

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Morfologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular**

Lucas Carvalho Cardoso

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA E CAFEÍNA E  
SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE A GESTAÇÃO EM MODELO MURINO**

**Belo Horizonte**

**2023**

Lucas Carvalho Cardoso

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA E CAFEÍNA E  
SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE A GESTAÇÃO EM MODELO MURINO**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biologia Celular do Departamento de Morfologia,  
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre em Biologia Celular.**

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi C. L. de Almeida

Co-orientador: Dr. Enrrico Bloise

**Belo Horizonte**

**2023**

043

Cardoso, Lucas Carvalho.

Associação entre o consumo de dieta hipercalórica e cafeína e suas implicações sobre a gestação em modelo murinho [manuscrito] / Lucas Carvalho Cardoso. – 2023.

77 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi C. L. de Almeida. Co-orientador: Dr. Enrico Bloise.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Dieta da Carga de Carboidratos. 3. Obesidade. 4. Diabetes Mellitus. 5. Placenta. 6. Cafeína. I. Almeida, Fernanda Radicchi Campos Lobato de. II. Bloise, Enrico. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

## ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUCAS CARVALHO CARDOSO

Às **nove horas** do dia **29 de maio de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**ASSOCIAÇÃO ENTRE O CONSUMO DE DIETA HIPERCALÓRICA E CAFÉINA E SUAS IMPLICAÇÕES SOBRE A GESTAÇÃO EM MODELO MURINO**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	Aprovado
Dr. Enrrico Bloise	UFMG	Aprovado
Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda	UFMG	Aprovado
Dra. Dirce Ribeiro de oliveira	UFJF Campus GV	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **Aprovado**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 29 de maio de 2023.**

Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida (Ori) \_\_\_\_\_

Dr. Enrrico Bloise (Coorientador) \_\_\_\_\_

Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda \_\_\_\_\_

Dra. Dirce Ribeiro de oliveira \_\_\_\_\_

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda, Professora do Magistério Superior**, em 29/05/2023, às 14:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Professora do Magistério Superior**, em 29/05/2023, às 18:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Enrrico Bloise, Professor do Magistério Superior**, em 29/05/2023, às 21:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 30/05/2023, às 19:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Dirce Ribeiro de Oliveira, Usuária Externa**, em 30/05/2023, às 20:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orga\\_o\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orga_o_acesso_externo=0), informando o código verificador **2342239** e o código CRC **CC9E21D1**.

## **AGRADECIMENTOS**

**Aos meus pais, Melânia e Adriano, que sempre me apoiaram e amaram.**

**Aos meus avôs, Deusvalte e José por todo o carinho e amor.**

**A minha madrinha Claudia, por ser minha inspiração.**

**Aos professores Fernanda e Hélio, que me acolheram e me ensinaram a ser um cientista.**

**A todos os meus colegas de laboratório e amigos que me ajudaram e apoiaram em todo o processo.**

*“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”*

**Gandalf**

## Resumo

O padrão alimentar dos seres humanos se alterou ao longo do tempo, sendo atualmente composto por uma dieta hipercalórica, com excesso de gorduras e açúcares. Muitos alimentos presentes nesse tipo de dieta, tais como café, chocolates, refrigerantes e energéticos, apresentam grandes quantidades de cafeína. Há evidências de que, isoladamente, o consumo de dieta hipercalórica e a ingestão de cafeína podem comprometer a reprodução. Porém, pouco se sabe sobre o efeito combinado dessas substâncias especificamente sobre o período gestacional. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do consumo materno crônico de dieta hipercalórica, associada à ingestão de cafeína durante a gestação, sobre parâmetros reprodutivos, morfologia placentária e parâmetros biométricos fetais em camundongos heterogênicos. Para isso, utilizamos camundongos Swiss fêmeas alocadas em quatro grupos experimentais: 1) dieta controle normocalórica, sem administração de cafeína (CC); 2) dieta controle e suplementação de 120mg/kg/dia de cafeína (C120); 3) dieta hipercalórica sem cafeína (TC); 4) dieta hipercalórica e suplementação de 120mg/kg/dia de cafeína (T120). Os animais receberam as respectivas dietas por seis semanas e a suplementação da cafeína foi feita por duas semanas a partir da sétima semana, quando as fêmeas foram acasaladas, sendo eutanasiadas no terço gestacional final (DG17.5). Amostras de sangue foram coletadas para avaliações de parâmetros bioquímicos e os úteros foram dissecados para avaliações biométricas e morfológicas dos conceptos e respectivas placentas. Os resultados encontrados apontam para um quadro de síndrome metabólica nos animais que consumiram a dieta hipercalórica, os quais além de apresentarem um quadro de obesidade, apresentaram hiperglicemia, dislipidemia e resistência à insulina ( $P < 0,05$ ). Já os animais que consumiram cafeína obtiveram níveis mais elevados de triglicerídeos e colesterol total, bem como um quadro de hiperglicemia ( $P < 0,05$ ). Além disso, a dieta hipercalórica, a cafeína e a associação entre ambas afetaram o desenvolvimento fetal, reduzindo o peso do feto assim como o peso do fígado ( $P < 0,05$ ), sendo estes achados mais severos nos fetos do sexo feminino. Tais efeitos sobre o desenvolvimento fetal foram decorrentes das alterações nas placentas, que além de menores e mais leves em todos os tratamentos ( $P < 0,05$ ), apresentaram alterações estruturais na interface a materno fetal, com destaque para o aumento na altura da membrana interhemal ( $P < 0,05$ ). Vale ressaltar que o consumo da dieta hipercalórica associada a cafeína foi mais deletério sobre o desenvolvimento placentário e fetal que o consumo isolado destas substâncias. Em conjunto, os achados do presente estudo demonstram que as alterações metabólicas advindas tanto do consumo de dieta hipercalórica, quanto de cafeína

ou da associação de ambas promovem a alterações morfológicas placentárias, comprometendo o desenvolvimento fetal, especialmente nas fêmeas, predispondo esses indivíduos a complicações metabólicas futuras.

**Palavras-chave:** Dieta hipercalórica, cafeína, obesidade, diabetes, placenta.

## Abstract

The dietary pattern of human beings has changed over time, and nowadays consists of a high-calorie diet with an excess of fats and sugars. Many foods in this type of diet, such as coffee, chocolate, soft drinks, and energy drinks, have large amounts of caffeine. There is evidence that consumption of a high calorie diet and caffeine intake alone can compromise reproduction. However, little is known about the combined effect of these substances specifically on the gestational period. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effects of chronic maternal consumption of a high calorie diet, associated with caffeine intake during pregnancy, on reproductive parameters, placental morphology and fetal biometrics in heterozygous mice. For this, we used female Swiss mice allocated into four experimental groups: 1) control normocaloric diet, without caffeine administration (CC); 2) control diet and supplementation of 120mg/kg/day of caffeine (C120); 3) hypercaloric diet without caffeine (TC); 4) hypercaloric diet and supplementation of 120mg/kg/day of caffeine (T120). The animals received the respective diets for six weeks and the caffeine supplementation was done for two weeks from the seventh week, when the females were mated and euthanized in the final gestational third (DG17.5). Blood samples were collected for biochemical parameter evaluations and the uteri were dissected for biometric and morphological evaluations of the conceptuses and their placentas. The results found point to a metabolic syndrome in animals that consumed the hypercaloric diet, which besides presenting obesity, showed hyperglycemia, dyslipidemia, and insulin resistance ( $P < 0.05$ ). The animals that consumed caffeine had higher levels of triglycerides and total cholesterol, as well as hyperglycemia ( $P < 0.05$ ). Moreover, the high calorie diet, caffeine and the association between both affected fetal development, reducing fetal weight and liver weight ( $P < 0.05$ ), and these findings were more severe in female fetuses. Such effects on fetal development were due to changes in the placentas, which besides being smaller and lighter in all treatments ( $P < 0.05$ ), showed structural changes in the maternal-fetal interface, with emphasis on the increase in the height of the interhemal membrane ( $P < 0.05$ ). It is worth mentioning that the consumption of the hypercaloric diet associated with caffeine was more deleterious on placental and fetal development than the consumption of these substances alone. Taken together, the findings of the present study demonstrate that the metabolic alterations resulting either from the consumption of a high calorie diet, or of caffeine, or the association of both, promote placental morphological alterations, compromising fetal development, especially in females, predisposing these individuals to future metabolic complications.

**Keywords:** Hypercaloric diet, caffeine, obesity, diabetes, placenta.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Padrão de beleza.....	18
<b>Figura 2</b> - Tipos placentários.....	28
<b>Figura 3</b> - Classificação do ciclo estral.....	36
<b>Figura 4</b> - Comparação sexual entre gônadas.....	39
<b>Figura 5</b> - Análises placentárias.....	41
<b>Figura 6</b> - Evolução do peso corporal semanal (g) medido durante os períodos pré gestacional e gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	44
<b>Figura 7</b> - Índice de massa corporal nos períodos pré-tratamento, pré-gestacional e gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	46
<b>Figura 8</b> - Teste de tolerância a glicose no período pré- gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	48
<b>Figura 9</b> -Teste de tolerância a insulina no período pré- gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	49
<b>Figura 10</b> - Parâmetros bioquímicos do plasma de fêmeas gestante que consumiram dieta HF/HS e ou cafeína durante a gestação em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Consumo alimentar médio semanal durante os períodos pré gestacional e gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	43
<b>Tabela 2:</b> Ganho médio de peso corporal (g) durante os períodos pré-tratamento, pré gestacional e gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	45
<b>Tabela 3:</b> Proporção de indivíduos obesos ao longo do período experimental em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	47
<b>Tabela 4:</b> Verificação da fertilidade e análise do ciclo estral em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	51
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros reprodutivos em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	52
<b>Tabela 6:</b> Tabela 6 - Peso dos órgãos de fêmeas prenhas alimentadas somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).....	53
<b>Tabela 7:</b> Parâmetros biométricos placentários e fetais de fetos cujas mães consumiram dieta HF/HS e ou cafeína.....	55
<b>Tabela 8:</b> Parâmetros histomorfométricos de placentas de fetos cujas mães consumiram dieta HF/HS e ou cafeína.....	57
<b>Tabela 9:</b> Proporção volumétrica da zona juncional e labirinto de placentas de fetos cujas mães consumiram dieta HF/HS e ou cafeína.....	59

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1 O padrão alimentar atual e suas consequências. ....	17
2.1.2 Fatores genéticos e fisiológicos.....	17
2.1.3 Fatores sociais e comportamentais .....	19
2.2 Doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). ....	21
2.3 Obesidade e problemas reprodutivos.....	21
2.4 Consumo de cafeína e sua relação com a gestação .....	24
2.5 Placenta.....	27
2.6 Desenvolvimento pré-natal e e restrição intrauterina de crescimento.....	31
3.HIPÓTESE.....	32
4. OBJETIVOS .....	33
4.1 Objetivo Geral .....	33
4.2 Objetivos Específicos .....	33
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	34
4.1 Desenho experimental .....	34
5.1.2 Animais .....	34
5.1.3 Dieta .....	35
5.2 Avaliação dos ciclos estrais.....	36
5.3 Consumo alimentar e parâmetros biométricos corporais .....	37
5.4 Coleta das amostras .....	37
5.5 Análises bioquímicas .....	38
5.6 Determinação do sexo .....	39
5.7 Avaliação da placenta .....	40
5.7.1 Preparo e seleção .....	40
5.7.2 Área das regiões placentárias .....	41
5.7.3 Proporção dos componentes das áreas placentárias e vasos fetais e maternos ..	41
5.7.4 Diâmetro dos vasos e distância interhemal .....	43
5.8. Análises estatísticas .....	43
6. RESULTADOS.....	43
6.1 Consumo alimentar .....	43
6.2 Peso corporal .....	44
6.3 Ganho de peso corporal.....	45
6.4 Índice de massa corporal.....	46
6.5 Relação obesidade .....	47
6.6 Teste de tolerância a glicose .....	49

6.7 Teste de tolerância a insulina.....	49
6.8 Análise bioquímica.....	50
6.9 Ciclo estral.....	51
6.10 Parâmetros reprodutivos.....	53
6.11 Peso dos órgãos.....	53
6.12 Biometria fetal e placentária.....	54
6.13 Parâmetros histomorfométricos da placenta.....	57
6.14 Proporção volumétrica dos componentes placentários.....	59
7. DISCUSSÃO.....	61
8. CONCLUSÃO.....	66
9. REFERÊNCIAS.....	66

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo do processo evolutivo da espécie humana (*Homo sapiens*), os indivíduos habitavam um ambiente no qual a escassez de alimentos era constantemente uma ameaça, dependendo da caça e coleta de mantimentos que encontravam pelo seu caminho (Zink, et al., 2016). O padrão alimentar atual é completamente diferente, sendo composto principalmente por uma dieta rica em alimentos hipercalóricos com grandes quantidades de gordura e açúcar, estando tal dieta associada a problemas metabólicos, assim como a problemas reprodutivos (Nazni, 2014; Chia, et al., 2019; Rhee, et al., 2016; Saben, et al., 2016; Rosario, et al., 2016; Li, et al., 2013).

Muitos dos alimentos presentes nessa dieta, tais como refrigerantes, chocolates, energéticos e café, contém cafeína em sua composição. Tal substância é consumida, principalmente, no café, cuja média de consumo per capita entre os países que mais o consomem chega a 8 xícaras de 100 mL por dia. A população brasileira, consome em média de 4 a 5 xícaras de café, contendo cerca de 100 mg de cafeína (dePaula & Farah, 2019). Por ser uma substância lipossolúvel, pode atravessar diversas barreiras orgânicas, sendo o seu consumo relacionado a modificações placentárias e reprodutivas, tais como redução do número de implantações e alterações na vasculatura da placenta (Yadegari et al, 2016; Jahanfar & Jaafar, 2015; Sesardic et al, 1990; Tsutsumi et al, 2001; Julie Lyngs et al, 2017; Darren C et al, 2014).

Os efeitos do consumo da dieta hipercalórica e da cafeína isoladamente foram previamente descritos. No entanto, pouco se sabe sobre o impacto da associação entre o consumo de uma dieta hipercalórica e o consumo de cafeína sobre parâmetros chave da gestação. Dessa forma, é de suma importância estudar a associação dessas duas dietas uma vez que ambas são comumente consumidas pela população.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O padrão alimentar atual e suas consequências.

#### 2.1.2 Fatores genéticos e fisiológicos

A base genética que define o comportamento e a fisiologia humanas evoluíram em uma condição ambiental distinta da qual a maioria dos humanos vive na atualidade. O bipedismo evoluiu em ancestrais humanos seguindo a divergência evolutiva dos chimpanzés a 6-7 milhões de anos atrás (Veile, 2018). A morfologia e o comportamento humano moderno evoluíram através de processos evolutivos cumulativos ao longo da época do Pleistoceno (~ 2,5 milhões a ~ 11.000 anos atrás), com evidências fósseis e genéticas colocando a origem do *Homo sapiens* a aproximadamente 200.000 anos atrás (Zink, et al., 2016; Veile, 2018). Durante boa parte desse processo evolutivo, os indivíduos habitavam um ambiente no qual a escassez de alimentos era constantemente uma ameaça, dependendo da caça e coleta de alimentos que encontravam pelo seu caminho e dos ciclos sazonais de disponibilidade dos mesmos (Zink, et al., 2016).

Como o processo evolutivo humano sempre foi marcado pela escassez de alimentos, ocorreu uma seleção por indivíduos que conseguissem armazenar o máximo possível de energia, quando houvesse disponibilidade (Eaton e Konner, 1985). Dessa forma, três modelos (Genótipo e fenótipo parcimonioso; Ponto de ajuste; Ponto de intervenção duplo) foram criados para tentar explicar o processo de armazenamento de energia que foi evolutivamente selecionado ao longo do processo evolutivo humano (Higginson, McNamara & Houston, 2016).

O primeiro modelo da hipótese do genótipo e fenótipo parcimonioso propõem que os animais, incluindo os humanos, têm estratégias de armazenamento de energia que lhes permitem sobreviver em períodos em que a comida é escassa ou não está disponível. Ou seja, as pessoas são geneticamente predispostas a comer alimentos em excesso em tempos de fartura, de modo que tenham reservas suficientes para momentos de necessidade. No entanto, os indivíduos não ganham peso indefinidamente, mas tendem a permanecer com um nível definido de reservas energéticas. Tais observações levaram ao modelo de ponto de ajuste do controle da adiposidade, que foi reforçado pela descoberta da leptina, um hormônio que fornece feedback negativo da adiposidade ao comportamento alimentar (Higginson, McNamara & Houston, 2016).

No segundo modelo, ponto de ajuste, se as reservas de energia estiverem abaixo de um determinado limite, o animal come; se estiver acima desse limite, o animal não come. O último modelo, do ponto de intervenção duplo, o animal tem dois limiares. O limite inferior evita que as reservas fiquem tão baixas que o animal corra o risco de morrer de fome, e o superior evita que as reservas fiquem tão altas que o animal esteja em perigo de predação devido à capacidade de manobra reduzida (Higginson, McNamara & Houston, 2016). O desenvolvimento do fogo e da sociedade tornou os humanos a salvo de predadores. Essa liberação da pressão de predação permitiu a deriva genética do limiar superior, enquanto o limiar inferior não se moveu, resultando em uma ampla distribuição da massa corporal humana (Speakman, 2008). Esses três modelos ajudam a entender as pressões evolutivas que levaram ao fenótipo encontrado na maior parte da população mundial, no qual há uma grande tendência a se manter o tecido adiposo adquirido, e que agora ajudam a disseminar a obesidade (Higginson, McNamara & Houston, 2016).

Como em outras espécies, os estoques de gordura dos seres humanos não apenas protegem da desnutrição, mas também regulam a reprodução e a função imunológica e estão sujeitos à seleção sexual. A deposição de gordura atinge o pico durante o final da gestação e no início da infância, e novamente durante a adolescência nas mulheres (Wells, 2006). A evolução favoreceu o aumento dos estoques de energia principalmente na fêmea reprodutiva e na prole no início da vida. Como pode ser comprovado por achados arqueológicos de esculturas do corpo feminino de cerca de 28 mil anos atrás (Figura 1 -A). A presença de uma maior quantidade de gordura no sexo feminino foi o padrão estético a ser almejado até o período do Renascimento, fato comprovado pelas diversas obras datadas deste período (Figura 1 – B). Entretanto, atualmente essa seleção sexual está associada a maior presença da obesidade no sexo feminino, que atinge atualmente no Brasil cerca de 25,4% das mulheres, contra apenas 18,5% dos homens (WHO, 2021).

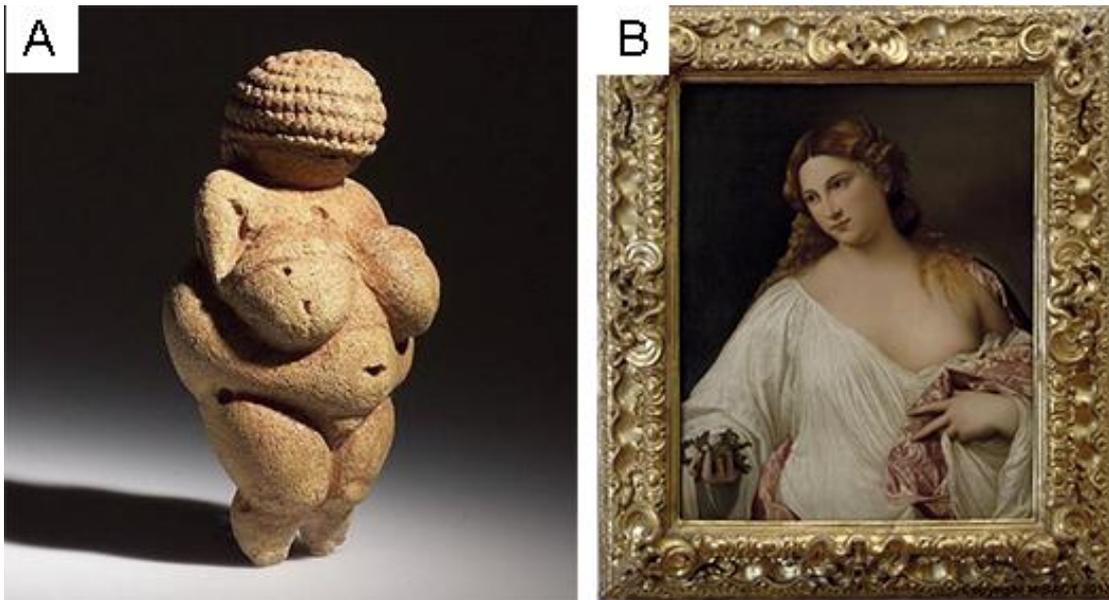


Figura 1 - Padrão de beleza. A - vênus de Willendorf, 28 mil anos atrás, autor desconhecido, B - Flora, 1515, autor Ticiano.

