



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DA SOBRENUTRIÇÃO
PÓS-NATAL PRECOCE EM RATAS *WISTAR* PROVENIENTES DA
REDUÇÃO DE NINHADA DURANTE A LACTAÇÃO: Consequências
na primeira e segunda geração**

KEYTIANE DE JESUS VIANA AMARAL

GOIÂNIA-GO

2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

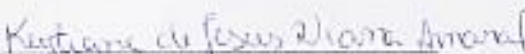
Nome completo do autor: Keytiane de Jesus Viana Amaral

Título do trabalho: EFEITOS METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE EM RATAS WISTAR PROVENIENTES DA REDUÇÃO DE NINHADA DURANTE A LACTAÇÃO: Consequências na primeira e segunda geração

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura da autora²

Ciente e de acordo:


Assinatura do orientador²

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

² A assinatura deve ser escaneada.

KEYTIANE DE JESUS VIANA AMARAL

**EFEITOS METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DA SOBRENUTRIÇÃO
PÓS-NATAL PRECOCE EM RATAS *WISTAR* PROVENIENTES DA
REDUÇÃO DE NINHADA DURANTE A LACTAÇÃO: Consequências
na primeira e segunda geração**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Mazaro e Costa

GOIÂNIA-GO

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Amaral, Keytiane de Jesus Viana
EFEITOS METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DA
SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE EM RATAS WISTAR
PROVENIENTES DA REDUÇÃO DE NINHADA DURANTE A
LACTAÇÃO: Consequências na primeira e segunda geração
[manuscrito] / Keytiane de Jesus Viana Amaral. - 2019.
119 f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes; co-orientadora Dra.
Renata Mazaro e Costa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Obesidade. 2. Programação metabólica. 3. Desenvolvimento físico
e sensorio-motor. 4. Reprodução.. 5. Puberdade.. I. Gomes, Rodrigo
Mello, orient. II. Título.

CDU 612



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 497**
2 Aos dezessete dias do mês de abril do ano de dois mil e dezenove, às nove
3 horas , no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade
4 Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof.
5 Dr. Rodrigo Mello Gomes, Profa. Dra. Flávia Campos Corgosinho e Profa. Dra.
6 Veridiana Mota Moreira Lima para, em sessão pública presidida pelo primeiro
7 examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada
8 "EFEITOS METABÓLICOS E REPRODUTIVOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL
9 PRECOCE EM RATAS WISTAR PROVENIENTES DA REDUÇÃO DE NINHADA
10 DURANTE A LACTAÇÃO: Consequências na primeira e segunda geração", em
11 nível de mestrado, área de concentração em Farmacologia e Fisiologia, de
12 autoria de **Keytiane de Jesus Viana Amaral**, discente do Programa de Pós-
13 Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão
14 foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da
15 banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação que em cerca
16 de 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a
17 apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o
18 sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à
19 avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1491
20 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que
21 regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a
22 dissertação foi Aprovada, considerando-se integralmente cumprido este
23 requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela
24 Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da
25 entrega da versão definitiva da dissertação na Secretaria do programa, com as
26 devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

27 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às
28 12 horas e 10 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de
29 dissertação e, para constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em
30 Administração da Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências
31 Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após
32 lida e aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três
33 vias de igual teor.

34
35
36
37 **Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes**

38 **Presidente da Banca**

39 **Universidade Federal de Goiás**

40
41
42 **Profa. Dra. Flávia Campos Corgosinho**

43 **Universidade Federal de Goiás**

44
45
46 **Profa. Dra. Veridiana Mota Moreira Lima**

47 **Faculdade Araguaia**

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus, autor da minha vida, que iluminou meu caminho e me deu forças para vencer todas as dificuldades; a meu esposo Suzimar, pelo carinho, amor, compreensão e companheirismo; aos meus filhos Elias e Ester, para que entendam que o futuro é feito a partir da constante dedicação do presente; ao professor orientador Rodrigo, pela oportunidade, paciência, ensinamentos e confiança.

Agradecimentos

À Deus, por me guiar nesse trabalho, pela paciência e amor. Por me dar força, ânimo e fé para superar todas as dificuldades, não desistir e continuar lutando por este meu sonho e objetivo de vida. A Ele, toda minha gratidão.

A meu esposo Luzimar Domingues do Amaral, pela paciência, amor, compreensão e companheirismo. Aos meus filhos Elias Domingues Viana e Ester Domingues Viana, por acreditarem no meu sonho e entenderem a minha dedicação aos estudos. Aos meus pais Manoel Domingues Viana e Maria dos Anjos de Jesus Viana, pelo apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Goiás, pelo ambiente propício à evolução e crescimento, e aos laboratórios pelas colaborações.

Ao professor orientador Rodrigo Mello Gomes, pelo apoio, confiança e oportunidade que me deu em ser sua aluna. Pelos ensinamentos e empenho dedicado à elaboração deste trabalho.

À professora co-orientadora Renata Mazaro e Costa, pelas orientações e incentivos.

À Monaliza Lopes dos Santos, Renata Karine de Carvalho e Jordana Andrade, alunas da professora Renata Mazaro e Costa, pelas colaborações sobre reprodução.

À Alba Valéria Melo de Araújo, Raquel Alves Cardoso, Carolina de Cubas Ramos, Lucas Ferreira Araújo, Dhiógenes Balsanufu Taveira Campos, Larissa Cristina dos Santos Ribeiro Coutinho, alunos de iniciação científica do professor Rodrigo Mello Gomes, pelas colaborações no desenvolvimento do trabalho.

Ao Marcos Divino Ferreira Júnior, aluno de mestrado do professor Rodrigo Mello Gomes, pelas muitas colaborações neste trabalho.

À Amanda de Sá Martins Bessa, aluna de mestrado do professor Carlos Castro, pelas colaborações na identificação do ciclo estral das ratas.

À Naiara Cristina de Souza Ribeiro, aluna de doutorado da professora Fernanda Cristina Alcântara dos Santos, pelas colaborações na histologia.

Aos professores colaboradores Gustavo Rodrigues Pedrino, Fernanda Cristina Alcântara dos Santos e Paulo Cézar de Freitas Mathias pelas colaborações.

À Fapeg, pelo incentivo financeiro, que em muito me auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, pelas críticas e sugestões necessárias ao aperfeiçoamento de meu trabalho.

A todos, que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação. Muito obrigada.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	08
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	16
Resumo	17
Abstract	19
1. INTRODUÇÃO	21
1.1 TECIDO ADIPOSEO	21
1.1.1 Leptina	23
1.1.2 Adiponectina	24
1.1.3 Resistina	25
1.1.4 Visfatina	26
1.1.5 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	26
1.1.6 Interleucina-6 (IL-6)	27
1.1.7 Inibidor do Fator Ativador de Plasminogênio 1 (PAI-1)	28
1.2 METABOLISMO E REPRODUÇÃO	28
1.3 EPIGENÉTICA E PROGRAMAÇÃO METABÓLICA	34
1.4 MODELOS DE OBESIDADE	37
1.5 JUSTIFICATIVA	39
2 OBJETIVO GERAL	41
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
2.1.1 Fêmeas da geração F1	41
2.1.2 Fêmeas e machos da Geração F2	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS	42
3.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E METABÓLICOS	46
3.2.1 Avaliação da massa corporal e consumo alimentar	46
3.2.2 Avaliação das massas de gorduras, fígado e pâncreas	46
3.2.3 Consumo de leite pelos filhotes F2	46
3.3 PARÂMETROS REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS DE F1	47
3.3.1 Instalação da puberdade	47
3.3.2 Frequência do ciclo estral	47
3.3.3 Comportamento sexual	50
3.3.4 Comportamento maternal	56
3.3.5 Fertilidade	59
3.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS DE F1	60

3.5	EUTANÁSIA E COLETA DE ÓRGÃOS DE F1	60
3.5.1	Nulíparas (A1)	60
3.5.2	Gestantes (A2)	61
3.5.3	Lactantes (A3)	61
3.6	ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS DE F1	61
3.7	WESTERN BLOT DE OVÁRIOS	62
3.8	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO, SENSORIO-MOTOR E REPRODUTIVO NA PROLE F2	62
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	69
4	RESULTADOS	70
4.1	Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce sobre parâmetros biométricos e metabólicos da geração F1	70
4.2	Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce sobre parâmetros biométricos e metabólicos da geração F2	73
4.3	Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce sobre parâmetros reprodutivos e comportamentais de ratas F1	74
4.4	Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce sobre parâmetros bioquímicos de F1	78
4.5	Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce de f1 sobre o desenvolvimento físico, sensorio-motor e reprodutivo da prole F2	80
4.6	Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce sobre glândula mamária, ovário e útero de F1	82
4.7	Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce sobre a expressão dos receptores ER α e ER β em ovários de F1	86
5	DISCUSSÃO	87
	REFERÊNCIAS	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1	ANIMAL 1
A2	ANIMAL 2
A3	ANIMAL 3
AdipoR1	RECEPTOR DE ADIPONECTINA TIPO 1
AdipoR2	RECEPTOR DE ADIPONECTINA TIPO 2
AMPK	PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR ADENOSINA MONOFOSFATO
ARC	NÚCLEO ARQUEADO DO HIPOTÁLAMO
ASC	ÁREA SOB A CURVA
CEUA	COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CG	CÉLULAS DA GRANULOSA
CL	COEFICIENTE DE LORDOSE
cl	CORPOS LÚTEOS
CONCEA	CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
CT	CÉLULAS DA TECA
DCiF	DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
DGes	DIA GESTACIONAL
DLac	DIA LACTACIONAL
DM	<i>DIABETES MELLITUS</i>
DM1	<i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 1
DM2	<i>DIABETES MELLITUS</i> TIPO 2
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
EPM	ERRO PADRÃO DA MÉDIA
ER	RECEPTORES DE ESTROGÊNIO
ER α	RECEPTORES DE ESTROGÊNIO TIPO ALFA
ER β	RECEPTORES DE ESTROGÊNIO TIPO BETA
ESR1	GENE DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO TIPO 1
ESR2	GENE DO RECEPTOR DE ESTROGÊNIO TIPO 2
F0	PAIS
F1	PRIMEIRA GERAÇÃO

F2	SEGUNDA GERAÇÃO
FSH	HORMÔNIO FOLÍCULO-ESTIMULANTE
GABA	ÁCIDO GAMA-AMINOBUTÍRICO
GAPDH	PROTEÍNA GLICERALDEÍDO-3-FOSFATO DESIDROGENASE
GCF2	GRUPO CONTROLE GERAÇÃO F2
GH	HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
GLUT-4	TRANSPORTADOR DE GLICOSE 4
GnRH	HORMÔNIO LIBERADOR DE GONADOTROFINA
GOF2	GRUPO OBESIDADE GERAÇÃO F2
GP	GRAU DO PARÂMETRO
HDL	<i>HIGH DENSITY LIPOPROTEINS</i>
HE	HEMATOXILINA E EOSINA
HPG	EIXO HIPOTALÂMICO-HIPOFISÁRIO-GONADAL
HRP	ENZIMA <i>HORSERADISH PEROXIDASE</i>
ICB	INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
ICV	INTRACEREBROVENTRICULAR
IGF-1	FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA-1
IGFBP	PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO AO FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA
IL-6	INTERLEUCINA-6
IL-6R	RECEPTOR DE INTERLEUCINA-6
IMC	ÍNDICE DE MASSA CORPORAL
IP	INTRAPERITONEAL
IRS-1	SUBSTRATO-1 DO RECEPTOR DA INSULINA
LDL	<i>LOW DENSITY LIPOPROTEINS</i>
LH	HORMÔNIO LUTEINIZANTE
mRNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO
MSG	L-GLUTAMATO MONOSSÓDICO
NA	NORADRENALINA
NAD	NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO
NL	<i>NORMAL LITTER</i>
NP	NÍVEL DE PROCEPTIVIDADE
NR	NÍVEL DE RECEPTIVIDADE

OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
PAI	INIBIDOR DO FATOR ATIVADOR DE PLASMINOGÊNIO
PAI-1	INIBIDOR DO FATOR ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO 1
PAI-2	INIBIDOR DO FATOR ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO 2
PAI-3	INIBIDOR DO FATOR ATIVADOR DO PLASMINOGÊNIO 3
PN	PÓS-NATAL
PPAR γ	RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADOR DE PEROXISSOMA
RCIU	RESTRIÇÃO DE CRESCIMENTO INTRAUTERINO
RNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
SDS	DODECIL SULFATO DE SÓDIO
SDS-PAGE	DODECIL SULFATO DE SÓDIO DE POLIACRILAMIDA
SHBG	GLOBULINA LIGADORA DE HORMÔNIOS SEXUAIS
SI	SÍTIOS DE IMPLANTAÇÃO
SL	<i>SMALL LITTER</i>
SM	SÍNDROME METABÓLICA
SNC	SISTEMA NERVOSO CENTRAL
SOP	SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS
SR	SÍTIOS DE REABSORÇÃO
TAB	TECIDO ADIPOSEO BRANCO
TAM	TECIDO ADIPOSEO MARROM
TG	TRIGLICÉRIDES
TNF- α	FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA
Tris-HCL	TRIS HIDROCLORETO
UFG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
UNICEF	FUNDO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA A INFÂNCIA
VF	VIABILIDADE FETAL

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Modelo redução de ninhada (geração F1). Grupo controle (NLF1) com 9 filhotes (A) e grupo obesidade (SLF1) com 3 filhotes (B).	44
FIGURA 2	Identificação do sexo dos filhotes. Filhote fêmea com distância anogenital menor (esquerda), macho, com distância anogenital maior (direita).	44
FIGURA 3	Delineamento experimental. E – Eutanásia; DGes19 – Dia Gestacional 19; DLac22 – Dia Lactacional 22. F0 – Pais. F1 – Primeira geração. F2 – Segunda geração. PN – Dia Pós-Natal.	46
FIGURA 4	Pesagem de filhote em balança analítica.	48
FIGURA 5	Fases do ciclo estral. Proestro (A-B), estro (C-D), diestro (E-F) e metaestro (G-H). Lavado vaginal a fresco com solução salina. Fotomicrografia com aumento de 100x e 400x, respectivamente.	50
FIGURA 6	Comportamento sexual: proceptividade. A-C : corridas e saltos. D : apresentação da genitália. E : aproximação do macho.	52
FIGURA 7	Comportamento sexual: rata não receptiva e não proceptiva apresentando comportamentos de fuga e chutes (círculos em destaque).	53
FIGURA 8	Comportamento sexual: receptividade - acasalamento de ratos, vista lateral, mostrando sequência de lordose da fêmea.	55
FIGURA 9	Tipos de lordose, segundo Hardy & DeBold (1972). Sem lordose (A), lordose marginal (B), lordose normal (C), lordose exagerada (D).	55
FIGURA 10	Lavado vaginal para confirmação da prenhez. Presença de espermatozoides e clusters de células epiteliais. Aumento de 100x.	56
FIGURA 11	Comportamento materno. Latência de retorno do 1º filhote (A), 2º filhote (B), 3º filhote (C) e todos os filhotes no ninho (D). Observe a mãe com o filhote na boca (círculo) levando-os para o ninho (seta)	58
FIGURA 12	Comportamento materno. Mãe amamentando os filhotes no ninho (A), mãe explorando a caixa com filhotes no ninho (B), mãe explorando a caixa com filhotes fora do ninho (C), mãe se auto limpando (seta) com filhotes no ninho (D).	59
FIGURA 13	A : laparotomia em fêmea grávida. B : útero gravídico com fetos e placentas. C : feto (1) ligado à placenta (2) pelo cordão umbilical (3). D : útero gravídico aberto mostrando locais de implantação (setas finas) e reabsorção (setas grossas). E : ovário mostrando corpos lúteos. F : corpos lúteos extraídos para contagem.	60
FIGURA 14	Punção em veia cava para coleta de sangue.	61

FIGURA 15	Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Reflexo postural: filhote colocado em superfície lisa em decúbito dorsal recuperando a postura.	64
FIGURA 16	Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Esquiva ao abismo. Filhote sem reflexo (A) e filhote com reflexo (B).	64
FIGURA 17	Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Geotaxia negativa. Filhote realizando o teste com êxito.	65
FIGURA 18	Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: abertura de olhos. Filhote com olho fechado (A) e filhote com olho aberto (B).	65
FIGURA 19	Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: erupção dos dentes incisivos. Filhote sem dentes incisivos (A) e filhote com dentes incisivos (B).	66
FIGURA 20	Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Desdobramento das orelhas. Filhote com orelha dobrada (A) e filhote com orelha desdobrada (B).	66
FIGURA 21	Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: olfato. Filhote se orientando para a maravalha do ninho (direita) e limpa (esquerda).	67
FIGURA 22	Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Queda livre. Filhote sem reflexo caindo com ventre voltado para cima (A-B) e com reflexo, caindo com as quatro patas voltadas para a base da caixa (C-D).	68
FIGURA 23	Avaliação da instalação da puberdade em machos. Descida dos testículos em B (seta).	69
FIGURA 24	Avaliação da instalação da puberdade em fêmeas. Fêmea com vagina (círculos) fechada (A), início da abertura (B) e com abertura vaginal completa (C).	69
FIGURA 25	Imagens representativas comparando o tamanho de fêmeas NLF1 (esquerda) e SLF1 (direita) desde o nascimento até 70 dias de idade.	71
FIGURA 26	Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre a massa corporal e ingestão de alimentos em ratas F1. Massa corporal antes do desmame (A), após o desmame (B), durante a gestação (C) e durante a lactação (D). E-G : ingestão alimentar - área sob a curva (ASC). E : ASC – Ingestão alimentar de ratas nulíparas. F : ASC – Ingestão alimentar na fase gestação. G : ASC – Ingestão alimentar na fase lactação. Dados expressos como média $\pm$ EPM. ANOVA two-way, pós teste de Tukey; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.	72

- FIGURA 27** Imagens representativas dos órgãos e gorduras dos grupos NLF1 (esquerda) e SLF1 (direita) de ratas nulíparas (**A-B**) e lactantes (**C-D**). Fí: fígado. Pâ: pâncreas. Cé: cérebro. Ut: útero. Ov: ovário. GPO: gordura periovariana. GRP: gordura retroperitoneal. GPU: gordura periuterina. 73
- FIGURA 28** Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre a massa corporal e ingestão de leite da prole F2 dos grupos GCF2 e GOF2. **A**: Massa corporal da prole F2 macho. **B**: Massa corporal da prole F2 fêmea. **C**: consumo de leite pelos filhotes machos. **D**: consumo de leite pelos filhotes fêmeas. Os dados são expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$. 74
- FIGURA 29** Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre parâmetros reprodutivos em ratas NLF1 e SLF1. **A**: instalação da puberdade. **B**: número de estros. **C-E**: comportamento sexual. **C**: proceptividade. **D**: receptividade. **E**: coeficiente de lordose. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. 76
- FIGURA 30** Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre a fertilidade de ratas NLF1 e SLF1. Número de implantações (**A**), número de reabsorções (**B**) e número de corpos lúteos (**C**). Número de fetos vivos machos (**D**), fêmeas (**E**) e total (**F**). Número de filhotes nascidos vivos machos (**G**), fêmeas (**H**) e total (**I**). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student; * $p < 0,05$. 77
- FIGURA 31** Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre parâmetros bioquímicos dos grupos SLF1 e NLF1. Dosagens de glicose (**A-C**), triglicérides (**D-F**), colesterol total (**G-I**), colesterol HDL (**J-L**) nas fases nulípara, gestação e lactação. **M**: dosagem de estradiol na fase nulípara. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. 80
- FIGURA 32** Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas. **A-D**: fotomicrografia de cortes histológicos transversais das glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas mostrando qualitativamente a espessura da camada de tecido adiposo branco (TAB) e tamanho dos adipócitos nos grupos NLF1 (**A, C**) e SLF1 (**B, D**) (coloração HE; aumento 50x e 400x, respectivamente). **E**: medida da espessura da camada adiposa das glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas. **G**: número de adipócitos das glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas. **G**: área dos adipócitos das glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student; (n=5/grupo); **** $p < 0,0001$. 84
- FIGURA 33** Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre ovários de ratas F1 nulíparas. Cortes histológicos transversais de ovário corados pelo método da hematoxilina-eosina. **A-B**: Aspectos teciduais dos ovários de fêmeas do grupo NLF1. Vários corpos lúteos (cl) e 85

folículos em crescimento (setas longas) são observados no córtex ovariano. Folículo primário multilaminar contendo um oócito primário íntegro (seta curta). **C-F**: Estrutura histológica dos ovários de fêmeas SLF1. **C**: visão geral de um ovário policístico exibindo folículos císticos (*), folículos em crescimento (setas longas) e corpos lúteos (cl) no córtex ovariano. **D**: folículos em crescimento (setas longas) próximos a um folículo cístico (*). **E**: detalhe de um corpo lúteo (cl) bem desenvolvido. **F**: Detalhe de um folículo atresico com evidente degeneração das células da granulosa (g) e do oócito (o). **G**: número de folículos ovarianos (primário unilaminar e multilaminar, secundário e maduro). **H**: número de folículos císticos. **I**: número de folículos atresicos. **J**: número de corpos lúteos. Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM. Teste t de Student; (n=5/grupo); **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

FIGURA 34 Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre útero de ratas F1 nulíparas. Cortes histológicos transversais do útero de fêmeas dos grupos NLF1 (**A-B**) e SLF1 (**C-D**), submetidos ao método de coloração pela hematoxilina-eosina. **A-B**: fêmeas NLF1 apresentaram endométrio (e) com glândulas desenvolvidas (gl). Lúmen uterino (l), miométrio (m). **C**: fêmeas SLF1 apresentaram focos inflamatórios na lâmina própria endometrial (seta curta). **D**: observe as glândulas endometriais apresentando células inflamatórias (seta curta) e células em degeneração (seta longa).

86

FIGURA 35 Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce sobre os receptores de estrogênios no ovário. Análises *western blot* de ER α (**A**) e ER β (**B**). Immunoblots representativos são mostrados abaixo dos gráficos. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM de cada grupo, normalizado para densidade de GAPDH. Teste t-Student; (n=4/grupo em A-B; *p<0,05).

87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Características das fases do ciclo estral de ratas	49
TABELA 2	Parâmetros da proceptividade	53
TABELA 3	Grau do parâmetro de proceptividade	53
TABELA 4	Nível de proceptividade	54
TABELA 5	Escore da intensidade de lordose	56
TABELA 6	Nível de receptividade	56
TABELA 7	Escore do cuidado materno	57
TABELA 8	Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre gorduras, fígado e pâncreas de ratas nulíparas, gestantes e lactantes	73
TABELA 9	Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre o comportamento maternal de ratas lactantes	78
TABELA 10	Avaliação física e sensório-motor da prole F2	82

RESUMO

Os insultos nutricionais e ambientais no período perinatal produzem alterações endócrinas, funcionais e comportamentais na vida adulta. Assim, é necessário avaliar o impacto da alimentação infantil no aumento do risco de obesidade e outras doenças associadas, inclusive nas gerações subsequentes. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos metabólicos e reprodutivos da sobrenutrição pós-natal precoce durante a lactação em ratas Wistar e as consequências na segunda geração. Ratas Wistar prenhes (geração F0) foram distribuídas em dois grupos experimentais: ninhada normal (NL, 9 filhotes, n=11) e ninhada reduzida (SL, 3 filhotes, n=11) durante todo o período de lactação. No 3º dia pós-natal (PN3), as ninhadas SL foram reduzidas para 3 filhotes/mãe. Após o desmame (PN21), as fêmeas F1 (NLF1 e SLF1) foram alimentadas com água e ração à vontade e os parâmetros metabólicos e reprodutivos foram analisados nas fases adulta (nulípara), gestação e lactação. Na prole da geração F1 (geração F2 – GCF2 e GOF2) foram avaliados parâmetros físicos e sensório-motor, metabólicos e reprodutivos. Em comparação com o grupo NLF1, o grupo SLF1 mostrou: aumento de massa significativa a partir do PN7, o qual se manteve durante a fase adulta, no final da gestação e da lactação; aumento da ingestão alimentar durante o PN21 a PN70, sem diferença significativa nas fases gestacional e lactacional; aumento nas massas de gorduras nas fases adulta, gestacional e lactacional; aumento nas massas do fígado na fase lactação e do pâncreas em todas as fases; antecipação da instalação da puberdade e menor número de estros; menor desempenho no comportamento sexual; redução no número de corpos lúteos, sem alteração no percentual de pré-implantação, perdas pós-implantação e no número de fetos vivos machos e fêmeas; menor número de filhotes nascidos vivos machos e fêmeas; maior cuidado materno; redução da concentração sérica de estradiol; aumento das concentrações séricas de triglicérides e redução do colesterol HDL na gestação e lactação, sem alteração nas dosagens de colesterol total; aumento da glicemia na fase adulta. Nas análises histopatológicas também houve aumento da área dos adipócitos e da espessura da camada adiposa das glândulas mamárias; redução do número de folículos em crescimento e aumento do número de folículos císticos e atrésicos em ovários; glândulas endometriais com células inflamatórias e em degeneração no útero. A prole GOF2, comparada com a prole GCF2, apresentou maior massa corporal desde o nascimento até o PN21, assim

como maior ingestão de leite no PN8. Na avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor, a prole GOF2 apresentou antecipação dos parâmetros sensório-motores (reflexo postural, geotaxia negativa, esquiva ao abismo) em machos e fêmeas. Todavia o reflexo de sobressalto auditivo foi mais tardio em machos e fêmeas, não tendo diferença significativa nos parâmetros de olfato e queda livre. Quanto aos parâmetros físicos, a erupção dos dentes incisivos foi antecipada e a abertura dos olhos, atrasada, sem diferença significativa no desdobramento das orelhas. A instalação da puberdade foi antecipada nos machos e fêmeas. Concluindo, a sobrenutrição pós-natal precoce, atuando como fator de programação metabólica, promoveu obesidade, alterações metabólicas e reprodutivas em ratas da geração F1 e, conseqüentemente, também promoveu alterações metabólicas, reprodutivas e no desenvolvimento físico e sensório-motor da prole F2.

Palavras-Chave: Obesidade; Reprodução; Programação metabólica; Ninhada reduzida; Desenvolvimento físico e sensório-motor; Puberdade.

ABSTRACT

Nutritional and environmental insults during perinatal period induces endocrine, functional and behavioral disorders in adulthood. Thus, it is necessary to assess the impact of infant feeding on the increased risk of obesity and other associated diseases, including in subsequent generations. The objective of the present study was to evaluate the metabolic and reproductive effects of early postnatal overnutrition in Wistar during lactation and the consequences in the second generation. Female Wistar rats (F0 generation) were distributed in two experimental groups: normal litter (NL, 9 pups, n=11) and reduced litter (SL, 3 pups, n=11) throughout the lactation period. On the 3rd postnatal day (PN3), litters SL were reduced to 3 pups/dam. After weaning (PN21), F1 females (NLF1 and SLF1) were fed with water and feed at will, and metabolic and reproductive parameters were analyzed in the adult (nulliparous), pregnancy and lactation phases. In the offspring of the F1 generation (F2 generation – GCF2 and GOF2), physical and sensory-motor, metabolic and reproductive parameters. In comparison to the NLF1 group, the SLF1 generation F1 group showed: a significant increase body weight in PN7, which was maintained during the adult phase, at the end of gestation and lactation; increased food intake during PN21 to PN70, without significant difference in the pregnancy and lactation phases; increase in the fat masses in the adult, pregnancy and lactation phases; increase in the masses of the liver in the lactation phase and of the pancreas in all phases; early of the onset of puberty and lower numbers of estrus; lower performance in sexual behavior; reduction in the number of corpus luteum, with no change in pre-implantation percentage, post-implantation losses and number of live male and female fetuses; fewer live births, both male and female; greater maternal care; reduction of serum estradiol concentration; increase in serum triglyceride concentrations and reduction of HDL cholesterol in pregnancy and lactation, with no change in total cholesterol levels; increase in adult glucose. In the histopathological analyzes there was also an increase in the area of adipocytes and the thickness of the adipose layer of the mammary glands; reduction in the number of growing follicles and increase in the number of cystic and atretic follicles in ovaries; endometrial glands with inflammatory cells and degenerating in the uterus. The GOF2 offspring, compared to the GCF2 offspring, presented higher body weight from birth to PN21, as well as higher milk intake in PN8. In the evaluation of the physical and sensory-motor development, the GOF2 offspring

presented advance of the sensory-motor parameters (righting reflex, negative geotaxis, cliff avoidance) in males and females. However, the auditory startle reflex was later in males and females, with no significant difference in smell and free-fall righting parameters. Regarding the physical parameters, the eruption of the incisors was anticipated and the opening of the eyes delayed, without significant difference in the unfolding of the ears. The onset of puberty was anticipated in males and females. In conclusion, early postnatal overnutrition, acting as a factor of metabolic programming, promoted obesity, metabolic and reproductive changes in F1 generation rats and, consequently, also promoted metabolic and reproductive changes and in the physical and sensory-motor development of F2 offspring.

Keywords: Obesity; Reproduction; Metabolic programming; Reduced litter; Physical and sensory-motor development; Ovulation; Puberty.

