances whisker growth.** *J. Clin. Exp. Dermatol. Res.* 4, 1–5. 2013.

ZAGAJEWSKI, J. *et al.* **Conversion of L-tryptophan to melatonin in the GIT: new HPLC method enabling simultaneous determination of six metabolites of L-tryptophan by native fluorescence and UV–VIS detection.***J. Phys. Pharmacol.* 63, 613–621. 2012.

ZHANG, W.H.; LI, J.Y.; ZHOU, Y. **Melatonin abates liver ischemia/reperfusion injury by improving the balance between intric oxide and endothelin.***HepatobiliaryPancreatDis Int.* 5(4):574-579, 2006.



1. Guide for Authors

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.



Food and Chemical Toxicology (FCT), an internationally renowned journal, aspires to publish original research articles and reviews on **toxic effects**, in animals or humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on **food, drugs, and chemicals, including agricultural and industrial safety, and consumer product safety**. Areas such as safety evaluation of **novel foods and ingredients, biotechnologically-derived products, and nanomaterials** are included in the scope of the journal. FCT also encourages submission of papers on **inter-relationships between nutrition and toxicology** and on *in vitro* techniques, particularly those fostering the **3 Rs**.

The principal aim of the journal is to publish high impact, scholarly work and to serve as a multidisciplinary forum for research in toxicology. Papers submitted will be judged on the basis of scientific originality and contribution to the field, quality and subject matter. Studies should address at least one of the following:

- Physiological, biochemical, or pathological changes induced by specific substances
- Techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology
- Mechanisms underlying toxic phenomena
- Toxicological examinations of specific chemicals or consumer products, both those showing adverse effects and those demonstrating safety, that meet current standards of scientific acceptability

2144 Manuscripts concerning materials/substances of only local interest for which the
2145 chemical composition of the material/substance is **not clearly defined** will **not** be
2146 considered. Manuscripts addressing only pharmacological properties, or only potentially
2147 beneficial effects using *in vitro* or *in vivo* systems, are not within the scope of the
2148 journal.

2149 FCT is committed to the highest standards. Only papers that have not been previously
2150 published, that fit in the above mentioned scope, and that have been reviewed by experts
2151 in the field prior to publication will be accepted. Cover letters must state that the paper
2152 is new and original and not under consideration for publication elsewhere. Papers
2153 pending in other journals will not be considered. Co-authors should be individuals who
2154 have contributed substantially to the content of the papers.

2155 **Types of paper**

2156
2157 The Journal's main purpose is the publication of papers reporting and interpreting
2158 original unpublished toxicological research, particularly studies promoting an
2159 understanding of the mechanisms underlying toxic effects or improvements in methods
2160 for predicting adverse effects. Papers reporting the toxicological examination of specific
2161 foods, chemicals or consumer products will be published, irrespective of the positive or
2162 negative nature of the results, provided the tests and reporting meet current standards of
2163 acceptability. In addition, Short Communications will also be considered, as will
2164 concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance.
2165 Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in
2166 the journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be
2167 invited from the authors of the original contribution. All Letters to the Editor should be
2168 submitted to the Editor in Chief, Jose L. Domingo through the online submission system
2169 of the Journal.

2170 **SPECIAL ISSUE PUBLICATION RULES**

2171 The policies and guidelines mentioned in [THIS DOCUMENT](#) is intended for Guest
2172 Editors intending to submit a special issue proposal for Food and Chemical Toxicology
2173 (FCT).

2174 **Submission checklist**

2175
2176 You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to
2177 the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for
2178 more details.

2179 **Ensure that the following items are present:**

2180 One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- 2181 • E-mail address
- 2182 • Full postal address

2183 All necessary files have been uploaded:

2184 *Manuscript:*

- 2185 • Include keywords

- 2186 • All figures (include relevant captions)
 - 2187 • All tables (including titles, description, footnotes)
 - 2188 • Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - 2189 • Indicate clearly if color should be used for any figures in print
 - 2190 *Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)
 - 2191 *Supplemental files* (where applicable)
- 2192 Further considerations
- 2193 • Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
 - 2194 • All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
 - 2195 • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources
 - 2196 (including the Internet)
 - 2197 • A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing
 - 2198 interests to declare
 - 2199 • Journal policies detailed in this guide have been reviewed
 - 2200 • Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- 2201 For further information, visit our [Support Center](#).



Before You Begin

2203 Ethics in publishing

2204
2205 Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for](#)
2206 [journal publication](#).

2207 Studies in humans and animals

2208
2209 If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work
2210 described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World](#)
2211 [Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The
2212 manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting,](#)
2213 [Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the
2214 inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those
2215 recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

2216 Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was
2217 obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human
2218 subjects must always be observed.

2219 All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be
2220 carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and
2221 associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the
2222 National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH
2223 Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the
2224 manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be
2225 indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of
2226 the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors should complete the declaration of interest statement using [this template](#) and upload to the submission system at the Attach/Upload Files step. If there are no interests to declare, please choose: 'Declarations of interest: none' in the template. This statement will be published within the article if accepted. [More information](#).