### 2.1.3 Fatores sociais e comportamentais

Um passo importante do processo evolutivo surgiu com o *Homo erectus*, o qual adquiriu uma maior capacidade de manipular os alimentos por meio do processo de cozimento. Com o avançar do processo evolutivo, a cerca de 10 mil anos atrás, os seres humanos passaram a ser capazes de criar animais e a plantar os seus próprios alimentos, o que permitiu que se fixassem em um local (Ulijaszek. 2002). O início desse processo de sedentarismo, associado a essa mudança na disponibilidade de alimentos, causou um grande aumento populacional. Porém, também houve o aumento de problemas dentários e esqueléticos, evidenciados pelo aumento de patologias presente nos ossos e dentes datados deste período (Larsen, 1995).

À medida que o ser humano aumentou a complexidade da forma de adquirir alimentos, ele reduziu a energia necessária para obtê-los. A mudança na massa corporal pode ser determinada pela equação de balanço energético de ingestão de energia menos o gasto de energia, dessa forma, com a redução do gasto energético para obter os alimentos o ganho de peso passou a ser controlado basicamente pela ingestão (Blundell, 2020).

Uma pesquisa baseada em duas populações indígenas da América do Sul com níveis distintos de aculturação em comparação aos países ocidentais desenvolvidos, demonstrou que tais povos possuíam níveis mais baixos de HDL, massa corporal, assim como um maior volume cerebral quando comparadas às nações mais industrializadas. Entretanto, a tribo mais

aculturada possuía níveis de colesterol, massa corporal e volume cerebral piores do que a menos aculturada (Kaplan et al, 2023), exemplificando a importância do exercício para o gasto energético na busca pelos alimentos.

Após a primeira revolução industrial (1760-1820) e o surgimento das grandes cidades, a disponibilidade dos alimentos aumentou, deixando de ser o fator limitante para a dieta das populações (Hudson, 2014). Com o surgimento da comida industrializada, os alimentos se tornaram acessíveis para a maior parte da população, pois o custo de produção de um produto industrializado se tornou menor do que o de produtos naturais, devido à sua produção em grande escala, associado à sua baixa perecibilidade (Jideani, et al., 2020). A partir de todas essas transformações sociais e econômicas, desde o surgimento da agricultura, os humanos passaram a usar os alimentos de formas simbólicas cada vez mais elaboradas, de modo que a alimentação humana deixou de ser apenas um ato para saciar a fome e tornou-se cada vez mais um ato social e cultural (Ulijaszek, 2002).

Associado ao surgimento dos alimentos industrializados, apareceram também os alimentos feitos para serem consumidos de forma rápida (fast foods), devido ao curto tempo que as pessoas passaram a ter para se alimentar nas grandes cidades. Entretanto, a globalização desses alimentos também fez com que houvesse uma simplificação da dieta, reduzindo a diversidade de alimentos consumidos. Dessa forma, a dieta básica passou a ser composta pelas principais commodities: trigo, milho, soja, laticínios, carnes e açúcar (Hawkes, 2015). Diante desse cenário, os alimentos foram rotulados como “alimentos saudáveis” e “alimentos não saudáveis”. “Alimentos saudáveis” é um termo geral para descrever alimentos considerados benéficos para a saúde e que contêm baixo teor de açúcar, gordura e sal. Por outro lado, “comida não saudável” ou “junk food” geralmente contém alto nível de calorias de açúcar ou gordura com pouca proteína, vitaminas ou minerais, normalmente na forma de salgadinhos, doces, fast food fritos e refrigerantes (O'Neill, 2006).

Na sociedade contemporânea, existe uma maior facilidade em se adquirir alimentos considerados não saudáveis do que alimentos considerados saudáveis, pois, os alimentos industrializados e as comidas tipo “fast food” estão constantemente disponíveis ao nosso redor e possuem um preço mais acessível. Tais alimentos são constituídos por grande quantidade de gorduras e açúcares que são facilmente absorvidos por nosso organismo, o qual ainda é evolutivamente adaptado para absorver o máximo de energia dos alimentos (Goodman, 2010).

Dessa forma, o comportamento alimentar humano atual na sociedade industrializada é caracterizado pelo consumo de dietas de alta densidade energética e padrões de alimentação

muitas vezes não estruturados, em grande parte desacoplados dos ciclos sazonais de disponibilidade de alimentos. Consequentemente, esse novo padrão alimentar contribuiu para o surgimento de doenças relacionadas à alimentação, que incluem as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como é o caso do diabetes, das doenças cardiovasculares e da obesidade, todas associadas ao excesso de alimentos ricos em gorduras e açúcares (Eaton and Konner, 1985; Hawkes, 2015).

## **2.2 Doenças crônicas não transmissíveis (DCNT).**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a proporção de mortes causadas por doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) aumentaram drasticamente nas últimas décadas, tornando-se a principal causa de mortes no mundo, sendo responsável por 74% de todas as mortes, o que corresponde a cerca de 41 milhões de pessoas (WHO, 2022). Deste total, 86% eram pessoas com menos de 70 anos e que viviam em países de baixa e média renda. As projeções do número de mortes total por DCNT mostram que o número de mortes irá aumentar ainda mais, passando de 38 milhões de mortes em 2012 para 52 milhões em 2030 (WHO). Existem quatro fatores de risco principais que as DCNT compartilham: tabagismo, sedentarismo, uso prejudicial de álcool e dietas pouco saudáveis. As DCNT incluem as doenças cardiovasculares, acidente vascular encefálico, câncer, diabetes, obesidade e doenças pulmonares crônicas (WHO, 2022).

Associado as DCNT, há a síndrome metabólica, que é caracterizada pela coexistência de vários fatores de risco importantes para doenças cardiovasculares, como a aterosclerose e diabetes. O aparecimento da síndrome metabólica é favorecido pelo ganho de peso e pelo acúmulo de gordura intra-abdominal com grande circunferência da cintura (Eckel, Grundy & Zimmet, 2005; Eckel et al., 2010; Samson & Garber, 2014). Dessa forma, a obesidade aparece como o principal fator para o desenvolvimento dessa síndrome.

## **2.3 Obesidade e problemas reprodutivos**

A obesidade é definida por um índice de massa corporal (peso dividido pela altura ao quadrado) de 30 kg/m<sup>2</sup> ou mais. A epidemia global de obesidade resulta da combinação da suscetibilidade genética, aumento da disponibilidade de alimentos altamente energéticos e diminuição da necessidade de atividade física na sociedade moderna (Nogues et al., 2021).

Além das DCNT, a obesidade tem sido associada a problemas reprodutivos. Pesquisas do tipo coorte demonstraram que a obesidade em mulheres, associada a uma dieta rica em açúcar e gordura, levam a um desequilíbrio hormonal e disfunção ovulatória (Nazni, 2014). Além disso, há uma maior prevalência de síndrome dos ovários policísticos (SOP) entre mulheres obesas (30%-75%). A SOP provoca desequilíbrio endócrino que interfere na ovulação e na menstruação normais, causando amenorreia e hiperandrogenemia. (Guelinckx et al., 2008).

O risco de aborto em mulheres obesas é 25-37% maior em comparação com mulheres não obesas, além de aumentar o risco de hipertensão arterial relacionada à gravidez e pré-eclâmpsia, assim como redução do peso ao nascimento do bebê e aumento do risco de parto prematuro (Chia, et al., 2019). Também já foi visto que níveis elevados de produtos finais de glicação avançada (compostos gerados a partir de uma reação não enzimática que ocorre entre açúcares redutores e seus metabólitos reativos ou lipídeos oxidados e proteínas ou ácidos nucleicos) podem afetar negativamente a função endometrial. Isso ocorre por meio da inibição da adesão e proliferação das células epiteliais endometriais, impedindo a implantação do embrião e o desenvolvimento placentário (Antoniotti et al., 2018).

O estudo realizado por Nogueira et al. (2021) com mulheres obesas e não obesas de idade entre 27 e 37 anos demonstrou que as amostras de tecido placentário de mulheres obesas estavam associadas a menor expressão de IL-6 e infiltração de macrófagos/leucócitos, menor expressão de GLUT1 e SNAT1-2, menor densidade de vasos placentários, assim como níveis mais baixos de leptina e de gonadotrofina coriônica humana.

Estudos em modelos animais e *in vitro* demonstraram que animais expostos a uma dieta rica em gorduras e açúcares possuem menos sítios de implantação, estando relacionado a problemas na decidualização causados pela diminuição da progesterona circulante (Rhee, et al., 2016; Saben, et al., 2016). Também já foi visto que a obesidade induzida por uma dieta rica em gordura e açúcar está associada a alterações nas vias de sinalização placentária da leptina e insulina/IGF-I/Mtor (Kelly, Powell, & Jansson, 2020). Nesse estudo, a dieta contribuiu para o crescimento anormal do feto, o qual está associado a complicações perinatais e aumento do risco de o feto vir a desenvolver síndromes metabólicas posteriormente em sua vida (Rosario et al., 2016).

A indução de obesidade e diabetes por meio de dieta rica em gordura favoreceu o aumento anormal de malondialdeído, substância essa produzida devido ao aumento do estresse oxidativo, criando um ambiente de hipoxia devido a redução das ramificações arteriais, afetando o desenvolvimento placentário e aumentando o risco de complicações no

período perinatal (Li et al., 2013). Foi demonstrado que a obesidade materna durante a gravidez em ratas alterou o desenvolvimento folicular diminuindo o número de folículos antrais e induziu ao desenvolvimento de cistos foliculares na prole adulta. Além disso, foi observada uma desregulação endócrina, representada por aumento do estradiol no início da vida e puberdade precoce na prole (Ambrosetti et al., 2016).

Em outro estudo, camundongos C57BL6/J receberam uma dieta rica em gordura por 12 semanas para induzir a obesidade e relataram que, durante o início da gravidez, o número de corpos lúteos, os níveis séricos de estradiol e progesterona aumentaram, assim como a beta-oxidação de ácidos graxos, que por sua vez aumenta o ciclo do ácido tricarboxílico e a expressão gênica relacionada à cadeia de transporte de elétrons, levando ao aumento da produção de ATP e disfunção ovariana (Li et al., 2021). Ainda sobre a capacidade ovariana já foi visto em ratos Sprague Dawley fêmeas alimentadas com dieta rica em gordura por 18 semanas a redução do número e porcentagem de folículos primordiais, e aumento do número e porcentagem de folículos em desenvolvimento e atresicos. Sugerindo que essa dieta pode acelerar o desenvolvimento do folículo ovariano e a taxa de perda folicular (Wang et al., 2014).

Além disso já foi visto que a obesidade induzida por dieta rica em gordura afetou a atividade da via de sinalização Akt/FoxO3a/Smad1/5/8 de maneira dependente do tempo durante o desenvolvimento folicular do ovário de camundongos, levando ao desenvolvimento folicular anormal (Wu et al., 2016). Sobre o processo de decidualização, foi visto que a obesidade induzida por dieta prejudica a decidualização das células do estroma endometrial, comprometendo a implantação (Rhee et al., 2016). Em outro estudo, a obesidade materna induzida por dieta rica em gordura e açúcar aumentou a taxa de fetos pequenos para a idade gestacional e aumentou as concentrações de glicose no sangue na prole de camundongos C57. O peso placentário, a área de superfície e os espaços sanguíneos maternos diminuíram em ambos os sexos, com reduções no volume do trofoblasto placentário, na capacidade de difusão de oxigênio e aumento da barreira à transferência apenas nos machos. Também viram a redução da AMPK fosforilada e a capacidade de síntese lipídica, ao mesmo tempo em que aumentou os índices de estresse oxidativo nos machos (Napso et al., 2022).

As alterações comportamentais e alimentares que ocorreram ao longo do processo evolutivo humano, levaram a alterações na fisiologia, fazendo com que surgissem doenças metabólicas causando alterações até na vida reprodutiva destes indivíduos. Portanto, é de fundamental importância o conhecimento das alterações que ocorrem nos órgãos reprodutivos e durante o processo gestacional para a adoção de estratégias para mitigar tais efeitos.

## 2.4 Consumo de cafeína e sua relação com a gestação

O consumo de bebidas e alimentos contendo cafeína faz parte da cultura de muitos países, pois esta substância está presente em alimentos como café, refrigerantes, chocolates e bebidas energéticas. A forma mais comum de se consumir cafeína é através do café, cuja média per capita entre os países que mais consomem cafeína chega a 8 xícaras de café por dia. Além de haver uma grande variação no número de xícaras consumidas por dia, a quantidade de cafeína presente em cada xícara é muito variável. Em países como Estados Unidos, a quantidade de cafeína em uma xícara de 100 mL é de cerca de 40 mg, enquanto em países como a Etiópia, chega a 400 mg (dePaula & Farah, 2019). A população brasileira, consome em média de 4 a 5 xícaras de café, contendo cerca de 100 mg de cafeína (dePaula & Farah, 2019).

A cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) é uma substância alcaloide cuja meia-vida, em humanos, varia em torno de 2 a 4,5 horas. Sua metabolização ocorre no fígado por meio das enzimas hepáticas, com destaque para a citocromo P450 1A2 (CYP1A2). Seus principais metabólitos são as dimetilxantinas (teofilina a teobromina e a paraxantina), as quais são muito pequenas e altamente lipofílicas (Grosso & Bracken, 2005). Devido a essas características, possuem a capacidade de transpor, por difusão passiva, membranas biológicas como a hematoencefálica, a hematotesticular e a placentária (Mose et al, 2008; Christian & Brent, 2001).

Os efeitos da cafeína no organismo estão diretamente relacionados à sua capacidade de difusão. No cérebro, a melatonina é regulada pela adenosina que atua por meio de seus receptores A1 e A2a, que estão relacionados a funções associadas ao sono, excitação e cognição. A paraxantina, liga-se a estes receptores de adenosina de forma inespecífica, o que impede a estimulação da enzima N-acetiltransferase e conseqüentemente, impede o aumento das concentrações de melatonina. Dessa forma, a cafeína prolonga a latência do sono, reduz o tempo total e a eficiência do sono e piora a qualidade do mesmo, podendo causar distúrbios do sono (Clark and Landolt, 2017; Shilo, et al., 2002; O'Callaghan, et al., 2018; Snel and Lorist, 2011). No testículo, pesquisas demonstraram a relação entre o consumo de cafeína com problemas de fertilidade, comprovando que o consumo afeta a espermatogênese, além de comprometer outras funções do sistema reprodutor masculino, tais como redução do diâmetro do tubo seminífero e diminuição dos níveis de testosterona (Dorostghoal et al, 2012), em ratos.

Durante a gestação, devido ao aumento de estrogênio circulante, ocorre uma redução da atividade das enzimas P450, e conseqüente redução no metabolismo e na excreção da

caféina, levando à deposição destas substâncias nos tecidos maternos e fetais (Yadegari et al, 2016; Jahanfar & Jaafar, 2015; Sesardic et al, 1990). Tal fato pode aumentar o tempo da meia-vida daqueles metabólitos para até 18 horas no último trimestre gestacional (Tsutsumi et al, 2001). Além disso, alguns artigos de coorte reportaram efeito da caféina sobre o risco de aborto espontâneo (Weng, Odouli & Li, 2008; Srisuphan & Bracken 1986; Fernandes et al., 1998), assim como menores peso e comprimento do recém-nascido (Darren et al., 2014; Martin & Bracken 1987; Rhee et al., 2015; Fernandes et al., 1998).

Adicionalmente, foi relatada por Fenster e colaboradores (1991) a associação entre o alto consumo materno de caféina (maior que 300 mg/dia) durante o primeiro trimestre e o crescimento intrauterino restrito. Resultado similar ao encontrado por Potda (2010) que realizou um estudo prospectivo de 1.340 mulheres grávidas em Leicestershire, Reino Unido, quantificando a ingestão total de caféina 4 semanas antes e durante a gravidez.

Em pesquisas com modelos animais, foi demonstrada a redução de certos tipos neuronais na prole de camundongos tratados com caféina durante a gestação e a lactação. Além disso, a caféina atrasou a migração de populações específicas de neurônios durante a maturação do cérebro, resultando em sua inserção atrasada no hipocampo. Dessa forma, esses animais apresentaram memória prejudicada, bem como maior susceptibilidade a convulsões, quando expostos a um agente indutor de convulsões (Silva et al., 2013). Adicionalmente, alterações comportamentais e de memória em machos e depressão e ansiedade em fêmeas foram relatadas na prole de camundongos fêmeas tratadas com caféina durante a gestação e lactação. Além disso, danos ao DNA e estresse oxidativo no cérebro foram observados na prole de ambos os sexos (Magenis et al., 2022). Outro trabalho similar verificou sinais relacionados à ansiedade nos testes comportamentais (Laureano-Melo et al., 2016). Tais achados corroboram os dados encontrados por Paula (2023), que avaliou os efeitos do consumo materno crônico de caféina durante a gestação e lactação nas gerações F1 e F2. Foram relatados problemas de ansiedade, compulsão, depressão e comprometimento de memória, sendo as fêmeas mais afetadas que os machos e a prole F2 apresentou maior comprometimento que a F1. Esses animais também apresentaram menor peso ao nascimento e crescimento intrauterino restrito. Esse mesmo grupo de pesquisa avaliou as placentas de camundongos após consumo de doses elevadas (120 mg/kg/dia) de caféina durante a gestação, sendo demonstrada menor proporção de vasos maternos e maior proporção de vasos fetais, o que poderia levar ao menor desenvolvimento desses fetos. Outro grupo de pesquisa demonstrou presença de regiões edematosas no retículo endoplasmático, expansão das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, degranulação dos ribossomos e condensação da

heterocromatina em células trofoblásticas, após consumo de altas doses de cafeína (240 mg/kg/dia) durante a gestação (Huang et al., 2012). Adicionalmente, foi demonstrado aumento da apoptose e inibição da angiogênese no saco vitelino (Ma et al., 2015), bem como redução no número de implantações e de nascidos vivos (Yadegari et al., 2016). após exposição à cafeína. Ainda na placenta, foi observado diminuição no peso fetal, peso placentário, comprimento da cabeça-nádega e retardo da ossificação esquelética relacionado à dose de cafeína consumida durante a gestação (Smith, McElhatton & Sullivan, 1987). Com relação à fertilidade, foi visto que camundongos prenhes tratados com doses moderadas ou altas de cafeína apresentaram maior retenção de embriões na tuba uterina, desenvolvimento embrionário defeituoso, devido a erros no processo de clivagem e formação do blastocisto, e menor número de implantação embrionária, sugerindo receptividade uterina prejudicada pela administração de cafeína, revelada pelo aumento da taxa de reabsorção embrionária, desenvolvimento anormal e diminuição do peso ao nascer (Qian et al., 2018).

Diante dos exposto, fica evidente a necessidade de se analisar de forma minuciosa os efeitos da cafeína sobre o sistema genital feminino nas diversas fases do ciclo reprodutivo, especialmente na gestação. Nesta fase, deve-se destacar a placenta, órgão chave para as trocas de nutrientes e gases respiratórios entre mãe e feto.

## 2.5 Placenta

Os tipos placentários podem ser classificados de diferentes formas, de acordo com a espécie. Neste contexto, iremos destacar o tipo placentário comum a humanos e roedores. O primeiro nível refere-se à origem dos vasos fetais que vascularizam o córion. Como o córion é intrinsecamente avascular, para participar das trocas materno-fetais, deve desenvolver uma circulação funcional. Para tanto, os vasos podem se desenvolver a partir dos vasos do mesoderma extraembrionário que cobrem o alantoide, formando a placenta corioalantóide (Burton, Kaufmann, & Huppertz, 2006). O segundo nível de classificação considera a morfologia macroscópica da placenta. Nas placentas discoidais, que podem ser simples ou duplas, a interação é confinada a uma área circular estando presente nos primatas e roedores de laboratório (Figura 2A) (Burton, Kaufmann, & Huppertz, 2006).