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença crônica caracterizada pelo excesso de tecido adiposo branco e passou a ser considerada um problema de saúde mundial (1,2). Está relacionada com alterações metabólicas como hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertensão arterial, dislipidemia, e reprodutivas como disfunção ovariana, parto prematuro, distúrbios do desenvolvimento fetal, entre outros (3–5).

Um estudo realizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF) indicou que a prevalência mundial da obesidade quase triplicou entre 1975 e 2016. Em 2016, mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais tinham excesso de massa. Destes, mais de 650 milhões tinham obesidade e também estimou-se que 41 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos estavam acima do peso ou com obesidade (1,2).

Embora a etiologia da obesidade seja de difícil identificação é caracterizada por fatores endógenos como genéticos, psicológicos, neurológicos, endócrinos e metabólicos, e exógenos que envolvem a alimentação, medicamentos, estresse e inatividade física (6,7). Esses fatores estão fortemente relacionados à expressão das tendências genéticas da obesidade (8,9), e a influência do genótipo na etiologia dessa doença pode ser atenuada ou exacerbada por fatores não-genéticos, como o ambiente psicossocial em que o indivíduo está inserido, podendo este ser favorável ou não ao ganho excessivo de massa corporal (10–13).

As influências ambientais precoces, obesidade materna e distúrbios hormonais ou nutricionais induzem variação epigenética, afetando permanentemente o metabolismo e o risco de doenças crônicas (14). Sendo assim, o risco de desenvolver obesidade e síndrome metabólica (SM) na idade adulta pode ser influenciado pelo período de vida inicial, especialmente pela nutrição inadequada disponível para o feto e o recém-nascido (15–18).

1.1 TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo era considerado um reservatório passivo de armazenamento de energia (19). Contudo, é identificado como importante local para o metabolismo de diversas substâncias, expressando e secretando vários peptídeos bioativos (adipocinas) que atuam em nível local e sistêmico, passando a ser considerado um órgão endócrino (20–22). Também está integralmente envolvido na coordenação de

uma variedade de processos biológicos, incluindo o metabolismo energético, a função neuroendócrina e a função imunológica (23–26).

O tecido adiposo é constituído principalmente por células chamadas adipócitos e também contém matriz de tecidos conjuntivo e nervoso, fração vascular estromal e células imunes (27,28). Pode ser dividido em dois tipos principais: tecido adiposo branco (TAB) e tecido adiposo marrom (TAM). O TAB representa a maior parte do tecido adiposo no organismo e é o local de armazenamento de energia, enquanto o principal papel do TAM é a termogênese em pequenos mamíferos e neonatos humanos (29).

Os fatores psicológicos, gênero, etnia, consumo alimentar e o estilo de vida são importantes para a quantidade e distribuição do tecido adiposo (7,30). O acúmulo de gordura é determinado pelo equilíbrio entre a síntese (lipogênese) e a quebra de gordura (lipólise / oxidação de ácidos graxos) (30,31). A lipogênese é um processo que promove a síntese de ácidos graxos que são usados como reserva energética, ocorrendo no fígado e preferencialmente no tecido adiposo, sendo sensível às mudanças na dieta (30,31). Esse processo é estimulado por uma dieta rica em carboidratos, levando às altas concentrações de triglicérides no plasma pós-prandial, enquanto é inibida por ácidos graxos poli-insaturados e pelo jejum (31).

À medida que o indivíduo fica com obesidade, o tecido adiposo se altera com aumento da deposição de gorduras intra-abdominal e subcutânea e, em fases mais avançadas, ocorre a deposição de gordura ectópica nos músculos, fígado e pâncreas (31,32). Os adipócitos armazenam energia na forma de triacilglicerol e podem aumentar de tamanho (hipertrofia) para atingir um limiar que desencadeia o recrutamento e a diferenciação dos pré-adipócitos (hiperplasia) (31,32).

Na obesidade ocorre um estado de inflamação em vários estágios sequenciais, caracterizados por uma modificação da composição celular do TAB. A hiperplasia e hipertrofia dos adipócitos, a infiltração de macrófagos e a fibrose caracterizam o TAB em condições humanas de obesidade (33–38). A hipertrofia dos adipócitos é induzida pelo aumento do armazenamento de gordura dos adipócitos totalmente diferenciados e aumento da expressão de mediadores pró-inflamatórios (36–38). De outro modo, os adipócitos hipertróficos mudam o equilíbrio imunológico para a produção de moléculas pró-inflamatórias (34,39–42).

Dessa forma, a produção desequilibrada de adipocinas pró e anti-inflamatórias no tecido adiposo pode contribuir para muitos aspectos da SM (43). A secreção excessiva de adipocinas potencialmente prejudiciais, como visfatina, interleucina 6 (IL-6), inibidor do fator ativador de plasminogênio (PAI), resistina, fator de necrose tumoral (TNF- α) e leptina, e a hipossecreção de adipocitocinas potencialmente benéficas, como adiponectina, podem ser os principais mecanismos envolvidos em doenças relacionadas ao estilo de vida, incluindo *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2), hiperlipidemia, hipertensão e aterosclerose (35,44,45).

Nesse contexto, a obesidade é entendida como um estado de inflamação sistêmica crônica de baixo grau (46) e tem um forte impacto na secreção de adipocinas e na resistência à insulina (47). Sendo assim, o desequilíbrio na secreção dessas adipocinas podem promover impactos negativos de funções corporais e riscos à saúde e, a redução da gordura visceral, portanto, pode ser uma medida preventiva essencial para a SM e suas consequências.

Nos últimos anos, houve um interesse crescente em compreender o papel do tecido adiposo no organismo e, em especial, no sistema reprodutor. Está bem descrito que tanto o excesso de tecido adiposo como sua deficiência resultam em disfunção reprodutiva (4,48–51). O aumento da secreção de adipocinas do TAB na obesidade altera muitas funções do sistema reprodutor (52). Nas mulheres, a obesidade está associada a distúrbios menstruais, infertilidade e complicações obstétricas, enquanto mulheres magras apresentam baixo crescimento fetal, amenorreia e aborto espontâneo (53–56). Um dos distúrbios reprodutivos mais comuns em mulheres associadas à obesidade é a síndrome do ovário policístico (SOP), caracterizada por excesso de massa, amenorreia e anovulação (56,57).

As adipocinas também têm potencial envolvimento na reprodução masculina e a atividade biológica da célula germinativa depende significativamente da ação proliferativa e diferenciadora das citocinas (58).

Dentre as adipocinas produzidas pelo tecido adiposo, vale ressaltar a importância das principais no sistema reprodutor:

1.1.1 Leptina

A leptina é um hormônio peptídico expresso pelos adipócitos, sendo responsável pelo controle da ingestão alimentar com ação no sistema nervoso central (SNC), principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC), promovendo a redução da ingestão alimentar e o aumento do gasto energético, além de regular a função neuroendócrina e o metabolismo da glicose e de gorduras (59–61). Existe uma correlação fortemente positiva entre as concentrações circulantes de leptina e a quantidade de gordura corporal, indicando que a secreção de leptina é um reflexo da hipertrofia dos adipócitos (61–63).

O aumento da leptina sérica, típico de indivíduos com obesidade, leva ao quadro de resistência à leptina, sendo caracterizada por redução da expressão do receptor de leptina ou deficiência em seu sistema de transporte pela barreira hematoencefálica, que é mediada por um receptor específico para o hormônio (59,60). A leptina também tem funções importantes em outros sistemas, tais como, sistema hematopoiético, ósseo, imune, cardiovascular e reprodutor (59–61,64,65).

No hipotálamo, a leptina acelera a pulsação de liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), e na glândula pituitária estimula a produção do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH) (66). Nos ovários, regula a produção de hormônios esteroides (66,67).

Os camundongos com deficiência de leptina ou Ob-R apresentam concentrações reduzidas de LH e desenvolvimento parcial dos órgãos reprodutivos. O tratamento exógeno com leptina em camundongos ob/ob (com obesidade *knockout* para gene leptina) induz o desenvolvimento puberal e a maturação dos órgãos reprodutivos, assim como aumenta a secreção de LH e restaura a fertilidade, mostrando a importância da sinalização da leptina na reprodução feminina (68,69).

A leptina também possui ação sobre células epiteliais do órgão masculino e nos espermatozoides (70), a qual atua na diferenciação testicular e na proliferação de células germinativas por meio da produção de testosterona em células de Leydig (71).

Estudos mostram que a leptina também é produzida pela placenta humana e desempenha um papel importante no crescimento fetal e neonatal (72), sendo

que as concentrações de leptina do cordão umbilical estão associados à massa fetal, massa gorda e índice de massa corporal (IMC) (73,74). Também está presente no leite materno e pode ser produzida por vários tipos de células do tecido mamário. Smith-Kirwin *et al.* (75) mostraram que o gene *ob* é expresso na glândula mamária de mulheres lactantes e que as células epiteliais mamárias produzem leptina. Casabiell *et al.* (76) e outros autores (73,77) mostraram que a leptina é conduzida da circulação materna para o leite e que pode exercer efeitos biológicos sobre a criança. A absorção da leptina pelo estômago imaturo durante os momentos iniciais de vida do neonato pode enfatizar a importância da quantidade de leptina fornecida durante o período lactacional no controle da massa corporal e no desenvolvimento ontogenético posterior (78).

1.1.2 Adiponectina

A adiponectina é uma proteína secretada por adipócitos, células musculares e hepáticas (79,80), sua ação é mediada pelos receptores da superfície celular, AdipoR1 e AdipoR2, expressos em tecidos reprodutivos femininos, incluindo ovário, placenta, endométrio e oviduto (81). Gavrilu *et al.* (82) relataram redução da concentração sérica de adiponectina na obesidade e aumento com a redução da massa corporal.

A principal função da adiponectina inclui o aumento da sensibilidade à insulina, estimulando a captação de glicose no fígado e no músculo, reduzindo a gliconeogênese hepática e estimulando a β -oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético (81). Estudos de Lu *et al.* (83) e Wen *et al.* (84) mostraram que a adiponectina inibe a liberação de LH e GnRH, apresentando um possível papel na regulação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) (85).

As concentrações circulantes reduzidas de adiponectina estão correlacionadas negativamente com as concentrações de testosterona em indivíduos com obesidade (86). A testosterona apresenta efeito inibitório na secreção de adiponectina de alto massa molecular a partir de adipócitos (87), e mulheres com SOP apresentam declínio na adiponectina dependente do IMC e do receptor de insulina (88).

Em 2006, estudos de Martin *et al.* (89) e Bronsky *et al.* (90) identificaram a presença de adiponectina imunorreativa no leite materno humano e mostraram que

concentrações de adiponectina no leite materno estão associadas negativamente com a duração da lactação e, positivamente, à adiposidade materna (89,91). Newburg *et al.* (92) propuseram que a adiponectina pode desempenhar um papel significativo na regulação do desenvolvimento infantil durante a lactação nas primeiras semanas de vida.

1.1.3 Resistina

A resistina é uma pequena proteína relatada por Steppan *et al.* (93) durante o seu estudo sobre os efeitos dos agonistas dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR γ) na homeostase da glicose. A resistina tem um papel inibitório na proteína quinase ativada por adenosina monofosfato (AMPK) no fígado e músculo de roedores, reduzindo a gliconeogênese hepática e aumentando a captação de glicose muscular (94).

O papel da resistina em mulheres com SOP ainda é incerto. O estudo de Seow (95) e Zhang *et al.* (96) não mostrou diferença significativa na concentração de resistina no soro ou no fluido folicular entre o grupo com SOP e o grupo controle. No entanto, foi mostrado no estudo de Munir *et al.* (97) um aumento da concentração de resistina no soro, correlacionando-se positivamente com o IMC e concentrações de testosterona em mulheres com SOP. Embora a função da resistina na reprodução masculina ainda não esteja clara, essa adipocina também foi detectada no plasma seminal humano correlacionando-se com marcadores de inflamação, como elastase e IL-6 (98).

As concentrações séricas de resistina estão elevadas na gravidez e podem aumentar com a idade gestacional e diminuir após o parto. No entanto, a expressão da proteína resistina é maior no tecido placentário do que no tecido adiposo (99–101). Conforme Savino *et al.* (102), a resistina pode ter um papel no controle do crescimento fetal, na regulação do apetite e no desenvolvimento metabólico de lactentes. Esse estudo ainda propõe que ela desempenha um papel no controle da massa corporal pela regulação efetiva da adipogênese por *feedback* negativo.

1.1.4 Visfatina

A visfatina é uma proteína com efeitos biológicos pleiotrópicos (103), expressando alto nível de mRNA no tecido adiposo visceral humano (104) e em outros órgãos como fígado, músculo esquelético, coração, placenta, pulmão, rim e medula óssea (103).

A visfatina é produzida e secretada por células do sistema imunológico, especialmente macrófagos (105), que pode desempenhar um papel importante na obesidade e comorbidades. Exibe importantes efeitos autócrinos sobre a sensibilidade das células do fígado às ações da insulina (106), e também pode regular a secreção de insulina a partir de células beta pela produção de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) (107). Por outro lado, foi mostrado em ratos que a função de visfatina é comprometida por uma dieta rica em gorduras, contribuindo para a patogênese do *diabetes mellitus* tipo 2 (DM2) (108).

A visfatina está envolvida na regulação do metabolismo da glicose e lipídeos e na resistência à insulina, apresentando vários efeitos pró-inflamatórios (109,110). É capaz de causar hipoglicemia através de um mecanismo combinado envolvendo a redução da glicogenólise nos hepatócitos e a estimulação da utilização da glicose nos adipócitos e miócitos através da sinalização a jusante (111). Um estudo de Nourbakhsh *et al.* (112) mostrou que a visfatina, leptina, insulina e colesterol LDL apresentaram concentrações mais elevadas em crianças e adolescentes com obesidade, com redução da adiponectina e uma associação positiva com os parâmetros de resistência à insulina e SM.

Alguns dados sugerem um papel da visfatina na função ovariana, estando envolvida na regulação do folículo ovariano, no crescimento folicular, maturação de oócitos, dominância e seleção de folículo e ovulação em mulheres (113,114). Em combinação com o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) induz a proliferação e esteroidogênese da célula granulosa (CG) no ovário humano (114).

1.1.5 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α é constitutivamente expresso por muitos tipos de células, incluindo macrófagos, linfócitos e adipócitos (115). Sua fonte principal são os macrófagos, cujo número aumenta com o aumento da massa de gordura (42,116,117).

A quantidade de massa de tecido adiposo pode ser parcialmente determinada pelo TNF- α devido a sua capacidade de impedir a diferenciação de pré-adipócitos humanos, aumentar a apoptose de adipócitos e a lipólise (118–120). O TNF- α inibe a sinalização da insulina pela inibição da atividade da tirosina quinase e favorece a fosforilação da serina do substrato 1 do receptor da insulina (IRS-1) (116,121,122). Além disso, o TNF- α diminui a secreção de adiponectina pelos adipócitos *in vitro* e suprime transportadores de glicose GLUT-4 e receptores de insulina (119,123,124).

Os esteroides sexuais também podem influenciar a produção de TNF- α , como mostra o estudo de Bismar *et al.* (125), no qual a liberação de TNF- α foi significativamente aumentada nas células da medula óssea cultivadas na pós-menopausa precoce em comparação com as mulheres mais jovens, e diminuído, provavelmente, pelo tratamento com estrógeno. O TNF- α pode ser parcialmente responsável pela deficiência de gonadotrofinas com redução da secreção de GnRH e LH, como mostra o estudo de Watanobe & Hayakawa (126).

1.1.6 Interleucina-6 (IL-6)

Tal como outras adipocinas, a IL-6 liga-se a um receptor transmembranar (IL-6R) homólogo ao receptor da leptina, expresso pelo tecido adiposo (127–129), e sua concentração sérica corresponde ao tamanho dos adipócitos e à massa gorda (127). Embora na obesidade as concentrações de IL-6 estejam elevadas, camundongos com baixos valores de IL-6 desenvolvem obesidade e a administração intracerebral de IL-6 diminui a gordura corporal e aumenta o gasto energético, sugerindo ações em sítios centrais e periféricos (127). A IL-6 também é aumentada pelo TNF- α (130).

A IL-6 reduz a sinalização dos receptores de insulina, a adipogênese e a liberação de adiponectina (127,130,131). Nas células pancreáticas de ratos, a IL-6 regula negativamente a liberação de insulina estimulada pela glicose, mas quando administrada em indivíduos humanos normais aumenta a glicose plasmática sem alterar as concentrações de insulina (122,132).

A IL-6 também pode contribuir para a infertilidade. Deura *et al.* (133) mostraram redução na produção de estrogênio pelas CG humana devido à IL-6. Yoshida *et al.* (134) descreveram uma diminuição significativa na motilidade espermática e no rápido movimento dos espermatozoides de maneira dose-

dependente quando a combinação de IL-6 e IL-6R solúvel foi adicionada às culturas de espermatozoides (134,135).

1.1.7 Inibidor do Fator Ativador de Plasminogênio 1 (PAI-1)

Os ativadores do plasminogênio tem papéis importantes na fibrinólise e são regulados por inibidores dos ativadores do plasminogênio (PAI), sendo classificados em 3 tipos: endotelial (PAI-1), placentário (PAI-2) e urinário (PAI-3) (136).

O PAI-1 é o principal inibidor da fibrinólise e é expresso no fígado, células endoteliais, plaquetas, células musculares lisas e tecido adiposo (137–139).

As concentrações elevadas de PAI-1 estão associadas à trombose venosa, doença cardiovascular, abortos e complicações na gravidez (127,140–142). Também estão associados à obesidade, resistência à insulina, DM2, dislipidemia, hipertensão e SM (143,144).

O inibidor do fator ativador do plasminogênio 2 (PAI-2), também chamado de PAI placentário devido à elevada expressão no epitélio trofoblástico, é encontrado no plasma somente durante a gravidez (138). Um aumento na relação PAI-1 / PAI-2 no plasma materno é um marcador bioquímico de pré-eclâmpsia (145).

1.2 METABOLISMO E REPRODUÇÃO

A reprodução é uma função fundamental do organismo, sendo regulada por interações complexas entre o hipotálamo, a hipófise e as gônadas, o chamado eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (HPG) (146). Todavia, a reprodução e a sobrevivência da prole também é um processo energeticamente exigente, e as reservas de energia dependem não apenas da disponibilidade de fontes energéticas, mas também do gasto de energia (147). A obtenção do sucesso na reprodução depende da capacidade do organismo em monitorar o estado energético. A energia é armazenada principalmente como gordura e glicogênio e junto com a glicose, permite que os organismos cresçam e se reproduzam (147,148).

No ciclo reprodutivo feminino, o ciclo ovariano e uterino é regulado por ações hormonais. O hipotálamo, estimulado por substâncias (hormônios, citocinas, entre outras), libera pulsos de GnRH, que por sua vez estimulam a liberação dos hormônios FSH e (LH) pela hipófise (149). O FSH e o estrogênio promovem o crescimento e a

maturação dos folículos ovarianos e, para que ocorra a liberação do oócito, é necessário altas concentrações de LH, o chamado “pico de LH”, no qual o folículo se rompe e o oócito é liberado para a fecundação (150,151). O estrogênio é produzido pelas CG e, com o rompimento do folículo e perda dessas células, há uma redução significativa na concentração de estrogênio (151). Posteriormente, a concentração de estrogênio é retomada pela formação do corpo lúteo, também chamado de corpo amarelo, que é fonte de estrogênio e progesterona (152). O estrogênio e a progesterona promovem a proliferação endometrial, com aumento dos vasos sanguíneos e das glândulas endometriais no útero, preparando-o para a implantação do embrião que possivelmente será formado. Não havendo fecundação, o corpo lúteo regride e o útero passa pelo processo de degeneração que, sequencialmente, seguirá para a fase da menstruação (153).

A secreção de insulina é fundamental para a regulação da homeostase energética em animais e sua função principal é interagir e ativar os principais receptores ligados à membrana em células que armazenam carboidratos excedentes na forma de glicogênio ou como ácidos graxos (148,154). Por outro lado, o pâncreas é parcialmente responsável pelo aumento da concentração de glicose em estados de deficiência de nutrientes, secretando o hormônio glucagon (148,154). A glicose é o principal estimulante da liberação da insulina, sendo fundamental para o controle normoglicêmico, e o desequilíbrio desse processo resulta em distúrbios metabólicos como o DM (155,156).

A insulina, além de atuar no hipotálamo interagindo com neurotransmissores envolvidos no mecanismo de controle da fome-saciedade (157), também atua sobre o fígado, músculos, glândulas mamárias e ovário (158–160). Tanto em humanos como animais, os receptores de insulina são amplamente distribuídos em todos os compartimentos ovarianos, incluindo CG, células da teca (CT), estroma e oócito (161–163).

A ligação da insulina ao seu receptor resulta em uma série de efeitos metabólicos, sendo o mais importante a estimulação do transporte de glicose para o interior das células, utilizada como a principal fonte energética para o ovário (164). No ovário, a insulina modula o desenvolvimento folicular, a esteroidogênese, a maturação oocitária e o subsequente desenvolvimento embrionário (165), resultando em

aumento no número de folículos primários, menor taxa de atresia folicular e, consequentemente, aumento da taxa de ovulação (166).

Em condições patológicas, como na síndrome metabólica, a hiperinsulinemia promove a liberação de pulsos rápidos do GnRH pelo hipotálamo, que por sua vez superestimula a liberação do LH em detrimento do FSH (167,168). Com excesso de colesterol circulante e LH, as CT do ovário passa a produzir uma quantidade excessiva de andrógenos (testosterona e androstenediona). O FSH tem papel importante na ação da aromatase e sua deficiência promove baixas concentrações de aromatase para converter a androstenediona em estrona e a testosterona em estradiol (169,170). A deficiência de estradiol e FSH, consequentemente, não conseguirá promover o crescimento e maturação dos folículos ovarianos, que por sua vez, interrompe seu desenvolvimento numa fase antral. Sendo assim, promove um maior número de folículos imaturos (folículos císticos), caracterizando, dessa forma, a chamada SOP (167–169,171).

A SOP é um distúrbio da disfunção ovariana, geralmente caracterizada por concentrações relativamente altas de andrógenos, anormalidades metabólicas e muitas condições da SM (172). As características reprodutivas da SOP incluem aumento da produção de androgênio e secreção de gonadotrofinas desordenadas, levando à irregularidade menstrual, hirsutismo e infertilidade (172). Além dessas importantes manifestações reprodutivas, a SOP apresenta características metabólicas que incluem defeitos proeminentes na ação da insulina e na função das células β , defeitos que conferem risco substancialmente aumentado de intolerância à glicose e DM2 (168,172).

Nandi *et al.* (173), observaram que mulheres com hiperandrogenismo apresentavam resistência à insulina e, a partir disso, foi levantada a hipótese de que concentrações elevadas de insulina circulante podem causar excessiva produção de andrógenos em pacientes (174). Chang *et al.* (175) mostraram que oócitos de camundongos com *diabetes mellitus* tipo 1 (DM1) e hiperglicemia se desenvolve pouco devido à redução da foliculogênese, oogênese e maturação do oócito. Os camundongos com diabetes induzida apresentaram foliculogênese alterada e aumento da incidência de apoptose folicular, reduzindo, assim, as taxas de ovulação, e os oócitos de folículos pré-ovulatórios foram 30% menores em comparação com oócitos de animais controle.

O estrogênio é um hormônio importante e sua deficiência está associada à obesidade, osteoporose e resistência à insulina em mulheres na menopausa (176). Suas ações biológicas são mediadas principalmente por dois receptores estrogênicos (ERs) ER α e ER β , que são codificados pelos genes ESR1 e ESR2, respectivamente (177). O ER α é expresso no útero, estroma da próstata, CT ovariana, células de Leydig no testículo, epidídimo, mama e fígado (177). O ER β é expresso principalmente no epitélio da próstata, testículos, CG do ovário, medula óssea e cérebro (177). No ovário, o ER α é expresso principalmente em células intersticiais, e sua principal função é a regulação da esteroidogênese nas CT. Por outro lado, o ER β é predominantemente expresso em CG, tendo como principais funções: diferenciação de CG, maturação folicular e ovulação (178).

A obesidade tem influências prejudiciais em todos os sistemas, inclusive na saúde reprodutiva. Pasquali (48) relata alterações da obesidade sobre o sistema endócrino, incluindo concentrações anormais de hormônios sexuais decorrentes de mudanças nos padrões de secreção e/ou metabolismo, no transporte hormonal e em sua ação em nível tecidual.

O excesso ou deficiência do TAB resulta em distúrbios da maturação sexual, puberais e de fertilidade (49–51). Para o funcionamento normal do sistema reprodutivo, incluindo o desenvolvimento puberal, a produção de hormônios sexuais e gametas, assim como a manutenção da gravidez e lactação, há necessidade de armazenamento energético, sendo que o principal reservatório dessa energia é o tecido adiposo (147,179). Contudo, o excesso desse reservatório acarreta em distúrbios reprodutivos, como instalação precoce da puberdade feminina, irregularidades menstruais, disfunção ovariana, infertilidade na idade adulta, resistência à insulina, hiperandrogenia, SOP, aumento do risco de aborto, complicações obstétricas, morbidade neonatal, mortalidade e defeitos congênitos na prole (51,54,179–181).

Com o excesso de gordura corporal, a secreção de gonadotrofinas é afetada devido à maior aromatização periférica de andrógenos pela resistência à insulina (146,173,174). As concentrações de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), hormônio do crescimento (GH) e proteínas de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP) estão reduzidas e a da leptina está aumentada. Sendo assim, a neuroregulação do eixo HPG é prejudicada. Essas alterações podem

justificar o comprometimento da função ovariana e, conseqüentemente, a saúde reprodutiva (4,48,57,66,67,183).

O excesso de massa corporal também reduz a libido e prejudica o desempenho sexual. Os hormônios ovarianos estradiol e progesterona têm influências modulatórias nos circuitos neurais que regulam o comportamento sexual (184,185). Kirchengast *et al.* (186) observaram uma redução significativa do interesse sexual em mulheres com aumento da massa corporal e do IMC, e, após a redução de massa em mulheres jovens, antes com obesidade, houve uma melhora da função sexual, provavelmente devido às alterações nos hormônios sexuais, estrógenos e andrógenos, somado à fatores psicológicos e sociais com melhora da autoestima (185–188).

Após a fertilização e durante a gravidez, mudanças dramáticas ocorrem no metabolismo materno, pois ela acomoda demandas energéticas para si e para o feto (189). Essas mudanças permitem o desenvolvimento do feto e o acúmulo de reservas de energia em antecipação à lactação (190).

As concentrações da glicemia de jejum na gravidez permanecem menores do que as de jejum pré-gravídico, e as de glicose pós-prandiais estão elevadas em relação ao estado pré-gestacional (191). A sensibilidade periférica à insulina se altera na gestação, aumentando após a implantação do embrião e diminuindo marcadamente no final da gestação (192), o que ajuda a manter a homeostase normal da glicose para adequada nutrição materna e fetal (193). O aumento da utilização de glicose pelo feto através da placenta, removendo glicose da circulação materna, também contribui para o declínio e diminuição da sensibilidade à insulina materna (194,195).

Está bem estabelecido que a hiperglicemia materna induzida por DM1 e DM2, dieta pobre ou obesidade, resulta em redução da fecundidade, aumento das taxas de aborto e aumento do risco de anomalias congênitas (196). Além disso, está se tornando cada vez mais evidente que o ambiente materno durante o período de pré-concepção é importante para a programação de longo prazo da prole (197).

Kwong *et al.* (198) sugerem que a exposição de embriões aos sinais de estresse metabólico podem desencadear a programação materna do embrião. Esta exposição foi mostrada para restringir a proliferação embrionária precoce, induzir a

expressão de genes que dificultam o crescimento (199,200) e, em alguns casos, induzem apoptose (200).

As alterações na disponibilidade de componentes lipídicos podem ter implicações no desenvolvimento fetal e pós-natal e adaptações do metabolismo lipídico materno, ocorrendo durante toda a gestação, tendo consequências importantes para o crescimento (201). Sabe-se que a hiperlipidemia na gestação, mesmo quando temporária e limitada a esse período reprodutivo, promove alterações na aorta fetal e pode levar à aterosclerose na vida adulta (202–207).

O acúmulo de gordura corporal no início da gravidez foi associada a hiperfagia e aumento da lipogênese materna. A hiperfagia está presente tanto em mulheres (208,209) quanto em ratas durante a gestação (210,211), e aumenta à medida que o tempo gestacional avança. Este aumento progressivo na disponibilidade de substratos contribui ativamente para o acúmulo de depósitos de gordura materna. Tanto a condição de resistência à insulina como o aumento das concentrações plasmáticas de estrogênio que ocorrem no final da gravidez são fatores hormonais responsáveis pelo desenvolvimento da hipertrigliceridemia materna (212–215). Herrera *et al.* (216) e Herrera (201) encontraram uma correlação linear entre os triglicérides do plasma materno e fetal em ratos, e Kitajima *et al.* (217), Knopp *et al.* (207) e Skryten *et al.* (218) observaram uma relação direta entre triglicérides maternos e massa corporal do recém-nascido em humanos.