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. Furthermore, it is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects (i.e. animals and human subjects), and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

2272 Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to
2273 differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions
2274 about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might
2275 imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or
2276 any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should
2277 ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of
2278 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g.
2279 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

2280 **Author contributions**

2281
2282 For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining
2283 their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles:
2284 Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation;
2285 Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation;
2286 Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship
2287 statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s)
2288 following. [More details and an example](#)

2289 **Changes to authorship**

2290
2291 Authors are expected to consider carefully the list and order of
2292 authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at
2293 the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author
2294 names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been
2295 accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the
2296 Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for
2297 the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors
2298 that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or
2299 removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.
2300 Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or
2301 rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor
2302 considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript
2303 has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will
2304 result in a corrigendum.

2305 **Article transfer service**

2306 This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels
2307 your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be
2308 asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will
2309 be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that
2310 your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

2311 **Copyright**

2312
2313 Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing
2314 Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding
2315 author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing
2316 Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

2317 Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including
2318 abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is
2319 required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative
2320 works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted
2321 works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright
2322 owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by
2323 authors in these cases.

2324 For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to
2325 complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party
2326 reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

2327 ***Author rights***

2328 As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your
2329 work. [More information](#).

2330 ***Elsevier supports responsible sharing***

2331 Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

2332 **Role of the funding source**

2333

2334 You are required to identify who provided financial support for the conduct of the
2335 research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the
2336 sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data;
2337 in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If
2338 the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please
2339 see <https://www.elsevier.com/funding>.

2340 **Open access**

2341

2342 Please visit our Open Access page from the Journal Homepage for more information.

2343 ***Elsevier Researcher Academy***

2344 [Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-
2345 career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at
2346 Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides
2347 and resources to guide you through the process of writing for research and going
2348 through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission
2349 and navigate the publication process with ease.

2350 ***Language (usage and editing services)***

2351 Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a
2352 mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require
2353 editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct
2354 scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from
2355 Elsevier's Author Services.

2356 **Submission**

2357

2358 Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your

article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.



Preparation

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced– this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the

2402 relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The
2403 corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

2404 **Peer review**

2405
2406 This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially
2407 assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then
2408 typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific
2409 quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding
2410 acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on](#)
2411 [types of peer review](#).

2412 **REVISED SUBMISSIONS**

2413 ***Use of word processing software***

2414 Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us
2415 with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as
2416 possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article.
2417 The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional
2418 manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). See also the section on
2419 Electronic artwork.
2420 To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and
2421 'grammar-check' functions of your word processor.

2422 **Article structure**

2423 ***Subdivision - numbered sections***

2424 Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be
2425 numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section
2426 numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to
2427 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on
2428 its own separate line.

2429 ***Introduction***

2430 State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a
2431 detailed literature survey or a summary of the results.

2432 ***Material and methods***

2433 Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent
2434 researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by
2435 a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation
2436 marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be
2437 described.

2438 ***Results***

2439 Results should be clear and concise.

2440 ***Discussion***

2441 This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A

2442 combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations
2443 and discussion of published literature.

2444 **Conclusions**

2445 The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section,
2446 which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion
2447 section.

2448 **Essential title page information**

2449

2450 • **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems.
2451 Avoid abbreviations and formulae where possible.

2452 • **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family
2453 name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add
2454 your name between parentheses in your own script behind the English transliteration.
2455 Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the
2456 names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the
2457 author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of
2458 each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each
2459 author.

2460 • **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages
2461 of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes
2462 answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-**
2463 **mail address is given and that contact details are kept up to date by the**
2464 **corresponding author.**

2465 • **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the
2466 article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address')
2467 may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author
2468 actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript
2469 Arabic numerals are used for such footnotes.

2470 **Highlights**

2471

2472 Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the
2473 discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of
2474 bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that
2475 were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example](#)
2476 [Highlights](#).

2477 Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission
2478 system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points
2479 (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

2480 **Abstract**

2481

2482 A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose
2483 of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often
2484 presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason,
2485 References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also,

2486 non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must
2487 be defined at their first mention in the abstract itself.

2488 **Graphical abstract**

2489 Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more
2490 attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of
2491 the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide
2492 readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online
2493 submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328
2494 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13
2495 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or
2496 MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.
2497 Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation
2498 of their images and in accordance with all technical requirements.

2499 **Keywords**

2500
2501 Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British
2502 spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for
2503 example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly
2504 established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing
2505 purposes.

2506 **Abbreviations**

2507
2508 Abbreviations should be used sparingly; they should be defined when first used in the
2509 paper but also listed in alphabetical order under *Abbreviations* as a footnote to the title
2510 page (see above).