Além dessas classificações, existem variações na maneira pela qual os tecidos maternos e fetais interagem. Nos primatas superiores, a interação entre o tecido materno e fetal é descrito como trabecular pois os tecidos fetais formam uma estrutura tridimensional em forma de árvore (Figura 2C). Já nos roedores, os tecidos materno e fetal formam uma

estrutura tridimensional altamente complexa, que se interliga de maneira semelhante a um labirinto (Figura 2B) (Burton, Kaufmann, & Huppertz, 2006).

Além dessas variações morfológicas, também existem diferenças na relação fundamental entre o trofoblasto e os tecidos uterinos. Nos roedores e primatas, a invasão resulta em erosão nos vasos maternos, de modo que o trofoblasto seja banhado diretamente pelo sangue da mãe caracterizando a placentação hemocorial (Figura 2D). Mesmo dentro desta categoria, ocorrem variações dependendo se o trofoblasto tem uma (humanos) ou três (camundongo) camadas de espessura. As camadas que separam as circulações materna e fetal são uma combinação de elementos celulares e sinciciais. Portanto, a natureza histológica detalhada da membrana interheme é de fundamental importância ao considerar as propriedades de troca que ocorrem (Burton, Kaufmann, & Huppertz, 2006)

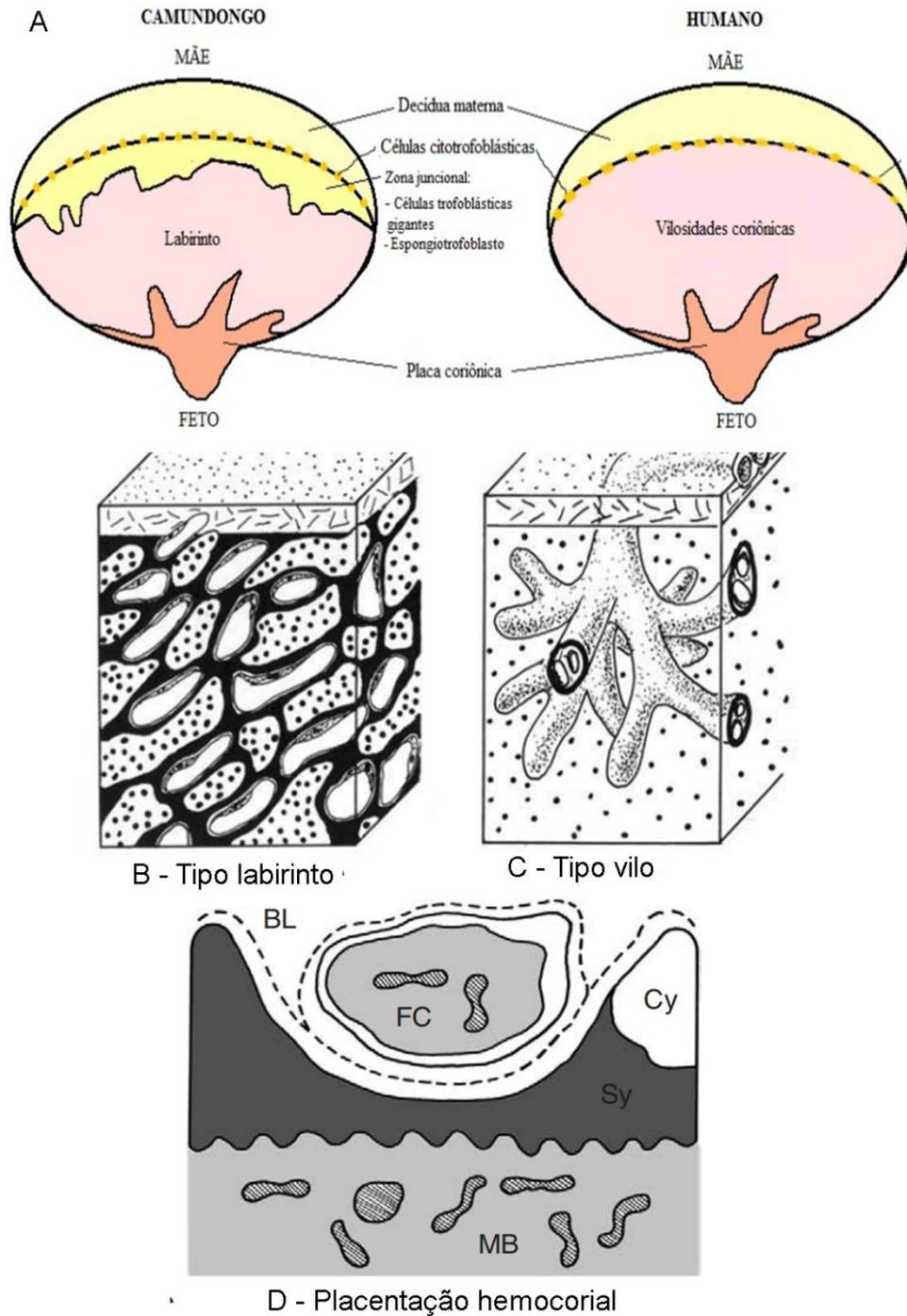


Figura 2 - Tipos placentários. A - Comparação entre a placenta dos camundongos e humanos. B - Placenta tipo labirinto, característica dos camundongos. C placenta tipo vilo característica dos humanos. D - Placentação hemocorial, presente nos humanos e roedores. MB: vaso materno; FC: capilar fetal; BL, lâmina basal; Sy, sincitiotrofoblasto; Cy, citotrofoblasto. Adaptado de Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition.

O desenvolvimento da placenta é um processo complexo que envolve a interação entre o embrião e o ambiente placentário. O blastocisto, ao atingir o lúmen uterino, prepara-se para a implantação. Primeiro, o embrião deve eclodir da zona pelúcida (ZP), uma matriz glicoproteica especial que envolve o ovo durante a formação do blastocisto. Durante a eclosão, o blastocisto é liberado da ZP através de uma fenda, devido à ação de uma proteinase semelhante à tripsina chamada estripsina e da serina protease, hepsina, ambas secretadas pelo trofotoderma. Concomitantemente com a implantação do blastocisto, muitas mudanças ocorrem no tecido endometrial materno para criar um ambiente receptivo para os trofoblastos invasores. Essas mudanças orientam e dão suporte ao embrião durante a implantação e o desenvolvimento (Hemberger, Hanna, & Dean, 2020).

O processo de implantação começa com a fixação de um blastocisto ao epitélio uterino no endométrio. No momento da implantação, o embrião é composto por três linhagens celulares diferenciadas: o trofoblasto, o endoderma primitivo e o epiblasto. No GD 4.5, o trofotoderma começa a se diferenciar em populações de células trofoblásticas funcionalmente específicas. Por meio de invasão ativa, as projeções do trofoblasto alcançam os espaços intercelulares da camada epitelial, a membrana basal e o estroma uterino subjacente. Essas células trofoblásticas gigantes permitem a rápida remoção de células uterinas e o alojamento do embrião no estroma devido a sua grande capacidade invasiva e fagocitária. Com a gastrulação, a partir do GD6.5, formam-se o âmnio, o córion e o alantoide. A fusão corio-alantóide permite que os vasos sanguíneos derivados do mesoderma invaginem na camada trofoblástica coriônica para formar o labirinto placentário (Hemberger, Hanna, & Dean, 2020). Durante esse processo, ocorre a proliferação e diferenciação das células trofoblásticas gigantes sinusoidais, resultando na formação da membrana interhemal, com o sangue fetal separado do sangue materno por quatro camadas de células: células endoteliais fetais, duas camadas de células sinciciotrofoblásticas (SynT-II, SynT-I) e uma camada de células trofoblásticas gigantes (S-TGCs) (Simmons, 2014). Entre os dias GD10.5 e GD14.5, a arquitetura labiríntica torna-se cada vez mais complexa, para facilitar o fornecimento de nutrientes e gases ao embrião. As células sinciciotrofoblásticas que surgem da fusão das células trofoblásticas coriônicas estabelecem a principal superfície de troca do labirinto placentário para o transporte de nutrientes. As células trofoblásticas gigantes revestem o local de implantação e estão em contato direto com a decídua materna. Juntamente com o espongiotrofoblasto e as células trofoblásticas de glicogênio em desenvolvimento, elas formam o principal compartimento endócrino da placenta.

Até o estágio de blastocisto, o desenvolvimento de camundongos e humanos é morfológicamente semelhante. Após a implantação, a invasão inicial do embrião humano no útero decidualizado é alcançada, predominantemente, por uma camada externa de células sincitiotrofoblásticas que envolve uma camada interna de células citotrofoblásticas proliferativas. A placenta definitiva é formada pela expansão localizada das vilosidades coriônicas, cada uma consistindo em um núcleo mesenquimal que contém vasos sanguíneos fetais, uma camada de células citotrofoblásticas proliferativas e uma camada externa de células sincitiotrofoblásticas, que se banham diretamente no sangue materno (Hemberger, Hanna, & Dean, 2020).

A placenta madura dos camundongos pode ser histologicamente dividida em três regiões distintas, que se iniciam a partir da decídua materna: zona juncional, labirinto e placa coriônica. A decídua materna é composta por células endometriais modificadas, estas células servem como fagócitos durante o remodelamento placentário, bem como secretam fatores de crescimento, hormônios e citocinas. Células natural killer uterinas também compõem a decídua, sendo responsáveis por função imunológica e angiogênica (Croy et al, 2014). Além disso, são encontrados na decídua as artérias espiraladas e seios venosos, que formam uma rede vascular que forma um canal que atravessa a zona juncional e o labirinto. A zona juncional é composta por células trofoblásticas gigantes parietais e espongiotrofoblasto. As células gigantes parietais são grandes e possuem núcleo bem destacado e basofílico, rodeado por um abundante citoplasma eosinofílico. Já o espongiotrofoblasto é um tecido rico em depósitos de glicogênio e inúmeras células ovais pequenas com núcleos basofílicos e citoplasma escasso. O labirinto é composto por uma rica rede de capilares fetais banhados por sangue materno oriundos das artérias espiraladas maternas que adentraram a zona juncional. É no labirinto que ocorrem as trocas efetivas de nutrientes, gases e metabólitos materno-fetais por meio da membrana interhemal. Por fim, há a placa coriônica, composta por grandes vasos sanguíneos que penetram nesta placa e são conectados aos vasos do cordão umbilical (Croy et al, 2014).

O desenvolvimento placentário apropriado é fundamental para assegurar trocas adequadas de nutrientes e gases respiratórias entre mãe e feto, assegurando o desenvolvimento fetal. Quaisquer alterações no desenvolvimento placentário que possam prejudicá-lo irão afetar o desenvolvimento fetal. Neste contexto, suprimento nutricional reduzido, devido a diminuição no fluxos sanguíneo útero-placentários, bem como na capacidade de transporte de nutrientes, podem comprometer o desenvolvimento fetal

(Pijnenborg et al., 1983). Tal comprometimento, por sua vez, pode está associado com o crescimento intrauterino restrito.

Há evidência de que o suprimento placentário de aminoácidos é significativamente reduzido independentemente da gravidade da restrição de crescimento e da presença de hipóxia (Cetin et al., 1996). Já foi relatado também que os gradientes materno-fetais de glicose estão aumentados em fetos com restrição (Marconi et al., 1996).

Outro estudo demonstrou que excesso de IGFBP-1, responsável por modular as IGFs e presente na decidua materna, também está associado ao crescimento intrauterino restrito, devido a uma insuficiência placentária. A super expressão decidual de IGFBP-1 causa alterações marcantes na morfologia da placenta devido à invasão e diferenciação alterada do trofoblasto. Essas mudanças resultam em um aumento da massa placentária durante a gravidez gerando um processo de insuficiência placentária (Crossey, Pillai & Miell, 2002). Portanto, quaisquer alterações que possam ocorrer durante o desenvolvimento placentário e que venham a prejudicá-lo, conseqüentemente, irão afetar o desenvolvimento pré-natal.

## **2.6 Desenvolvimento pré-natal e e restrição intrauterina de crescimento**

Desde a concepção até o nascimento, os desenvolvimentos embrionário e fetal levam em torno de 19 a 21 dias para se completar nos roedores de laboratório. Durante esse processo, o conceito passa por diversas alterações que garantem o seu desenvolvimento adequado. Na tuba uterina, o zigoto sofre diversas clivagens enquanto ocorre a sua migração para o útero (DG 1.5 - 4.5). Estas divisões celulares originam a mórula (DG 4.5), estágio no qual o embrião adentra o útero, que, por sua vez, continua o processo de divisão e diferenciação até a formação do blastocisto DG 5.5. Caso o ambiente uterino esteja favorável, a implantação do blastocisto no endométrio irá ocorrer em DG 5.5 - 6.5. Após a formação do saco vitelino (DG6.5), dá-se a formação do cone ectoplacentário (DG 7.5) e diferenciação entre a região embrionária e extraembrionária (Bolon, 2015).

A partir desse momento, ocorrem diversas alterações no embrião; dentre elas o surgimento do primórdio do coração (DG 9.5-10.5), desenvolvimento da placa neural (DG 8.5 - 9.5), início da formação do intestino (8.5 - 9.5), fechamento do sulco neural (DG 9.5-10.5) , formação do coração com ventrículo comum (DG 11.5), divisão do cérebro em telencéfalo e diencéfalo (DG 11.5 - 12.5) , divisão do fígado em 4 lóbulos (DG 12.5), início da ossificação (DG 15.5) e formação do diafragma (DG 15.5). No dia gestacional 15.5, ocorre a transição do período embrionário para o período fetal, caracterizado pela presença de córnea,

nervo óptico, ducto coclear, adenohipófise, glândula submandibular, metanefro e úmero. O feto, por sua vez, continua apresentando modificações. Por exemplo no DG 16.5 o fígado está completamente formado, o intestino sofre torções na cavidade abdominal (DG 17.5-18.5) e por fim ocorre o espessamento da pele (DG 18.5). A partir desse momento, o feto se encontra apto para sobreviver no ambiente externo (Bolon, 2015).

Conforme descrito anteriormente, o desenvolvimento fetal é um processo extremamente complexo, conseqüentemente quaisquer alterações que ocorram durante essa fase irão ocasionar alterações que podem comprometer a sobrevivência do conceito. Dentre tais alterações, existem modificações placentárias, as quais levam ao crescimento intrauterino restrito (Crossey, Pillai & Miell, 2002). A restrição intrauterina de crescimento pode ser definida como a condição na qual o feto não consegue expressar o seu potencial de crescimento, de acordo com a idade gestacional, sendo a segunda maior causa de mortalidade infantil no mundo (Blencowe et al., 2019). Dessa forma, o feto pode crescer dentro de seu potencial genético no início da gestação, porém o ambiente materno limita seu desenvolvimento normal. Essa restrição no crescimento leva a uma assimetria dos órgãos ocasionada pelo "efeito poupador do cérebro". Esse efeito é caracterizado pelo redirecionamento do fluxo sanguíneo para o cérebro para preservar suas funções vitais, o que compromete o desenvolvimento de outros órgãos, devido à baixa vascularização (Barbero et al., 2018).

Nas últimas décadas, tem sido demonstrado que o crescimento intrauterino restrito está envolvido na predisposição a patologias que podem seguir até a idade adulta ou se manifestar apenas nesse período (Martin-Gronert and Ozanne, 2006). A teoria da Origem do Desenvolvimento da Saúde e da Doença baseia-se no conceito de que as origens das doenças relacionadas ao estilo de vida são formadas no momento da fertilização, nos estágios embrionário, fetal e neonatal pela inter-relação entre os genes e o ambiente (nutrição, estresse ou produtos químicos ambientais).

O crescimento intrauterino restrito já foi correlacionado com diversas doenças, tais como diabetes (Rashid, Bansal & Simmons, 2018), hipertensão (Henington & Alexander, 2013), e síndrome metabólica (Jahan-Mihan et al., 2015). Esse fenômeno é conhecido como "programação fetal", quando um insulto in utero leva a alterações funcionais em órgãos-chave que permanecem na vida pós-natal e levam a um maior risco de doenças posteriores na idade adulta.

O insulto inicial faz com que o feto se adapte para sobreviver em um ambiente nutricionalmente insuficiente. Entretanto, após o nascimento, esses indivíduos reconhecem

como normal um ambiente nutricionalmente insuficiente e, ao serem expostos a um ambiente nutricionalmente favorável, reconhecem este como um ambiente estressor. Esse mecanismo é conhecido como fenótipo parcimonioso e foi proposto por Hales e Barker (2001). Dessa forma, mesmo ao passar por um período de recuperação do crescimento os indivíduos com crescimento intrauterino restrito possuem uma maior suscetibilidade a doenças na idade adulta devido a essa adaptação. Portanto, o entendimento das alterações que levam ao desenvolvimento do crescimento intrauterino restrito são de suma importância.

### **3. HIPÓTESE**

O consumo materno crônico de dieta hipercalórica associada à ingestão de cafeína irá comprometer a morfologia placentária, levando a alterações no desenvolvimento fetal de maneira sexo-dependente.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo Geral**

Avaliar os efeitos do consumo crônico de dieta hipercalórica, associada à ingestão de cafeína durante a gestação, sobre a morfologia placentária e parâmetros biométricos fetais em camundongos heterogênicos.

### **4.2 Objetivos Específicos**

Sempre comparando animais que ingeriram ou não dieta hipercalórica associada ou não à ingestão de cafeína, os objetivos específicos foram:

- Avaliar parâmetros reprodutivos maternos através da análise do ciclo estral por meio do lavado vaginal;
- Determinar curva de metabolismo de carboidratos por meio da dosagem da glicemia e a insulina materna no período pré-gestacional;
- Analisar parâmetros histomorfométricos placentários no terço final gestacional;
- Determinar dados biométricos fetais em ambos os sexos

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Desenho experimental

#### 5.1.2 Animais

Foram utilizadas fêmeas nulíparas de camundongo heterogênicos da linhagem Swiss (n= 48) em idade reprodutiva (8 semanas; peso corporal  $26 \pm 0,3g$ ) provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG e mantidas na sala de experimentação animal do Departamento de Morfologia (ICB/UFMG). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ( $23 \pm 2^{\circ}C$ ) em condições padrão de claro-escuro (12h de luz: 12h de escuro). Foi ofertada ração comercial (Nuvilab - Quintia) e água *ad libitum* durante uma semana para aclimação antes de iniciar o experimento. Durante todo o experimento foram ofertados aos animais ao menos uma vez por semana, rolos de papel, assim como material para construção do ninho, como uma forma de reduzir o estresse e promover o enriquecimento ambiental. Adicionalmente, foi realizado o enriquecimento ambiental social, mantendo os animais em grupos de dois até quatro indivíduos por caixa. O estudo apenas teve início após ser aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob o protocolo 255/2022.

#### 5.1.3 Dieta

Após o período de aclimação, deu-se início à verificação do ciclo estral, por meio de lavados vaginais, por um período de duas semanas, conforme descrito no tópico subsequente. Durante esse período, as fêmeas receberam dieta comercial (Nuvilab - Quintia) e água *ad libitum*. Posteriormente, as fêmeas comprovadamente cíclicas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos experimentais, sendo 12 fêmeas por grupo, a saber:

- Grupo dieta controle sem cafeína (CC): fêmeas que receberam dieta padrão e água por gavagem;
- Grupo dieta controle com cafeína (C120): fêmeas que receberam dieta padrão e 120 mg de cafeína/kg/dia por gavagem;
- Grupo dieta hipercalórica (alto teor de gorduras e açúcares - HF/HS) sem cafeína (TC): fêmeas que receberam dieta hipercalórica e água por gavagem;
- Grupo dieta HF/HS com cafeína (T120): fêmeas que receberam dieta hipercalórica e 120 mg de cafeína/kg/dia por gavagem.

A dieta padrão foi composta por 10% gordura e 0% sucrose, enquanto a dieta hipercalórica foi composta por 45% gordura e 17% sucrose (ambas produzidas pela empresa PragSoluções Biociências). Optou-se por usar tal dieta por ser um modelo confiável para representar o atual padrão alimentar humano, já tendo sido utilizado por outros grupos de pesquisa (Chin, et al., 2017; Pennington, et al., 2017; Pennington, et al., 2020).