Após o parto, o organismo necessita continuamente de um aporte energético para o cuidado da prole. A amamentação é o padrão normal para a alimentação e nutrição infantil (219,220) e, segundo a OMS, é a maneira perfeita de fornecer nutrientes ideais para um crescimento e desenvolvimento infantil saudável (221). Assim, durante a gravidez, várias mudanças metabólicas ocorrem para apoiar o crescimento fetal e a produção de leite (222,223).

Nas lactantes, os efeitos positivos na homeostase da adiposidade, lipídios e glicose são inversamente associados à SM, hiperlipidemia e risco de infarto (222), tendo assim um considerável efeito protetor sobre o risco de doença cardiovascular (224–226). A amamentação promove uma redução da pressão arterial em resposta à liberação de ocitocina, que é estimulada pela sucção do leite pelo neonato (227), e está inversamente associada ao risco de DM2, independente de outros fatores de risco para diabetes, como IMC, dieta, exercício e tabagismo (228,229).

Esses efeitos metabólicos favoráveis da lactação podem ser explicados pela possibilidade de haver um maior consumo energético da própria produção de leite e pela maior utilização de carboidratos pelas glândulas mamárias (222,223). Assim, contribuem para o retorno do metabolismo pré-gestacional podendo persistir a longo prazo (224), com aumento da sensibilidade à insulina na glândula mamária e redução no músculo e no tecido adiposo, diminuindo, assim, a lipogênese periférica (116).

Para os lactentes, os lipídios do leite materno fornecem uma importante fonte de calorias e ácidos graxos essenciais necessários ao seu desenvolvimento (230,231). Todavia, estudos mostram que a alimentação rica em gordura e/ou obesidade materna podem retardar o desenvolvimento da glândula mamária(232–234), alterar a concentração lipídica do leite, reduzir a transferência de ácidos graxos essenciais para a prole e aumentar o risco de alterações prejudiciais ao desenvolvimento da prole amamentada (232–234).

Associado à obesidade, estudos evidenciaram menor sucesso no aleitamento materno e redução do desempenho da lactação, com retardo do início e redução na duração da lactação (235–240). Diversas hipóteses foram sugeridas para elucidar o menor sucesso da lactação em mulheres com obesidade, como respostas menos intensas da prolactina à sucção, concentrações reduzidas de progesterona no período pós-parto, redução de lactogênio placentário humano circulante, alterações nos padrões de sucção em bebês nascidos de mães com desequilíbrios metabólicos na gestação, distúrbios psicológicos, aumento da síntese de serotonina na glândula mamária, levando a um processo inflamatório e problemas mecânicos devido à deposição excessiva de tecido adiposo no tecido mamário. Todavia, mais estudos são necessários para analisar essas possibilidades (235–241).

1.3 EPIGENÉTICA E PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

As mudanças nutricionais e ambientais no período gestacional e neonatal podem produzir alterações que interferem com a formação dos sistemas nervoso central, endócrino e imunológico do feto, promovendo distúrbios funcionais e comportamentais que perduram na vida adulta (242,243). Estes efeitos transgeracionais são descritos por alterações epigenéticas e estabelecem

associações entre a nutrição intrauterina e neonatal e o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta (242,244,245).

Em 1942, o embriologista Conrad Waddington introduziu o termo “epigenética” na biologia moderna definindo-a como o “complexo de processos de desenvolvimento que se encontra entre genótipo e fenótipo” (246). Segundo Tang e Ho (39), a epigenética é definida como “mudanças herdáveis na expressão de gene que não alteram a sequência do DNA, mas que são herdáveis pela mitose e ao longo das gerações”.

A metilação do DNA é uma das alterações epigenéticas mais amplamente estudadas e bem caracterizadas que remontam a estudos feitos por Griffith e Mahler em 1969 (40), sugerindo ter influência na função da memória genética de longo prazo. Outras alterações importantes incluem o remodelamento da cromatina, acetilação de histonas e mecanismos de RNA não codificadores (247,248). Esses mecanismos regulam funções celulares essenciais com a reprogramação de genes atuando no desenvolvimento da plasticidade fenotípica, e as exposições a fatores endógenos ou exógenos durante os períodos críticos alteram permanentemente a estrutura e a função específica de órgãos e sistemas (247–250).

Os estímulos aplicados no período pós-natal podem gerar alterações permanentes que persistem ao longo da vida. Tal fenômeno, chamado de “programação”, pode ocorrer no ambiente intrauterino e pós-natal, onde os diferentes órgãos e sistemas continuam a adaptar-se aos diversos estímulos (18,242,243). Em 1986, o Dr. David Barker descreveu esse conceito com a hipótese de origem fetal das doenças na idade adulta, baseada no desenvolvimento da plasticidade na qual um único genótipo pode originar diferentes fenótipos, influenciados por estímulos ambientais ou insultos intrauterinos (251,252). Posteriormente, outros estudos comprovaram a hipótese de Barker, indicando que um ou mais fatores que ocorrem no ambiente perinatal podem estar relacionados à nutrição materna e são responsáveis pelo maior risco de desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (242,252–255).

O estado nutricional da mãe influencia na quantidade e qualidade de nutrientes que chegam ao feto ou ao neonato pelo leite, sendo causa potencial da programação metabólica e da mudança da composição corporal (256–258). As alterações nutricionais na gestação, tais como, alta oferta de carboidratos e gorduras,

provocam modificações permanentes no feto que podem levar à obesidade na vida adulta (259). Dessa forma, o feto apresenta o fenótipo mais adequado a sua sobrevivência. Observa-se mudanças no metabolismo, na produção de hormônios e a sensibilidade dos tecidos a eles, levando ao desenvolvimento de adaptações anatômicas, endócrinas e metabólicas irreversíveis, com consequências tardias que podem se manifestar na infância e na vida adulta (242,260,261).

Consequentemente, a presença de obesidade ou de DM durante a gestação foi associada à hiperinsulinemia fetal, aumento da morbimortalidade perinatal, aumento da adiposidade corporal, desenvolvimento de obesidade, intolerância à glicose, hipertensão arterial, dislipidemia e SM (262–264).

A obesidade materna também foi relacionada às alterações no metabolismo e transporte dos ácidos graxos através da placenta, sem prejudicar o crescimento fetal (257,265,266). No entanto, essas modificações podem alterar o metabolismo do feto interferindo na formação e distribuição do tecido adiposo e na sua predisposição para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas futuras (257,265,266).

Estudos têm correlacionado a massa corporal ao nascer e fatores de risco para doença cardiovascular (267–271). Tanto o baixo peso ao nascer quanto a macrossomia fetal, típica do diabetes gestacional, foram associados ao desenvolvimento tardio de um conjunto de distúrbios que inclui adiposidade abdominal, hipertensão arterial, dislipidemia, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, DM2 e doença cardiovascular (267–271).

Em consequência, o rápido ganho de massa corporal na infância está associado com retardo do crescimento, aumento do risco de morbimortalidade e, portanto, ao aumento do risco futuro de doenças crônicas não transmissíveis (272,273)

A responsividade aos fatores ambientais também está relacionada ao nível de maturação do sistema nervoso e os testes de análise neurológica confirmam retardamento ou precocidade dos reflexos sensoriais e motores (274–276). A análise neurológica pode, assim, medir os efeitos de fatores ambientais na maturação do sistema nervoso e também detectar mudanças nas funções cerebrais na presença ou ausência de respostas (276,277).

Os fatores dietéticos podem produzir alterações sinápticas durante o desenvolvimento, semelhantes às neurotoxinas, possivelmente contribuindo para o aumento da incidência de distúrbios do neurodesenvolvimento (278). As alterações no desenvolvimento neonatal sugerem comprometimento do sistema sensorio-motor e podem ser reflexos da vulnerabilidade do cérebro em desenvolvimento a mudanças na dieta materna. Consequentemente, a sobrenutrição materna pode influenciar o desenvolvimento do cérebro fetal e o desenvolvimento sensorio-motor da prole (279,280).

1.4 MODELOS DE OBESIDADE

Vários modelos experimentais para o estudo da obesidade foram criados para entender melhor as alterações provocadas por essa doença. Os modelos de organismos geneticamente modificados, como o Zuker, ob/ob e db/db são exemplos de animais com obesidade por fatores genéticos (281).

Outro modelo é obtido por meio de lesão do ARC, que leva o animal ao desenvolvimento da obesidade na vida adulta. Nesse modelo o neonato é tratado com doses elevadas de Glutamato Monossódico (MSG), que lesiona os neurônios do SNC, localizados principalmente no ARC (282–284). A lesão desta região na fase neonatal implica em efeitos na função neuroendócrina, como hipertrigliceridemia, redução da secreção do GH, hiperinsulinemia, hiperfagia, dentre outros (285,286).

Também existem modelos de obesidade com dietas específicas. O modelo de dieta cafeteria, hipercalórica ou hiperlipídica é caracterizado pelo fornecimento de alimentos altamente palatáveis que fazem parte dos hábitos alimentares nos países ocidentais. Essa dieta pode ser composta de chocolate, amendoim, bacon, leite condensado, bolo, patê, refrigerante, manteiga, óleos e banhas, podendo estes serem associados à dieta padrão de roedores ou ainda a substituírem totalmente. Nesse modelo os animais apresentam aumento de massa corporal, aumento do tecido adiposo e alterações metabólicas (287,288).

Já o modelo de dieta com restrição proteica na gestação resulta em restrição de crescimento intrauterino (RCIU). Apesar da dieta normal pós-desmame, a prole desenvolve SM atribuída ao conceito do “fenótipo poupador”, permitindo rápido ganho de massa após o nascimento e hipertrofia do tecido adiposo. Esses animais

desenvolvem hiperfagia, resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e hiperleptinemia (289).

Por fim, outro modelo de obesidade muito utilizado é o de programação metabólica por meio da redução de ninhada. Nesse modelo, no terceiro dia pós-natal (PN3), realiza-se uma redução de ninhada, na qual apenas três filhotes permanecem com a mãe durante o período de lactação (290,291). A padronização do modelo no PN3 se justifica pelo fato de que, nos primeiros dias após o nascimento, concentrações séricas de prolactina se elevam, correlacionando-se com o tamanho da ninhada, influenciando, dessa forma, na produção de leite (292).

O hipotálamo possui importantes funções na modulação do consumo alimentar e gasto energético e, durante a lactação, encontra-se em formação, sendo muito sensível à ação de hormônios neurotróficos que podem conduzir à persistente desorganização estrutural e consequente disfunção (180,293,294). Esse desequilíbrio do controle alimentar hipotalâmico é caracterizado pela redução do efeito inibitório da leptina sobre neurônios relacionados à regulação do apetite no ARC, além de menor sensibilidade à insulina (180,293).

Sendo assim, com uma maior oferta de leite, ocorre uma programação hipotalâmica, tornando os filhotes hiperfágicos e supernutridos, promovendo um aumento de gordura corporal e hiperinsulinemia no período da lactação (180,181,293–295). O sobrepeso continua na vida adulta e é acompanhado por muitas alterações comuns à SM como aumento da pressão sistólica, resistência periférica à insulina, hiperinsulinemia, dislipidemia, hiperfagia e obesidade (16,180,255,296–298).

1.5 JUSTIFICATIVA

Os mecanismos genéticos envolvidos na gênese da obesidade ainda não estão totalmente compreendidos. No entanto, os principais propósitos das pesquisas em relação à obesidade consistem em buscar compreender os fatores ambientais que podem modular a expressão gênica e afetar marcadores epigenéticos dessa condição metabólica. Assim, considerando que:

- No cenário mundial no qual a obesidade está presente como um problema de saúde pública, atingindo níveis de pandemia, estando associada ao desenvolvimento de diversos distúrbios endócrinos, cardiovasculares, entre outros;

- A programação metabólica presente no período perinatal está associada ao desenvolvimento de obesidade infantil e também na fase adulta;

- A obesidade está relacionada a problemas reprodutivos, sejam de fertilidade, de comportamentos sexuais ou maternais;

- Estudos sobre obesidade, reprodução e comportamento em animais provenientes do modelo de sobrenutrição neonatal durante a lactação ainda não foram realizados;

- Estudos sobre obesidade, reprodução e desenvolvimento físico e sensório-motor na prole de mães provenientes do modelo de sobrenutrição neonatal ainda não foram realizados;

O presente estudo se justifica tendo como enfoque explorar os efeitos da programação metabólica neonatal, por meio do modelo de redução de ninhada, sobre a reprodução e metabolismo em duas gerações (F1 e F2) assim como as consequências na geração F2 sobre o desenvolvimento físico e sensório-motor. Dessa forma, busca-se contribuir para o entendimento dessa intrincada rede de fatores que constituem o controle metabólico sobre a reprodução, bem como os efeitos da programação metabólica e reprodutiva nessas gerações.

Em termos translacionais, os resultados que serão apresentados podem contribuir para melhor compreensão dos efeitos da sobrenutrição pós-natal sobre os parâmetros metabólicos, reprodutivos, comportamentais e de desenvolvimento em outras espécies, sobretudo em humanos, e também para avaliar o impacto da

alimentação infantil no aumento do risco de obesidade e outras doenças associadas nas gerações subsequentes, contribuindo também para embasar estudos adicionais.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos metabólicos e reprodutivos da sobrenutrição pós-natal precoce em ratas *Wistar* (F1) obtidas por redução de ninhada durante a lactação e as consequências na segunda geração (F2).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1.1 Fêmeas da geração F1

- Avaliar parâmetros biométricos e metabólicos: ganho de massa corporal, ingestão alimentar e massa das gorduras.
- Avaliar parâmetros bioquímicos: glicemia, lipidograma, estradiol.
- Avaliar parâmetros reprodutivos e comportamentais: instalação da puberdade, frequência do ciclo estral, comportamento sexual, fertilidade e comportamento maternal.
- Avaliar morfologia e histologia das glândulas mamárias, ovários e útero.

2.1.2 Fêmeas e machos da Geração F2

- Avaliar parâmetros biométricos e de consumo alimentar: ganho de massa corporal e consumo de leite.
- Avaliar o desenvolvimento físico e sensório-motor: reflexo postural, esquiva ao abismo, geotaxia negativa, queda livre, abertura dos olhos, erupção dos incisivos, desdobramento das orelhas, olfato e sobressalto auditivo.
- Avaliar parâmetro reprodutivo: instalação da puberdade.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Este estudo foi conduzido de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, determinados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), pela Lei 11.794/08 e pelo Decreto 6.899/09, sendo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFG) de protocolo 043/2017.

Ratos *Wistar* fêmeas e machos (geração F0) com 60-70 dias de idade (200 – 250 gramas) originados do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG) foram acomodados no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCiF) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Campus Samambaia, Goiânia, GO. Durante todo o período experimental os animais permaneceram em caixas de polipropileno (45 cm / 30 cm / 15 cm) sob condições controladas de luminosidade [12 h claro-escuro (06:00-18:00 h)] e temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) com suprimento à vontade de água e ração.

Após uma semana de adaptação os animais foram submetidos ao cruzamento na proporção de duas fêmeas ($n = 22$) para um macho ($n = 11$), com restrição da inserção de novos machos durante o período gestacional para evitar o efeito Bruce (299,300), que consiste em bloqueio gestacional quando uma fêmea prenhe é exposta ao odor de um macho que não corresponde ao seu par. Constatada a prenhez, pela presença de espermatozoides em lâminas de lavado vaginal, as fêmeas foram alocadas em caixas individuais polipropileno (45 cm / 30 cm / 15 cm) sob condições controladas de luminosidade [12 h claro-escuro (06:00-18:00 h)] e temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) com suprimento à vontade de água e ração.

No terceiro dia após o parto, 11 fêmeas tiveram suas ninhadas reduzidas a três filhotes cada, constituindo o grupo redução de ninhada (*small litter* – SLF1), as outras 11 ratas tiveram suas ninhadas padronizada para 9 filhotes, constituindo assim o grupo controle (*normal litter* – NLF1) (Fig. 1). Foi deixado o maior número possível de filhotes fêmeas por mãe para não haver alteração significativa no cuidado materno entre filhotes machos e fêmeas (301), e não foram utilizados filhotes de outras ninhadas para evitar o *cross fostering*, ou seja, colocar outros filhotes com mães não biológicas (302).

A identificação do sexo foi realizada pela observação da distância anogenital do animal (Fig. 2). As ninhadas com menos de 9 filhotes foram descartadas e os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação.



Figura 1– Modelo redução de ninhada (geração F1). Grupo controle (NLF1) com 9 filhotes (A) e grupo obesidade (SLF1) com 3 filhotes (B).

Fonte: a autora



Figura 2 – Identificação do sexo dos filhotes. Filhote fêmea com distância anogenital menor (esquerda), macho, com distância anogenital maior (direita).

Fonte: a autora

Após a lactação (PN21), as fêmeas F1 foram mantidas em número máximo de 3 animais (escolhidas, aleatoriamente da ninhada, aquelas com massa corporal dentro da média) em caixa de polipropileno (45 cm / 30 cm / 15 cm) sob condições controladas de luminosidade [12 h claro-escuro (06:00-18:00 h)] e temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com suprimento à vontade de água e ração. Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação.

Para evitar o efeito ninhada sobre os parâmetros avaliados, a cada grupo com 3 fêmeas, identificadas por marcação na cauda, separamos uma rata de cada ninhada (F1), a qual foi destinada para um protocolo específico, não sendo usada em outros

protocolos. O estudo foi delineado da seguinte forma:

- Animal 1 (A1): avaliação de parâmetros experimentais, tais como biométricos, metabólicos e bioquímicos (massa corporal, consumo alimentar, massas das gorduras, do fígado e do pâncreas, perfil lipídico, glicemia, estrogênio sérico), reprodutivos (puberdade, frequência do ciclo estral) e histológicos (útero, ovário e glândula mamária), na fase estro do ciclo estral, aos 70 – 80 dias de idade e todas as ratas virgens.

- Animal 2 (A2): avaliação de parâmetros experimentais na gestação, tais como biométricos, metabólicos e bioquímicos (massa corporal, consumo alimentar, massas das gorduras, do fígado e do pâncreas, perfil lipídico, glicemia), reprodutivos e comportamentais (puberdade, frequência do ciclo estral, comportamento sexual, fertilidade);

- Animal 3 (A3): avaliação de parâmetros experimentais na lactação, tais como biométricos, metabólicos e bioquímicos (massa corporal, consumo alimentar, massas das gorduras, do fígado e do pâncreas, perfil lipídico, glicemia), reprodutivos e comportamentais (fertilidade e comportamento maternal) (Fig. 3).

As fêmeas A2 e A3 (70-85 dias de idade) foram submetidas ao cruzamento com machos fornecidos pelo Biotério Central da UFG (80 -90 dias de idade, 250– 300 gramas) para execução do protocolo experimental, com restrição da inserção de novos machos durante o período gestacional para evitar o efeito Bruce (299,300). No grupo das fêmeas A3, foi permitido o nascimento a termo dos filhotes (F2) e as ninhadas foram padronizadas no PN3 para 6 filhotes (3 fêmeas e 3 machos) para melhor eficiência lactacional (303). Na prole F2, foram realizados testes de avaliação do desenvolvimento físico, sensório-motor, consumo de leite e instalação da puberdade. Os filhotes excedentes foram eutanasiados por decapitação.

Após o desmame (PN21), os filhotes F2 foram mantidos em caixa de polipropileno (45 cm / 30 cm / 15cm) no biotério do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo, do DCiF, ICB, UFG, sob condições controladas de luz (12 horas claro/12 horas escuro) e temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), com suprimento à vontade de água e ração, e mantidos separados por grupo, provenientes de mães com obesidade (GOF2) e mães controle (GCF2), e sexo (machos e fêmeas), para experimentos subsequentes.

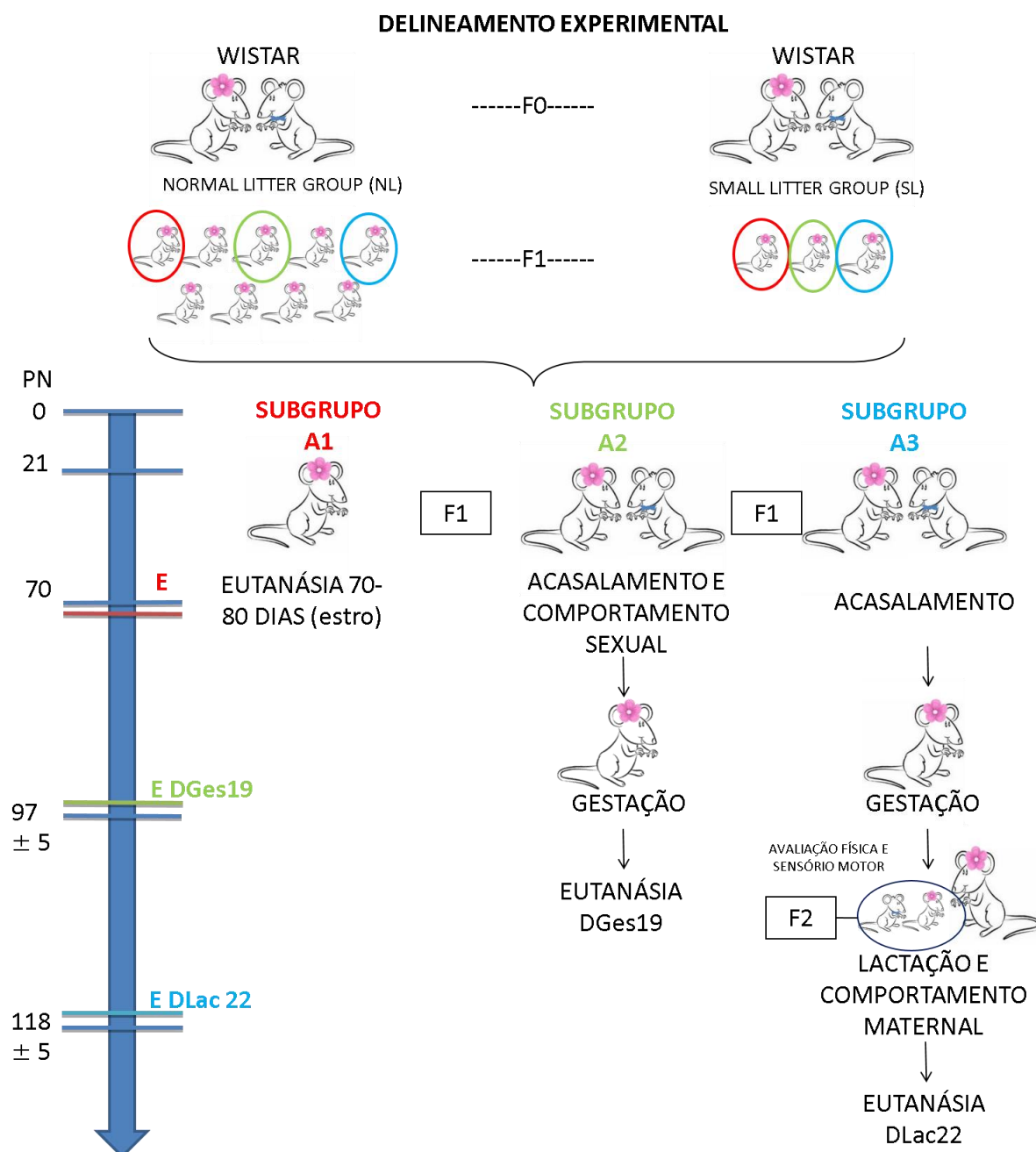


Figura 3 – Delineamento experimental. **E** – Eutanásia; **DGes19** – Dia Gestacional 19; **DLac22** – Dia Lactacional 22. **F0** – Pais. **F1** – Primeira geração. **F2** – Segunda geração. **PN** – Dia Pós-Natal.
Fonte: a autora

3.2 PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E METABÓLICOS

3.2.1 Avaliação da massa corporal e consumo alimentar

Nas fêmeas F1, a massa corporal foi mensurada semanalmente desde o nascimento e nos períodos PN21 a PN70, gestacional e lactacional. O consumo alimentar foi mensurado desde o PN21 a PN70, durante a gestação e lactação. Nos filhotes F2, a massa corporal foi medida semanalmente desde o nascimento até o PN21.

3.2.2 Avaliação da massas de gorduras, do fígado e do pâncreas

Nas fêmeas F1, as gorduras retroperitoneal, periovariana e periuterina foram extraídas e pesadas em balança analítica para o fornecimento da estimativa do acúmulo de gordura tecidual desses animais. O fígado e o pâncreas também foram extraídos e pesados em balança analítica.

3.2.3 Consumo de leite pelos filhotes F2

Os filhotes F2 no dia PN8 foram separados da mãe por um período de 2 horas para jejum, mantidos aquecidos por bolsa térmica. Após esse período, foram pesados em balança analítica, acomodados em algodão para melhor conforto do filhote e facilitar a pesagem (Fig. 4). Na sequência, foram recolocados junto à mãe por 30 minutos e retirados para nova pesagem.

No manuseio dos filhotes, teve-se o cuidado de primeiro separar a mãe e colocá-la em uma caixa de polipropileno pequena com grade para depois manusear os filhotes. Os mesmos foram manuseados com as mãos usando luvas previamente sujas na maravalha do ninho para não haver rejeição dos mesmos pela mãe (304). Depois de retirar os filhotes para uma caixa limpa com bolsa térmica, a mãe era recolocada em sua caixa de origem. Após o manuseio e pesagem dos filhotes, estes eram recolocados no ninho.

O consumo de leite foi estimado pela subtração da massa final pela massa inicial dos filhotes.



Figura 4 - Pesagem de filhote em balança analítica.
Fonte: a autora

3.3 PARÂMETROS REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS DE F1

3.3.1 Instalação da puberdade

O início da função reprodutiva ocorre com a instalação da puberdade, processo que leva à maturidade sexual com capacidade reprodutiva (305), podendo ser influenciada por vários fatores, tais como, genéticos (306–308), químicos (309,310), nutricionais (311–315) e psicológicos (316). Em ratas, a instalação da puberdade é caracterizada pela abertura vaginal acompanhada da primeira ovulação, que ocorre entre 35 e 45 dias (317). A partir do PN21, foi verificado diariamente a ocorrência ou não da abertura vaginal das fêmeas F1 para verificação da data da instalação da puberdade.

3.3.2 Frequência do ciclo estral

A rata é um excelente modelo experimental para pesquisa devido sua semelhança com o perfil hormonal da mulher e muitos estudos sobre o ciclo ovariano são baseados nos estudos do ciclo estral de ratas. No ciclo reprodutivo, a rata apresenta ovulação cíclica espontânea, sendo que as gonadotrofinas e os esteroides ovarianos coordenam e modulam os processos de crescimento e maturação folicular, assim como o funcionamento do corpo lúteo (318). O ciclo reprodutivo da rata é chamado de ciclo estral, caracterizado por alterações hormonais e morfológicas no

útero, ovários e vagina, com duração de 4 a 5 dias (Tabela 1). A citologia do esfregaço vaginal é utilizada para a determinação fases do ciclo estral sendo caracterizado por quatro fases: proestro, estro, diestro e metaestro (Fig. 5). A ovulação ocorre desde o início do proestro ao final do estro (319–322). A frequência do ciclo estral foi realizada por meio da verificação das fases do ciclo, obtida por lavado vaginal e visualização a fresco em microscópio de luz com objetivas de 10x e 40x, no período de PN50 a PN70.

Tabela 1 - Características das fases do ciclo estral de ratas

FASES	CARACTERÍSTICAS
PROESTRO	Apresenta predominância de células epiteliais arredondadas nucleadas (Fig. 5 A e B). Concentrações elevadas de estradiol e ocorrência do pico de LH, prolactina e FSH. Início da ovulação. Dura 12 a 14 horas.
ESTRO	Apresenta predominância de células cornificadas anucleadas, com intensa queratinização e descamação do epitélio vaginal (Fig. 5 C e D). Redução da concentração de estradiol e formação do corpo lúteo. Final da ovulação. Dura 25 a 27 horas.
DIESTRO	Maior predominância de leucócitos (Fig. 5 E e F). Baixa concentração de estradiol. Fase não fértil. Dura 55 a 57 horas.
METAESTRO	Mesma predominância de células epiteliais nucleadas, cornificadas e leucócitos (Fig. 5 G e H). Baixa concentração de estradiol. Fase não fértil. Dura 6 a 8 horas.

Fonte: Long & Evans, 1922; Young *et al.*, 1941; Schwartz, 1964; Marcondes *et al.*, 2002.