2511 **Acknowledgements**

2512 Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the
2513 references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title
2514 or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g.,
2515 providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

2516 **Nomenclature and units**

2517
2518 All measurements should be expressed in metric, preferably SI, units. Test chemicals
2519 and enzymes must be clearly identified, IUPAC and CAS names being used, wherever
2520 possible with the aid of CAS Registry and EC numbers. Pesticides should be referred to
2521 be their ISO names and human and veterinary drugs by their INNs.

2522 **Footnotes**

2523 Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article.
2524 Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used.
2525 Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the
2526 footnotes themselves separately at the end of the article.

2527 **Artwork**

2528 ***Electronic artwork***

2529 *General points*

- 2530 • Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
2531 • Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
2532 • Number the illustrations according to their sequence in the text.
2533 • Use a logical naming convention for your artwork files.
2534 • Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
2535 • For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and
2536 tables within a single file at the revision stage.
2537 • Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate
2538 source files.

2539 A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

2540 **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are**
2541 **given here.**

2542 *Formats*

2543 Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please
2544 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution
2545 requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
2546 EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
2547 TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of
2548 300 dpi.

2549 TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

2550 TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum
2551 of 500 dpi is required.

2552 **Please do not:**

- 2553 • Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the
2554 resolution is too low.
2555 • Supply files that are too low in resolution.
2556 • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

2557 ***Color artwork***

2558 Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS
2559 (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your
2560 accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no
2561 additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and
2562 other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the
2563 printed version. **For color reproduction in print, you will receive information**
2564 **regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please
2565 indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the](#)
2566 [preparation of electronic artwork](#).

2567 ***Figure captions***

2568 Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title
2569 (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the
2570 illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

2571 **Tables**

2572

2573 Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next

to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambenh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you

use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-and-chemical-toxicology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;

3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

2666 Reference to a website:
2667 Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.
2668 <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13
2669 March 2003).
2670 Reference to a dataset:
2671 [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for
2672 Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.
2673 <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

2674 **Journal abbreviations source**
2675 Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

2676 **Video**

2677
2678 Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your
2679 scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit
2680 with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the
2681 article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or
2682 animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted
2683 files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In
2684 order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide
2685 the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of
2686 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published
2687 online in the electronic version of your article in Elsevier Web products,
2688 including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame
2689 from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of
2690 standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed
2691 instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation
2692 cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the
2693 electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

2694 **Data visualization**

2695
2696 Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact
2697 and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out
2698 about available data visualization options and how to include them with your article.

2699 **Supplementary material**

2700
2701 Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published
2702 with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as
2703 they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit
2704 your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each
2705 supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any
2706 stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any
2707 corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in
2708 Microsoft Office files as these will appear in the published version.

2709 **Research data**

2710

2711 This journal encourages and enables you to share data that supports your research
2712 publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published
2713 articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that
2714 validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also
2715 encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods
2716 and other useful materials related to the project.

2717 Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a
2718 statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you
2719 are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your
2720 manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more
2721 information about data citation. For more information on depositing, sharing and using
2722 research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

2723 ***Data linking***

2724 If you have made your research data available in a data repository, you can link your
2725 article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link
2726 articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying
2727 data that gives them a better understanding of the research described.

2728 There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can
2729 directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the
2730 submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

2731 For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to
2732 your published article on ScienceDirect.

2733 In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of
2734 your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020;
2735 CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

2736 ***Mendeley Data***

2737 This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data
2738 (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and
2739 methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository.
2740 During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the
2741 opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets
2742 will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

2743 For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

2744 ***Data in Brief***

2745 You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional
2746 raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and
2747 describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated,
2748 formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are
2749 encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly
2750 alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted,
2751 your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be
2752 editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please

note an open access fee of 600 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the [Data in Brief website](#). Please use [this template](#) to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple MethodsX articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the [MethodsX website](#). Please use [this template](#) to prepare your MethodsX article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).



After Acceptance

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Author Services](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



Author Inquiries

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

Solutions

- [Scopus](#)
- [ScienceDirect](#)
- [Mendeley](#)
- [Evolve](#)
- [Knovel](#)
- [Reaxys](#)
- [ClinicalKey](#)

Researchers

- [Submit your paper](#)
- [Find books & journals](#)
- [Visit Author Hub](#)
- [Visit Editor Hub](#)
- [Visit Librarian Hub](#)
- [Visit Reviewer Hub](#)

About Elsevier

- [About](#)
- [Careers](#)
- [Newsroom](#)
- [Events](#)
- [Publisher relations](#)
- [Advertising, reprints and supplements](#)

How can we help?

- [Support and Contact](#)

Follow Elsevier

Select location/language [Global - English](#)

2840

2841 Copyright © 2020 Elsevier, except certain content provided by third parties
2842 Cookies are used by this site. To decline or learn more, visit our [Cookies](#) page.
2843 [Terms and Conditions](#) [Privacy Policy](#) [Sitemap](#)

2844

2845