A dosagem da cafeína (Sigma-Aldrich - Reagent Plus®, C0750) de 120 mg/kg/dia equivale a 13,2 mg/kg/dia em uma pessoa de peso médio de 60 kg totalizando 583,2 mg de cafeína/dia, o que corresponde a 3,6 xícaras de 100 mL de café de consumo em humanos, de acordo com o fator de correção para camundongos estabelecido por Nair & Jacob (2016). Essa dosagem de cafeína foi escolhida a partir de resultados preliminares obtidos por nosso grupo de pesquisa por induzir diversas alterações feto-placentárias (Paula., 2017), além de corresponder ao número médio de xícaras consumido nos países que mais consomem café (Grosso & Bracken, 2004; EFSE 2012).

Para estabelecer o padrão de consumo crônico, ambas as dietas (HF/HS e padrão) foram fornecidas durante 6 semanas, conforme previamente descrito em outros estudos (Sabén, et al., 2016; Rosario, et al., 2016; Merle, et al., 2019; Andreas, et al., 2019; Díaz, et al., 2015). No início da quinta semana, as fêmeas receberam cafeína diluída em água ou apenas água, num volume final de 0,5mL por animal, proporcional à capacidade de diluição total da cafeína e ao volume gástrico relativo aos camundongos. A gavagem foi realizada diariamente próximo ao início do período escuro dos animais (17:00 h). O mesmo protocolo de dieta associado à cafeína foi mantido durante toda a gestação, sendo os animais eutanasiados no terço gestacional final (DG 17.5).

## **5. 2 Avaliação dos ciclos estrais**

Os lavados vaginais foram realizados diariamente por um período de 15 dias antes do início dos tratamentos para identificação das fases do ciclo estral: proestro (caracterizado por células epiteliais nucleadas), estro (células epiteliais cornificadas), metaestro (células epiteliais e leucócitos polimorfonucleares) e diestro (leucócitos polimorfonucleares) (Cora et al., 2015) (Figura 3). A duração total de cada fase do ciclo estral foi então contabilizada e avaliada por duas semanas para excluir do experimento aquelas fêmeas que apresentassem alterações no ciclo estral, tendo sido identificada uma fêmea que não apresentou fase fértil (proestro e estro) durante todo o período.

Os ciclos estrais foram acompanhados por um período de 8 semanas, abrangendo o período do estabelecimento da cronicidade do consumo das dietas (6 semanas), bem como o período da associação entre as dietas e o consumo de cafeína (2 semanas). Para facilitar o entendimento do efeito dos tratamentos ao longo do tempo, a análise do ciclo estral foi dividida em três ciclos de duas semanas cada. O primeiro e o segundo ciclos correspondem ao período de tratamento com as dietas controle e HF/HS, enquanto o terceiro ciclo representa o período de associação com cafeína.

A partir da terceira semana após a associação entre dietas e cafeína, as fêmeas em proestro e estro foram acasaladas e o início da gestação foi marcado pelo primeiro dia de visualização do plugue vaginal, indicativo de uma possível prenhez (dia gestacional - DG 0,5; Lima et al., 2016). No DG 0,5, as fêmeas foram separadas dos machos e os tratamentos experimentais ainda mantidos.

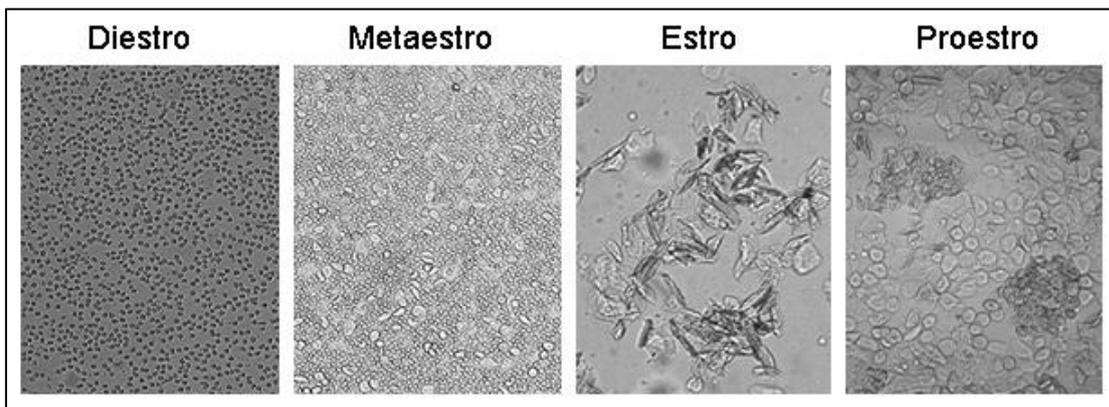


Figura 3 - Classificação do ciclo estral. Diestro - leucócitos polimorfonucleares. Metaestro - células epiteliais e leucócitos polimorfonucleares. Estro - células epiteliais cornificadas. Proestro - caracterizado por células epiteliais nucleadas.

### 5.3 Consumo alimentar e parâmetros biométricos corporais

O consumo alimentar médio foi mensurado diariamente antes e durante a gestação, sendo determinado pela diferença entre as pesagens da ração de dois dias consecutivos. Além disso, os animais foram pesados semanalmente para monitoramento do peso corporal, sendo calculado o ganho de peso semanal pela diferença entre os pesos de cada semana. Estas medidas também foram utilizadas para calcular o índice de massa corporal por meio da fórmula:  $IMC = \text{Peso (g)} / \text{comprimento}^2(\text{cm})$  (adaptado de Brockmann & Bevova, 2002), bem como a taxa de obesidade, dada pela média de peso corporal do grupo controle mais três desvios-padrões (Enriori et al., 2007). Dessa forma, todos os animais que apresentaram pesos corporais acima desse valor foram considerados obesos.

## 5.4 Coleta das amostras

As fêmeas prenhes em DG 17.5 foram pesadas, anestesiadas (associação entre xilazina 2%, 20mg/kg e ketamina 5%, 50mg/kg, i.m.), sendo posteriormente eutanasiadas por meio de decapitação, momento no qual amostras de sangue foram coletadas. Em seguida, foi realizada laparotomia para exposição dos cornos uterinos, sendo estes dissecados para remoção das placentas e conceptos. Posteriormente, foram determinados: (1) número de fetos viáveis, (2) número de fetos inviáveis (reabsorção fetal - caracterizado pela morte do embrião na fase de implantação; fetos mumificados - caracterizado pela morte do feto após a formação da placenta sem o completo desenvolvimento do feto; e fetos mortos - caracterizado pela morte do feto completamente formado), (3) diâmetro placentário (média entre o maior e o menor diâmetro), (4) peso placentário, (5) tamanho corporal do feto (obtido pela medida do comprimento cabeça-base da cauda), (6) eficiência placentária (avaliada a partir da razão entre a média de peso fetal e a média de peso placentário), (7) pesos do cérebro e fígado fetais (utilizados para cálculo da razão peso cérebro/peso fígado - parâmetro para diagnóstico de restrição intrauterina de crescimento - RIUC) (Felicioni et al., 2019). Além disso, foram obtidos os pesos dos seguintes órgãos maternos; fígado, baço; ovários, bem como do tecido adiposo. O tecido adiposo foi subdividido em tecido adiposo visceral (tecido adiposo associado aos órgãos), abdominal (tecido adiposo presente na cavidade abdominal não associado aos órgãos), subcutâneo (localizado abaixo da pele) e gonadal (associado às gônadas).

## 5.5 Análises bioquímicas

Testes de tolerância à glicose e insulina foram realizados na quinta e sexta semanas de indução da dieta e conseqüentemente na primeira e segunda semanas de indução da cafeína, respectivamente, pois é necessária uma semana de intervalo entre os dois testes devido ao stress imposto aos animais. Os camundongos foram submetidos ao jejum por 6 horas antes dos testes e a glicose e a insulina foram administradas por via intraperitoneal. Os níveis de glicose foram medidos em 0, 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da glicose e em 0, 15, 30, 60 minutos após a administração da insulina. Uma gota de sangue foi coletada de um corte na ponta da cauda dos animais, para determinar os níveis de glicose, que foram medidos usando um glicosímetro portátil (On Call® Plus; Laboratórios Acon, Inc., San Diego, CA, EUA).

As amostras de sangue coletadas no momento da eutanásia foram centrifugadas, sendo o soro utilizado para dosar os seguintes parâmetros bioquímicos: colesterol total; colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade); colesterol HDL (lipoproteínas de alta densidade); triglicerídeos; ALT (Alanina aminotransferase) e AST (Aspartato aminotransferase) (Villas et al., 2018).

Para as análises de colesterol total, colesterol HDL e triglicerídeos foram utilizados kits específicos (Analisa) para determinação de cada um desses parâmetros por meio de análise enzimática-colorimétrica. Em tubos de ensaio foram pipetados 1ml de um reagente de cor contendo um complexo enzimático específico para cada tipo de análise. Posteriormente, 0,01 mL de plasma foi pipetado em cada tubo, sendo estes homogenizados e incubados em banho-maria a 37° por 10 min. Em seguida, foram feitas as leituras fotométricas em um analisador semi automático (Bioplus Bio 200). Os níveis de absorvância foram determinados pela comparação das amostras teste com a amostra padrão.

Para as análises de ALT e AST foram utilizados kits específicos (Bioclin) para determinação de cada um desses parâmetros por meio de análise enzimática-colorimétrica. Em tubos de ensaio, foram pipetados 1mL de substrato contendo um complexo enzimático específico para cada tipo de análise. Posteriormente, 0,1 mL de plasma foi pipetado em cada tubo, sendo estes homogenizados e levados ao equipamento de leitura o qual manteve as amostras à 37°, fazendo quatro leituras com intervalo de 1 minuto cada. Os níveis de absorvância foram determinados pela comparação das amostras teste com a amostra padrão.

## **5.6 Determinação do sexo**

Após a dissecação dos conceptos, a pelve de cada feto foi fixada em paraformaldeído a 4% por 24 horas, e armazenada em tampão fosfato a 0,1M. Posteriormente, foram dissecadas sob lupa para avaliação da ultraestrutura das gônadas para determinação do sexo fetal. As gônadas de cada feto foram coletadas e incluídas em resina plástica à base de glicol metacrilato, de acordo com Chiarini-Garcia et al (2011). Dos blocos montados, foram obtidos cortes histológicos de 3µm de espessura, que foram corados com azul de toluidina-borato de sódio a 1% , para confirmação do sexo fetal. (Figura 4)

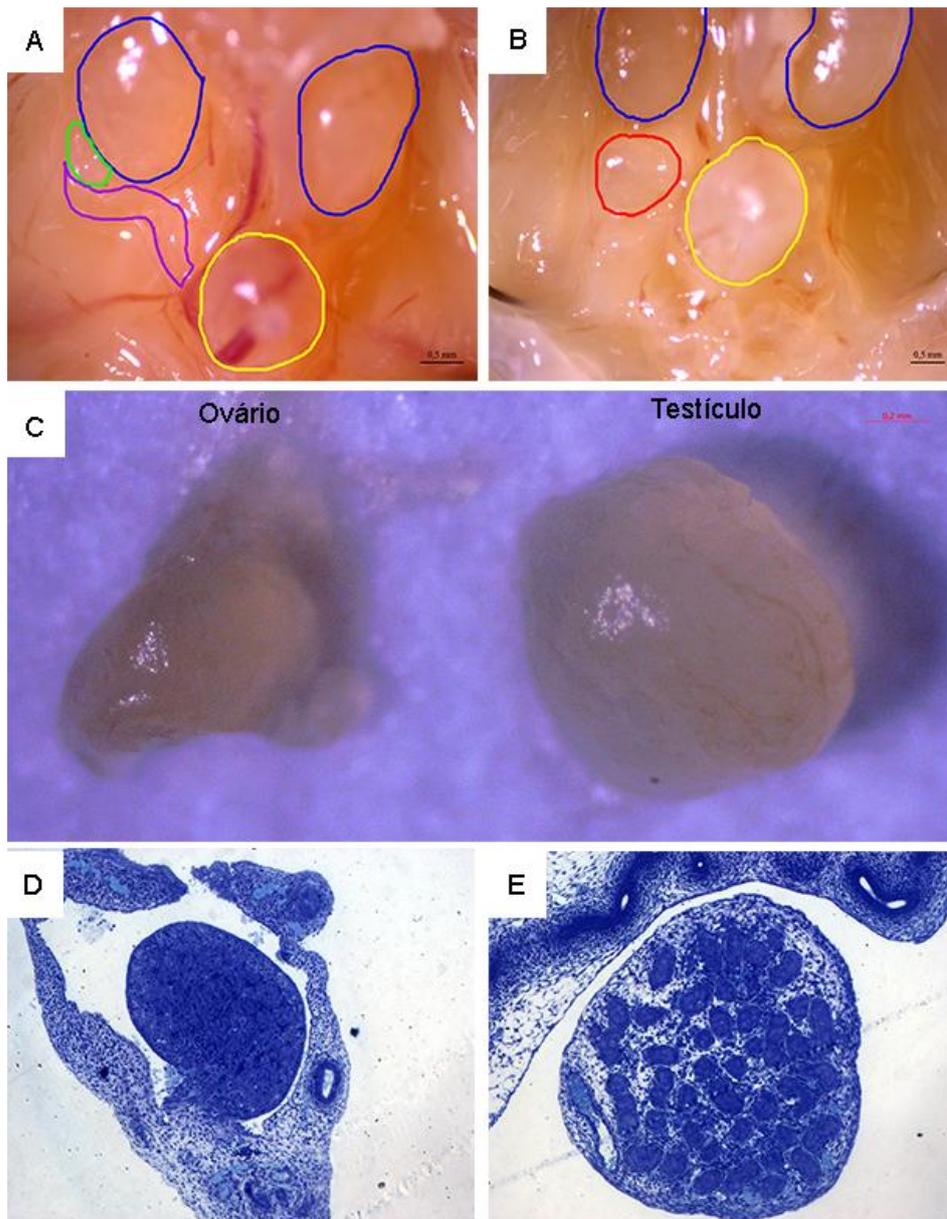


Figura 4 - Comparação sexual entre gônadas. A - Posição anatômica gônada feminina. B - Posição anatômica gônada masculina. C- Comparativo entre gônada feminina e masculina. D - Fotomicrografia da gônada feminina. E - Fotomicrografia da gônada masculina. Círculo azul - rim, círculo amarelo - bexiga, círculo vermelho - testículo, círculo verde - ovário, destacado roxo - corno uterina.

## 5.7 Avaliação da placenta

### 5.7.1 Preparo e seleção

Para avaliação histomorfométrica das placentas, um fragmento de cada placenta foi fixado em paraformaldeído a 4% por 24 horas e armazenado em tampão fosfato a 1M. As placentas escolhidas para inclusão foram selecionadas com base no peso médio fetal de cada sexo por grupo. Após a seleção, os fragmentos foram incluídos em parafina para se obter

secções histológicas de 5 µm, que foram coradas com hematoxilina/eosina de acordo com Chiarini-Garcia (2011).

### **5.7.2 Área das regiões placentárias**

A determinação das áreas placentárias de cada grupo experimental foi realizada por meio do programa de análise de imagens Zen (blue edition, Carl Zeiss Microscopy), considerando as regiões da decídua, zona juncional, labirinto e placa coriônica em imagens histológicas obtidas por meio de câmera acoplada a lupa (Carl Zeiss Microscopy GmbH)( Figura 5A).

### **5.7.3 Proporção dos componentes das áreas placentárias e vasos fetais e maternos**

Utilizando o softwear Image ProExpress® (Media Cybernetics® versão 4.5), foi feita a proporção de vasos fetais e maternos presentes no labirinto placentário de cada placenta (Figura 5D?). Tal proporção foi realizada com o uso uma graticula de 220 pontos de interseção na zona juncional e no labirinto de cinco secções histológicas de cada placenta analisada (Figura 5B). Os pontos de interseção na zona juncional foram definidos como: núcleo de células de glicogênio, citoplasma de células de glicogênio, núcleo de células endócrinas, citoplasma de células endócrinas e vasos sanguíneos (Figura 5C). Os pontos no labirinto foram definidos como: “vaso fetal”, caracterizado pela presença de hemácias nucleadas e limites definidos por células de sinusoidais; “espaço com sangue materno”, característico por hemácias maduras não nucleadas; “núcleos” e “citoplasma”, pontos de interseção sobre células sinusoidais características do labirinto placentário (Figura 5D). Também foram contabilizados os artefatos, que correspondem a estruturas de origem diferente da estudada ou campos vazios sem estruturas na imagem.. A proporção volumétrica (VP) de cada componente histológico foi calculada como  $VP = NP \times 100/1100$ , onde NP = número de pontos equivalentes em cada componente histológico, 1100 = número total de pontos nas 5 secções histológicas. O número total de pontos em alguns casos podia ser inferior a 1100, caso houvesse a presença de artefatos, uma vez que estes não fazem parte das estruturas analisadas.

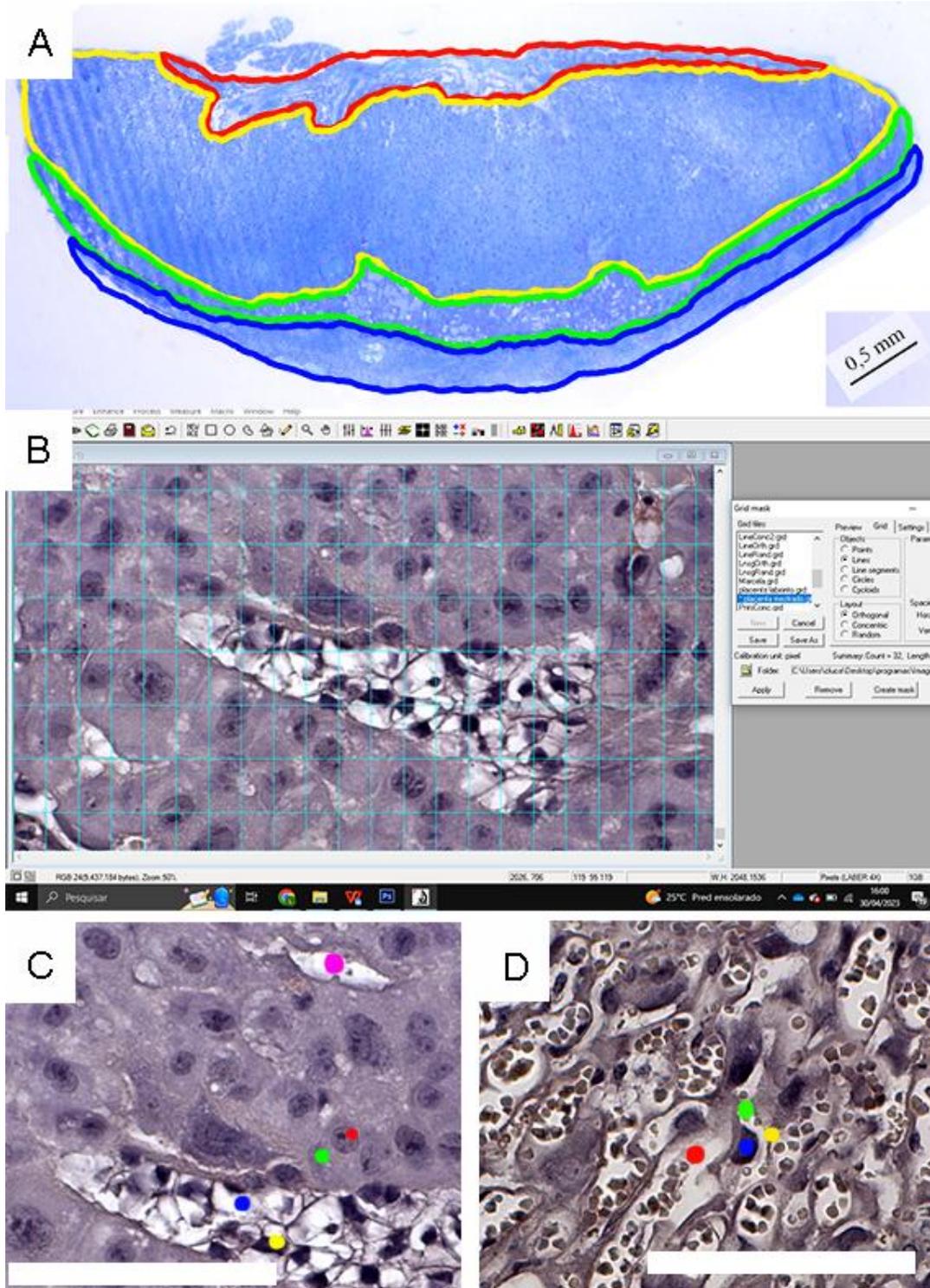


Figura 5 - Análises placentárias - A - Áreas das regiões placentárias; decídua - azul, zona juncional - verde, labirinto - amarelo e placa coriônica - vermelho. B - Análise da proporção volumétrica. C - Parâmetros utilizados para a proporção volumétrica na zona juncional; vaso - rosa, núcleo célula gigante - vermelho, citoplasma célula gigante - verde, núcleo célula glicogênio - amarelo, citoplasma célula de glicogênio - azul. D parâmetros utilizados para a proporção volumétrica no labirinto; vaso fetal - vermelho, vaso materno - verde, núcleo célula da membrana interhemal - azul, membrana interhemal- amarelo. Barra 100µm.