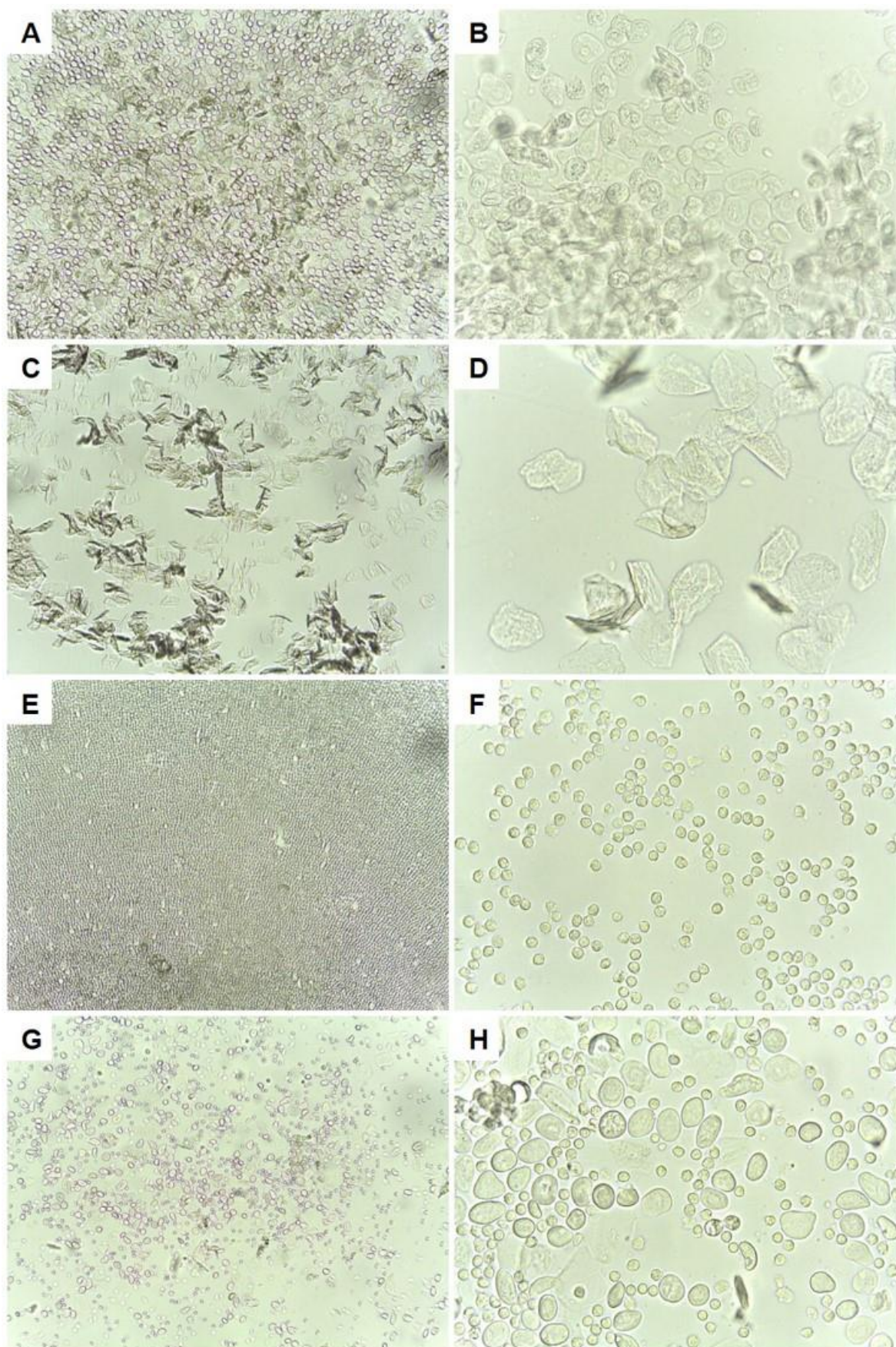


Figura 5 - Fases do ciclo estral. Proestro (A-B), estro (C-D), diestro (E-F) e metaestro (G-H). Lavado vaginal a fresco com solução salina. Fotomicrografia com aumento de 100x e 400x, respectivamente.
Fonte: a autora

3.3.3 Comportamento sexual

Quanto ao comportamento sexual, embora seja o resultado de uma interação contínua entre o macho e a fêmea, cada sexo exibe comportamentos quantificáveis e específicos a fim de atrair o sexo oposto. O comportamento sexual feminino é frequentemente associado a sinais morfológicos e fisiológicos, apresentando três componentes típicos: atratividade, proceptividade e receptividade (323).

A atratividade sexual da rata é determinada por certos comportamentos apetitivos que o rato exibe em resposta a sinais emitidos pela fêmea. O macho aborda e investiga a fêmea em resposta a sinais olfativos e visuais, sendo esse comportamento essencial para a sobrevivência da espécie, pois aumenta a probabilidade de cópula quando a fêmea está fértil (323).

A proceptividade foi definida como “uma reação em direção ao macho que constitui sua suposição de iniciativa no estabelecimento ou manutenção da interação sexual” (323), despertando e estimulando o macho a montar (324). Quando as fêmeas estão férteis, não são apenas atraentes para o macho, mas também são atraídas por ele, sendo esse comportamento caracterizado por componentes, tais como aproximação do macho, pulos e saltos, fugas, vocalizações, apresentação da genitália e mexidas das orelhas com agitação rápida da cabeça (323,325).

A receptividade foi definida como “respostas femininas necessárias e suficientes para o sucesso do macho em conseguir a ejaculação intravaginal” (323), caracterizada pela postura de lordose, que facilita a inserção peniana e a ejaculação. Além disso, a classificação de lordose, definida como a intensidade média de cada dorsiflexão espinhal com base em uma escala de quatro pontos, é usada para medir a magnitude da resposta de lordose. Constitui a fase consumatória da sequência de acasalamento (323,326).

A receptividade da rata fêmea diminui progressivamente, resultado da estimulação repetida do macho (326); eventualmente, a fêmea mostra um período refratário durante o qual ela não irá mais acasalar com o macho. A rata, quando está na fase não fértil (diestro e metaestro), apresenta comportamento de agressividade, ela foge e não aceita o macho montá-la.

Cada fêmea A2 dos grupos com idade aproximada de 70 a 80 dias na fase do proestro foram colocadas em uma caixa de observação (70 cm / 70 cm / 35 cm) por

10 min para ambientação e logo foi colocado um macho sexualmente ativo e experiente para iniciar o registro (entre 18:00 e 21:00 h), por 15 min. O registro foi realizado com uma filmadora para analisar os parâmetros comportamentais das fêmeas.

O nível de proceptividade (NP) da fêmea foi obtido a partir da presença/ausência e frequência de parâmetros, tais como, corridas e saltos, aproximação do macho, apresentação da genitália, balanço da cabeça tremendo as orelhas e vocalizações (Fig. 6 e 7) (Tabela 2, 3 e 4), obtido pelo cálculo (326,327):

$$NP = \frac{\sum GPo}{\sum GPt} \times \frac{nPo}{nPt} \times 100$$

Onde:

NP = Nível de Proceptividade

$\sum GPo$ = soma dos graus dos parâmetros obtidos

$\sum GPt$ = soma dos graus dos parâmetros totais = 15

nPo = número de parâmetros obtidos

nPt = número de parâmetros totais = 5

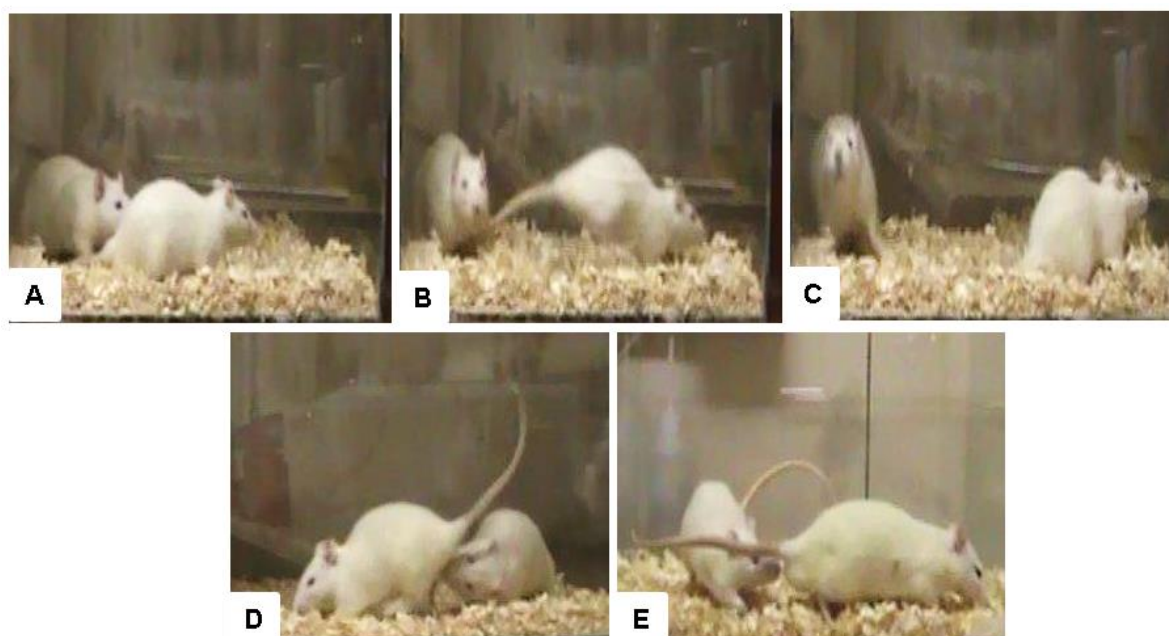


Figura 6—Comportamento sexual: proceptividade. **A-C**: corridas e saltos. **D**: apresentação da genitália. **E**: aproximação do macho.

Fonte: a autora

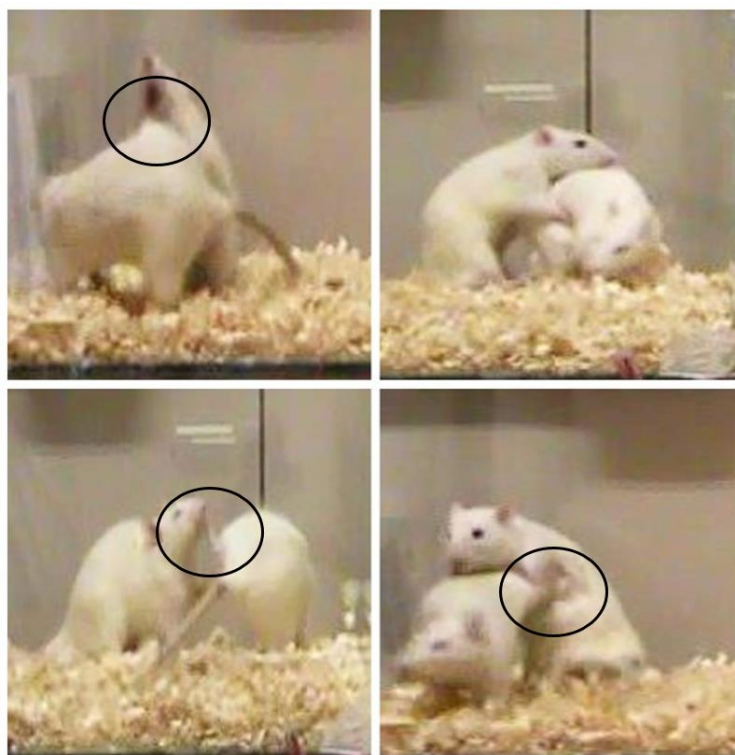


Figura 7 - Comportamento sexual: rata não receptiva e não proceptiva apresentando comportamentos de fuga e chutes (círculos em destaque).

Fonte: a autora

Tabela 2 - Parâmetros da proceptividade

PROCEPTIVIDADE - PARÂMETROS
A. Aproximação do macho
B. Apresentação da genitália
C. Vocalizações
D. Balanço da cabeça tremendo as orelhas
E. Aproximar e afastar. Pulos e saltos

Fonte: Hardy & DeBold, 1972; Södersten & Hansen, 1977.

Tabela 3 - Grau do parâmetro de proceptividade

GRAU DO PARÂMETRO (GP)	FREQUÊNCIA DE CADA PARÂMETRO
0	0
1	1 a 3
2	4 a 7
3	Acima de 7

Fonte: a autora

Tabela 4 - Nível de Proceptividade

NÍVEL DE PROCEPTIVIDADE	
menor que 1	Ausência proceptividade
1 a 39,99	Baixa proceptividade
40 a 79,99	Média proceptividade
80 a 100	Alta proceptividade

Fonte: a autora

O nível de receptividade (NR) foi obtido a partir do cálculo do coeficiente de lordose e a média das intensidades de lordoses (Fig. 8 e 9) (Tabelas 5 e 6) (326,327):

$$CL = \frac{nL}{nM} \times 100$$

Onde:

CL = coeficiente de lordose

nL = número de lordoses

nM = número de montas

$$\bar{L} = \frac{\sum So}{\sum St}$$

Onde:

$\bar{L}$ = média das intensidades das lordoses

$\sum So$ = somatória dos escores obtidos

$\sum St$ = somatória dos escores totais máximos

$$NR = \bar{L} \times CL$$

Onde:

NR = nível de receptividade

$\bar{L}$ = média das lordoses

CL = coeficiente de lordose



Figura 8 - Comportamento sexual: receptividade - acasalamento de ratos, vista lateral, mostrando sequência de lordose da fêmea.

Fonte: a autora

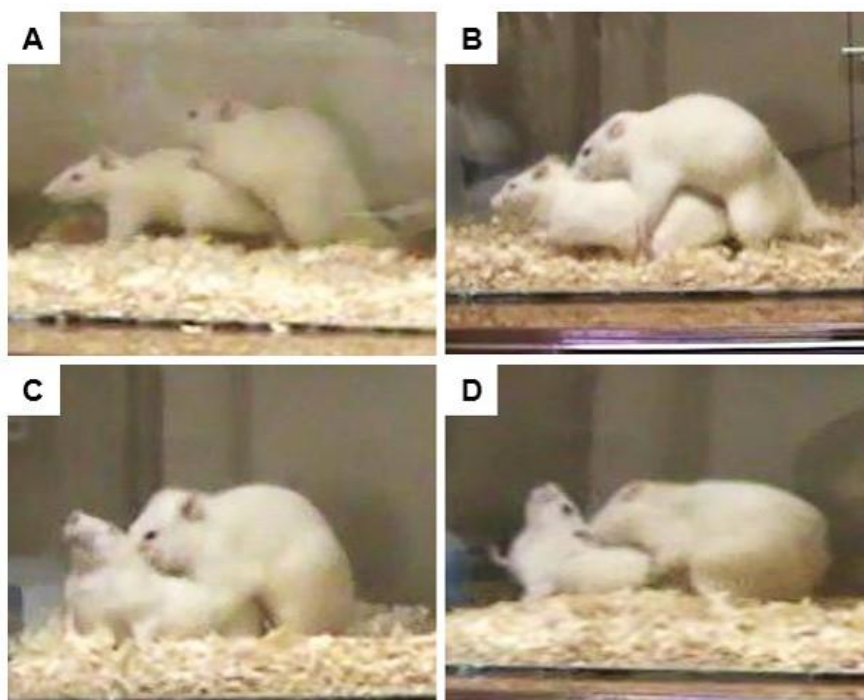


Figura 9 - Tipos de lordose, segundo Hardy & DeBold (1972). Sem lordose (A), lordose marginal (B), lordose normal (C), lordose exagerada (D).

Fonte: a autora

Tabela 5 - Escore da intensidade de lordose

ESCORES	INTENSIDADE DA LORDOSE
0	Ausência de lordose – chuta, fuge, agressiva. Dorso arqueado para cima (Fig. 7 e 9A)
1	Lordose marginal, ligeira flexão da coluna vertebral, cabeça levemente levantada e quadris, com base da cauda elevada do chão (Fig. 9B)
2	Lordose normal, flexão espinhal, cabeça com ângulo aproximado de 30° com o chão, patas dianteiras colocadas ligeiramente para a frente e pernas posteriores endireitadas (Fig. 9C)
3	Lordose exagerada, flexão espinhal pronunciada, cabeça com ângulo maior de 45° com o chão (Fig. 9D)

Fonte: Hardy & DeBold, 1972

Tabela 6 – Nível de Receptividade

NÍVEL DE RECEPTIVIDADE	
menor que 1	Ausência receptividade
1 a 49,99	Baixa receptividade
50 a 79,99	Média receptividade
80 a 100	Alta receptividade

Fonte: a autora

No dia seguinte ao acasalamento, a prenhez foi confirmada pela presença de espermatozoides no lavado vaginal a fresco com solução salina (Fig. 10).

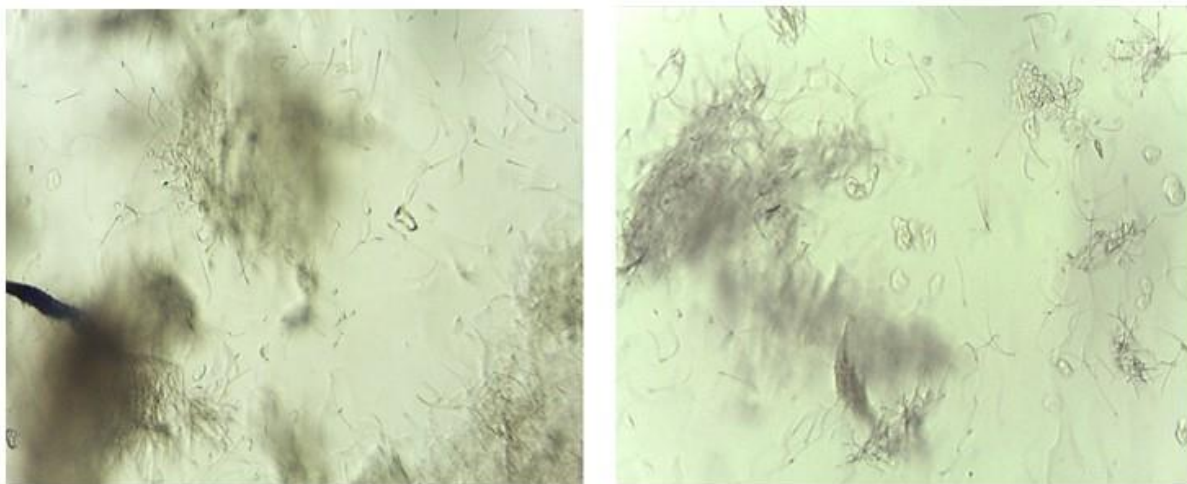


Figura 10 - Lavado vaginal para confirmação da prenhez. Presença de espermatozoides e clusters de células epiteliais. Aumento de 100x.

Fonte: a autora

3.3.4 Comportamento maternal

Quanto ao comportamento maternal, modelos eficientes foram desenvolvidos para uso em pesquisa básica. Tais protocolos incluem aqueles empregados por Lonstein (328), baseados na latência, frequência e duração de diversos padrões comportamentais; por Felicio (329), a partir da latência de comportamentos específicos e da presença de comportamento materno completo; e por Myers (330), que permite classificar o comportamento materno considerando a frequência de lambidas nos filhotes.

As mães lactantes (A3) foram colocadas em uma caixa (45 cm / 30 cm / 15 cm) por 5 minutos para ambientação sem sua ninhada. Após esse período, os filhotes (F2) foram inseridos na caixa de modo que ficassem espalhados em lados opostos ao que se apresentavam antes. O processo foi filmado por 35 minutos para avaliação do comportamento maternal e foram analisados o tempo que as mães demoravam para retornar seus filhotes para o ninho e/ou abandono do ninho, o tempo da mãe no ninho e fora dele e o cuidado com a prole, que consistia em limpar/lamber os filhotes, carregá-los para o ninho e amamentá-los (Fig. 11 e 12). O teste foi realizado nos dias PN3, PN7 e PN11 e o cuidado materno foi obtido a partir do escore mostrado na Tabela 7 (331–333).

Tabela 7 - Escore do Cuidado Materno

ESCORE	CUIDADO MATERNO
0	Não recupera os filhotes. Não cuida dos filhotes.
1	Recupera os filhotes, cuida menos de 50% tempo
2	Recupera os filhotes, cuida dos filhotes em mais de 50% e menos de 75% do tempo
3	Recupera os filhotes, cuida dos filhotes de 75% a 100% do tempo.

Fonte: a autora

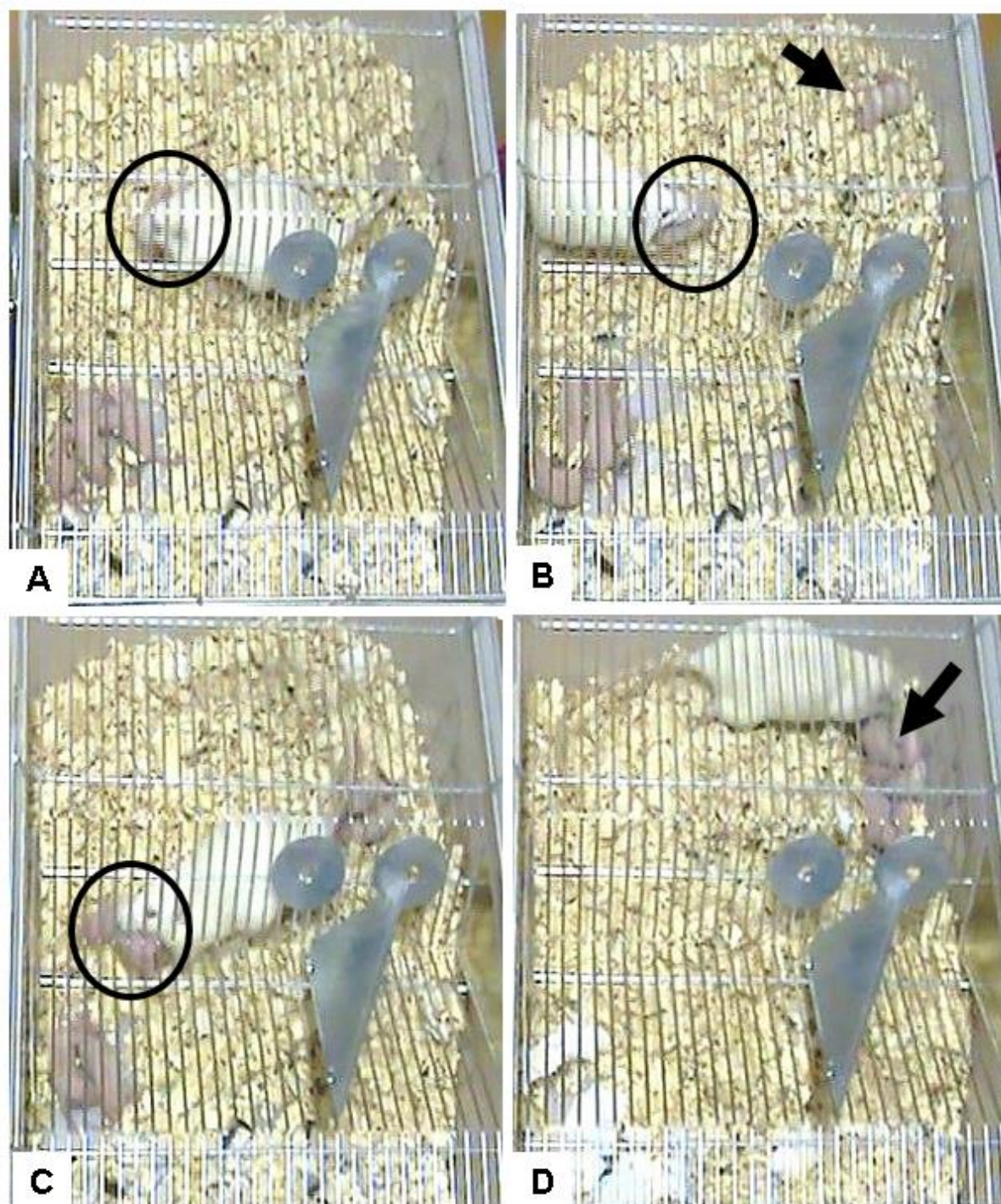


Figura 11 - Comportamento materno. Latência de retorno do 1º filhote (A), 2º filhote (B), 3º filhote (C) e todos os filhotes no ninho (D). Observe a mãe com o filhote na boca (círculo) levando-os para o ninho (seta)

Fonte: a autora

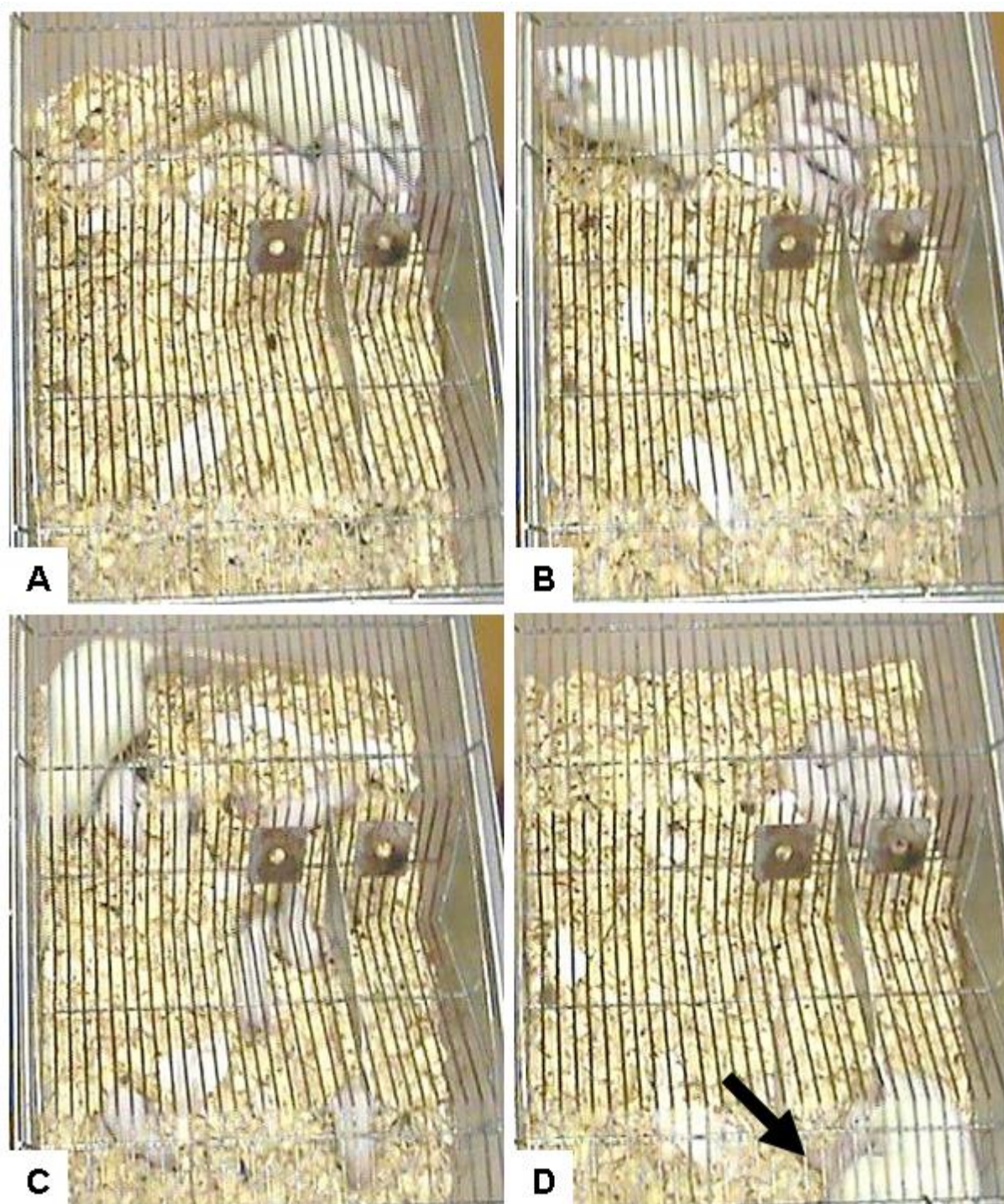


Figura 12 – Comportamento materno. Mãe amamentando os filhotes no ninho (A), mãe explorando a caixa com filhotes no ninho(B), mãe explorando a caixa com filhotes fora do ninho (C), mãe se auto limpando (seta) com filhotes no ninho (D).

Fonte: a autora

3.3.5 Fertilidade

No 19º dia da gestação (DGes19) as ratas do subgrupo A2 da geração F1 foram anestesiadas com tiopental sódico (45 mg/kg, IP, Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), para realização da laparotomia. Os fetos foram separados da placenta e do cordão umbilical, pesados e identificados por sexo (Fig. 13). A viabilidade fetal (VF) foi determinada por um batimento cardíaco visível ou resposta ao toque. Posteriormente, os fetos foram eutanasiados por decapitação. No útero, foram avaliados e contados os sítios de implantação (SI) e sítios de reabsorção (SR), que consiste em perda fetal após a implantação. Os ovários foram coletados para contagem de corpos lúteos (cl) (Fig. 13).