#### 5.7.4 Diâmetro dos vasos e altura da membrana interhemal

A análise do diâmetro dos vasos maternos e fetais na região do labirinto foi realizada por meio do diâmetro de Ferret, o qual proporciona o diâmetro médio de uma estrutura irregular. Para isso, 10 vasos maternos e 10 vasos fetais de cada placenta analisada foram medidos, utilizando o programa Image ProExpress® (Media Cybernetics® versão 4.5). Para a análise da membrana interhemal, o mesmo programa foi utilizado para calcular a altura desta membrana.

## **5.8 Análises estatísticas**

Todos os parâmetros foram testados quanto à normalidade antes da análise, usando-se o procedimento univariado do programa Statistical Analysis System® (SAS Institute, Cary, NC, EUA). Todos os dados gerados passaram pelo teste Shapiro-Wilk para análise de normalidade, os dados não normais foram transformados por meio do log ou raiz quadrada. Os efeitos das dietas e da cafeína foram analisados pelo procedimento do modelo geral linear (GLM) do programa SAS. Adicionalmente, o teste de qui-quadrado foi utilizado para comparar a frequência de animais obesos nos diferentes grupos experimentais.

Nos eventos nos quais os efeitos dos tratamentos foram significativos, comparações múltiplas entre as médias foram realizadas utilizando a probabilidade de diferenças, ajustadas pelo teste Tukey-Kramer (SAS, 2001). Nas tabelas e figuras, os dados foram descritos como média dos quadrados mínimos  $\pm$  erro padrão da média. Em todas as análises,  $P < 0,05$  foi considerado significativo.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Consumo alimentar**

Com relação ao consumo de ração no período pré-gestacional, observou-se que os grupos experimentais que receberam a dieta HF/HS (TC; T120) alternaram como o grupo que apresentou o maior consumo durante as cinco primeiras semanas, quando comparados aos grupos que consumiram a dieta controle (C120; CC) ( $P < 0,05$ ). Já no período gestacional, observou-se maior consumo no grupo que consumiu apenas cafeína (C120) em comparação ao grupo tratado com a dieta HF/HS mais cafeína (T120) no início da gestação (DG 5.5) ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1: Consumo alimentar médio semanal (g) durante os períodos pré gestacional e gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120)

Parâmetros		CC	C120	TC	T120	S.E.M
Período pré-gestacional	1ªsemana	5,2 <sup>ab</sup>	5,0 <sup>a</sup>	5,3 <sup>b</sup>	5,3 <sup>b</sup>	0,05
	2ªsemana	4,20 <sup>a</sup>	4,43 <sup>ab</sup>	4,70 <sup>bc</sup>	4,72 <sup>c</sup>	0,08
	3ªsemana	3,67 <sup>a</sup>	3,86 <sup>ac</sup>	5,0 <sup>b</sup>	4,38 <sup>bc</sup>	0,21
	4ªsemana	3,33 <sup>c</sup>	3,80 <sup>a</sup>	4,10 <sup>ab</sup>	4,43 <sup>b</sup>	0,09
	5ªsemana	3,33 <sup>a</sup>	3,30 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	4,26 <sup>b</sup>	0,12
	6ªsemana	3,77	3,53	3,96	3,96	0,17
Período gestacional	DG 1.5	4,2	4,3	4,5	3,5	0,6
	DG 5.5	4,5 <sup>ab</sup>	5,4 <sup>a</sup>	4,6 <sup>ab</sup>	3,5 <sup>b</sup>	0,5
	DG 10.5	4,9	5,3	5,3	3,9	0,7
	DG 15.5	4,8	6,1	4,5	4,4	0,6
	DG 17.5	5,1	5,1	5,0	4,9	0,4

<sup>a,b,c</sup> Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

## 6.2 Peso corporal

As medidas de peso corporal revelaram que a partir da primeira semana de tratamento da dieta houve um aumento no peso dos animais tratados com a dieta HF/HS (TC; T120;  $P < 0,05$ ) aumento este que permaneceu mesmo após o início do tratamento com a cafeína na quinta semana ( $P < 0,05$ ). Já no início da gestação (DG 0.5), o grupo tratado apenas com a dieta HF/HS (TC) apresentou peso corporal maior comparado ao grupo tratado com a dieta e

a cafeína (T120;  $P < 0,05$ ). A partir do DG 15.5, o grupo T120 passou a apresentar peso corporal similar ao grupo CC (Figura 6).

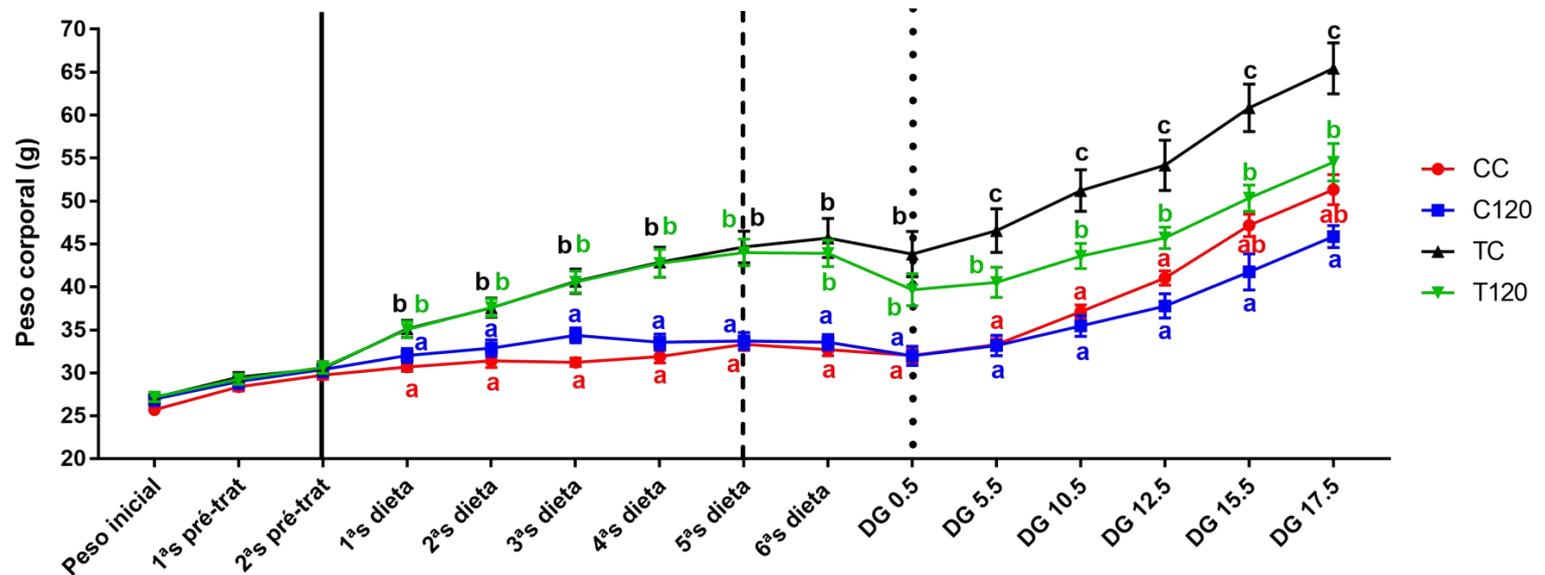


Figura 6 – Evolução do peso corporal semanal (g) medido durante os períodos pré gestacional e gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).

<sup>a,b,c</sup> Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

### 6.3 Ganho de peso corporal

Os dados de ganho médio de peso corporal, apresentados na Tabela 2, demonstram que tal parâmetro foi maior no período pré-gestacional nos grupos que consumiram a dieta HF/HS na primeira ( TC e T120 maiores que CC e C120), terceira (TC e T120 maiores que CC), quarta ( TC e T120 maiores que CC e C120) e sexta (TC maior que CC) semanas de tratamento ( $P < 0,05$ ). No período gestacional, observou-se diferença no ganho de peso no DG10.5, no qual o grupo C120 teve o menor ganho de peso em comparação ao TC ( $P < 0,05$ ). Já no DG 15.5 a redução no ganho de peso foi observada nos grupos que consumiram cafeína, independente do tipo de dieta (C120 e T120;  $P < 0,05$ ) em comparação aos grupos TC e T120.

Tabela 2: Ganho médio de peso corporal (g) durante os períodos pré-tratamento, pré gestacional e gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120)

Parâmetro	CC	C120	TC	T120	S.E.M
-----------	----	------	----	------	-------

Pré-tratamento	1ª semana	2,7	2,0	2,4	2,1	0,3
	2ª semana	1,3	1,4	1,0	1,4	0,3
Período pré-gestacional	1ª semana	0,9 <sup>a</sup>	1,5 <sup>a</sup>	4,6 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>	0,4
	2ª semana	0,7	0,9	2,4	2,6	0,5
	3ª semana	-0,2 <sup>a</sup>	1,5 <sup>ab</sup>	3,1 <sup>b</sup>	3,0 <sup>b</sup>	0,6
	4ª semana	0,7 <sup>a</sup>	-0,8 <sup>a</sup>	2,2 <sup>c</sup>	2,2 <sup>c</sup>	0,5
	5ª semana	1,4	0,1	1,8	1,2	0,5
	6ª semana	-0,6 <sup>a</sup>	-0,2 <sup>ab</sup>	1,0 <sup>b</sup>	-0,1 <sup>ab</sup>	0,5
Período gestacional	DG 0.5	-0,09	-0,64	-0,63	-0,20	0,29
	DG 5.5	0,80	1,19	2,74	0,84	0,5
	DG 10.5	4,2 <sup>ab</sup>	2,3 <sup>c</sup>	4,7 <sup>a</sup>	3,0 <sup>bc</sup>	0,5
	DG 12.5	3,9	2,3	2,9	2,3	0,7
	DG 15.5	6,6 <sup>a</sup>	4,0 <sup>b</sup>	6,7 <sup>a</sup>	4,3 <sup>b</sup>	0,8
	DG 17.5	4,2	4,1	4,6	3,6	0,8

<sup>a,b,c</sup> Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da linha diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

#### 6.4 Índice de massa corporal

Foi observado que, a partir da segunda semana de tratamento com a dieta HF/HS, ambos os grupos (TC; T120) apresentaram aumento de IMC em comparação aos grupos CC e C120 ( $P < 0,05$ ). Entretanto, no DG0.5 houve uma diminuição do IMC do grupo T120, igualando ao grupo CC e C120. O grupo TC, durante todo o período gestacional teve os

maiores valores de IMC ( $P < 0,05$ ) em comparação aos grupos CC e C120. A partir do DG 12.5 a diferença entre os grupos CC e C120 tornou-se significativa, permanecendo o grupo C120 com os menores valores até o final da gestação ( $P < 0,05$ ) (Figura 7).

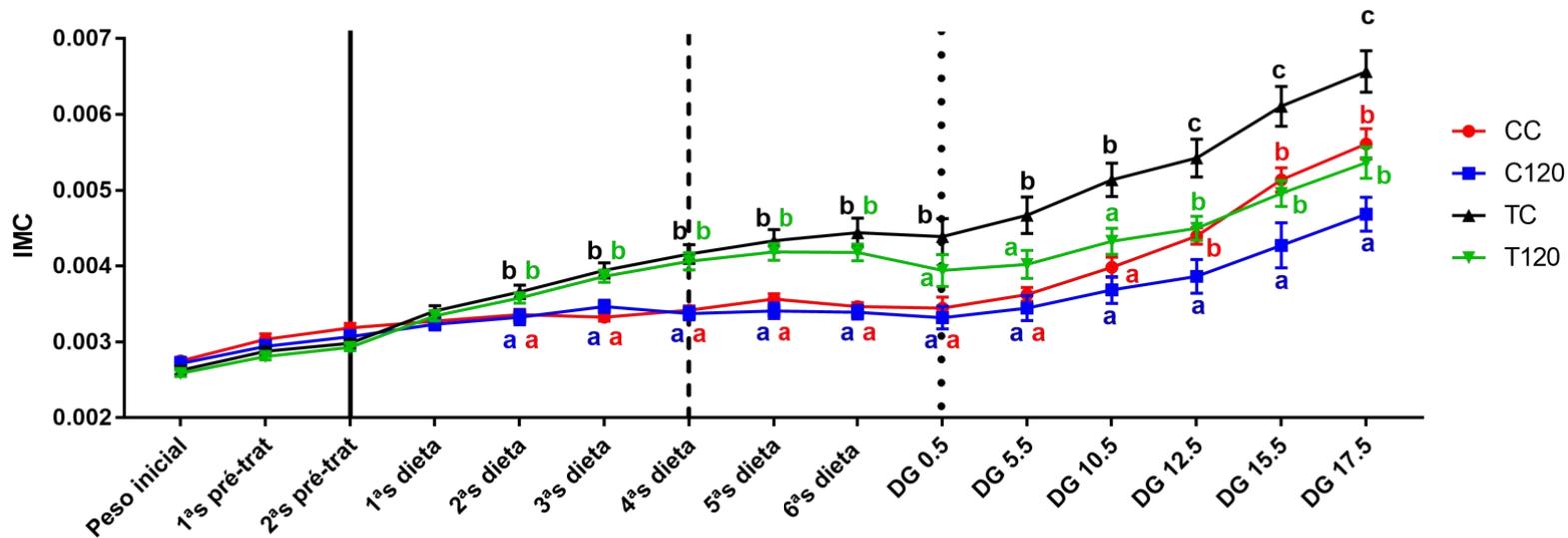


Figura 7 – Índice de massa corporal nos períodos pré-tratamento, pré-gestacional e gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).

a,b,c Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

## 6.5 Relação obesidade

Desde a primeira semana de tratamento com a dieta HF/HS, foi observado um aumento significativo de indivíduos obesos nos grupos TC e T120, passando de 41% e 42% na primeira semana, para 83% e 78% na sexta semana, respectivamente, no período pré-gestacional ( $P < 0,05$ ). Por sua vez, no período gestacional, o padrão de obesidade permaneceu durante toda a gestação para o grupo TC, ocorrendo uma queda de 75% para 38% na porcentagem final. Essa tendência de queda também foi observada no grupo T120. No entanto, nesse grupo a porcentagem de fêmeas obesas diminuiu gradativamente com o avançar da gestação até não haver mais obesidade no GD17.5 (Tabela 3)

Tabela 3: Proporção de indivíduos obesos ao longo do período experimental em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120)

Parâmetros	CC		C120		CT		T120		P-valor
	NO	O	NO	O	NO	O	NO	O	
Peso inicial	100%	0%	92%	8%	100%	0%	93%	7%	NS
1 <sup>as</sup> pré-trat	100%	0%	92%	8%	100%	0%	93%	7%	NS
2 <sup>as</sup> pré-trat	100%	0%	100%	0%	100%	0%	93%	7%	NS
<b>Período pré-gestacional</b>									
1 <sup>as</sup> dieta	100%	0%	92%	8%	58%	42%	57%	43%	0,017
2 <sup>as</sup> dieta	100%	0%	100%	0%	67%	33%	79%	21%	0,04
3 <sup>as</sup> dieta	100%	0%	67%	33%	17%	83%	14%	86%	0,0001
4 <sup>as</sup> dieta	100%	0%	100%	0%	33%	67%	36%	64%	0,0001
5 <sup>as</sup> dieta	100%	0%	100%	0%	17%	83%	21%	79%	0,0001
6 <sup>as</sup> dieta	100%	0%	100%	0%	17%	83%	21%	79%	0,0001
<b>Período gestacional</b>									
GD 0.5	100%	0%	100%	0%	25%	75%	56%	44%	0,0001
GD 5.5	100%	0%	100%	0%	13%	87%	44%	56%	0,0001
GD10.5	100%	0%	100%	0%	25%	75%	67%	33%	0,0001
GD12.5	100%	0%	100%	0%	37%	63%	67%	33%	0,0001
GD15.5	100%	0%	100%	0%	50%	50%	89%	11%	0,0001
GD17.7	100%	0%	100%	0%	62%	38%	100%	0%	0,0001

.NO - animais não obesos; O - animais obesos; NS- não significativo

### 6.6 Teste de tolerância à glicose

A curva do teste de tolerância à glicose demonstrou que, aos 15 e 60 minutos após a injeção de glicose, os grupos tratados com a dieta HF/HS (TC e T120) já apresentavam níveis glicêmicos elevados ( $P < 0,05$ ) em comparação com os grupos CC e C120. Aos 30 minutos apenas o grupo T120 era diferente dos grupos CC e C120 (Figura 8).

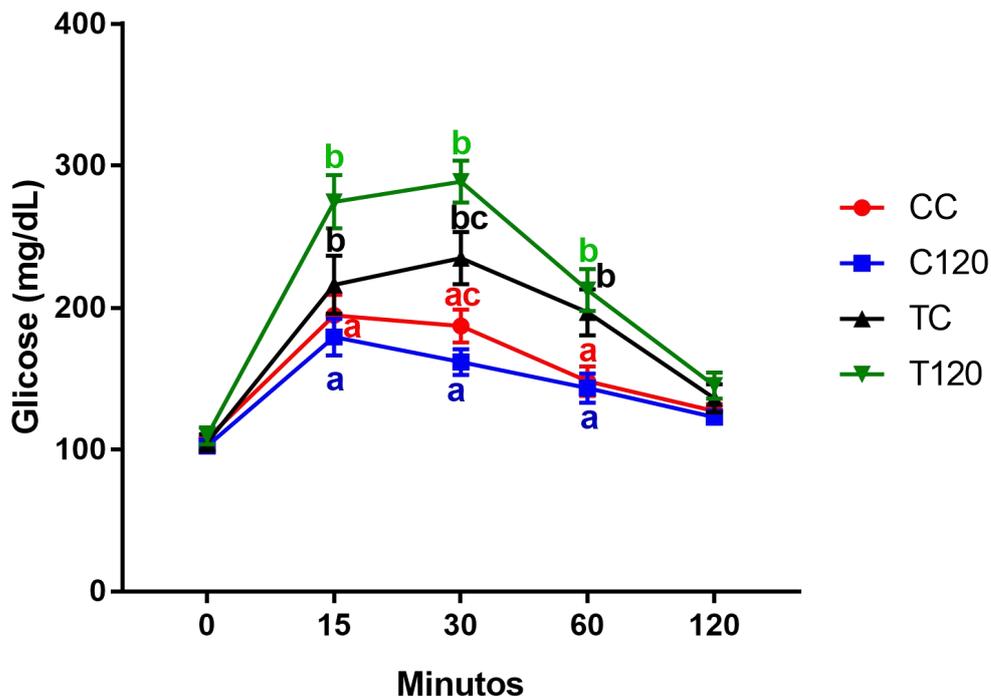


Figura 8 - Teste de tolerância a glicose no período pré- gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).  
<sup>a,b,c</sup> Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

### 6.7 Teste de tolerância à insulina

Por sua vez, a curva para o teste de tolerância à insulina revelou níveis mais elevados no grupo C120 antes da injeção de insulina (momento 0) em comparação aos grupos CC e TC ( $P < 0,05$ ). Após 15 e 60 minutos da injeção de insulina, os níveis de glicose mais elevados foram observados nos grupos que receberam dieta HF/HS (TC e T120;  $P < 0,05$ ) em relação ao grupo CC. O grupo C120 teve os maiores valores em 90min comparado ao grupo CC ( $P < 0,05$ ) (Figura 9).