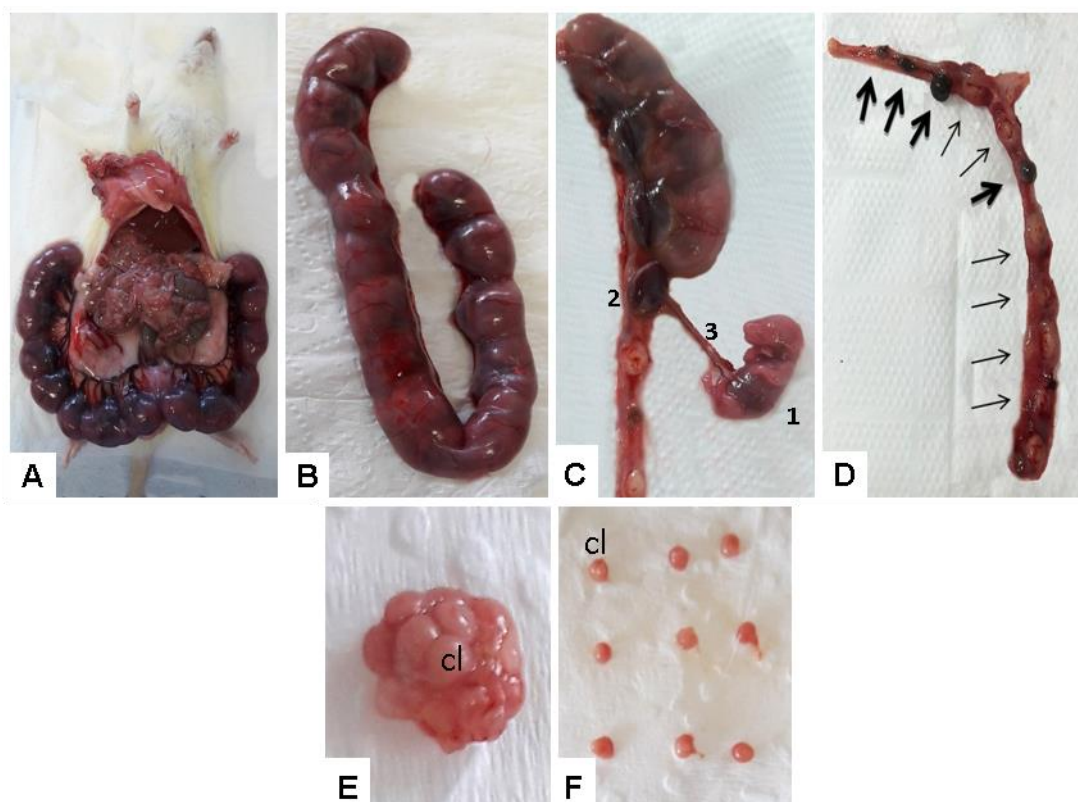


Figura 13 - **A:** laparotomia em fêmea grávida. **B:** útero grávido com fetos e placentas. **C:** feto (1) ligado à placenta (2) pelo cordão umbilical (3). **D:** útero grávido aberto mostrando locais de implantação (setas finas) e reabsorção (setas grossas). **E:** ovário mostrando corpos lúteos (cl). **F:** corpos lúteos (cl) extraídos para contagem.

Fonte: a autora

3.4 DOSAGENS BIOQUÍMICAS DE F1

Após jejum de 12 horas e anestesia com tiopental sódico (45 mg/kg, IP, Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), o sangue foi coletado da veia cava inferior com agulha e seringa estéreis e previamente heparinizadas (Fig. 14) e transferido para tubos tipo *ependorfs* previamente heparinizados. O plasma foi separado por centrifugação (2000 rpm por 15 min) e congelado à -80 °C para posteriores dosagens sanguíneas de estradiol, glicose e lipidograma.

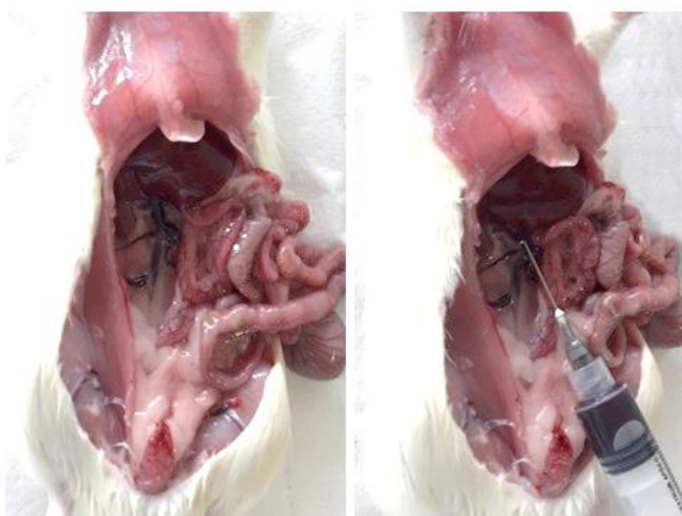


Figura 14 - Punção em veia cava para coleta de sangue.
Fonte: a autora

As concentrações plasmáticas de estradiol foram determinadas por radioimunoensaio utilizando-se kit específico (Architect® Estradiol 7K72) fornecido pelo Abbott Laboratories, EUA. As concentrações de glicose foram determinadas por espectrofotometria com a técnica da glicose-oxidase (Gold Analisa® Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil). O colesterol total, colesterol de alta densidade (HDL) e triglicérides (TG) foram medidos por método enzimático colorimétrico (Gold Analisa® Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

3.5 EUTANÁSIA E COLETA DE ÓRGÃOS DE F1

3.5.1 Nulíparas (A1)

As ratas foram submetidas ao lavado vaginal na tarde do dia anterior à coleta para confirmar a fase do ciclo estral, confirmando o proestro para que a coleta dos ovários ocorresse no estro. Após jejum de 12 horas, as fêmeas foram anestesiadas com tiopental sódico (45 mg/kg, IP, Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil)

para coleta e pesagem de amostras de pâncreas, fígado, útero, ovários, glândula mamária e gorduras retroperitoneal, periovariana e periuterina.

3.5.2 Gestantes (A2)

No DGe19, ratas prenhas foram submetidas ao jejum por 12 horas e anestesiadas com tiopental sódico (45 mg/kg, IP, Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil). Foi realizada laparotomia abdominal e retirada do útero gravídico. Em seguida, foram coletadas e pesadas amostras de pâncreas, fígado e gorduras retroperitoneal, periovariana e periuterina.

3.5.3 Lactantes (A3)

Após o desmame da prole F2, as mães foram submetidas ao jejum de 12 horas, anestesiadas com tiopental sódico (45 mg/kg of BW, i.p., Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) para coleta e pesagem de amostras de pâncreas, fígado e gorduras retroperitoneal, periovariana e periuterina.

3.6 ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E MORFOMÉTRICAS DE F1

As amostras de glândula mamária abdominal direita, ovário esquerdo e útero foram coletadas de fêmeas nulíparas em estro e fixadas em formalina 10% por 48h, desidratadas em série de concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina histológica. Cortes de 5 µm de espessura foram dispostos sobre lâminas de vidro e secas em estufa a 37 °C. As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas, hidratadas, coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) e montadas com lamínulas coladas com Ethelan.

A análise histopatológica do tecido mamário, dos ovários e do útero foram realizadas utilizando imagens digitais (TIFF, 24 bits, 1338 × 1040 pixels) obtidas em microscópio de luz Zeiss Axioscope A1 (Zeiss, Alemanha). A espessura (µm) da camada de tecido adiposo subcutâneo foi obtida utilizando 150 mensurações por grupo (aumento de 50x); a área de adipócitos (µm²) foi obtida usando 150 adipócitos por grupo (aumento de 200x), a contagem do número total de adipócitos foi realizada contando o número total de adipócitos por campo fotomicrográfico. Para essas medidas foram utilizadas seis imagens digitais de cada animal (n = 5 animais / grupo). As análises morfométricas foram realizadas utilizando o software Image-Pro Plus 6.1

para Windows (Cibernética, Silver Spring, MD, EUA).

Nos ovários, foram quantificados, por campo fotomicrográfico, o número de folículos em crescimento (folículo primário unilaminar, folículo primário multilaminar, folículo secundário e maduro ou pré-ovulatório), folículos císticos, folículos atrésicos (folículo em degeneração com apoptoses evidentes) e corpos lúteos. Para esta análise foram utilizados 20 campos fotomicrográficos, sendo 5 animais por grupo e 4 imagens por animal.

3.7 WESTERN BLOT DE OVÁRIOS

As proteínas totais foram extraídas de amostras de ovários. As amostras foram desnaturadas em solução tampão Laemmli (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10% de glicerol, 2% de SDS, 1% de 2-mercaptoetanol, 0,001% de azul de bromofenol). As proteínas foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de nitrocelulose (Amersham Protran, GE Healthcare, Little Chalfont, BUX, UK). As membranas foram incubadas com anticorpos primários (visando ER α , ER β e GAPDH em diluições 1: 1000, da Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), e depois com anticorpo secundário específico conjugado com HRP (anti-coelho a 1: 2000 diluição) por 90 minutos, e coberta com solução de detecção de quimiluminescência (Amersham ECL, GE Healthcare, Little Chalfont, BUX, Reino Unido). A quimiluminescência foi detectada por um sistema de documentação de imagens (ImageQuant LAS 4000 series, GE Healthcare, Chicago, IL, EUA). A concentração relativa da expressão proteica foi calculada comparando os valores de proteínas alvo com as bandas do controle.

3.8 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO FÍSICO, SENSÓRIO-MOTOR E REPRODUTIVO NA PROLE F2

A avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor é realizada por meio do acompanhamento diário do surgimento dos parâmetros listados abaixo. Os testes foram realizados a partir do PN2, no qual os dados foram anotados para cada filhote de acordo com o dia em que os respectivos parâmetros apareceram e realizados sempre no mesmo período do dia (matutino). Os filhotes foram identificados com marcação nas patas anteriores e posteriores utilizando tinta nanquim. Antes de manusear os filhotes e proceder os testes, a mãe era retirada do ninho e mantida em caixa de polipropileno pequena com grade. Os filhotes eram manuseados

cuidadosamente com as mãos usando luvas previamente sujas na maravalha do ninho para evitar rejeição dos filhotes pela mãe após a realização dos testes (304).

- **Reflexo Postural:** a partir do PN2, o filhote é colocado em decúbito dorsal em uma superfície lisa e observa-se durante 10 segundos a resposta reflexa do animal em se virar, com o ventre voltado para a superfície, recuperando a postura. Anota-se o dia de vida pós-natal em que o animal conseguiu realizar de forma perfeita no tempo determinado. O teste pode ser realizado com até duas tentativas. (Fig. 15).



Figura 15 - Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Reflexo postural: filhote colocado em superfície lisa em decúbito dorsal recuperando a postura.

Fonte: a autora

- **Esquiva ao Abismo:** a partir do PN2, o filhote é colocado com as patas anteriores tocando a borda da mesa e a resposta a esse reflexo é o movimento do animal em se afastar da borda, dentro do tempo determinado de 10 segundos. O teste pode ser realizado com até duas tentativas (Fig. 16).

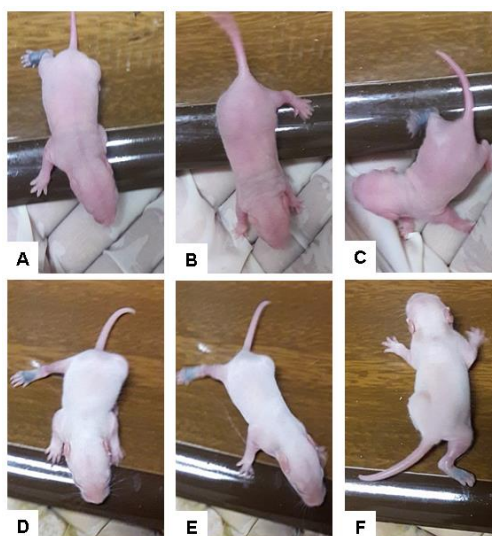


Figura 16 – Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Esquiva ao abismo. Filhote sem reflexo (A-C) e filhote com reflexo (D-F).

Fonte: a autora

- **Geotaxia Negativa:** a partir do PN2, o filhote é colocado em uma superfície lisa, em ângulo de 35°, voltado com a cabeça para baixo. A resposta a esse parâmetro consiste em o animal virar-se de cabeça para cima em 20 segundos. O teste pode ser realizado com até duas tentativas (Fig. 17).



Figura 17 – Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Geotaxia negativa. Filhote realizando o teste com êxito.

Fonte: a autora

- **Abertura dos olhos:** após o PN2 é observado o dia da abertura completa dos olhos, com fissura longitudinal nas pálpebras dos dois globos oculares (Fig. 18).

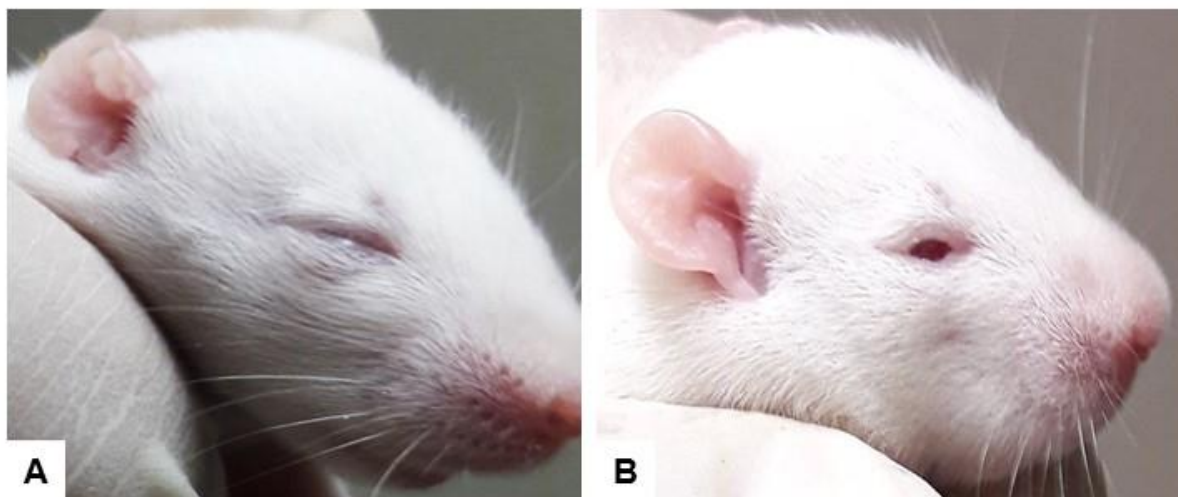


Figura 18 – Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: abertura de olhos. Filhote com olho fechado (A) e filhote com olho aberto (B).

Fonte: a autora

- **Erupção dos dentes incisivos:** após o PN2 é realizada a abertura da boca dos filhotes delicadamente na qual se permite observar a erupção dos dois dentes incisivos superiores (Fig. 19).

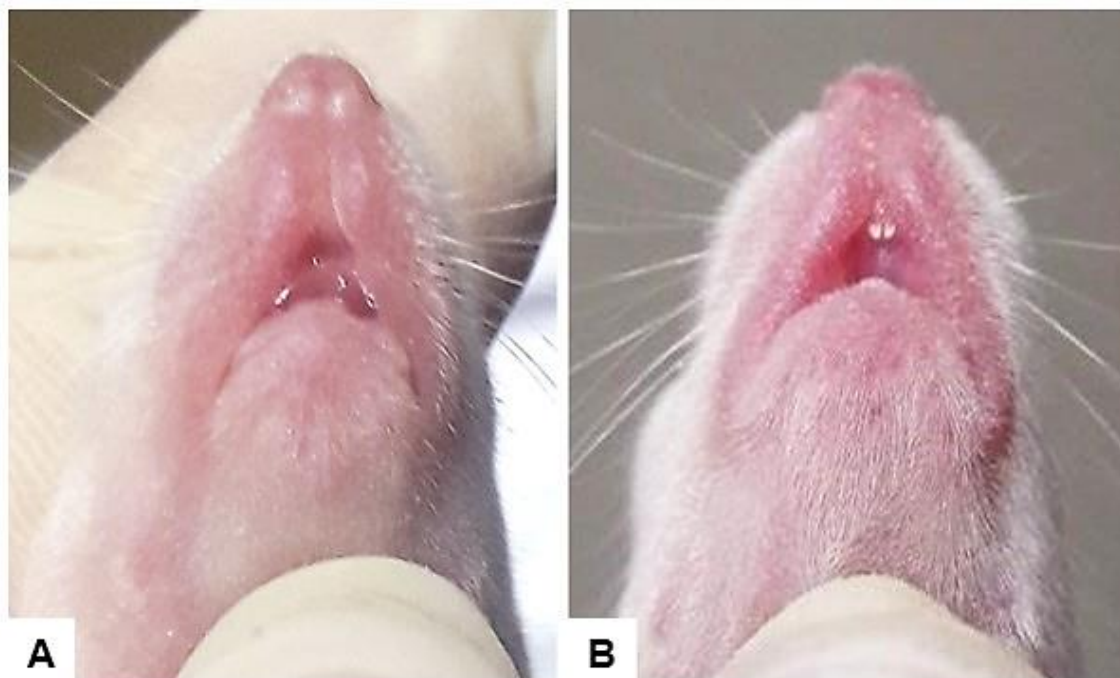


Figura 19 – Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: erupção dos dentes incisivos. Filhote sem dentes incisivos (A) e filhote com dentes incisivos (B).
Fonte: a autora

- **Desdobramento das orelhas:** após o PN1, é verificado se a parte superior das duas orelhas se afastou da cabeça (Fig. 20).



Figura 20 – Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Desdobramento das orelhas. Filhote com orelha dobrada (A) e filhote com orelha desdobrada (B).
Fonte: a autora

- **Olfato:** após o PN7, o filhote é posicionado no meio de uma caixa limpa ou superfície lisa, com maravalha nova em um canto da caixa, e de lado oposto maravalha proveniente do ninho do animal. É cronometrado o tempo de 20 segundos, sob observação para onde o animal se locomove. No dia em que o animal se move para o canto com maravalha proveniente do ninho, anota-se o dia pós-natal correspondente. Esse teste pode ser realizado com até duas tentativas para confirmação do parâmetro (Fig. 21).

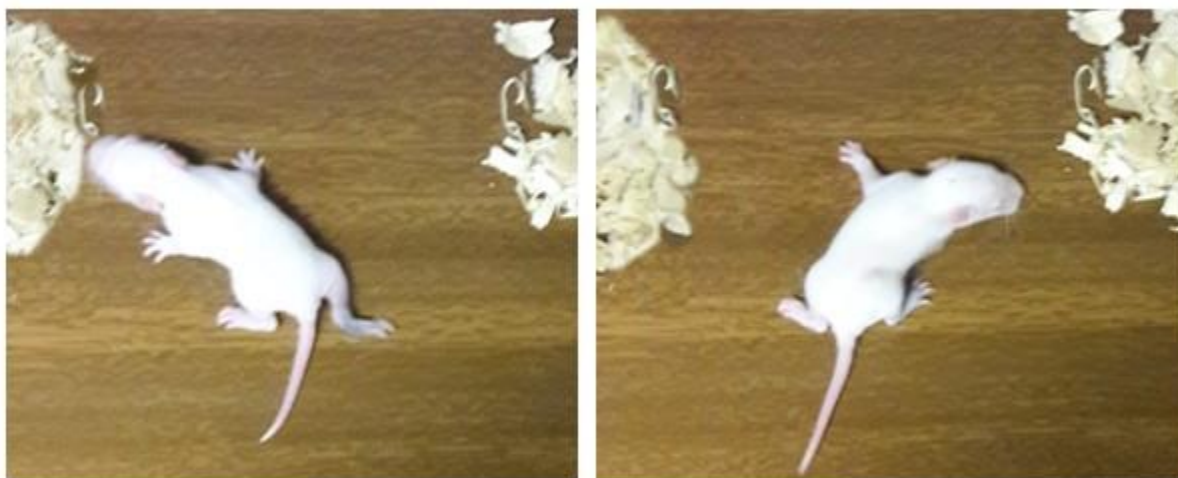


Figura 21 - Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: olfato. Filhote se orientando para a maravalha do ninho (direita) e limpa (esquerda).

Fonte: a autora

- **Sobressalto auditivo:** após o PN7, o filhote é colocado na palma da mão e em seguida o pesquisador solta um estalo com a boca, como o som de um beijo estalado, e observa-se a reação do animal. A reação de aparecimento da função auditiva consiste no sobressalto do filhote, ou seja, uma parada súbita seguida de um salto de alguns milímetros, como se fosse um pequeno susto.

● **Queda livre:** após o PN7, o animal é segurado pelas quatro patas com o dorso voltado para a base da caixa contendo maravalha. Solta-se o animal a uma altura de 30 cm e verifica-se se o animal cai com as quatro patas voltadas para base da caixa (Fig. 22).

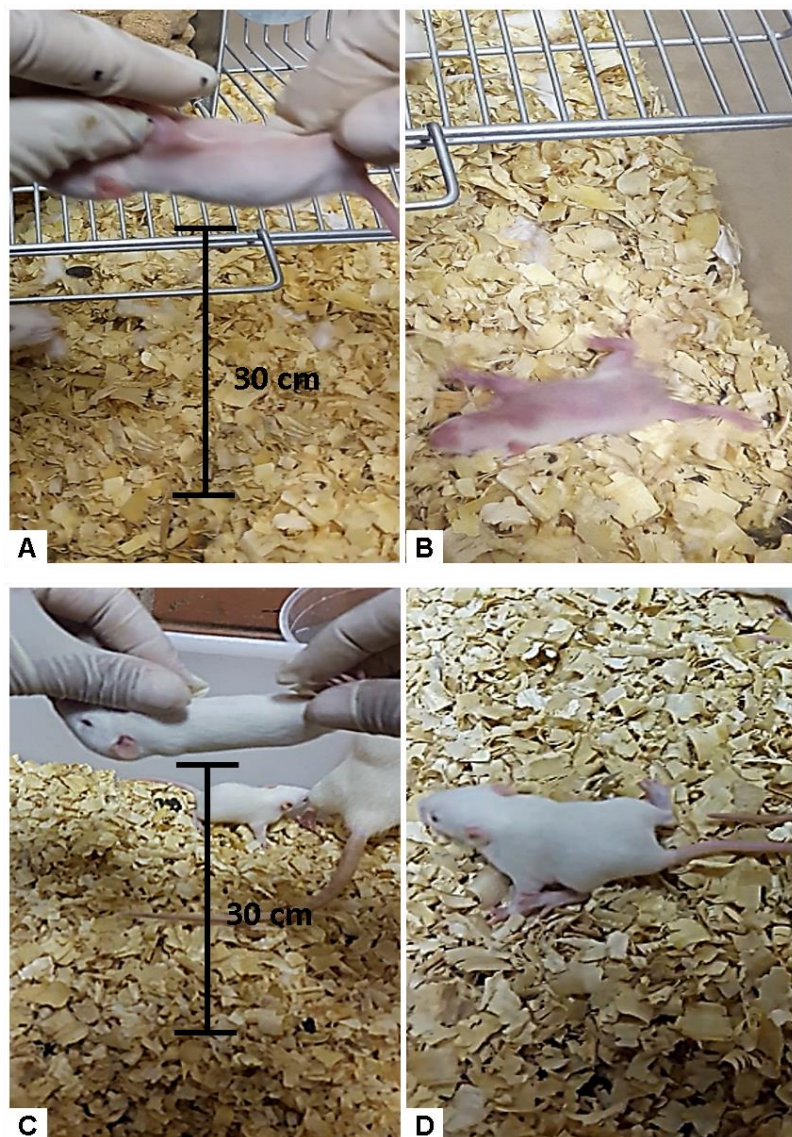


Figura 22 – Avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor: Queda livre. Filhote sem reflexo caindo com ventre voltado para cima (A-B) e com reflexo, caindo com as quatro patas voltadas para a base da caixa (C-D).

Fonte: a autora

● **Descida dos testículos:** a partir do PN14 verifica-se o dia em que os dois testículos do animal podem ser apalpados no escroto (Fig. 23). No macho, a descida dos testículos inicia a partir de PN15 (317) .



Figura 23 – Avaliação da instalação da puberdade em machos. Descida dos testículos em **B** (seta).
Fonte: a autora

● **Abertura vaginal:** a partir do PN25 verifica-se o dia em que houve a completa abertura vaginal da fêmea. (Fig. 24).

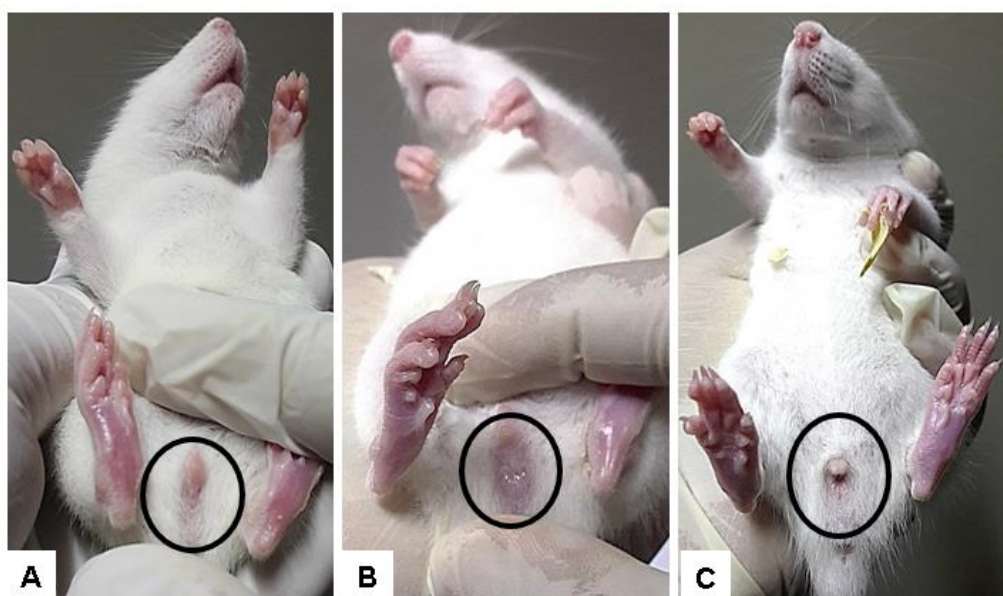


Figura 24 – Avaliação da instalação da puberdade em fêmeas. Fêmea com vagina (círculos) fechada (**A**), início da abertura (**B**) e com abertura vaginal completa (**C**).
Fonte: a autora

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As análises estatísticas dos dados e a construção dos gráficos foram realizadas com o software *GraphPadPrism*® versão 6 (*GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA*). Os resultados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para a comparação das diferenças entre os grupos experimentais foi usado o teste ANOVA duas vias seguido do pós-teste *Tukey* para análises das curvas de massa corporal e ingestão alimentar, e o teste *t* de *Student* não pareado para análise dos demais dados. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE SOBRE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E METABÓLICOS DA GERAÇÃO F1

Os resultados indicam que a redução de ninhada no grupo SLF1 promoveu aumento significativo da massa corporal nas ratas já no PN7 (Fig 25) (NLF1 $13,6 \pm 0,27$ g vs SLF1 $16,1 \pm 0,41$ g; $p = 0,0001$; Fig. 26A), que se manteve durante a vida adulta PN70 (NLF1 $186,3 \pm 2,12$ g vs SLF1 $196,7 \pm 2,83$ g; $p = 0,005$; Fig. 26B), no final da gestação (NLF1 $299,1 \pm 8,12$ g vs SLF1 $333,7 \pm 11,92$ g; $p = 0,03$; Fig. 26C) e da lactação (NLF1 $233,9 \pm 7,05$ g vs SLF1 $266,1 \pm 11,08$ g; $p = 0,04$; Fig. 26D).

Durante o PN21 a PN70, o consumo alimentar (Área Sob a Curva – ASC) foi maior no grupo SLF1, comparado ao grupo NLF1 (NLF1 $312,7 \pm 17,08$ vs SLF1 $366,7 \pm 16,93$ $p = 0,04$; Fig. 26E). No entanto, não houve diferença significativa nos períodos gestacional (NLF1 $2,9 \pm 0,35$ vs SLF1 $4,8 \pm 1,19$; $p = 0,15$; Fig. 26F) e lactacional (NLF1 $25,4 \pm 1,10$ vs SLF1 $27,3 \pm 0,74$; $p = 0,15$; Fig. 26G).

A tabela 8 mostra o efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre a gordura corporal. A massa das gorduras periuterina, perigonadal e retroperitoneal foi maior no grupo SLF1, comparado ao grupo NLF1, em todas as fases (nulípara, gestacional e lactacional) (Fig. 27). Na mesma tabela observamos que o grupo SLF1 apresentou aumento significativo nas massas do fígado na fase da lactação e do pâncreas em todas as fases (nulípara, gestacional e lactacional).

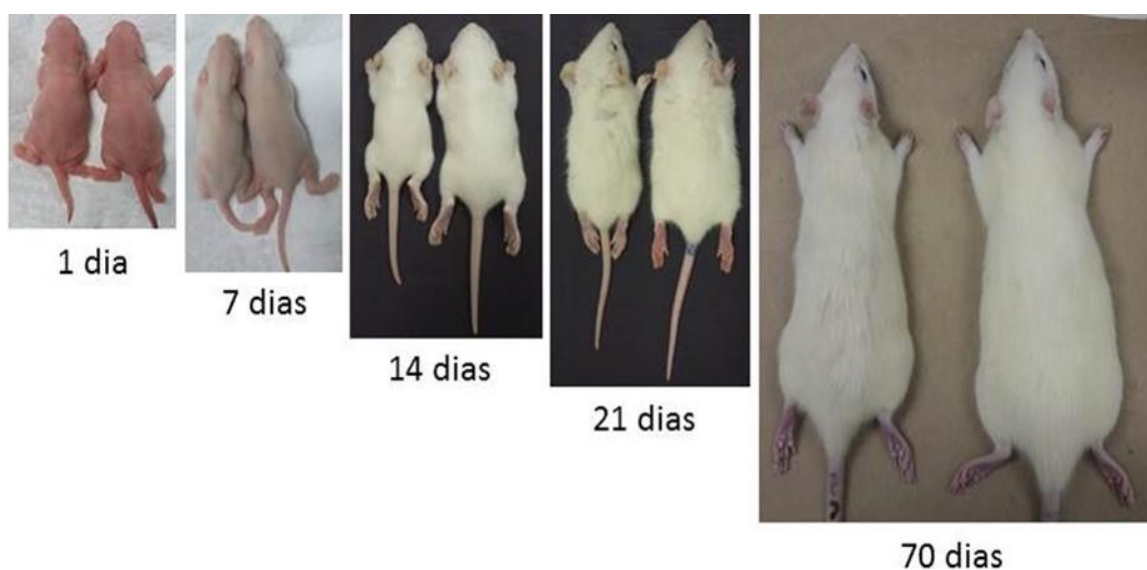


Figura 25- Imagens representativas comparando o tamanho de fêmeas NLF1 (esquerda) e SLF1 (direita) desde o nascimento até 70 dias de idade.

Fonte: a autora

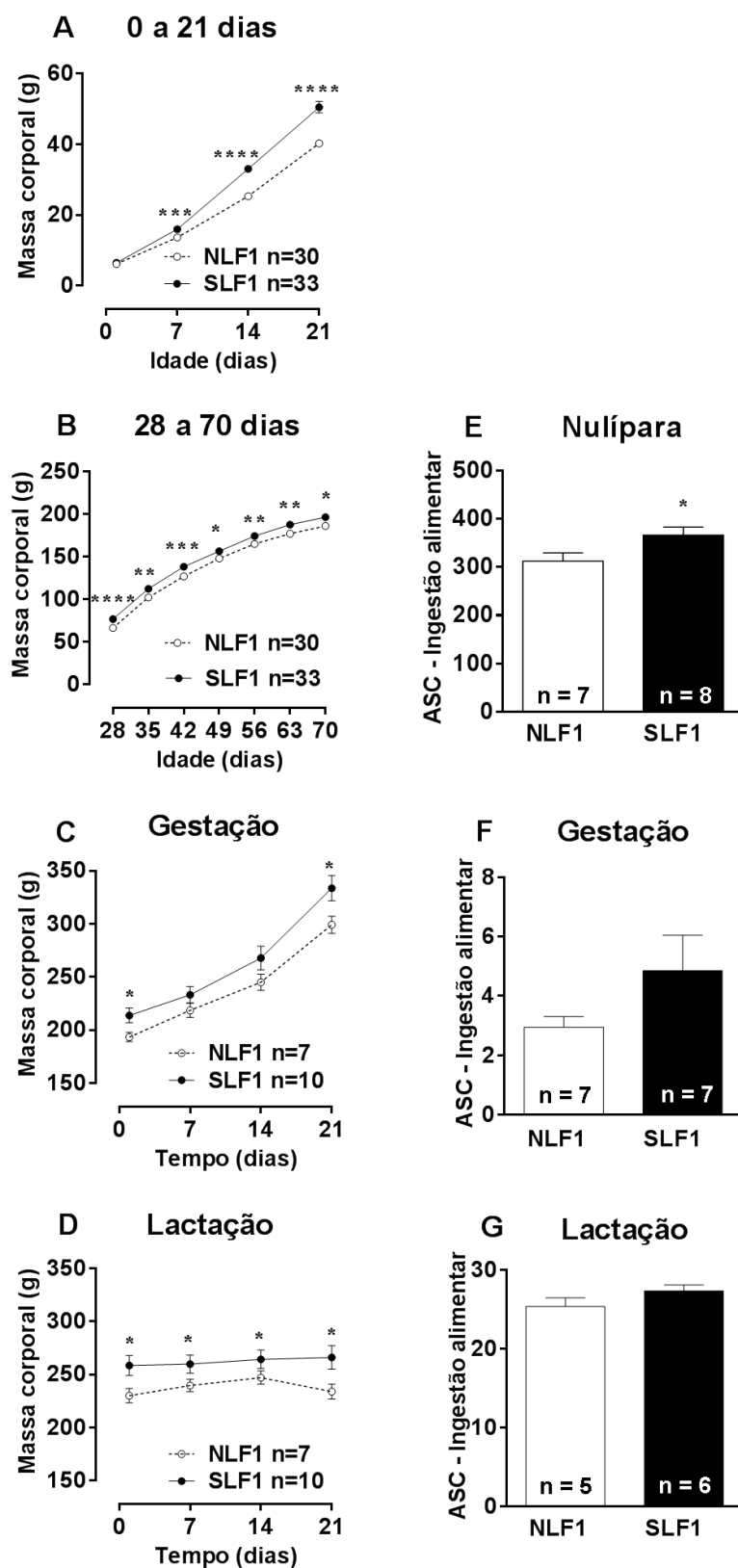


Figura 26 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre a massa corporal e ingestão de alimentos em ratas F1. Massa corporal antes do desmame (**A**), após o desmame (**B**), durante a gestação (**C**) e durante a lactação (**D**). **E-G**: ingestão alimentar - área sob a curva (ASC). **E**: ASC – Ingestão alimentar de ratas nulíparas. **F**: ASC – Ingestão alimentar na fase gestação. **G**: ASC – Ingestão alimentar na fase lactação. Dados expressos em média $\pm$ EPM. ANOVA two-way; pós teste de Tukey; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Tabela 8 - Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre gorduras, fígado e pâncreas de ratas nulíparas, gestantes e lactantes da geração F1

ÓRGÃOS	MASSAS DOS ÓRGÃOS/FASE (mg)					
	NULÍPARA		GESTAÇÃO		LACTAÇÃO	
	NLF1	SLF1	NLF1	SLF1	NLF1	SLF1
Gordura periuterina	1483 ± 114,3 (n=10)	2111 ± 158,7** (n=11)	2771 ± 259,0 (n=10)	3765 ± 311,3* (n=8)	1445 ± 250,7 (n=7)	2388 ± 284,4* (n=7)
Gordura perigonadal	874 ± 68,9 (n=10)	1709 ± 256,5** (n=10)	1519 ± 156,5 (n=8)	2275 ± 269,9* (n=6)	620 ± 72,2 (n=7)	1469 ± 282,5* (n=8)
Gordura retroperitoneal	1005 ± 88,3 (n=10)	1884 ± 240,8** (n=9)	1915 ± 145,8 (n=10)	2768 ± 328,7* (n=9)	827 ± 142,1 (n=7)	2109 ± 524,0* (n=7)
Fígado	6595 ± 243,8 (n=10)	6600 ± 241,2 (n=11)	10147 ± 485,2 (n=10)	10435 ± 316,1 (n=9)	9778 ± 581,9 (n=7)	11605 ± 602,9* (n=7)
Pâncreas	413 ± 18,8 (n=9)	473 ± 20,0* (n=9)	426 ± 13,2 (n=10)	537 ± 27,3** (n=9)	460 ± 12,8 (n=6)	545 ± 23,3* (n=8)

Os resultados são expressos em média ±EPM; *p<0,05; **p<0,01.

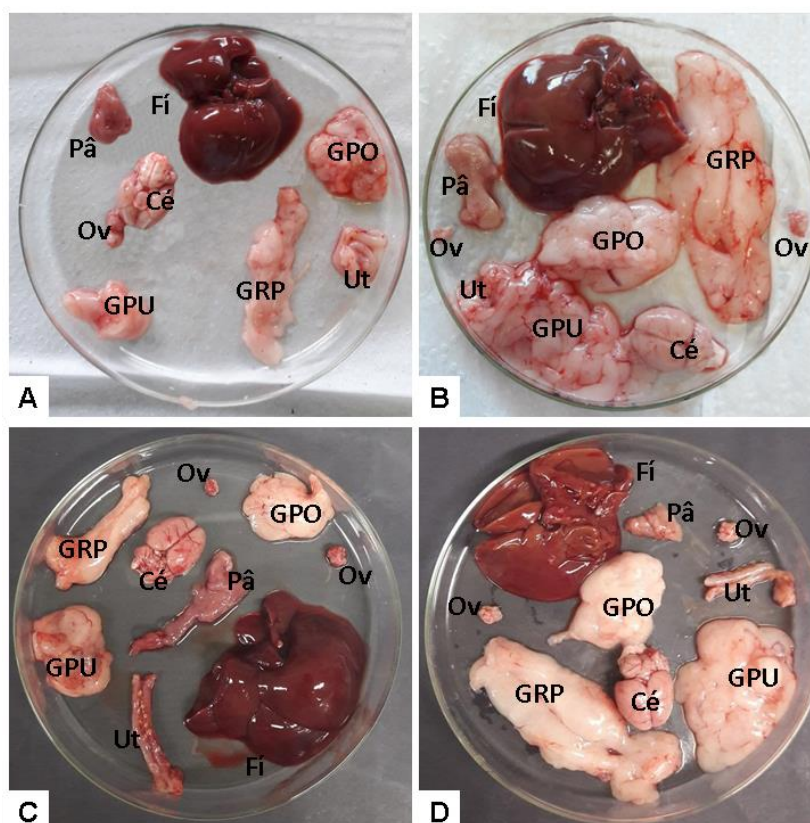


Figura 27-Imagens representativas de órgãos e gorduras dos grupos NLF1 (esquerda) e SLF1 (direita) de ratas nulíparas (A-B) e lactantes (C-D). Fí: fígado. Pâ: pâncreas. Cé: cérebro. Ut: útero. Ov: ovário. GPO: gordura periovariana. GRP: gordura retroperitoneal. GPU: gordura periuterina.

Fonte: a autora

4.2 EFEITOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE SOBRE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS E CONSUMO DE LEITE DA GERAÇÃO F2

A prole F2 do grupo SLF1 (GOF2), machos e fêmeas, teve aumento significativo na massa corporal em relação à do grupo NLF1 (GCF2), desde o nascimento até PN21. Em PN21 os filhotes machos do grupo GOF2 apresentaram maior ganho de massa comparado à prole GCF2 (GCF2 $38,9 \pm 0,55$ g vs GOF2 $45,5 \pm 0,66$ g; $p < 0,0001$; Fig.28A); resultado semelhante foi observado nas fêmeas GOF2 (GCF2 $38,5 \pm 0,48$ g vs GOF2 $42,8 \pm 0,95$ g; $p = 0,0007$; Fig. 28B). Além disso, o consumo de leite foi maior na prole GOF2, comparado a prole GCF2, em machos (GCF2 $0,19 \pm 0,040$ ml vs GOF2 $0,45 \pm 0,036$ ml; $p = 0,0003$; Fig. 28C) e em fêmeas (GCF2 $0,18 \pm 0,018$ ml vs GOF2 $0,41 \pm 0,044$ ml; $p = 0,0002$; Fig. 28D).

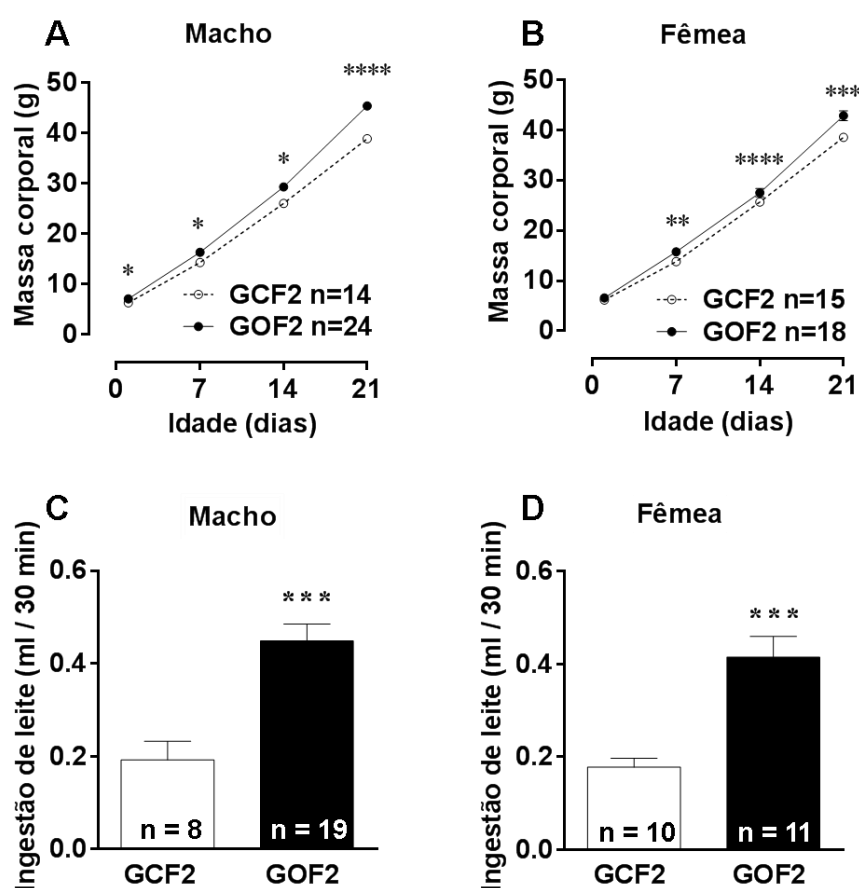


Figura 28 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre a massa corporal e ingestão de leite da prole F2 dos grupos GCF2 e GOF2. **A:** Massa corporal da prole F2 macho. **B:** Massa corporal da prole F2 fêmea. **C:** consumo de leite pelos filhotes machos. **D:** consumo de leite pelos filhotes fêmeas. Os dados são expressos em média $\pm$ EPM. Teste t de Student. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.3 EFEITOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE SOBRE PARÂMETROS REPRODUTIVOS E COMPORTAMENTAIS DE RATAS F1

As ratas do grupo SLF1 apresentaram instalação da puberdade antecipada (NLF1 $36,1 \pm 0,61$ dia vs SLF1 $34,4 \pm 0,44$ dia; $p=0,03$; Fig. 29A) e menor número de estros durante o período de 20 dias (NLF1 $4,5 \pm 0,12$ vs SLF1 $4,1 \pm 0,13$; $p = 0,03$; Fig. 29B), comparadas ao grupo NLF1.

No parâmetro comportamento sexual, as fêmeas SLF1, comparadas ao grupo NLF1, apresentaram menor proceptividade (NLF1 $92 \pm 4,0\%$ vs SLF1 $46 \pm 7,2\%$; $p<0,0001$; Fig. 29C), receptividade (NLF1 $92 \pm 7,0\%$ vs SLF1 $57 \pm 9,6\%$; $p = 0,01$; Fig. 29D) e coeficiente de lordose (NLF1 $96 \pm 3,7\%$ vs SLF1 $77 \pm 7,4\%$; $p = 0,03$; Fig. 29E).

Não houve alteração no percentual de pré-implantação (Fig. 30A) e perdas pós-implantação (Fig. 30B), no entanto, houve redução no número de corpos lúteos do grupo SLF1, comparado ao grupo NLF1 (NLF1 $13,3 \pm 0,42$ vs SLF1 $11,6 \pm 0,33$; $p = 0,01$; Fig. 30C). Não houve diferença significativa no número de fetos vivos machos e fêmeas (Fig. 30D e Fig. 30E). Todavia, o número de filhotes nascidos vivos foi menor no grupo SLF1 em machos (NLF1 $4,9 \pm 0,47$ vs SLF1 $3,5 \pm 0,33$; $p = 0,04$; Fig. 30G) e fêmeas (NLF1 $7,1 \pm 0,51$ vs SLF1 $5,9 \pm 0,23$; $p = 0,04$; Fig. 30H). Não houve diferença significativa no número total de fetos vivos (Fig. 30F), mas o número total de filhotes nascidos vivos foi menor no grupo SLF1 (NLF1 $11,4 \pm 0,53$ vs SLF1 $9,8 \pm 0,46$; $p = 0,03$; Fig. 30I).

Quanto ao comportamento maternal, a tabela 9 mostra que no primeiro dia de teste (PN3) as fêmeas SLF1, comparadas ao grupo NLF1, apresentaram maior latência de recuperação do segundo e terceiro filhote, no entanto, a latência de recuperação do último filhote foi menor no primeiro e no segundo dia de teste (PN7). No terceiro dia de teste (PN11) não houve diferença significativa na latência de recuperação dos filhotes. As fêmeas ficaram mais tempo no ninho no primeiro dia de teste. Contudo, não houve diferença significativa no segundo e terceiro dia de teste nesses parâmetros, mas o número de entradas e saídas no primeiro, segundo e terceiro dia de teste foi menor no grupo SLF1. Por fim, as fêmeas SLF1 apresentaram escore de cuidado materno maior somente no primeiro dia de teste, comparado ao grupo NLF1 (Tabela 9).

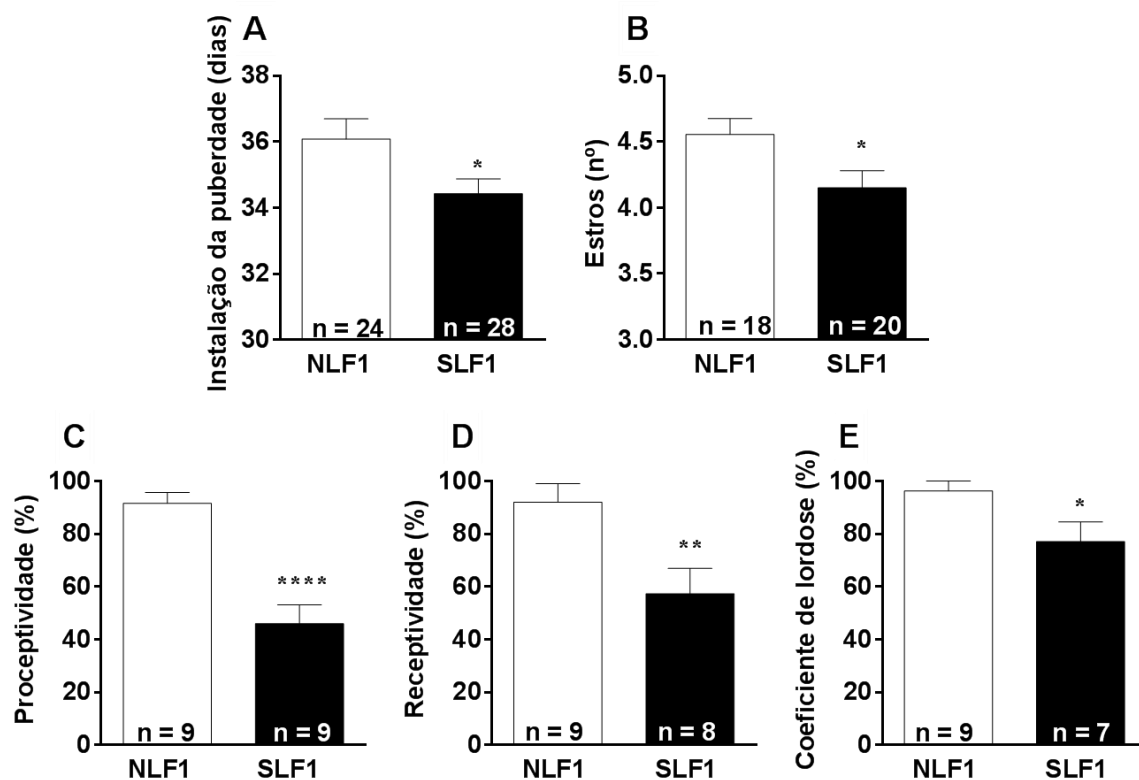


Figura 29 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre parâmetros reprodutivos em ratas NLF1 e SLF1. **A:** instalação da puberdade. **B:** número de estros. **C-E:** comportamento sexual. **C:** proceptividade. **D:** receptividade. **E:** coeficiente de lordose. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. Teste t de Student; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

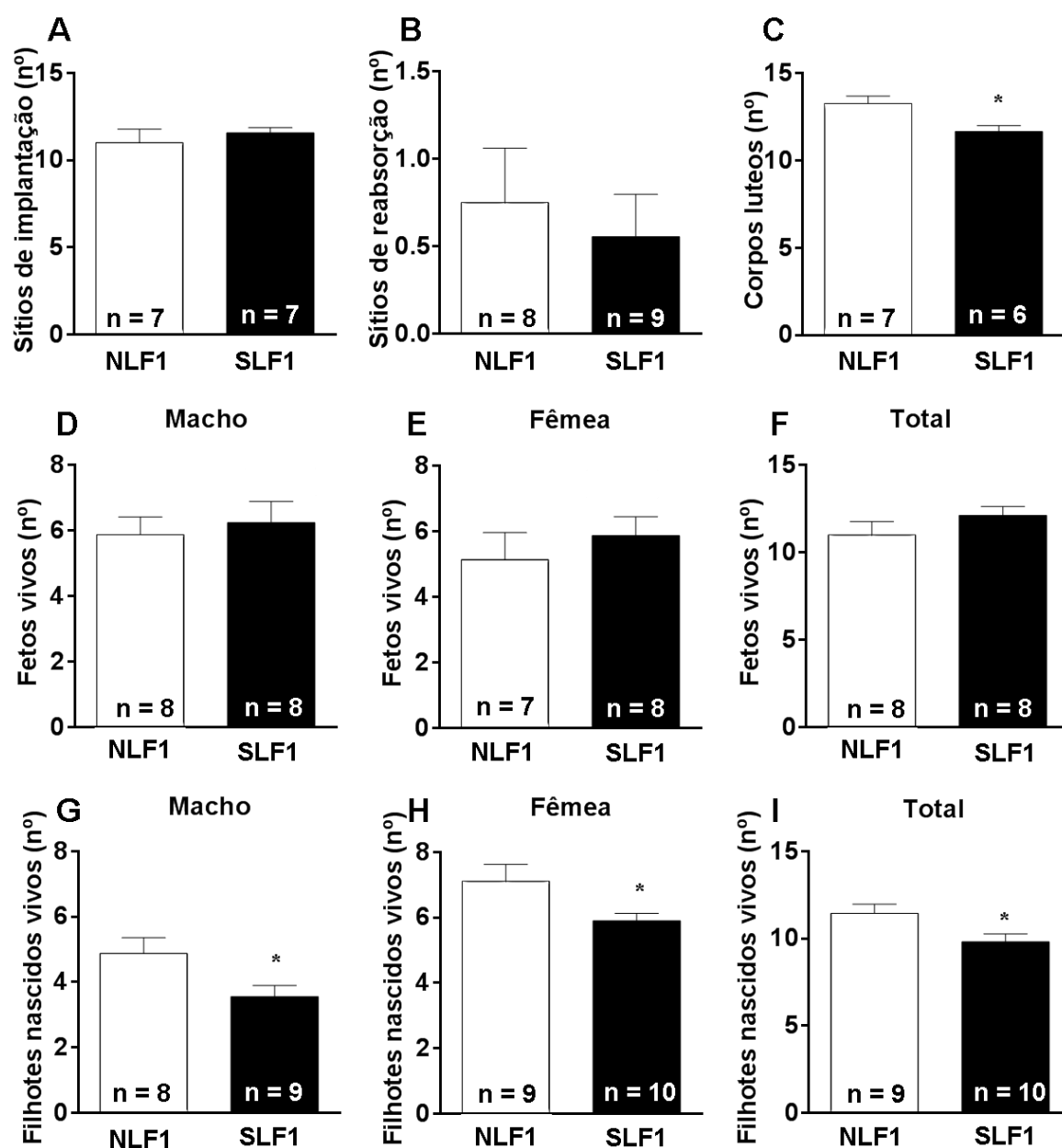


Figura 30 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre a fertilidade de ratas NLF1 e SLF1. Número de implantações (**A**), número de reabsorções (**B**) e número de corpos lúteos (**C**). Número de fetos vivos machos (**D**), fêmeas (**E**) e total (**F**). Número de filhotes nascidos vivos machos (**G**), fêmeas (**H**) e total (**I**). Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. Teste t de Student; * $p < 0,05$.

Tabela 9 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre o comportamento maternal de ratas lactantes F1

COMPORTAMENTO MATERNAL						
PARÂMETROS	1º dia de teste (PN3)		2º dia de teste (PN7)		3º dia de teste (PN11)	
	NLF1	SLF1	NLF1	SLF1	NLF1	SLF1
Latência 1º filhote (s)	24,1 ± 5,61 (n=6)	27,7 ± 5,40 (n=7)	60,4 ± 16,98 (n=7)	60,3 ± 14,57 (n=8)	73,0 ± 24,03 (n=7)	73,7 ± 19,86 (n=9)
Latência 2º filhote (s)	36,7 ± 6,11 (n=7)	68,1 ± 12,48* (n=7)	81,0 ± 15,99 (n=8)	89,6 ± 18,32 (n=8)	57,6 ± 16,11 (n=8)	65,9 ± 14,99 (n=9)
Latência 3º filhote (s)	43,3 ± 6,21 (n=7)	83,7 ± 12,79* (n=8)	105,8 ± 17,01 (n=8)	129,2 ± 25,67 (n=6)	79,9 ± 17,96 (n=8)	94,1 ± 20,28 (n=10)
Latência último filhote (s)	223,7 ± 22,19 (n=7)	131,9 ± 25,36* (n=7)	245,4 ± 30,45 (n=8)	155,3 ± 27,46* (n=7)	168,0 ± 28,60 (n=7)	247,9 ± 41,08 (n=8)
Tempo dentro do ninho (s)	471,3 ± 42,00 (n=8)	701 ± 77,50* (n=5)	607,9 ± 86,62 (n=8)	698,5 ± 113,90 (n=8)	595,4 ± 36,79 (n=10)	617,7 ± 93,56 (n=10)
Entradas e saídas do ninho (n)	18 ± 1,59 (n=8)	11,5 ± 1,93* (n=8)	17 ± 2,22 (n=7)	11 ± 0,98* (n=8)	14,2 ± 1,54 (n=10)	8 ± 1,07** (n=10)
Escore cuidado materno	1,1 ± 0,12 (n=8)	2 ± 0,36* (n=6)	1,6 ± 0,26 (n=8)	1,9 ± 0,35 (n=8)	1,4 ± 0,16 (n=10)	1,8 ± 0,24 (n=10)

Os resultados são expressos em média ± EPM; *p<0,05; **p<0,01.

s: segundos n: número PN: dia pós-natal

4.4 EFEITOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE SOBRE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE F1

No grupo SLF1, comparado ao grupo NLF1, houve aumento das concentrações de glicose sanguínea na fase nulípara (NLF1 $125,7 \pm 5,94$ mg/dl vs SLF1 $157,2 \pm 8,31$ mg/dl; $p = 0,01$; Fig. 31A) e de triglicérides séricos nas fases gestação (NLF1 $315,6 \pm 30,13$ mg/dl vs SLF1 $462,5 \pm 56,97$ mg/dl; $p = 0,04$; Fig. 31E) e lactação (NLF1 $73,8 \pm 4,06$ mg/dl vs SLF1 $131,7 \pm 19,29$ mg/dl; $p = 0,03$; Fig. 31F). Esse grupo também apresentou redução das concentrações de HDL sérico na gestação (NLF1 $23,5 \pm 3,93$ mg/dl vs SLF1 $13,8 \pm 0,61$ mg/dl; $p = 0,05$; Fig. 31K) e lactação (NLF1 $49,1 \pm 3,21$ mg/dl vs SLF1 $35,5 \pm 4,37$ mg/dl; $p = 0,05$; Fig. 31L) sem diferença significativa nas concentrações de colesterol total, e redução da concentração sérica de estradiol na fase nulípara (NLF1 $59,3 \pm 3,73$ pg/ml vs SLF1 $41,5 \pm 4,05$ pg/ml; $p = 0,01$; Fig. 31M).