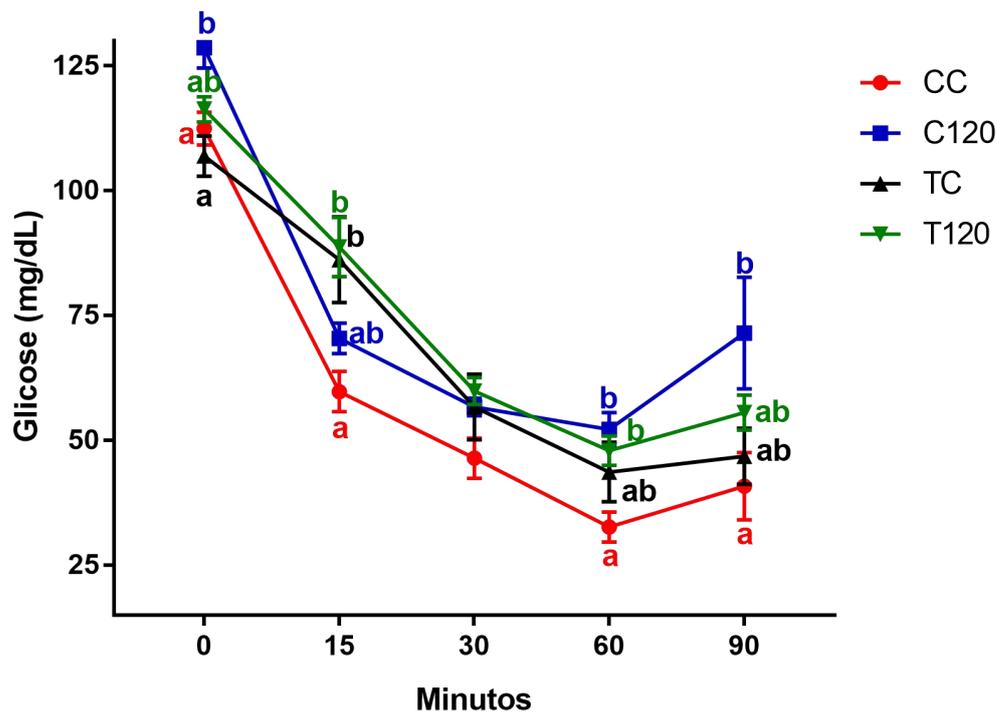


Figura 9 -Teste de tolerância a insulina no período pré- gestacional em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).

<sup>a,b</sup> Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

## 6.8 Análise bioquímica

Os resultados das análises bioquímicas estão representados na Figura 10. Observou-se que os níveis de triglicerídeos foram mais elevados nos grupos que receberam cafeína (C120 e T120), em comparação ao grupo CC ( $P < 0,05$ ). Em contrapartida, os níveis de colesterol total dos grupos C120, TC e T120 foram maiores que do grupo CC ( $P < 0,05$ ). Para o HDL os níveis foram mais altos nos grupos TC e T120 em comparação aos grupos CC e C120. Já o LDL foi mais alto apenas no grupo TC em comparação ao grupo CC ( $P < 0,05$ ).

Os níveis da enzima de função hepática, ALT, foram mais elevados nos animais do grupo T120 em comparação aos animais dos grupos CC e C120 ( $P < 0,05$ ), mas sem alterações entre os grupos experimentais para os níveis de AST.

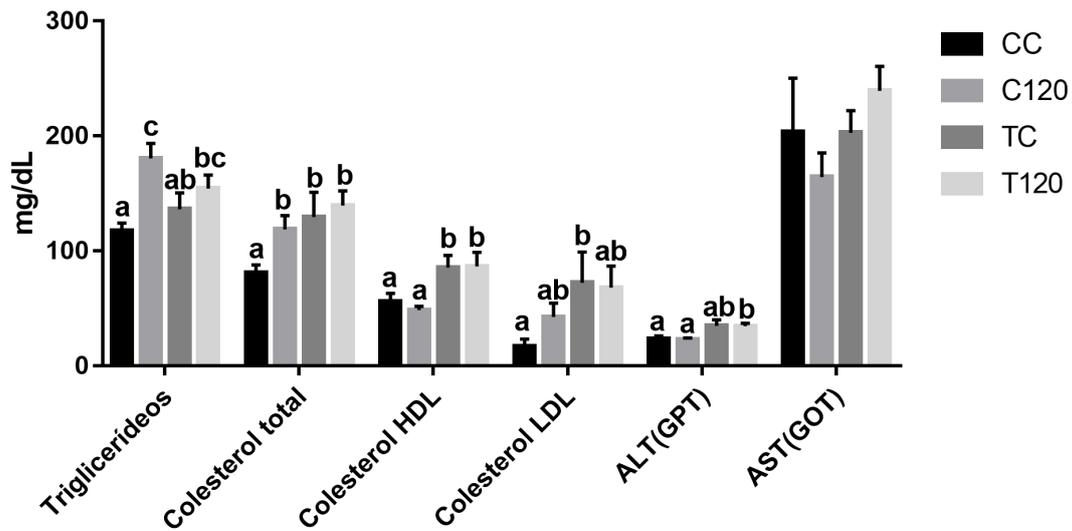


Figura 10 - Parâmetros bioquímicos do plasma de fêmeas gestante que consumiram dieta HF/HS e ou cafeína durante a gestação em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120).

<sup>a,b,c</sup> Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

## 6.9 Ciclo estral

Os dados dos lavados vaginais dos três ciclos estão apresentados na Tabela 4. Foi demonstrado que a dieta HF/HS não alterou o ciclo estral ( $P > 0,05$ ). Entretanto, a introdução da cafeína levou a um prolongamento da fase de metaestro (grupos C120; T120) em comparação aos animais tratados apenas com as dietas (grupos CC e TC;  $P < 0,05$ ).

Tabela 4: Verificação da frequência e análise do ciclo estral em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120)

Parâmetros	Ciclo basal			1º ciclo			2º ciclo			3º ciclo				
	Controle	Tratado	S.E.M	Controle	Tratado	S.E.M	Controle	Tratado	S.E.M	C	C120	T	T120	S.E.M
Nº de ciclos	2,0	1,8	0,1	1,9	1,8	0,1	1,75	1,85	0,17	1,5	1,7	1,9	1,6	0,2
Proestro	0,2	0,4	0,1	0,9	1,0	0,2	0,9	1,5	0,2	0,6	0,6	0,7	0,8	0,2
Estro	4,3	4,1	0,3	2,4	2,5	0,3	1,9	1,3	0,2	2,1	2,7	1,9	2,3	0,4
Metaestro	1,2	0,9	0,2	1,1	1,5	0,2	1,12	0,96	0,24	0,9 <sub>a</sub>	1,4 <sub>b</sub>	0,2 <sub>a</sub>	1,2 <sub>b</sub>	0,2
Diestro	8,3	8,6	0,4	9,4	9,0	0,4	10,0	10,2	0,3	10,4	9,3	11,2	9,6	0,5

<sup>a,b</sup> Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha em cada ciclo diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ).

### 6.10 Parâmetros reprodutivos

A análise dos parâmetros reprodutivos demonstrou que nem a porcentagem de fêmeas prenhas, tampouco o número de fetos vivos e mortos foram alterados pelas dietas ou cafeína. Entretanto, a cafeína promoveu um aumento significativo no número de reabsorções no grupo C120 em comparação ao grupo CC e CT ( $P < 0,05$ ). Já o consumo da dieta HF/HS levou a um maior número de fetos mumificados no grupo TC em comparação ao grupo CC ( $P < 0,05$ ) (Tabela 5).

Tabela 5 - Parâmetros reprodutivos em camundongos alimentados somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120)

Parâmetros	CC	C120	TC	T120
Porcentagem de prenhez	75,0 % (9/12)	66,6 % (8/12)	66,6 % (8/12)	75,0 % (9/12)
Fetos vivos	9,1 ± 0,8	9,2 ± 0,8	10,6 ± 0,8	10,0 ± 0,8
Reabsorção	0,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,3 <sup>ab</sup>
Mumificados	0,0 ± 0,2 <sup>b</sup>	0,3 ± 0,2 <sup>ab</sup>	0,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,2 ± 0,2 <sup>ab</sup>
Fetos mortos	0,2 ± 0,1	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1

<sup>a,b</sup> Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

### 6.11 Peso dos órgãos

Em se tratando do peso dos órgãos das fêmeas prenhas, notou-se que o consumo da dieta HF/HS levou a um aumento no peso do fígado (grupos TC e T120) em comparação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). Os pesos dos demais órgãos (baço e ovários) não foram alterados pelo consumo das respectivas dietas ( $P > 0,05$ ).

O consumo da dieta HF/HS promoveu maior deposição de tecido adiposo subcutâneo e abdominal nos grupos CT e C120 em comparação aos grupos CC e C120, ademais o grupo CT teve uma maior acumulo do que o grupo C120 ( $P < 0,05$ ). , Já para a gordura visceral, houve uma maior deposição no grupo CT em comparação com os demais ( $P < 0,05$ ). Quanto a

gordura gonadal o grupo CT teve um maior acúmulo em comparação aos demais grupos e o grupo T120 teve um maior acúmulo do que o grupo C120) (Tabela 6;  $P < 0,05$ ).

Tabela 6 - Peso dos órgãos de fêmeas prenhas alimentadas somente com dietas controle (CC) ou HF/HS (TC) ou tais dietas associadas a cafeína (C120 e T120)

Parâmetros	CC (n = 9)	C120 (n = 8)	TC (n = 8)	T120 (n = 9)	S.E.M
Fígado	2,2 <sup>a</sup>	2,3 <sup>ab</sup>	3,6 <sup>c</sup>	2,6 <sup>b</sup>	0,1
Baço	0,082	0,077	0,104	0,098	0,008
G visceral	0,7 <sup>a</sup>	0,5 <sup>a</sup>	1,6 <sup>b</sup>	0,8 <sup>a</sup>	0,1
G abdominal	1,2 <sup>a</sup>	0,7 <sup>a</sup>	4,3 <sup>b</sup>	2,6 <sup>c</sup>	0,4
G gonadal D	0,11 <sup>ab</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,30 <sup>c</sup>	0,17 <sup>b</sup>	0,02
G gonadal E	0,11 <sup>ab</sup>	0,07 <sup>a</sup>	0,33 <sup>c</sup>	0,20 <sup>b</sup>	0,03
G subcutânea	2,0 <sup>a</sup>	1,3 <sup>a</sup>	4,4 <sup>b</sup>	3,2 <sup>c</sup>	0,3
Ovário D	0,011	0,010	0,012	0,010	0,001
Ovário E	0,013	0,008	0,011	0,008	0,002

<sup>a,b,c</sup> Dados apresentados como média  $\pm$  erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ )

## 6.12 Biometrias fetal e placentária

Os dados das biometrias fetal e placentárias estão representados na Tabela 7. A partir dos dados biométricos fetais, observou-se o peso dos fetos em todos os tratamentos (C120, CT, T120) foi menor do que o do grupo CC, bem como diferentes entre si ( $P < 0,05$ ) independente do sexo. O comprimento fetal foi comprometido pelo consumo da cafeína, havendo um menor comprimento nos grupos C120 e T120 em comparação com o grupo CC e CT, além disso o comprimento do grupo T120 foi menor do que o do grupo C120. ( $P < 0,05$ ).

Verificou-se também um efeito de sexo para este parâmetro, sendo as fêmeas menores que os machos ( $P < 0,05$ ). O peso do fígado dos grupos tratados (C120, CT, T120) foi significativamente menor do que o dos grupos CC, sendo que o grupo T120 obteve os menores valores ( $P < 0,05$ ), independente do sexo. O peso do cérebro não foi afetado, mas a razão peso cérebro/peso fígado foi maior nos animais do grupo T120 em comparação com os demais grupos ( $P < 0,05$ ).

Em relação aos dados placentários, observou-se que o peso da placenta do grupo TC foi maior do que os demais grupos ( $P < 0,05$ ), e que o peso das placentas dos grupos C120 e T120 foram menores do que o grupo CC ( $P < 0,05$ ), ademais as fêmeas tiveram placentas mais leves ( $P < 0,05$ ). Já o diâmetro placentário foi afetado apenas pela cafeína nos quais os grupos C120 e T120 apresentaram os menores valores em comparação aos grupos CC e CT ( $P < 0,05$ ), além disso as placentas das fêmeas foram menores ocorrendo também interação entre tratamento e sexo ( $P < 0,05$ ). A eficiência placentária foi afetada apenas pela dieta, sendo menor nos grupos TC e T120 em comparação aos grupos CC e C120 ( $P < 0,05$ ), além disso a eficiência das fêmeas foi maior do que a dos machos ( $P < 0,05$ ).

Tabela 7 – Parâmetros biométricos placentários e fetais de fetos cujas mães consumiram dieta HF/HS e ou cafeína

Parâmetros	CC		C120		TC		T120		S.E.M	P-valor		
	Fêmea (n = 39)	Macho (n = 43)	Fêmea (n = 34)	Macho (n = 39)	Fêmea (n = 39)	Macho (n = 46)	Fêmea (n = 44)	Macho (n = 42)		Efeito de tratamento	Efeito de sexo	Tratament o * Sexo
Peso fetal (g)	1,02 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	0,87 <sup>c</sup>	0,84 <sup>c</sup>	0,95 <sup>b</sup>	1,01 <sup>b</sup>	0,75 <sup>d</sup>	0,75 <sup>d</sup>	0,02	P < 0.05	NS	NS
Comprimento fetal (mm)	22,2 <sup>ba</sup>	22,7 <sup>bb</sup>	20,7 <sup>aA</sup>	20,7 <sup>aB</sup>	20,7 <sup>ba</sup>	22,3 <sup>bb</sup>	19,8 <sup>cA</sup>	20,1 <sup>cB</sup>	0,2	P < 0.05	P < 0,001	NS
Peso fígado (g)	0,074 <sup>a</sup>	0,074 <sup>a</sup>	0,061 <sup>c</sup>	0,061 <sup>c</sup>	0,068 <sup>b</sup>	0,072 <sup>b</sup>	0,055 <sup>d</sup>	0,055 <sup>d</sup>	0,002	P < 0.05	NS	NS
Peso cérebro (g)	0,041	0,042	0,036	0,036	0,040	0,040	0,048	0,034	0,004	NS	NS	NS
Razão peso cérebro/pesofígado	0,56 <sup>a</sup>	0,57 <sup>a</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	0,59 <sup>a</sup>	0,57 <sup>a</sup>	0,64 <sup>b</sup>	0,63 <sup>b</sup>	0,01	P < 0.05	NS	NS
Peso placenta (g)	0,140 <sup>ba</sup>	0,150 <sup>bb</sup>	0,120 <sup>cA</sup>	0,130 <sup>cB</sup>	0,150 <sup>aA</sup>	0,170 <sup>aB</sup>	0,130 <sup>cA</sup>	0,140 <sup>cB</sup>	0,004	P < 0.05	P < 0,001	NS
Diâmetro placenta (mm)	7,84 <sup>aA</sup>	7,80 <sup>aB</sup>	7,14 <sup>ba</sup>	7,49 <sup>bb</sup>	7,66 <sup>aA</sup>	8,23 <sup>aB</sup>	7,31 <sup>ba</sup>	7,52 <sup>bb</sup>	0,09	P < 0.05	P < 0,001	P < 0,001
Eficiência placentária	7,3 <sup>aA</sup>	7,0 <sup>aB</sup>	7,6 <sup>aA</sup>	6,4 <sup>aB</sup>	6,4 <sup>ba</sup>	6,0 <sup>bb</sup>	6,0 <sup>ba</sup>	5,6 <sup>bb</sup>	0,2	P < 0.05	P < 0,001	NS

<sup>a,b,c,d</sup> Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha diferem estatisticamente quanto ao efeito dos tratamentos (dieta e cafeína) (P < 0,05)

<sup>A,B</sup> Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha diferem estatisticamente quanto ao efeito de sexo (machos e fêmeas) (P < 0,05)

### **6.13 Parâmetros histomorfométricos da placenta**

A determinação das áreas placentárias demonstrou que não houve comprometimento das regiões da placa coriônica e do labirinto pelos tratamentos experimentais. Entretanto, o consumo de cafeína aumentou a área da zona juncional do grupo TC em relação ao grupo C120 ( $P < 0,05$ ) independente do sexo. DE forma semelhante, a área da decídua foi significativamente aumentada no grupo TC em relação ao grupo C120 ( $P < 0,05$ ), sendo tal comprometimento mais severo nas fêmeas ( $P < 0,05$ ) (Tabela 8).

Os diâmetros dos vasos maternos e fetais não foram afetados pelos tratamentos, mas a altura da membrana interheme foi significativamente aumentada por todos os tratamentos em comparação ao grupo CC ( $P < 0,05$ ), havendo uma altura maior nas fêmeas ( $P < 0,05$ ) (Tabela 8).

Tabela 8 – Parâmetros histomorfométricos de placentas de fetos cujas mães consumiram dieta HF/HS e ou cafeína

Parâmetros	CC		C120		TC		T120		S.E.M	P-value			
	Fêmea (n = 5)	Macho (n = 5)	Fêmea (n = 5)	Macho (n = 5)	Fêmea (n = 5)	Macho (n = 5)	Fêmea (n = 5)	Macho (n = 5)		Treatment effect	Sex effect	Treatment * Sex	
Áreas placentárias	Placa Coriônica	0,75	0,62	0,62	0,58	0,86	0,70	0,76	0,55	0,11	NS	NS	NS
	Labirinto	6,7	6,7	5,4	5,8	6,5	6,8	5,9	5,7	0,7	NS	NS	NS
	Zona Juncional	1,5 <sup>ab</sup>	1,9 <sup>ab</sup>	1,4 <sup>a</sup>	1,4 <sup>a</sup>	2,1 <sup>b</sup>	2,1 <sup>b</sup>	1,7 <sup>ab</sup>	1,8 <sup>ab</sup>	0,2	P < 0.05	NS	NS
	Decídua	1,0 <sup>abA</sup>	1,5 <sup>abB</sup>	0,9 <sup>aA</sup>	0,9 <sup>aB</sup>	1,2 <sup>bA</sup>	1,5 <sup>bbB</sup>	0,9 <sup>abA</sup>	1,3 <sup>abB</sup>	0,2	P < 0.05	P < 0.01	NS
Diâmetro vaso fetal	26,4	26,5	28,3	30,6	30,6	28,0	32,4	29,4	2,3	NS	NS	NS	
Diâmetro vaso materno	28,5	27,3	28,9	29,3	32,3	27,7	29,8	32,3	1,6	NS	NS	NS	
Altura memb. interheme	3,3 <sup>aA</sup>	2,9 <sup>aB</sup>	3,7 <sup>bA</sup>	3,7 <sup>bB</sup>	3,9 <sup>bA</sup>	3,4 <sup>bbB</sup>	3,6 <sup>bA</sup>	3,5 <sup>bbB</sup>	0,1	P < 0.05	P < 0.01	NS	

<sup>a,b</sup> Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha diferem estatisticamente quanto ao efeito dos tratamentos (dieta e cafeína) (P < 0,05).

<sup>A,B</sup> Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha diferem estatisticamente quanto ao efeito de sexo (machos e fêmeas) (P < 0,05).

#### **6.14 Proporção volumétrica dos componentes placentários**

A proporção volumétrica da zona juncional revelou que apenas a proporção de vasos foi maior no grupo T120 em comparação aos grupos CC e TC independente do sexo fetal ( $P < 0,05$ ).

Já para a proporção dos constituintes do labirinto, o número de núcleos da membrana interheme foi afetado, havendo uma redução significativa da proporção desse componente estrutural no grupo T120 em comparação ao grupo controle, independente do sexo fetal ( $P < 0,05$ ) (Tabela 9).