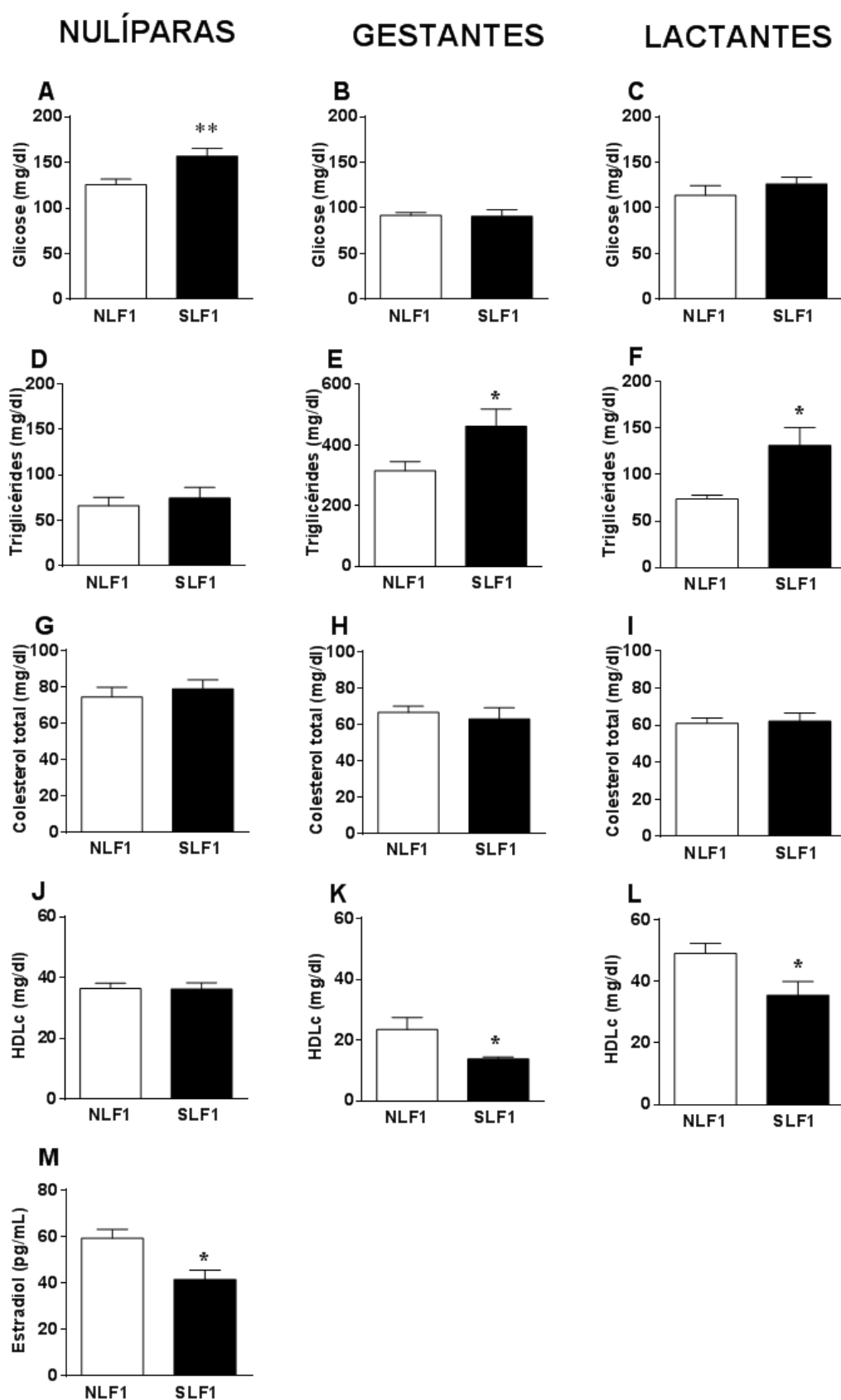


Figura 31 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre parâmetros bioquímicos dos grupos SLF1 e NLF1. Dosagens de glicose (**A-C**), triglicérides (**D-F**), colesterol total (**G-I**), colesterol HDL (**J-L**) nas fases nulípara, gestação e lactação. **M**: dosagem de estradiol na fase nulípara. Os resultados são expressos em média ± EPM. Teste t de Student, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

4.5 EFEITOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE DE F1 SOBRE O DESENVOLVIMENTO FÍSICO, SENSORIO-MOTOR E REPRODUTIVO DA PROLE F2

A tabela 10 mostra os resultados obtidos da prole dos grupos NLF1 e SLF1. Nota-se que a prole GOF2 apresentou antecipação dos parâmetros sensório-motor (reflexo postural, geotaxia negativa, esquiva ao abismo) em machos e fêmeas. Todavia o reflexo de sobressalto auditivo foi mais tardio em machos e fêmeas, não tendo diferença significativa nos parâmetros de olfato e queda livre. Quanto aos parâmetros físicos, foram antecipados a erupção dos incisivos e a instalação da puberdade, e mais tardio a abertura dos olhos, sem diferença significativa no desdobramento das orelhas.

Tabela 10- Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce de F1 sobre o desenvolvimento físico, sensório-motor e reprodutivo da prole F2

PARÂMETROS		AVALIAÇÃO FÍSICA, SENSÓRIO-MOTOR E REPRODUTIVA (idade pós-natal - PN)			
		GCF2		GOF2	
		MACHO	FÊMEA	MACHO	FÊMEA
SENSÓRIO-MOTOR	Reflexo postural	1,4 ± 0,16 (n=19)	1,7 ± 0,14 (n=23)	1,0 ± 0,05*	1,0 ± 0,04****
	Geotaxia negativa	7,5 ± 0,35 (n=16)	7,3 ± 0,27 (n=22)	6,7 ± 0,20*	6,5 ± 0,22*
	Esquiva ao abismo	8,0 ± 0,19 (n=16)	8,6 ± 0,26 (n=21)	7,4 ± 0,21*	7,4 ± 0,23**
	Olfato	10,1 ± 0,47 (n=18)	10,9 ± 0,40 (n=23)	10,0 ± 0,39 (n=28)	11,4 ± 0,19 (n=22)
	Sobressalto auditivo	12,8 ± 0,18 (n=18)	12,5 ± 0,16 (n=23)	13,5 ± 0,22*	13,2 ± 0,21**
	Queda livre	13,8 ± 0,29 (n=18)	13,9 ± 0,27 (n=23)	14,2 ± 0,18 (n=25)	14 ± 0,22 (n=22)
	Desdobramento da orelha	3,3 ± 0,10 (n=19)	3,3 ± 0,09 (n=23)	3,5 ± 0,10 (n=25)	3,5 ± 0,10 (n=22)
FÍSICO	Erupção incisivos	10,2 ± 0,21 (n=17)	9,9 ± 0,21 (n=23)	9,5 ± 0,18*	9,2 ± 0,15*
	Abertura dos olhos	14,0 ± 0,14 (n=18)	14,0 ± 0,16 (n=23)	14,4 ± 0,11*	14,7 ± 0,17*
	Instalação da puberdade	20,2 ± 0,43 (n=18)	35,6 ± 0,33 (n=26)	18,5 ± 0,27**	33,7 ± 0,37***
REPRODUTIVO					

Os resultados são expressos em média ± EPM; *p<0,05; **p<0,01; ***P<0,001; ****P<0,0001

4.6 EFEITOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE SOBRE GLÂNDULA MAMÁRIA, OVÁRIO E ÚTERO DE F1

As análises morfométricas das glândulas mamárias das ratas nulíparas mostraram aumento da espessura da camada adiposa (NLF1 $385,6 \pm 7,97 \mu\text{m}$ vs SLF1 $632,1 \pm 14,75 \mu\text{m}$; $p < 0,0001$; Fig. 32 A, B e E) e da área dos adipócitos (NLF1 $1265,0 \pm 22,21 \mu\text{m}^2$ vs SLF1 $2885,0 \pm 43,71 \mu\text{m}^2$; $p < 0,0001$; Fig. 32 C, D e G) nos grupos SLF1 quando comparados aos grupos NLF1. Todavia, não houve diferença significativa no número de adipócitos entre os grupos (Fig. 32F).

As análises histopatológicas e morfométricas dos ovários de ratas nulíparas foram realizadas classificando os folículos de acordo com o estágio de desenvolvimento. Essas análises mostraram uma redução no número de folículos em crescimento (NL $13,8 \pm 0,76$ vs SL $10,9 \pm 0,60$; $p = 0,005$; Fig. 33G) e de corpos lúteos (NL $11,6 \pm 0,62$ vs SL $9,3 \pm 0,26$; $p = 0,002$; Fig. 33J), com aumento do número de folículos císticos (NL $0,3 \pm 0,10$ vs SL $3,7 \pm 0,60$; $p < 0,0001$; Fig. 33H) e atrésicos (NL $1,5 \pm 0,15$ vs SL $3,5 \pm 0,46$; $p = 0,0002$; Fig. 33I) no grupo SLF1 comparado ao grupo NLF1. O grupo NLF1 apresentou predominantemente folículos secundários ou maduros, enquanto no grupo SLF1 predominou folículos em estágio inicial de desenvolvimento (primário unilaminar e multilaminar).

No útero, as análises histopatológicas mostraram que o grupo SLF1 apresentou glândulas endometriais com células inflamatórias e degenerativas (Fig. 34).

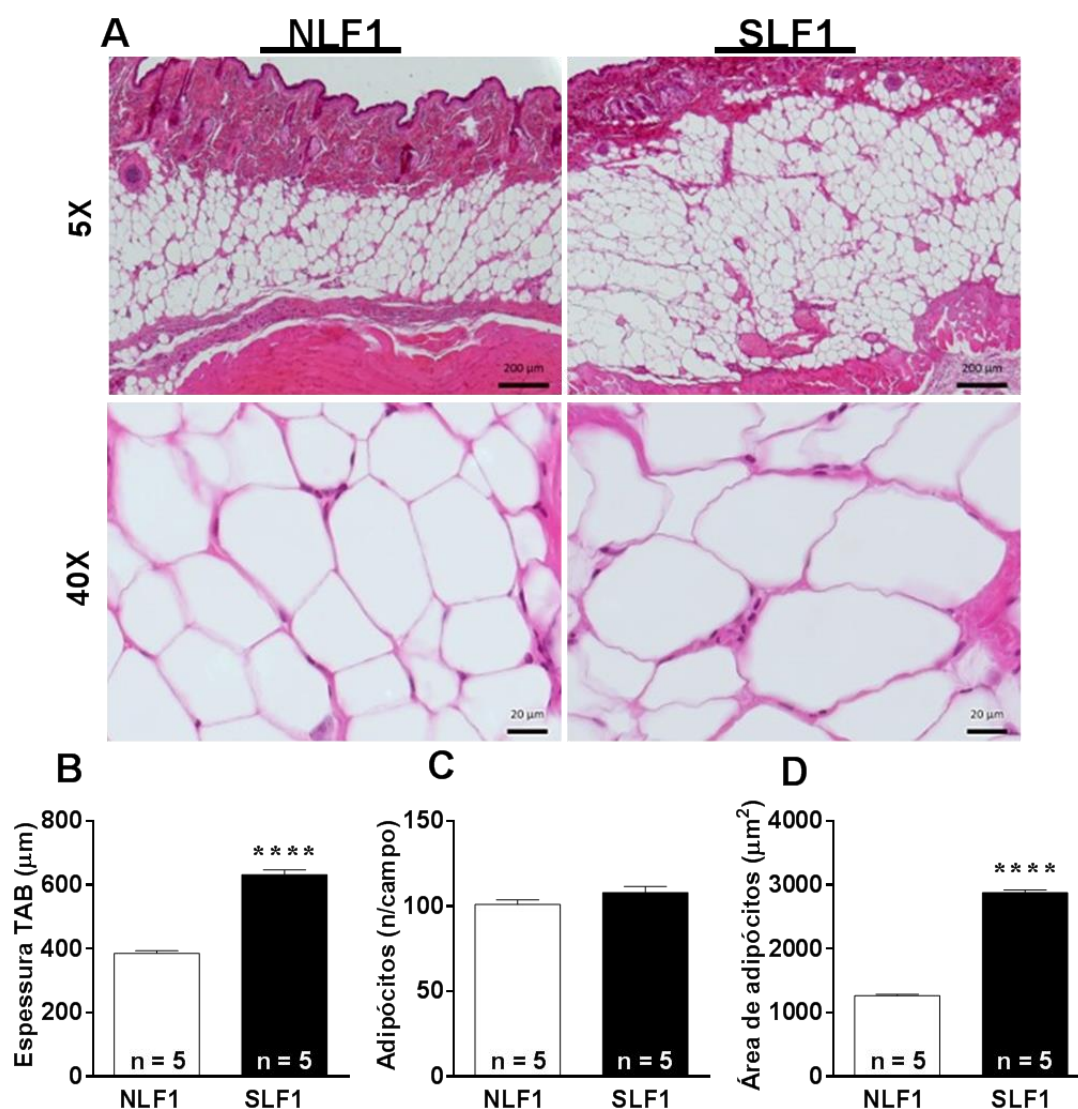


Figura 32 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas. **A:** fotomicrografia de cortes histológicos transversais das glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas mostrando qualitativamente a espessura da camada de tecido adiposo branco (TAB) e tamanho dos adipócitos nos grupos NLF1 (esquerda) e SLF1 (direita) (coloração HE; aumento 50x e 400x, respectivamente). **B:** medida da espessura da camada adiposa das glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas. **C:** número de adipócitos das glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas. **D:** área dos adipócitos das glândulas mamárias de ratas F1 nulíparas. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. Teste t de Student; (n=5/grupo); ****p<0,0001.

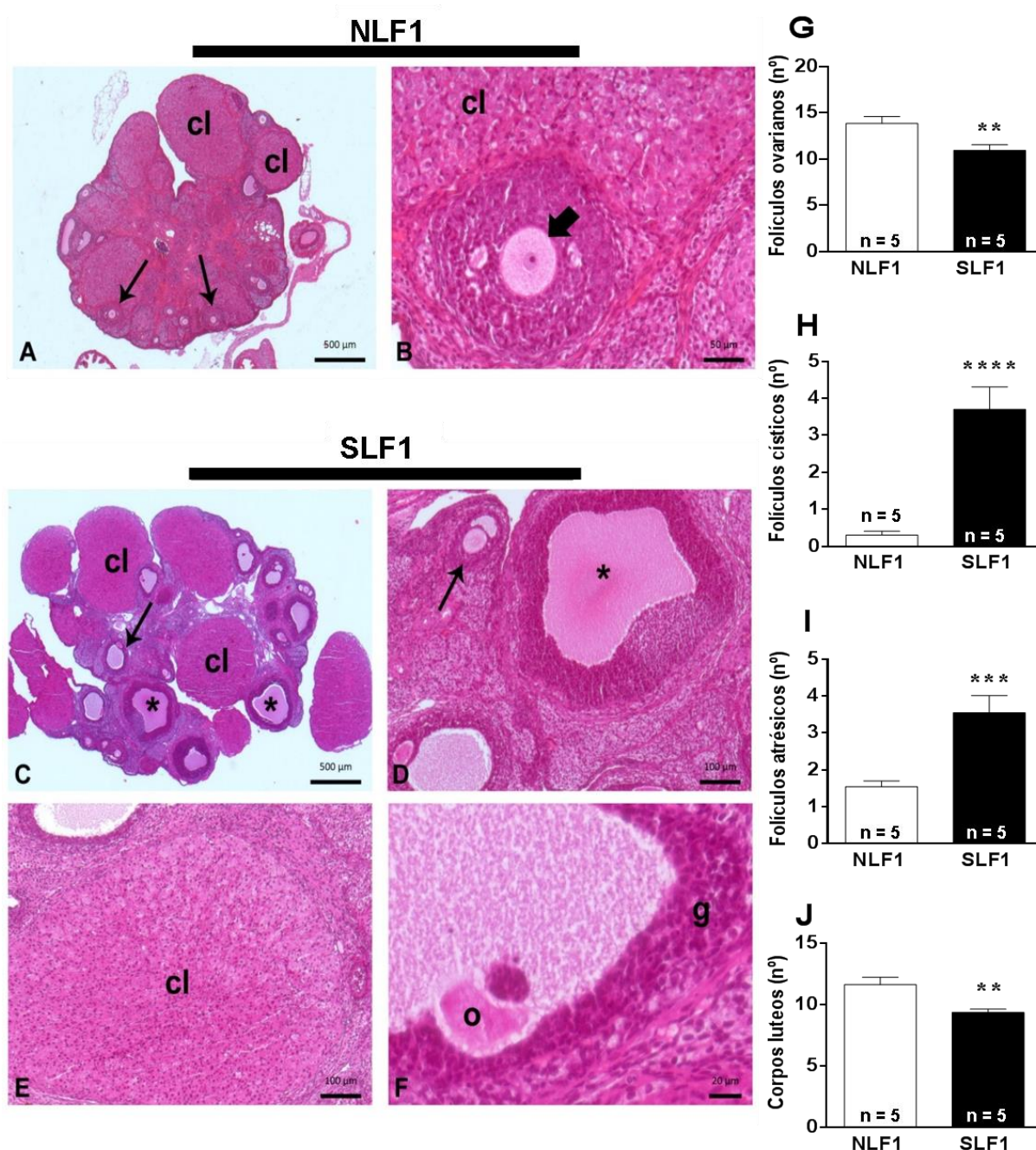


Figura 33 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre ovários de ratas F1 nulíparas. Cortes histológicos transversais de ovário corados pelo método da hematoxilina-eosina. **A-B**: Aspectos teciduais dos ovários de fêmeas do grupo NLF1. Vários corpos lúteos (cl) e folículos em crescimento (setas longas) são observados no córtex ovariano. Folículo primário multilaminar contendo um oócito primário íntegro (seta curta). **C-F**: Estrutura histológica dos ovários de fêmeas SLF1. **C**: visão geral de um ovário policístico exibindo folículos císticos (*), folículos em crescimento (setas longas) e corpos lúteos (cl) no córtex ovariano. **D**: folículos em crescimento (setas longas) próximos a um folículo cístico (*). **E**: detalhe de um corpo lúteo (cl) bem desenvolvido. **F**: Detalhe de um folículo atresíco com evidente degeneração das células da granulosa (g) e do oócito (o). **G**: número de folículos ovarianos (primário unilaminar e multilaminar, secundário e maduro). **H**: número de folículos císticos. **I**: número de folículos atresícos. **J**: número de corpos lúteos. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM. Teste t de Student; (n=5/grupo); **p<0,01; ***p<0,001; ****p<0,0001.

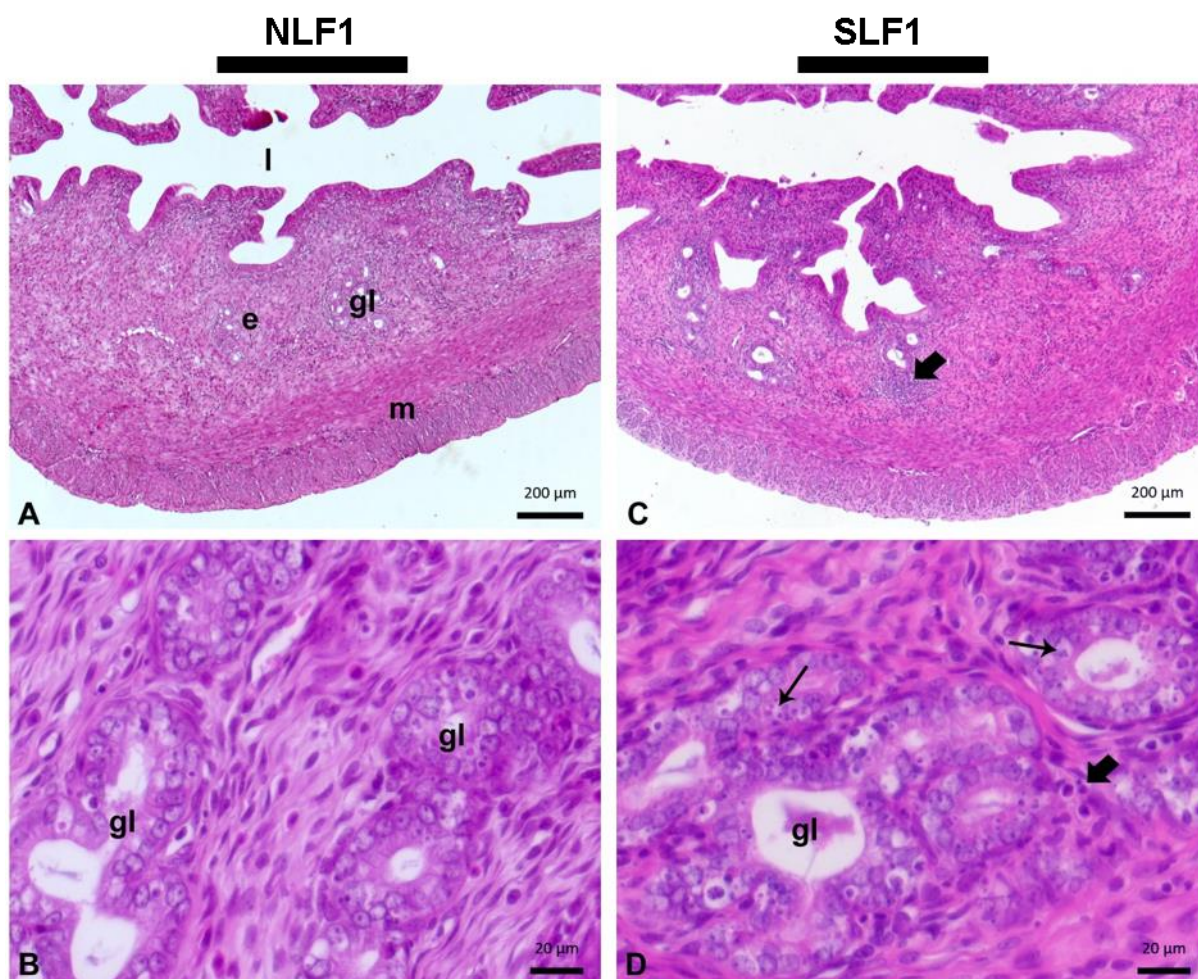


Figura 34 – Efeito da sobrenutrição pós-natal precoce sobre útero de ratas F1 nulíparas. Cortes histológicos transversais do útero de fêmeas dos grupos NLF1 (**A-B**) e SLF1 (**C-D**), submetidos ao método de coloração pela hematoxilina-eosina. **A-B**: fêmeas NLF1 apresentaram endométrio (e) com glândulas desenvolvidas (gl). Lúmen uterino (l), miométrio (m). **C**: fêmeas SLF1 apresentaram focos inflamatórios na lâmina própria endometrial (seta curta). **D**: observe as glândulas endometriais apresentando células inflamatórias (seta curta) e células em degeneração (seta longa).

4.7 EFEITOS DA SOBRENUTRIÇÃO PÓS-NATAL PRECOCE SOBRE A EXPRESSÃO DOS RECEPTORES ER α e ER β EM OVÁRIOS DE F1

A expressão da proteína ER α foi maior nos animais SLF1 em comparação aos animais NLF1 (NLF1 $100 \pm 25,4$ vs SLF1 $185 \pm 16,2$; $p < 0,05$; Fig. 35A). Não foi observada diferença na expressão de ER β no ovário de animais SLF1 em comparação com animais NLF1 (NLF1 $100 \pm 7,2$ vs SLF1 $113 \pm 10,1$; $p = 0,35$; Fig. 35B).

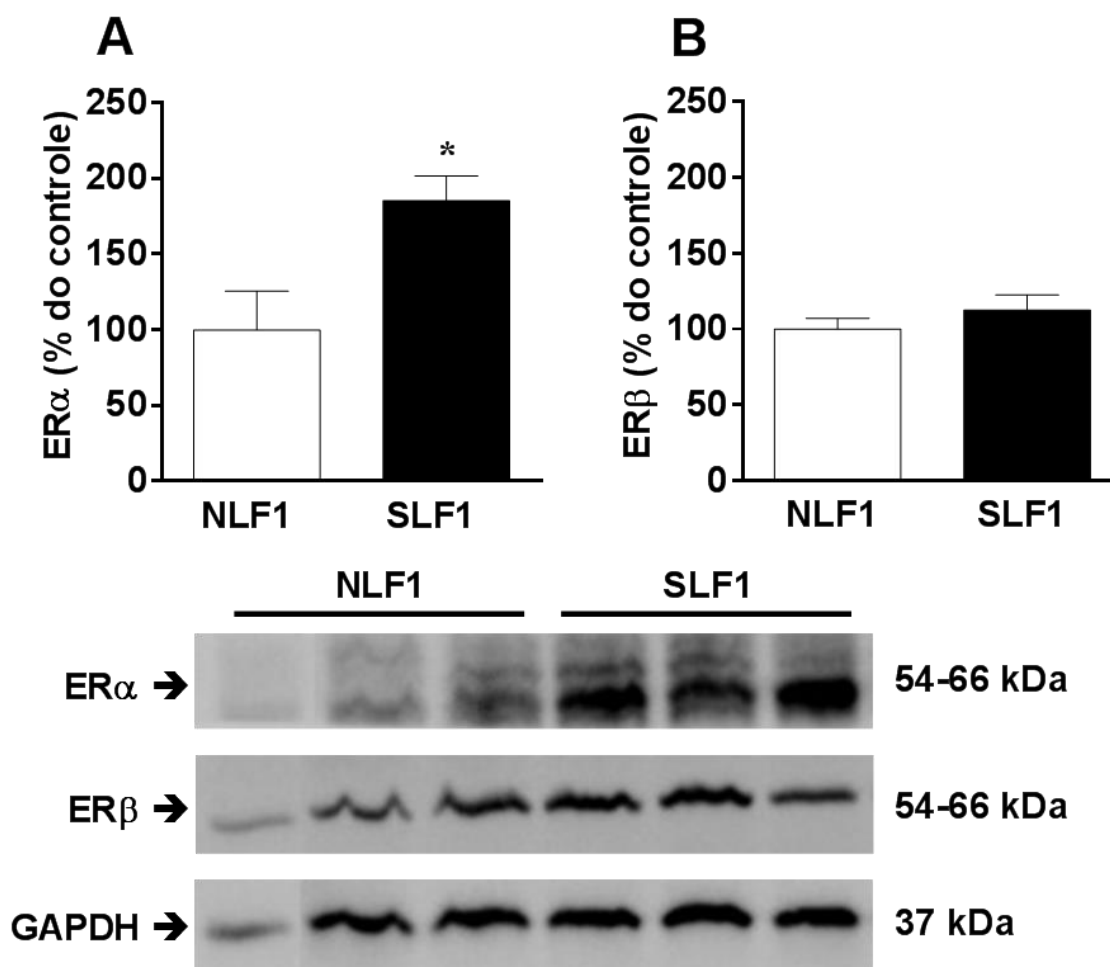


Figura 35. Efeitos da sobrenutrição pós-natal precoce sobre os receptores de estrogênios no ovário. Análises *Western Blot* de ER α (A) e ER β (B). Imunoblots representativos são mostrados abaixo dos gráficos. Os resultados são expressos em média $\pm$ EPM de cada grupo, normalizado para densidade de GAPDH. Teste t-Student; (n=4/grupo em A-B; * $p < 0,05$).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo utilizou-se o modelo de redução de ninhada para avaliar os efeitos de curto e longo prazo da programação metabólica pós-natal. Houve alterações na primeira e segunda geração, sendo que a programação metabólica neonatal promoveu modificações a curto e a longo prazo.

Após o nascimento, as fêmeas SLF1 apresentaram maior massa corporal desde a primeira semana, se mantendo na gestação e lactação, com aumento dos tecidos adiposos em todas as fases, dislipidemia mais acentuada na gestação e lactação, hiperglicemia e hiperfagia na pré-concepção. Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Collden *et al.* (296), em que camundongos machos provenientes de ninhada reduzida apresentaram sobrepeso durante a lactação e maior adiposidade e sobrepeso na vida adulta. Também observaram que esses animais eram hiperfágicos e hiperglicêmicos quando adultos.

Enes-Marques & Giusti-Paiva (297) observaram em seu estudo que ratos machos e fêmeas também apresentaram maior ganho de massa e adiposidade, hiperglicemia e dislipidemia quando adultos. Outros estudos também evidenciaram que alterações nutricionais no período gestacional ou pós-natal podem desencadear modificações no desenvolvimento e maturação de diversos órgãos, podendo, em longo prazo, estar associadas ao contexto da atual epidemia da obesidade (15,16,334).

A redução de ninhada promove alterações na quantidade e qualidade do leite, levando a uma maior produção de lipídios no leite (338,339). Também promove malprogramação precoce no sistema hipotalâmico, levando à resistência de leptina central e à insulina, aumentando os sinais orexígenos, sendo essas alterações responsáveis pela ocorrência de hiperfagia, sobrepeso, hiperglicemia e hiperinsulinemia ao longo da vida (180,293,294,340,341). Nossos achados corroboram os estudos anteriores, sugerindo que a sobrenutrição pós-natal precoce durante a lactação promove alterações comuns à síndrome metabólica na idade adulta. Assim, novos estudos devem ser delineados visando analisar a resistência à leptina nesse modelo de obesidade.

O presente estudo também mostrou que a instalação da puberdade em ratas F1 oriundas de ninhadas reduzidas foi antecipada, embora dentro dos padrões de normalidade para a espécie (317), assim como apresentaram menos estros, indicando

menor capacidade ovulatória. Wu *et al.* (342) observaram que fêmeas provenientes de pequenas ninhadas apresentaram antecipação da instalação da puberdade, assim como menor número de estros. Castellano *et al.* (343) também observaram antecipação da instalação da puberdade com níveis mais elevados de leptina e mRNA do Kiss1 hipotalâmico.

Embora influências genéticas e mutações gênicas possam estar relacionadas com a puberdade precoce, o excesso de gordura também influencia na maturação sexual (344,345). Esse excesso promove aumento das concentrações de leptina, que sinaliza precocemente o início da puberdade e pode contribuir para a ativação do eixo HPG, resultando em aumento na síntese de esteroides e desenvolvimento folicular anormal (49,50,346–348). Em humanos, o aumento excessivo de tecido adiposo precoce em meninas antecipa o período de instalação da puberdade, favorece o aparecimento de irregularidades menstruais e aumenta a disfunção ovulatória, podendo causar infertilidade na idade adulta (50,54,183,346). Esses achados demonstram que o excesso de gordura corporal persistente durante o período de desenvolvimento inicial pode contribuir para a ativação puberal precoce.