Tabela 9 - Proporção volumétrica da zona juncional e labirinto de placentas de fetos cujas mães consumiram dieta HF/HS e ou cafeína

Parâmetros	CC		C120		TC		T120		S.E.M	P-value			
	Fêmea (n = 5)	Macho (n = 5)	Fêmea (n = 5)	Macho (n = 5)	Fêmea (n = 5)	Macho (n = 5)	Fêmea (n = 5)	Macho (n = 5)		Treatment effect	Sex effect	Treatment * Sex	
<b>Zona Juncional</b>	CCG	63,2	62,3	68,1	70,4	58,6	59,4	61,0	61,4	4,4	NS	NS	NS
	CCGL	13,4	14,8	3,6	5,1	12,4	13,9	5,7	9,6	3,8	NS	NS	NS
	VA	3,6 <sup>a</sup>	6,1 <sup>a</sup>	12,5 <sup>ab</sup>	8,5 <sup>ab</sup>	10,1 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	18,0 <sup>b</sup>	13,2 <sup>b</sup>	2,5	P < 0.05	NS	NS
	NCG	16,8	13,6	14,9	13,9	15,2	15,7	13,1	13,0	1,4	NS	NS	NS
	NCGL	2,96	3,22	0,94	2,14	3,6	4,4	2,1	2,9	1,1	NS	NS	NS
<b>Labirinto</b>	VF	17,1	15,7	18,3	20,0	16,7	25,7	25,0	19,8	3,1	NS	NS	NS
	VM	9,9	9,5	8,8	7,6	7,4	6,3	7,0	5,8	1,7	NS	NS	NS
	MI	56,8	58,5	58,8	59,1	59,9	55,1	54,7	61,7	3,0	NS	NS	NS
	NCM	16,3 <sup>a</sup>	16,4 <sup>a</sup>	14,2 <sup>ab</sup>	13,3 <sup>ab</sup>	16,1 <sup>ab</sup>	12,9 <sup>ab</sup>	13,3 <sup>b</sup>	12,7 <sup>b</sup>	1,1	P < 0.05	NS	NS

<sup>a,b</sup> Dados apresentados como média ± erro padrão, onde valores que apresentam letras diferentes dentro da mesma linha diferem estatisticamente quanto ao efeito dos tratamentos (dieta e cafeína) (P < 0,05).

CCG - citoplasma célula gigante; CCGL - citoplasma célula de glicogênio; VA - vaso; NCG - núcleo célula gigante; NCGL - núcleo célula de glicogênio; VF - vaso fetal; VM - vaso materno; MI - membrana interhemal; NCM - núcleo célula membrana interhemal

## 7.DISCUSSÃO

A base genética que define o comportamento e a fisiologia humanas evoluíram em uma condição ambiental distinta da qual a maioria dos humanos vive na atualidade. Durante boa parte desse processo evolutivo, os indivíduos habitavam um ambiente no qual a escassez de alimentos era constantemente uma ameaça (Zink, et al., 2016). Portanto, ocorreu uma seleção por indivíduos que tivessem a capacidade de armazenar o máximo possível de energia dos alimentos, quando houvesse disponibilidade (Eaton and Konner, 1985). Dessa forma, o humano da atualidade possui grande capacidade de acumular gordura, que, associada ao comportamento alimentar atual na sociedade industrializada, é responsável pelo aumento na incidência de obesidade no mundo. Sabendo-se que a obesidade é fator de risco para uma grande diversidade de doenças bem como para problemas gestacionais, é crucial o estudo dessa patologia. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar as consequências do consumo de uma dieta rica em carboidratos e lipídeos (HF/HS) associada a cafeína durante a gestação em modelo murino heterogênico.

Devido as similaridades placentárias com os humanos, bem como a metabolização semelhante da cafeína, foi escolhido para este projeto o camundongo como modelo experimental. Visando obter uma maior representatividade da alta diversidade genética encontrada na população humana foi utilizado uma linhagem heterogênica.

O modelo de dieta HF/HS utilizado tem uma diferença de 472 kcal/dia entre a dieta controle e a dieta enriquecida, quando comparada a uma dieta em humanos, considerando uma dieta padrão de 2000 kcal. Esse aumento de calorias foi dado pelo acréscimo de gordura e açúcar, as quais podem ter contribuído para a palatabilidade da ração, favorecendo o aumento do consumo observado durante o experimento na fase pré-gestacional em ambos os grupos alimentados com a dieta HF/HS. Outro fator a ser considerado é a consistência da ração HF/HS, pois devido a maior quantidade de gordura e açúcar, sua consistência ficou mais macia que a ração controle. Em geral, os roedores necessitam roer objetos e alimentos para haver o desgaste dos dentes (Kono et al., 2020). Dessa forma, os animais dos grupos tratados com essa ração podem ter apenas roído mais a ração ao invés de tê-la consumido, fato comprovado pela constante presença de pedaços de ração depositados no fundo da caixa, não tendo sido notado tal comportamento nos animais que receberam a dieta controle. Comportamento semelhante também foi relatado por Leigh, Kendig & Morris 2019, que avaliaram a palatabilidade de uma dieta, assim como sua capacidade de gerar obesidade, encontrando diferenças no consumo e presença de alimentos nas gaiolas.

Seja pelo aumento de calorias ou pelo aumento de ingestão, ou até mesmo pela associação dos dois fatores, os grupos que receberam a dieta HF/HS obtiveram um ganho de peso maior no período pré-gestacional e, conseqüentemente, apresentaram peso corporal mais alto, assim como maior IMC. Tal fato foi responsável pela obesidade notada em 80,5% de todos os animais que consumiram a dieta HF/HS, até o final do período pré-gestacional, permanecendo significativamente elevado em todo o período gestacional no grupo TC. Apesar dos animais do grupo T120 manterem um IMC e um peso corporal elevados durante todo o período pré gestacional, durante a gestação esse padrão foi alterado. A partir do início da gestação, a cafeína no grupo T120 foi responsável pela redução do peso corporal desses animais, diminuindo, conseqüentemente, o IMC, que foi similar ao do grupo controle. No DG 5.5, o grupo T120 apresentou baixo consumo de ração, podendo estar associado ao menor ganho de peso encontrado no DG 10.5. Tal redução no ganho de peso gestacional afetou o peso corporal desses animais, que a partir do DG 15.5 foi similar ao grupo controle, bem como o IMC. Além disso, ao final do período gestacional já não eram encontrados indivíduos apresentando quadro de obesidade.

Essa redução no peso corporal está diretamente relacionada ao consumo da cafeína, uma vez que já foi demonstrado em estudos em humanos, que o consumo de 100 a 200mg/dia de cafeína afetou o metabolismo, tornando-o até 4% mais rápido, e conseqüentemente, fazendo com que ocorresse um maior gasto energético do que seria esperado (Dulloo et al., 1989; Koot & Deurenberg, 1995). Adicionalmente, o consumo de cafeína está inversamente relacionado a obesidade como demonstrado por Muhammad et al. (2019), que avaliou esta relação na população da Indonésia. O aumento no metabolismo, corrobora também com os achados no grupo que consumiu apenas a cafeína (C120). Neste grupo, foi observado menor ganho de peso em GD 10.5, mesmo diante de um aumento no consumo alimentar em GD5.5. Concomitantemente, em GD 12.5, o IMC desses animais foi inferior ao do grupo controle, demonstrando a alta demanda energética desses animais.

Conforme relatado, o consumo da dieta HF/HS aumentou significativamente o número de indivíduos obesos, sendo a obesidade um fator de risco para diversas doenças crônicas não transmissíveis. Baseado nos resultados encontrados no período pré-gestacional relativos ao teste de tolerância à glicose e à insulina, podemos concluir que os animais que consumiram a dieta HF/HS apresentaram resistência à insulina, uma vez que os níveis glicêmicos permaneceram elevados por um longo período de tempo no teste de tolerância à glicose, além de não ter apresentado queda acentuada no teste de tolerância à insulina. Já os dados bioquímicos revelaram que os níveis de triglicerídeos estavam mais elevados no grupo T120 e

ligeiramente aumentados no grupo TC. Apesar do nível de colesterol total estar mais elevado nos grupos que consumiram a dieta HF/HS, tanto os níveis de HDL quanto de LDL estavam mais elevados nesses animais. É associado ao diabetes tipo 2 uma elevação dos níveis de triglicerídeos e de LDL, assim como uma redução dos níveis de HDL. Apesar do padrão de colesterol HDL ter sido diferente do esperado, pode-se inferir que estes animais possuem uma predisposição a apresentar um quadro de diabetes tipo 2, uma vez que hiperglicemia e hiperinsulinemia são as principais características desse tipo de diabetes. Além disso, modelos de camundongos para diabetes possuem padrão similar ao encontrado neste estudo (Wu & Huan, 2007; Cefalu, 2006; Leiter, 2009). Já tá tendo sido visto também em animais com diabetes tipo II que o consumo de cafeína aumentou o padrão hiperglicêmico (Cardia et al., 2015).

O padrão glicêmico basal dos animais que consumiram cafeína foi alterado após a indução da cronicidade de seu consumo, uma vez que no teste de tolerância à glicose foi encontrado um perfil hiperglicêmico nestes animais. Associado a isso, o nível dos triglicerídeos do grupo C120 foi o mais elevado, em comparação aos dois grupos que não consumiram cafeína. Esse padrão hiperglicêmico e de triglicerídeos está novamente associado a perfil metabólico desses indivíduos que consumiram cafeína, tendo sido previamente relatada a correlação positiva entre o consumo de cafeína e a hiperglicemia (Kashani-Amin et al., 2013; Fredholm, Beaudoin & Graham, 2011).

Os níveis mais elevados de ALT encontrados nos animais do grupo T120 e TC são um indício de que esses animais possuem algum distúrbio metabólico, possivelmente relacionado ao fígado gorduroso ou esteatose hepática não alcoólica, uma vez que os altos índices de ALT são a principal alteração laboratorial encontrada naquela patologia (Amgulo, 2002). Associado à elevação do ALT, encontrou-se aumento no peso do fígado dos animais que consumiram a dieta HF/HS. Esse aumento no peso pode estar correlacionado a uma maior deposição de gordura nos hepatócitos, sendo um indicativo da ocorrência de fígado gorduroso. Além disso, cerca de 30-100% de pessoas acometidas por essa doença apresentam um quadro de obesidade e 10-75% possuem diabetes tipo II, corroborando para a nossa hipótese de que os animais de nosso estudo são acometidos por fígado gorduroso (Amgulo, 2002; Anstee & Goldin, 2006).

A obesidade resulta em alterações bioquímicas sanguíneas, na função cardíaca, e na distribuição de gordura no corpo. A deposição visceral de tecido adiposo, que caracteriza a obesidade da parte superior do corpo, é um dos principais contribuintes para o desenvolvimento de hipertensão, concentrações plasmáticas elevadas de insulina e resistência

à insulina, diabetes mellitus e dislipidemia (Kopelman, 2000; Libby, 2021). Em nossos achados, os grupos TC e T120 que foram alimentados com a dieta HF/HS apresentaram, de forma geral, maior quantidade de gordura corporal em comparação com os animais que receberam a dieta normal. Dessa forma, o acúmulo de gordura, principalmente abdominal, encontrado nos animais deste estudo corrobora com os achados bioquímicos, estando correlacionados a diversas doenças, sugerindo que estes animais possuem diabetes e correm um maior risco de desenvolverem aterosclerose e esteatose hepática não alcoólica.

Todas essas alterações no metabolismo dos animais que consumiram a dieta HF/HS e ou consumiram cafeína modificam a fisiologia, podendo ter efeitos em cascata em outras vias e órgãos desses animais, provavelmente afetando por exemplo a fertilidade e o desenvolvimento fetal no caso de uma gestação. Com base nos parâmetros reprodutivos, podemos perceber que não houve diferença na porcentagem de fêmeas prenhas, mesmo ocorrendo um prolongamento da fase de metaestro nos animais tratados com cafeína. Também não houve diferença no número de fetos vivos e mortos, o que indica que a taxa de ovulação não foi alterada. Entretanto, outras pesquisas já demonstraram que tanto o consumo isolado de cafeína (Dorostghoal M et al, 2011; Cao H et al, 2016), quanto a ingestão de uma dieta HF/HS (Li et al., 2021; Wang et al., 2014; Wu et al., 2016), pode ocasionar alterações na fertilidade.

Apesar de não ter afetado a taxa de fêmeas prenhas e o número de nascidos vivos, a cafeína aumentou significativamente o número de reabsorções nos grupos C120 e T120. Já a dieta HF/HS aumentou o número de fetos mumificados no grupo TC. Esses achados estão associados ao aumento do risco de aborto relatado em mulheres obesas (Chia, et al., 2019; Antoniotti et al., 2018) assim como em mulheres que consomem cafeína (Weng, Odouli & Li, 2008; Srisuphan & Bracken 1986; Fernandes et al., 1998). Demonstra-se assim, o efeito deletério do consumo desses alimentos em excesso durante o período pré-gestacional e inicial da gestação onde ocorre o processo de implantação e início da formação da placenta e desenvolvimento embrionário.

Os maiores índices de reabsorção e mumificados encontrados são um indicativo de que estejam ocorrendo também alterações no processo de formação das placentas e fetos que conseguiram iniciar e prosseguir no processo de desenvolvimento. De fato, foi visto que o peso dos fetos cujas mães consumiram a dieta HF/HS e ou consumiram cafeína foram menores, assim como também foi afetado o comprimento fetal e o peso do fígado nos grupos que consumiram cafeína. Vale destacar que a associação entre a dieta e a cafeína foi significativamente mais prejudicial do que tais fatores isolados, sendo os únicos a serem

acometidos pela restrição intrauterina de crescimento, demonstrado pela relação peso cérebro/peso fígado que indica que o cérebro desses indivíduos foi poupado em relação aos outros órgãos. Essas alterações biométricas fetais estão relacionadas com o desenvolvimento precário da placenta, como foi visto pelo peso reduzido das placentas das fêmeas que consumiram a dieta HF/HS e ou cafeína e pelo diâmetro reduzido devido ao consumo da cafeína. Refletindo na eficiência placentária, que foi menor nos grupos TC e T120 demonstrando que essas placentas não foram capazes de promover o crescimento adequado dos fetos. Estas alterações macroscópicas placentárias estão relacionadas com a alteração na proporção das áreas das placentas, devido ao aumento da zona juncional e decídua dos animais que consumiram a dieta HF/HS. Curiosamente, não houve diferença na proporção volumétrica dos componentes placentários para o grupo TC, mas a associação com a dieta afetou significativamente a proporção de vasos na zona juncional, podendo ser um indicativo de um mecanismo compensatório para aumentar o fluxo sanguíneo que chega na região do labirinto. Não houve alterações na área dos vasos no labirinto, mas houve uma redução do número de células trofoblásticas que constituem a membrana interhemal. Essa membrana é a região onde ocorrem as trocas materno fetais, sendo de grande importância para o desenvolvimento fetal. Conforme demonstrado, essa membrana foi significativamente aumentada por todos os tratamentos, implicando conseqüentemente em uma maior dificuldade de troca, resultando em menos nutrientes chegando ao feto e ocorrendo um desenvolvimento prejudicado do mesmo. Além dos efeitos dos tratamentos sobre o desenvolvimento fetal, foi visto também um efeito relativo ao sexo dos fetos. Observou-se um desenvolvimento prejudicado no sexo feminino, que mesmo tendo uma eficiência placentária maior do que os machos, apresentou fetos mais leves, provavelmente devido a uma maior membrana interhemal.

Todas essas alterações observadas levam ao desenvolvimento de um indivíduo cuja saúde já foi debilitada durante a vida fetal, podendo predispor mais facilmente esses indivíduos a doenças, como previsto pelo conceito de origem do desenvolvimento da saúde e da doença (DOHaD) (Suzuki, 2018). Esse conceito surgiu como resultado de estudos epidemiológicos retrospectivos mostrando as ligações entre o ambiente fetal inicial e o risco de desenvolver doenças posteriormente na vida, tais como a obesidade, hipertensão, diabetes mellitus e fígado gorduroso. Tendo sido comprovado por diversas pesquisas em animais experimentais que mostram que a perturbação dos processos de desenvolvimento pode, de fato, produzir alterações fisiopatológicas e epigenéticas gerando mudanças na prole adulta (Suzuki, 2018). Dessa forma, caso não ocorram alterações na forma como nos alimentamos,

com especial destaque para a alimentação materna durante a gestação, criaremos um ciclo vicioso de doenças, causando alterações cada vez mais profundas nas próximas gerações.

## **8. CONCLUSÃO**

Apesar de tanto o consumo crônico de cafeína quanto o consumo crônico da dieta hipercalórica serem prejudiciais para a saúde materna e para o desenvolvimento fetal, o consumo crônico de dieta hipercalórica, associada ao consumo de cafeína foi ainda mais prejudicial. Tendo sido demonstrado que estes animais possuem um quadro de síndrome metabólica. Que, mesmo não afetando a fertilidade, prejudicou a morfologia placentária bem como os parâmetros biométricos fetais. Esse comprometimento no desenvolvimento fetal está relacionado com a predisposição de doenças como a obesidade, hipertensão e diabetes melitus. Todas essas doenças são um grande problema de saúde pública e poderiam ser evitadas com mudanças alimentares maternas mais adequadas.

## 9. REFERÊNCIAS

- Ambrosetti, V., Guerra, M., Ramírez, L. A., Reyes, A., Alvarez, D., Olguin, S., ... & Cruz, G. (2016). Increase in endogenous estradiol in the progeny of obese rats is associated with precocious puberty and altered follicular development in adulthood. *Endocrine*, 53, 258-270.
- Amgulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *New England journal Med*, 346, 1221-31.
- Andreas E, Reid M, Zhang W, Moley KH. The effect of maternal high-fat/high-sugar diet on offspring oocytes and early embryo development. *Mol Hum Reprod*. 2019 Nov 30;25(11):717-728.
- Anstee, Q. M., & Goldin, R. D. (2006). Mouse models in non - alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *International journal of experimental pathology*, 87(1), 1-16.
- Antoniotti, G. S., Coughlan, M., Salamonsen, L. A., & Evans, J. (2018). Obesity associated advanced glycation end products within the human uterine cavity adversely impact endometrial function and embryo implantation competence. *Human Reproduction*, 33(4), 654–665.
- Barbero, A., Porcu, C., Spezzigu, A., Succu, S., Dattena, M., Gallus, M., ... & Berlinguer, F. (2018). Changes in renal hemodynamics of undernourished fetuses appear earlier than IUGR evidences. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 9(3), 338-343.
- Blencowe, H., Krusevec, J., De Onis, M., Black, R. E., An, X., Stevens, G. A., ... & Cousens, S. (2019). National, regional, and worldwide estimates of low birthweight in 2015, with trends from 2000: a systematic analysis. *The Lancet Global Health*, 7(7), e849-e860.
- Blundell, J. E., Gibbons, C., Beaulieu, K., Casanova, N., Duarte, C., Finlayson, G., ... & Hopkins, M. (2020). The drive to eat in homo sapiens: Energy expenditure drives energy intake. *Physiology & behavior*, 219, 112846.
- Bolon B. Biology of the Ectoplacental Cone. In: Croy A, Yamada AT, DeMayo FJ, Adamson SL. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. London: Elsevier; 2014.
- Bolon, B. (Ed.). (2015). *Pathology of the developing mouse: a systematic approach*. CRC Press.
- Brockmann, G. A., & Bevova, M. R. (2002). Using mouse models to dissect the genetics of obesity. *TRENDS in Genetics*, 18(7), 367-376.
- Burton, G. J., Kaufmann, P & Huppertz, B. (2006) *Anatomy and Genesis of the Placenta In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition* edited by Jimmy D. Neill, Elsevier ©
- Cao H, Ren J, Feng X, Yang G, Liu J. Is caffeine intake a risk factor leading to infertility? A protocol of an epidemiological systematic review of controlled clinical studies. *Systematic Reviews*. 2016;5:45. doi:10.1186/s13643-016-0221-9.

- Cardia, G. F. E., Rodrigues, P. J., Spironello, R. A., Gealh, L., & Cuman, R. K. N. (2015). Efeito da suplementação com cafeína sobre os níveis glicêmicos no diabetes tipo 2 Experimental. *Fiep Bulletin - Online*, 85(2).
- Cefalu, W. T. (2006). Animal models of type 2 diabetes: clinical presentation and pathophysiological relevance to the human condition. *ILAR journal*, 47(3), 186-198.
- Cetin, I., Ronzoni, S., Marconi, A. M., Perugino, G., Corbetta, C., Battaglia, F. C., & Pardi, G. (1996). Maternal concentrations and fetal-maternal concentration differences of plasma amino acids in normal and intrauterine growth-restricted pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology*, 174(5), 1575-1583.
- Chia, A.-R., Chen, L.-W., Lai, J. S., Wong, C. H., Neelakantan, N., van Dam, R. M., & Chong, M. F.-F. (2019). Maternal Dietary Patterns and Birth Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Advances in Nutrition*.
- Chiarini-Garcia H, Parreira G; Almeida F.R.C.L. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. In: Chiarini-Garcia H, Melo RCN. *Light Microscopy: Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press. 2011:3-18.
- Chin, E. H., Schmidt, K. L., Martel, K. M., Wong, C. K., Hamden, J. E., Gibson, W. T., ... & Christians, J. K. (2017). A maternal high-fat, high-sucrose diet has sex-specific effects on fetal glucocorticoids with little consequence for offspring metabolism and voluntary locomotor activity in mice. *PLoS One*, 12(3), e0174030.
- Christian, M.S., Brent, R.L. 2001. Teratogen Update: Evaluation of the reproductive and Chin, E. H., Schmidt, K. L., Martel, K. M., Wong, C. K., Hamden, J. E., Gibson, W. T., ... & Christians, J. K. (2017). A maternal high-fat, high-sucrose diet has sex-specific effects on fetal glucocorticoids with little consequence for offspring metabolism and voluntary locomotor activity in mice. *PLoS One*, 12(3), e0174030.
- developmental risks of caffeine. *Teratology*; 64:51–78.
- Clark, I., & Landolt, H. P. (2017). Coffee, caffeine, and sleep: A systematic review of epidemiological studies and randomized controlled trials. *Sleep Medicine Reviews*, 31, 70–78.
- Cora, M. C.; Kooistra, L.; Travlos, G. *Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse. Toxicologic Pathology*, v. 43, n. 6, p. 776–793, 3 ago. 2015.
- Crossey, P. A., Pillai, C. C., & Miell, J. P. (2002). Altered placental development and intrauterine growth restriction in IGF binding protein-1 transgenic mice. *The Journal of clinical investigation*, 110(3), 411-418.
- Croy, A., Yamada, A.T., DeMayo, F.J., Adamson, S.L. 2014. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. London: Elsevier; 808p.
- Darren C. Greenwood; Caffeine intake during pregnancy and adverse birth outcomes: a systematic review and dose–response meta-analysis, *European Journal of Epidemiology*, October 2014, Volume 29, Issue 10, pp 725–734

dePaula, J., & Farah, A. (2019). Caffeine consumption through coffee: Content in the beverage, metabolism, health benefits and risks. *Beverages*, 5(2), 37.

Díaz, P., Harris, J., Rosario, F. J., Powell, T. L., & Jansson, T. (2015). Increased placental fatty acid transporter 6 and binding protein 3 expression and fetal liver lipid accumulation in a mouse model of obesity in pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(12), R1569–R1577.

Dorostghoal M, Majd NE, Nooraei P. Maternal caffeine consumption has irreversible effects on reproductive parameters and fertility in male offspring rats. *Clin Exp Reprod Med*. 2012 Dec;39(4):144-152.

Dulloo, A. G., Geissler, C. A., Horton, T., Collins, A., & Miller, D. S. (1989). Normal caffeine consumption: influence on thermogenesis and daily energy expenditure in lean and postobese human volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 49(1), 44-50.

Eaton B. and Konner. M. Paleolithic Nutrition. (1985). *New England Journal of Medicine*, 312(22), 1458–1459.

Eckel, R. H., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2005). The metabolic syndrome. *The lancet*, 365(9468), 1415-1428.

Eckel, R. H., Alberti, K. G., Grundy, S. M., & Zimmet, P. Z. (2010). The metabolic syndrome. *The lancet*, 375(9710), 181-183.

Enriori, P. J., Evans, A. E., Sinnayah, P., Jobst, E. E., Tonelli-Lemos, L., Billes, S. K., ... & Cowley, M. A. (2007). Diet-induced obesity causes severe but reversible leptin resistance in arcuate melanocortin neurons. *Cell metabolism*, 5(3), 181-194.

Felicioni, F., Santos, T. G., e Paula, T. D. M. D., Chiarini-Garcia, H., & de Almeida, F. R. C. L. (2019). Intrauterine growth restriction: screening and diagnosis using animal models. *Animal Reproduction*, 16(1), 66.

Fenster, L., Eskenazi, B., Windham, G. C., & Swan, S. H. (1991). Caffeine consumption during pregnancy and fetal growth. *American Journal of Public Health*, 81(4), 458-461.

Fernandes, O. Sabharwal M, Smiley T, Pastuszak A, Koren G, Einarson T. (1998) Moderate to heavy caffeine consumption during pregnancy and relationship to spontaneous abortion and abnormal fetal growth: a meta-analysis. *Reprod Toxicol*, 12, 435-444.

Fredholm, B. B., Beaudoin, M. S., & Graham, T. E. (2011). Methylxanthines and human health: epidemiological and experimental evidence. *Methylxanthines*, 509-548.

Goodman, Barbara E. (2010). "Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans." *Advances in physiology education* 34.2 : 44-53

Grosso LM, Bracken MB. Caffeine metabolism, genetics, and perinatal outcomes: a review of exposure assessment considerations during pregnancy. *Ann Epidemiol* 2005; 15: 460-6. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2004.12.0>.

- Guelinckx, I., Devlieger, R., Beckers, K., & Vansant, G. (2008). Maternal obesity: pregnancy complications, gestational weight gain and nutrition. *Obesity reviews*, 9(2), 140-150.
- Hales, C. N., & Barker, D. J. (2001). The thrifty phenotype hypothesis: Type 2 diabetes. *British medical bulletin*, 60(1), 5-20.
- Hawkes, C. (2015). *Diet, Chronic Disease And The Food System: Making The Links, Pushing For Change*.
- Hemberger, M., Hanna, C. W., & Dean, W. (2020). 100ml . *Nature Reviews Genetics*, 21(1), 27-43.
- Hennington, B. S., & Alexander, B. T. (2013). Linking intrauterine growth restriction and blood pressure: insight into the human origins of cardiovascular disease. *Circulation*, 128(20), 2179-2180.
- Higginson, A. D., McNamara, J. M., & Houston, A. I. (2016). Fatness and fitness: exposing the logic of evolutionary explanations for obesity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283(1822), 20152443.
- Huang, J., Zhou, S., Ping, J., Pan, X., Liang, G., Xu, D., et al. 2012. Role of p53-dependent placental apoptosis in the reproductive and developmental toxicities of caffeine in rodents. *Clin Exp Pharmacol Physiol*;39:357-63.
- Hudson, Pat. (2014). *The industrial revolution*. Bloomsbury Publishing, .
- Jahanfar, S., Jaafar, S.H. 2015. Effects of restricted caffeine intake by mother on fetal, neonatal and pregnancy outcomes. *Cochrane Database of Systematic Reviews*; Issue 6.
- Jahan-Mihan, A., Rodriguez, J., Christie, C., Sadeghi, M., & Zerbe, T. (2015). The role of maternal dietary proteins in development of metabolic syndrome in offspring. *Nutrients*, 7(11), 9185-9217.
- Jideani, A. I., Mutshinyani, A. P., Maluleke, N. P., Mafukata, Z. P., Sithole, M. V., Lidovho, M. U., ... & Matshisevhe, M. M. (2020). Impact of Industrial Revolutions on Food Machinery-An Overview. *Journal of Food Research*, 9(5), 42-52.
- Julie Lyngs; Association between coffee or caffeine consumption and fecundity and fertility: a systematic review and dose–response meta-analysis, december 2017
- Kaplan, H., Hooper, P. L., Gatz, M., Mack, W. J., Law, E. M., Chui, H. C., ... & Irimia, A. (2023). Brain volume, energy balance, and cardiovascular health in two nonindustrial South American populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(13), e2205448120.
- Kashani-Amin, E., Yaghmaei, P., Larijani, B., & Ebrahim-Habibi, A. (2013). Xanthine derivatives as activators of alpha-amylase: Hypothesis on a link with the hyperglycemia induced by caffeine. *Obesity Research & Clinical Practice*, 7(6), e487-e493.

- Kelly, A. C., Powell, T. L., & Jansson, T. (2020). Placental function in maternal obesity. *Clinical Science*, 134(8), 961-984.
- Kono, K., Tanikawa, C., Murata, Y., Yanagita, T., Kamioka, H., & Yamashiro, T. (2020). Three-dimensional changes in the craniofacial complex associated with soft-diet feeding. *European Journal of Orthodontics*, 42(5), 509-516.
- Koot, P., & Deurenberg, P. (1995). Comparison of changes in energy expenditure and body temperatures after caffeine consumption. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 39(3), 135-142.
- Kopelman, P. G. (2000). Obesity as a medical problem. *Nature*, 404(6778), 635-643.
- Laureano-Melo, R., da Silveira, A. L. B., de Azevedo Cruz Seara, F., da Conceição, R. R., da Silva-Almeida, C., Marinho, B. G., ... & Côrtes, W. D. S. (2016). Behavioral profile assessment in offspring of Swiss mice treated during pregnancy and lactation with caffeine. *Metabolic brain disease*, 31, 1071-1080.
- Larsen, C. S. (1995). Biological Changes in Human Populations with Agriculture. *Annual Review of Anthropology*, 24(1), 185-213.
- Leigh, S.-J., Kendig, M. D., & Morris, M. J. (2019). Palatable Western-style Cafeteria Diet as a Reliable Method for Modeling Diet-induced Obesity in Rodents. *Journal of Visualized Experiments*, (153).
- Leiter, E. H. (2009). Selecting the “right” mouse model for metabolic syndrome and type 2 diabetes research. *Type 2 Diabetes: Methods and Protocols*, 1-17.
- Libby, P. (2021). The changing landscape of atherosclerosis. *Nature*, 592(7855), 524-533.
- Li HP, Chen X, Li MQ. Gestational diabetes induces chronic hypoxia stress and excessive inflammatory response in murine placenta. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(4):650-9. Epub 2013 Mar 15. PMID: 23573311; PMCID: PMC3606854.
- Lima, K. S. et al. Efeitos do metilfenidato sobre as glândulas salivares maternas de camundongos. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 45, n. 6, p. 316-321, 21 nov. 2016.
- Li, Q., Guo, S., Yang, C., Liu, X., Chen, X., He, J., ... & Gao, R. (2021). High-fat diet-induced obesity primes fatty acid  $\beta$ -oxidation impairment and consequent ovarian dysfunction during early pregnancy. *Annals of Translational Medicine*, 9(10).
- Magenis, M. L., Damiani, A. P., Franca, I. B., de Marcos, P. S., Effting, P. S., Muller, A. P., ... & de Andrade, V. M. (2022). Behavioral, genetic and biochemical changes in the brain of the offspring of female mice treated with caffeine during pregnancy and lactation. *Reproductive Toxicology*, 112, 119-135.
- Marconi, A. M., Paolini, C., Buscaglia, M., Zerbe, G., Battaglia, F. C., & Pardi, G. (1996). The impact of gestational age and fetal growth on the maternal-fetal glucose concentration difference. *Obstetrics & Gynecology*, 87(6), 937-942.

- Martin-Gronert, M. S., & Ozanne, S. E. (2006). Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring.
- Martin, T. R., & Bracken, M. B. (1987). The association between low birth weight and caffeine consumption during pregnancy. *American Journal of Epidemiology*, 126(5), 813-821.
- Ma, Z.L., Wan, G., Lu, W., Cheng, X., Chuai, M., et al. 2015. Investigating the effect of excess caffeine exposure on placental angiogenesis using chicken 'functional' placental blood vessel network. *J. Appl. Toxicol.*
- Merle, L., Person, O., Bonnet, P., Grégoire, S., Soubeyre, V., Grosmaître, X., & Jarriault, D. (2019). Maternal high fat high sugar diet disrupts olfactory behavior but not mucosa sensitivity in the offspring. *Psychoneuroendocrinology*.
- Mose, T., Kjaerstad, M.B., Mathiesen, L., Nielsen, J.B., Edelfors, S., Knudsen, L.E. 2008. Placental passage of benzoic acid, caffeine, and glyphosate in an ex vivo human perfusion system. *J Toxicol Environ Health*; 71: 984–991.
- Muhammad, H. F. L., Sulistyoningrum, D. C., Huriyati, E., Lee, Y. Y., & Manan Wan Muda, W. A. (2019). The interaction between coffee: caffeine consumption, UCP2 gene variation, and adiposity in adults—a cross-sectional study. *Journal of nutrition and metabolism*, 2019.
- Nair, A. B., & Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of basic and clinical pharmacy*, 7(2), 27.
- Napso, T., Lean, S. C., Lu, M., Mort, E. J., Desforges, M., Moghimi, A., ... & Sferruzzi - Perri, A. N. (2022). Diet - induced maternal obesity impacts fetoplacental growth and induces sex - specific alterations in placental morphology, mitochondrial bioenergetics, dynamics, lipid metabolism and oxidative stress in mice. *Acta Physiologica*, 234(4), e13795.
- Nazni, P. (2014)“Association of western diet & lifestyle with decreased fertility.” *The Indian journal of medical research* vol. 140 Suppl,Suppl 1 : S78-81
- Neill, B. O. Is this what you call junk food? 2006 [Last Updated: Thursday, 30 November 2006, 18: 48 GMT] Available from. [news.bbc.co.uk/2/hi/uk\\_news/magazine/6187234.stm](http://news.bbc.co.uk/2/hi/uk_news/magazine/6187234.stm).
- (NDA) - Scientific opinion on the safety of caffeine. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. *EFSA J* 2015; 13:4102.
- Nogues, P., Dos Santos, E., Couturier-Tarrade, A., Berveiller, P., Arnould, L., Lamy, E., ... & Dieudonne, M. N. (2021). Maternal obesity influences placental nutrient transport, inflammatory status, and morphology in human term placenta. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 106(4), 1880-1896.
- O'Callaghan, F., Muurlink, O., & Reid, N. (2018). Effects of caffeine on sleep quality and daytime functioning. *Risk Management and Healthcare Policy*, Volume 11, 263–271.
- Paula, T. M. D. Alterações estruturais placentárias e do desenvolvimento fetal decorrentes do consumo crônico de cafeína durante a gestação em camundongos. 2017. 62 p. Dissertação

(Mestrado em Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2017.

Pennington, K. A., Dong, Y., Ruano, S. H., van der Walt, N., Sangi-Haghpeykar, H., & Yallampalli, C. (2020). Brief high fat high sugar diet results in altered energy and fat metabolism during pregnancy in mice. *Scientific Reports*, 10(1), 20866.

Pennington, K. A., van der Walt, N., Pollock, K. E., Talton, O. O., & Schulz, L. C. (2017). Effects of acute exposure to a high-fat, high-sucrose diet on gestational glucose tolerance and subsequent maternal health in mice. *Biology of reproduction*, 96(2), 435-445.

Pijnenborg, R., Bland, J. M., Robertson, W. A., & Brosens, I. (1983). Uteroplacental arterial changes related to interstitial trophoblast migration in early human pregnancy. *Placenta*, 4(4), 397-413.

Potdar, N. (2010). Maternal caffeine consumption and its relationship to adverse pregnancy outcomes (Doctoral dissertation, University of Leicester).

Qian, J., Zhang, Y., Qu, Y., Zhang, L., Shi, J., Zhang, X., ... & Zhang, Y. (2018). Caffeine consumption during early pregnancy impairs oviductal embryo transport, embryonic development and uterine receptivity in mice. *Biology of reproduction*, 99(6), 1266-1275.

Rashid, C. S., Bansal, A., & Simmons, R. A. (2018). Oxidative stress, intrauterine growth restriction, and developmental programming of type 2 diabetes. *Physiology*, 33(5), 348-359.

Rhee, J., Kim, R., Kim, Y., Tam, M., Lai, Y., Keum, N., & Oldenburg, C. E. (2015). Maternal caffeine consumption during pregnancy and risk of low birth weight: a dose-response meta-analysis of observational studies. *PloS one*, 10(7), e0132334.

Rhee, J. S., Saben, J. L., Mayer, A. L., Schulte, M. B., Asghar, Z., Stephens, C. Moley, K. H. (2016). Diet-induced obesity impairs endometrial stromal cell decidualization: a potential role for impaired autophagy. *Human Reproduction*, 31(6), 1315–1326.

Rosario, F. J., Powell, T. L., & Jansson, T. (2016). Activation of placental insulin and mTOR signaling in a mouse model of maternal obesity associated with fetal overgrowth. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(1), R87–R93.

Saben, J. L., Asghar, Z., Rhee, J. S., Drury, A., Scheaffer, S., & Moley, K. H. (2016). Excess Maternal Fructose Consumption Increases Fetal Loss and Impairs Endometrial Decidualization in Mice. *Endocrinology*, 157(2), 956–968.

Samson, S. L., & Garber, A. J. (2014). Metabolic syndrome. *Endocrinology and Metabolism Clinics*, 43(1), 1-23.

Sesardic, D., Pasanen, M., Pelkonen, O., Boobis, A.R. 1990. Differential expression and regulation of members of the cytochrome P4501A gene subfamily in human tissues. *Carcinogenesis*; 11:1183– 88.

- Shilo, L., Sabbah, H., Hadari, R., Kovatz, S., Weinberg, U., Dolev, S. Shenkman, L. (2002). The effects of coffee consumption on sleep and melatonin secretion. *Sleep Medicine*, 3(3), 271–273.
- Silva, C. G., M étin. C., Fazeli, W., Machado, NJ, Darmopil, S., Launay, PS, Ghestem, A., Nesa, MP, Bassot, E., Szab ó, E. (2013), Adenosine Receptor Antagonists Including Caffeine Alter Fetal Brain Development in Mice. *Sci. Transl. Med.* 5, 197ra104-197ra104
- Simmons, D. G. (2014). Postimplantation development of the chorioallantoic placenta. In *The guide to investigation of mouse pregnancy* (pp. 143-161). Academic Press.
- Smith, S. E., McElhatton, P. R., & Sullivan, F. M. (1987). Effects of administering caffeine to pregnant rats either as a single daily dose or as divided doses four times a day. *Food and chemical toxicology*, 25(2), 125-133.
- Snel, J., & Lorist, M. M. (2011). Effects of caffeine on sleep and cognition. *Human Sleep and Cognition Part II - Clinical and Applied Research*, 105–117.
- Speakman, J. R. (2008). Thrifty genes for obesity, an attractive but flawed idea, and an alternative perspective: the ‘drifty gene’ hypothesis. *International journal of obesity*, 32(11), 1611-1617.
- Srisuphan, W., & Bracken, M. B. (1986). Caffeine consumption during pregnancy and association with late spontaneous abortion. *American journal of obstetrics and gynecology*, 154(1), 14-20.
- Suzuki, K. (2018). The developing world of DOHaD. *Journal of developmental origins of health and disease*, 9(3), 266-269.
- Tsutsumi K, Kotegawa T, Matsuki S, Tanaka Y, Ishii Y, Kodama Y, et al. The effect of pregnancy on cytochrome p4501a2, xanthine oxidase, and n-acetyltransferase activities in humans. *ClinPharmacolTher.* 2001;70:121–125.
- Ulijaszek, S. (2002). Human eating behaviour in an evolutionary ecological context. *Proceedings of the Nutrition Society*, 61(4), 517-526.
- Veile, A. (2018). Hunter-gatherer diets and human behavioral evolution. *Physiology & behavior*, 193, 190-195.
- Villas Boas, G. R. et al. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from guavira fruits (*Campomanesia pubescens* (D.C.) O. BERG) in experimental models of acute and short-term toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 118, n. March, p. 1–12, 2018.
- Wang, N., Luo, L. L., Xu, J. J., Xu, M. Y., Zhang, X. M., Zhou, X. L., ... & Fu, Y. C. (2014). Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism*, 63(1), 94-103.
- Wells, J. C. (2006). The evolution of human fatness and susceptibility to obesity: an ethological approach. *Biological Reviews*, 81(2), 183-205.

Weng, X., Odouli, R., & Li, D. K. (2008). Maternal caffeine consumption during pregnancy and the risk of miscarriage: a prospective cohort study. *American journal of obstetrics and gynecology*, 198(3), 279-e1.

WHO. World Health Organization, 2021. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1)

WHO. World Health Organization, 2022. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/obesity#tab=tab_1)

Wu, K. K., & Huan, Y. (2007). Diabetic atherosclerosis mouse models. *Atherosclerosis*, 191(2), 241-249.

Wu, Y., Zhang, Z., Liao, X., Qi, L., Liu, Y., & Wang, Z. (2016). Effect of high-fat diet-induced obesity on the Akt/FoxO/Smad signaling pathway and the follicular development of the mouse ovary. *Molecular medicine reports*, 14(4), 3894-3900.

Yadegari, M., Khazaei, M., Anvari, M., & Eskandari, M. (2016). Prenatal Caffeine Exposure Impairs Pregnancy in Rats. *International Journal of Fertility & Sterility*, 9(4), 558–562.

Zink, K., Lieberman, D. (2016). Impact of meat and Lower Palaeolithic food processing techniques on chewing in humans. *Nature* 531, 500–503 .