Muitos modelos de indução da obesidade em animais já foram descritos para avaliar as alterações produzidas pelo excesso de gordura corporal. No entanto, poucos estudos sobre reprodução no modelo de redução de ninhada foram propostos. No modelo usado neste estudo, fêmeas com obesidade apresentaram menor desempenho no comportamento sexual, que pode ser parcialmente justificado pela redução da concentração de estradiol plasmático no grupo SLF1 comparadas ao grupo NLF1. Bazzano *et al.* (349) observaram em fêmeas tratadas com dieta hipercalórica após o desmame que elas apresentaram redução nas concentrações de estradiol. Zemlan *et al.* (187) e Domínguez-Ordóñez *et al.* (350) mostraram que a administração de estrogênio em ratas ovariectomizadas facilita o comportamento de lordose, promovendo aumento do grau de arqueamento das costas durante o movimento e na latência para responder com lordose ao macho, estendendo a duração da postura de lordose.

Outra possível justificativa sobre a redução do comportamento sexual refere-se ao estado de hiperleptinemia que ratas com obesidade apresentam, embora não estudado nesse modelo no presente estudo. García-Juárez (351) mostrou que a administração intracerebroventricular (icv) de leptina em ratas ovariectomizadas,

previamente tratadas com estradiol facilita a lordose por meio da ativação do receptor de GnRH-1 e progestina, todavia, inibe a proceptividade e aumenta o comportamento de rejeição.

Estudos *in vitro* mostram que a leptina diminui a liberação de noradrenalina (NA) no hipotálamo de maneira dose-dependente e essa inibição aumenta significativamente os comportamentos sexuais de rejeição (352,353). A administração icv de leptina pode ativar simultaneamente duas vias: a liberação de GnRH, resultando em facilitação da lordose, e a inibição da liberação de NA, induzindo a exibição de comportamentos de rejeição e inibindo o comportamento de proceptividade (352,353).

Os hormônios esteroides ovarianos estradiol e progesterona têm profundas influências modulatórias nos circuitos neurais que regulam o comportamento sexual (184,185). Alguns autores observaram que mulheres com obesidade apresentam concentrações mais elevadas de estradiol do que pacientes com massa normal (354), enquanto outros mostraram que pacientes com obesidade têm concentrações mais baixas de estradiol (355–357) com um possível efeito inibitório direto da massa corporal na produção de gonadotrofina e estradiol (358). Kirchengast *et al.* (186) observaram que o aumento do massa corporal e do IMC em mulheres reduziram significativamente o interesse sexual. Os autores defendem que a melhoria da função sexual após a redução de massa em mulheres jovens com obesidade deve-se provavelmente a alterações nos hormônios sexuais, estrógenos e andrógenos e à melhora da autoestima.

Outro fator a ser considerado é que o estradiol pode inibir a ingestão de alimentos, ingestão de água e reduzir a massa corporal em modelos animais (359), bem como em mulheres (360). Em roedores, a ovariectomia leva ao desenvolvimento da obesidade, enquanto a suplementação com estradiol antagoniza esses efeitos (361,362). Levando em consideração todos esses achados, sugerimos que a sobrenutrição pós-natal precoce induz a obesidade e concentrações mais baixas de estradiol podem ser uma característica importante no desenvolvimento dessa patologia.

Nas análises morfométricas dos ovários, as fêmeas SLF1, apresentaram menor número de folículos ovarianos em crescimento e corpos lúteos e maior número de folículos císticos e atrésicos. Vale destacar também que, os ovários das fêmeas SLF1, coletados no período fértil, apresentaram mais folículos ovarianos em estágios iniciais

(primário unilaminar e multilaminar), enquanto nas fêmeas NLF1 os folículos predominantes eram secundários ou maduros. As fêmeas SLF1 também apresentaram aumento da glicose sanguínea na fase adulta virgem. Bazzano *et al.* (349) observaram em seu estudo o aumento do número de folículos císticos e atresícos em ovários de fêmeas tratadas com dieta hipercalórica. No entanto, não houve diferença no número de folículos ovarianos em crescimento nos grupos estudados.

A composição do fluido folicular de pacientes submetidos à reprodução assistida com diferentes IMC foi analisada por Robker *et al.* (363), e observaram que o aumento do IMC resultou em alterações na composição do líquido folicular, em particular, aumentos nas concentrações de insulina folicular, glicose e lactato. A exposição a altos níveis de glicose pode ser um dos principais contribuintes para a má qualidade do oócito em mulheres com obesidade.

Os oócitos derivados de mulheres com obesidade provavelmente estão expostos a concentrações mais altas de glicose através de uma combinação de concentrações de glicose e aumento da atividade dos transportadores de glicose dentro das células do folículo ovariano (175,364,365). Chang *et al.* (175) mostraram que oócitos de camundongos com DM1 e hiperglicemia se desenvolve pouco devido à redução da foliculogênese, oogênese e maturação do oócito. Os camundongos com diabetes induzida apresentaram foliculogênese alterada e aumento da incidência de apoptose folicular, reduzindo, assim, as taxas de ovulação, e os oócitos de folículos pré-ovulatórios foram 30% menores em comparação com oócitos de animais controle. Mulheres com sobrepeso e obesidade também exibem insulina e triglicérides intrafoliculares elevados e aumentam a expressão de receptores de lipoproteínas (366,367).

Além disso, folículos ovarianos de mulheres com obesidade apresentam características inflamatórias e um elevado índice de atividade androgênica (368). A fisiopatologia da SOP envolve defeitos primários no eixo HPG, secreção e ação da insulina e função ovariana, e está associada à obesidade e à resistência à insulina. Com excesso de insulina, os ovários respondem produzindo andrógenos, o que pode levar à anovulação (171).

A redução de ações estrogênicas está relacionada à atresia folicular, que leva à degeneração precoce dos folículos (369,370). Além disso, o estrogênio suprime a apoptose nas CG (371) e mantém a função do corpo lúteo (372).

Nosso estudo mostrou, pela primeira vez, que ratas com obesidade tiveram maior expressão de ER α no ovário; no entanto, nenhuma diferença foi observada na expressão de ER β . Estudos mostraram que há diferença na expressão de ER α e ER β em ovários de ratas. O ER α é expresso exclusivamente em CT, enquanto ER β é expresso exclusivamente em CG dos folículos em maturação (373). Estes dados são consistentes com a hipótese de que o estradiol desempenha um papel na regulação do crescimento e desenvolvimento do folículo dominante em mulheres. Na SOP, os folículos dominantes não se desenvolvem adequadamente. Durante os ciclos ovulatórios, há uma falha em regular positivamente a expressão da enzima aromatase nas CG, e a concentração de estradiol no microambiente folicular não aumenta adequadamente (374).

Jakimiuk (178) et al. mostraram que a expressão de mRNA para ER β foi menor em CG e CT de folículos derivados de fêmeas com SOP em comparação com folículos de tamanho correspondente de fêmeas normais. Em relação ao ER α , observou-se aumento na expressão nas CT em ovários policísticos. Esses dados indicam que há mudanças na proporção de isoformas de ER α e ER β em CG e CT de mulheres com SOP (178).

No ovário policístico, as CG superexpressa os mRNAs para a biossíntese de andrógenos e secretam andrógenos aumentados em comparação as CT dos ovários normais (169). Alterações na responsividade das CT aos estrogênios podem desempenhar um papel no hiperandrogenismo ovariano, porque o estrogênio é um potente inibidor da produção de androgênio mediada por ER (375). Nesse sentido, alterações nas razões ER α / ER β podem alterar as respostas das CT aos estrogênios na produção de andrógenos no desenvolvimento de folículos.

Estudos mostram que a expressão de ER β é alta em ovários normais. Por outro lado, a expressão de ER α é alta em cânceres de ovário (376). No entanto, mostramos pela primeira vez o envolvimento de ER α com SOP em ratas com obesidade. Este resultado é consistente com outros dados encontrados por nós neste estudo.

Cada um destes parâmetros alterados tem o potencial de influenciar as funções dos ovários e a qualidade dos oócitos. O mecanismo para o aumento do número de folículos em estágios iniciais no ovário das fêmeas de ninhada reduzida pode ser um mau funcionamento do sistema reprodutivo induzido pela supernutrição pós-natal precoce ao nível do hipotálamo, hipófise ou ovário. Nossos achados sugerem que, concentrações reduzidas de estradiol, hiperglicemia e aumento da expressão dos receptores ER α nos ovários podem ser responsáveis pelo aumento do número de folículos atrésicos e císticos.

Apesar da redução do número de estros e foliculogênese prejudicada, mostrando menor concentração plasmática de estradiol, o que pode ter diminuído a receptividade ao macho, as fêmeas SLF1, nos parâmetros de fertilidade analisados, não apresentaram alterações no número de implantações e reabsorções, não houve aumento das taxas de aborto ou efeito embriotóxico, sendo que o número de fetos vivos obtidos durante a laparotomia foram iguais ao das fêmeas NLF1. Por outro lado, observou-se uma redução no número de corpos lúteos. Outro ponto interessante reside no número de filhotes vivos, ou seja, aqueles filhotes que constituíram a geração F2, nesse caso, o número foi reduzido no grupo SLF1 em comparação com o grupo NLF1.

Robker (347) demonstrou que a obesidade induzida por dieta hipercalórica em camundongos prejudica a competência de desenvolvimento do oócito. Níveis alterados de gonadotrofinas e esteroides contribuem para a anovulação e estudos de Van Der Steeg et al. (377) e Jensen et al. (378) mostraram que, mesmo em mulheres que ovulam regularmente, o aumento do IMC se correlaciona com redução da concepção. A obesidade pode afetar a função do corpo lúteo e do trofoblasto, e a receptividade endometrial, tendo muitas implicações maternas com forte associação com desordens hipertensivas da gravidez, diabetes, infecção, tromboembolismo, alterações de humor e complicações no parto aumentando, dessa forma, o risco de abortos (347,379–383).

Adicionalmente, a análise histopatológica do útero evidenciou alterações celulares sugerindo aumento do processo inflamatório e degenerativo. Esses achados são importantes pois mostram que a obesidade medeia a disfunção endometrial antes mesmo da concepção, podendo ser a causa da redução da taxa de implantação do embrião, possíveis perdas fetais e redução da taxa de nascidos vivos

(54,364,382,384,385). O estrogênio tem papel fundamental na regeneração e crescimento do endométrio, preparando o tecido uterino para responder à ação da progesterona pós-ovulação. No entanto, a biodisponibilidade sustentada dos estrogênios, bem como dos receptores, é necessária para induzir uma resposta proliferativa uterina completa, e níveis excessivos ou deficientes de estrogênio podem ter efeitos adversos na implantação (386–388). Nesse sentido, nosso estudo sugere que o processo inflamatório e degenerativo encontrado deve-se, provavelmente, ao aumento de citocinas pró-inflamatórias decorrentes da síndrome metabólica, embora as dosagens não tenham sido realizadas no presente estudo, e da redução da concentração de estradiol nos animais SLF1.

Na sequência dos resultados obtidos, pela primeira vez nosso estudo sobre o comportamento maternal da geração F1 mostrou que as mães com obesidade apresentaram um maior cuidado materno com sua prole no primeiro dia de teste, contudo, esses comportamentos se normalizam com o grupo NLF1 com o passar do tempo. No entanto, estudos mostram que a obesidade está relacionada à ansiedade (389) e menor cuidado materno (390,391).

Uma das hipóteses para explicar nossos resultados obtidos na avaliação de comportamento maternal está baseada no estudo de Enes-Marques & Giusti-Paiva (297), que defende que mães que possuem menos filhotes passam mais tempo no ninho dedicando-se mais ao cuidar da prole. As mães F1, provenientes de ninhadas reduzidas, podem ter recebido mais cuidado materno no período neonatal e, dessa forma, repetiram o comportamento materno aprendido.

O fenótipo do comportamento materno pode ser herdado por vias genéticas clássicas ou por um modo comportamental não genômico de herança, baseado em fatores epigenéticos e ambientais (392–394). Esse pressuposto foi confirmado por estudos relatando que, em ratos, a prole apresenta os mesmos padrões de comportamento manifestado pela mãe. As ninhadas de mães muito lambedoras (boa cuidadoras), quando criadas e estimuladas por mães que lambem pouco os filhotes, crescem como mães também pouco lambedoras e mostram menor cuidado materno (297,333,393,395). Contudo, uma análise mais minuciosa dos protocolos de comportamento materno precisa ser desenvolvida para entender melhor esses resultados.

A superalimentação pós-natal precoce de F1 promoveu alterações nessa geração e na prole F2. A obesidade também apresenta risco de desenvolvimento de doenças aos descendentes na vida adulta. Os filhos de mães com obesidade são mais propensos a desenvolver obesidade, diabetes tipo II e doença cardiovascular na vida adulta (396). Corroborando com esses achados, os resultados obtidos no presente estudo mostraram que os filhotes F2 de mães com obesidade, machos e fêmeas, apresentaram um maior ganho de massa já no início da vida pós-natal e consumiram mais leite, comparados ao grupo controle.

Gomes *et al.* (255) mostraram que a obesidade materna durante a lactação promove o desenvolvimento de obesidade na prole, com comprometimento do sistema de melanocortina. Em seu estudo, a prole também apresentou alteração na homeostase da glicose e resistência insulínica periférica e central. Desai *et al.* (397) observaram que a prole de mães com obesidade tratadas com dieta hipercalórica na gestação e lactação apresentou hiperfagia, maior massa corporal e maior adiposidade, comparada ao grupo controle. Estudos mostraram que diferentes tipos de estresse durante a gestação e lactação podem induzir programação metabólica, sugerindo que esses períodos desempenham um papel importante no estabelecimento do fenótipo de obesidade na descendência adulta (15–18,398).

É importante destacar que as interações entre fatores fetais intrínsecos (genéticos) e fatores ambientais extrínsecos (massa pré-gestacional materno e nutrição) influenciam nas vias de sinalização e podem acarretar no desenvolvimento anormal de órgãos (399,400). Os embriões podem desenvolver a capacidade de se adaptar às modificações do meio em resposta ao ambiente atípico, processo chamado de plasticidade do desenvolvimento (252,401)

Nesse contexto, Barker e colaboradores propuseram que essa plasticidade pode se tornar mal adaptativa e causar doença em longo prazo. Os filhos de mães que passaram por cirurgia para perda de massa corporal têm menos probabilidade de ter obesidade quando comparado aos seus irmãos que nasceram antes da cirurgia. Também são mais propensos a melhorar a sensibilidade à insulina, reduzir os lipídeos sanguíneos e menos propensos a nascer com macrosomia (402,403). Sendo assim, os efeitos da obesidade materna sobre o ambiente intrauterino parecem ser muito importantes para determinar a saúde dos descendentes.

Nas últimas décadas, estudos têm correlacionado alterações da massa corporal ao nascer e fatores de risco para doença cardiovascular. Tanto o baixo massa ao nascer quanto a macrosomia fetal foram associados ao desenvolvimento tardio de um conjunto de desordens que inclui adiposidade abdominal, hipertensão arterial, dislipidemia, resistência à insulina, hiperinsulinemia, intolerância à glicose, *diabetes mellitus* tipo 2 e doença cardiovascular (267–271).

Em experimentação animal, filhotes expostos à dieta hiperlipídica materna na gestação têm concentrações elevadas de leptina na circulação periférica (404–406). Chang *et al.* (407) identificaram que concentrações elevadas de lipídios e de leptina no sangue de fetos e neonatos estimulam a proliferação e diferenciação de células neuroepiteliais no terceiro ventrículo. Depois de diferenciadas, essas células migram para o hipotálamo onde estimulam a produção de neuropeptídeos orexígenos, podendo causar hiperfagia, ganho de massa e exacerbação do processo de resistência à leptina.

O aumento da gordura corporal materna também altera a qualidade do leite. Estudos mostram que a alimentação rica em gordura e/ou obesidade materna podem retardar o desenvolvimento da glândula mamária, alterar a concentração lipídica do leite e prejudicar o desenvolvimento do neonato (232–234). A leptina sanguínea materna pode ser transferida ao leite através das células epiteliais mamárias e sua concentração no leite está relacionada com a adiposidade materna (75,408,409). Dessa forma, os animais que se alimentam desse leite materno são expostos a níveis elevados de leptina, que pode ser absorvida pelo sistema digestório do neonato. A prole das fêmeas com obesidade, geralmente hiperfágica, possivelmente também ingerem mais leptina presente no leite que os filhotes de ratas magras. Embora não tenha sido avaliada neste estudo, a resistência central à leptina pode ser a base para a hiperfagia encontrada e o aumento do ganho de massa, e estudos adicionais são necessários para verificar os mecanismos envolvidos nessas alterações.

Nosso estudo também demonstrou que glândulas mamárias de ratas nulíparas provenientes de ninhada reduzida apresentaram maior espessura da camada adiposa subcutânea e hipertrofia dos adipócitos. Kamikawa *et al.* (410) observaram que a obesidade induzida em camundongos não gestantes resulta em um típico fenótipo de distúrbio nutricional, incluindo glândulas mamárias abdominais aumentadas e aumento significativo na expressão da leptina. Além disso, glândulas

mamárias de ratas com obesidade exibiram um desenvolvimento anormal do ducto mamário e continham maiores adipócitos.

Os adipócitos possuem propriedades moduladoras no desenvolvimento das glândulas mamárias através da secreção e ação de várias adipocinas, determinando, assim, a extensão em que o epitélio glandular de um indivíduo pode se transformar em uma glândula mamária funcional com desempenho lactacional (73,411–413). No entanto, o excesso de tecido adiposo pode alterar a produção dessas adipocinas e, conseqüentemente, prejudicar o desempenho lactacional e/ou alterar a quantidade dessas substâncias que serão transferidas ao leite, afetando, assim, o desenvolvimento do neonato (78,89,92,238,239,414).

Nossos achados também evidenciaram várias alterações no desenvolvimento físico e sensório-motor da prole F2 em decorrência do aumento da disponibilidade de leite durante o período lactacional da geração F1. Na avaliação do desenvolvimento físico e sensório-motor, a prole F2 do grupo SLF1 apresentou antecipação dos parâmetros sensório-motor em machos e fêmeas. Também houve antecipação na erupção dos dentes incisivos, corroborando com um estudo que associou a antecipação da erupção dos dentes em crianças com obesidade (415). A erupção dentária tem sido associada ao estágio de desenvolvimento, que também está relacionado à gordura corporal (346,416).

Todavia, a abertura dos olhos e o sobressalto auditivo foram mais tardios. A obesidade na infância está associada a aumento do risco de déficit visual (417) e alterações auditivas com aumento das chances de perda auditiva unilateral de baixa frequência (418). Soares *et al.* (419) observaram um menor tempo na maturação dos reflexos na prole de mães com obesidade por dieta hiperlipídica na gestação e lactação, enquanto Mendes-da-Silva *et al.* (420) observaram um atraso na maturação desses reflexos.

Estudos mostram que a desnutrição neonatal resulta em atraso no desenvolvimento somático e sensório-motor (421). Entretanto, estudos utilizando modelo experimental de hiperalimentação, como dietas de cafeteria e hiperlipídica, têm encontrado alterações em nível neuroquímico em resposta ao excesso de oferta alimentar (180,422,423). Em geral, como os reflexos neonatais podem ser considerados como um índice de maturação cerebral, os presentes achados reforçam

a ideia de que a nutrição materna e alterações epigenéticas herdadas afetam os mecanismos pré-natais e pós-natal precoces responsáveis pelo desenvolvimento normal do cérebro (245,298,424–426).

O cuidado materno também pode influenciar no desenvolvimento físico e sensório-motor da prole. O contato social precoce entre a mãe-filho molda o desenvolvimento neural e comportamental da prole (427,428). Estudos mostram que a sensibilidade às influências maternas precoces servem como excelentes sistemas modelo para manipular o cuidado materno (429). Os filhotes que recebem mais cuidado materno mostram maior densidade de neurônios no hipocampo (430), maior expressão de neurotrofinas no cérebro (431), alteração na expressão da subunidade do receptor GABA na amígdala (432,433), alteração no desenvolvimento do eixo HPG (434), alteração na expressão do receptor de ocitocina (435) e consequentes mudanças nos muitos comportamentos mediados por essas estruturas.

Outros estudos mostraram que o cuidado materno induz alterações epigenéticas de longa duração, com implicações no desenvolvimento de circuitos neurais e na função desses circuitos na vida adulta (436–438). A plasticidade do cérebro em resposta à qualidade das interações mãe-filho durante o período pós-natal sugere a presença de um período sensível para o desenvolvimento desses sistemas e seus resultados fisiológicos e comportamentais associados. Sendo assim, as alterações encontradas na prole de fêmeas SLF1 pode ter sido reflexo da obesidade materna e alterações epigenéticas herdadas e/ou da influência de um maior cuidado materno recebido nos primeiros dias de nascimento.

Curiosamente, o mesmo padrão de antecipação da instalação da puberdade foi observado na prole F2, tanto em machos como em fêmeas. Pela primeira vez, mostramos em nosso estudo que a prole (machos e fêmeas) de F1 também apresentou instalação da puberdade antecipada, embora dentro dos padrões de normalidade para a espécie (317). Galarza *et al.* (439) observaram que a prole feminina de mães tratadas com dieta hipercalórica na pré-concepção, na gestação e na lactação apresentaram sobrepeso, antecipação da instalação da puberdade e menos números de estros. Sendo assim, a sobrenutrição precoce pós-natal promoveu alterações no desenvolvimento sexual de F1 e de seus descendentes. Nossos resultados, inéditos no modelo de redução de ninhada, reforçam que esses períodos são críticos para a programação metabólica e reprodutiva, uma vez que, influências

ambientais precoces, obesidade materna e distúrbios hormonais ou nutricionais induzem variação epigenética, afetando permanentemente o metabolismo e o risco de doenças crônicas (14).

A obesidade materna pode levar a efeitos adversos sobre o crescimento e desenvolvimento e os momentos iniciais da vida são críticos para o desenvolvimento dos sistemas fisiológicos, principalmente o SNC (261,440). Insultos durante o início da vida podem modificar o desenvolvimento somático e sensório-motor (275,441,442). Alterações no desenvolvimento neonatal sugerem comprometimento do sistema sensório-motor e podem ser reflexos da vulnerabilidade do cérebro em desenvolvimento a mudanças na dieta ou condições nutricionais maternas. Nesse sentido, nosso estudo mostrou que a sobrenutrição pós-natal precoce de F1 pode influenciar o desenvolvimento do cérebro fetal, promovendo alterações no desenvolvimento físico e sensório-motor da prole F2.

A partir desses achados, mostramos que o modelo de redução de ninhada e a sobrenutrição pós-natal precoce no período da lactação foi eficaz para promover alterações biométricas e metabólicas (maior ganho de massa corporal, hiperglicemia, dislipidemia, hiperfagia e aumento das massas das gorduras), reprodutivas e comportamentais (antecipação da instalação da puberdade, menos estros, redução da fertilidade, redução do desempenho sexual e maior cuidado materno no período da lactação) em F1. Não está claro como de fato isso acontece, mas observa-se que as alterações encontradas nesses animais, comuns à síndrome metabólica, podem contribuir para redução da fertilidade. Na sequência, mostramos que a prole F2, machos e fêmeas, também apresentou alterações biométricas (hiperfagia e maior ganho de massa corporal), reprodutiva (antecipação da instalação da puberdade) e no desenvolvimento (físico e sensório-motor).

Embora a saúde materna durante a gravidez e lactação tenha um impacto sobre a saúde a longo prazo da prole e esteja bem estabelecida, torna-se cada vez mais evidente que o período pré-concepcional também é importante. Nosso estudo mostrou que mudanças nutricionais e ambientais no período neonatal provocam alterações endócrinas, comportamentais e reprodutivas maternas que perduram até a vida adulta, e que algumas dessas alterações, mostradas neste estudo, foram transmitidas para sua prole na infância e na idade pré-puberal. Dessa forma, este trabalho mostra a importância das fases iniciais da vida como janelas de programação,

que podem determinar o estado de saúde ou doença na vida adulta e em gerações subsequentes.

Estudos adicionais são necessários para melhor compreensão dessas alterações, visando identificar os mecanismos responsáveis por essa cascata de efeitos deletérios promovida pela programação metabólica neonatal.

REFERÊNCIAS

1. UNICEF, WHO, WORLD BANK GROUP. Levels and Trends in Child Malnutrition. Join Child Malnutrition Estimates 2017. 2017;16.
2. WHO. Report of the Commission on Ending Childhood Obesity. Implementation plan: executive summary. WHO/NMH/PND/ECHO. 2017;24p.
3. KORT HI, MASSEY JB, ELSNER CW, MITCHELL-LEEF D, SHAPIRO DB, WITT MA, et al. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *J Androl*. 2006;27(3):450–2.
4. PASQUALI R, PELUSI C, GENGHINI S, CACCIARI M, GAMBINERI A. Obesity and reproductive disorders in women. *Hum Reprod Update*. 2003;9(4):359–72.
5. RIBEIRO RA, RAINEKI C, GONÇALVES O, FRANCI CR, LUCION AB, SANVITTO GL. Reproductive dysfunction in female rats with renovascular hypertension. *Am J Hypertens*. 2013;26(1):104–10.
6. WEINSIER RL, HUNTER GR, HEINI AF, GORAN MI, SELL SM. The etiology of obesity: relative contribution of metabolic factors, diet, and physical activity. *Am J Med*. 1998;105(2):145–50.
7. RACETTE SB, DEUSINGER SS, DEUSINGER RH. Obesity: Overview of Prevalence, Etiology, and Treatment. *Phys Ther*. 2003 Mar 1;83(3):276–88.
8. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Diet, Nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Tech Rep Ser. 2003;916:160p.
9. BELL CG, WALLEY AJ, FROGUEI P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet*. 2005;6(3):221–34.
10. COUTINHO W. Consenso Latino-Americano em Obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 1999;48(1):21-67.
11. MUST A, JACQUES PF, DALLAL GE, J BC, DIETZ WH. Long term morbidity and mortality of overweight adolescents. *N Engl J Med*. 1992;327:1379–80.
12. FRANCISCHI RPP, PEREIRA LO, FREITAS CS, KLOPPER M, SANTOS RC, VIEIRA P, et al. Obesity: updated information about its etiology, morbidity and treatment. *Rev Nutr*. 2000;13:17–28.
13. MARQUES-LOPES I, MARTI A, MORENO-ALIAGA MJ, ALFREDO M. Genetics of obesity. *Rev Nutr*. 2004;17:327–38.
14. WATERLAND RA, JIRTLE RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition*. 2004;20(1):63–8.
15. HILL JO, PETERS JC. Environmental Contributions to the Obesity Epidemic. *Science*. 1998;280(5368):1371–4.
16. LAWLOR DA, TIMPSON NJ, HARBORD RM, LEARY S, NESS A, MCCARTHY MI, et al. Exploring the developmental overnutrition hypothesis using parental-offspring associations and FTO as an instrumental variable. *PLoS Med*. 2008;5(3):484–93.
17. BARKER DJ. The developmental origins of adult disease. *J Am Coll Nutr*. 2004;23:588S-595S.

18. BARKER DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ*. 1990;301:1111.
19. OTTAVIANI E, MALAGOLI D, FRANCESCHI C. The evolution of the adipose tissue: a neglected enigma. *Gen Comp Endocrinol*. 2011;174:1–4.
20. SIITERI PK. Adipose tissue as a source of hormones. *Am J Clin Nutr*. 1987;45:277–82.
21. FLIER JS, COOK KS, USHER P, SPIEGELMAN BM. Severely impaired adiponin expression in genetic and acquired obesity. *Science*. 1987;237:405–8.
22. AHIMA RS, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11:327–32.
23. FONSECA-ALANIZ, M H, TAKADA J, ALONSO-VALE MI, LIMA FB. The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2006;50:216–29.
24. KIESS W, PETZOLD S, TÖPFER M, GARTEN A, BLÜHER S, KAPPELLEN T, et al. Adipocytes and adipose tissue. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab*. 2008;22:135–53.
25. LACLAUSTRA M, CORELLA D, ORDOVAS JM. Metabolic syndrome pathophysiology: the role of adipose tissue. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2007;17:125–39.
26. GRAY SL, VIDAL-PUIG AJ. Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev*. 2007;65:7–12.
27. FRAYN KN, KARPE F, FIELDING BA, MACDONALD IA, COPPACK SW. Integrative physiology of human adipose tissue. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27:875–88.
28. FANTUZZI G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 2005;115(5):911–9.
29. SAELY C, GEIGER K, DREXEL H. Browns versus white adipose tissue: a mini-review. *Gerontol*. 2012;58(1):15–23.
30. TRUJILLO ME, SCHERER PE. Adipose tissue–derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev*. 2006;27:762–78.
31. KERSTEN S. Mechanisms of nutritional and hormonal regulation of lipogenesis. *EMBO Rep*. 2001;2:282–6.
32. DE FERRANTI S, MOZAFFARIAN D. The perfect storm: obesity, adipocyte dysfunction, and metabolic consequences. *Clin Chem*. 2008;54:945–55.
33. SPALDING KL, ARNER E, WESTERMARK PO, BERNARD S, BUCHHOLZ, B A, BERGMANN, O, BLOMQVIST, L, HOFFSTEDT J, NÄSLUND E, et al. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*. 2008;453(7196):783–7.
34. BOURLIER V, ZAKAROFF-GIRARD A, MIRANVILLE A, DE BARROS S, MAUMUS M, SENGES C, et al. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*. 2008;117(6):806–15.
35. FAUST I, JOHNSON P, STERN J, HIRSCH J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 1978;235(3):E279–286.

36. JERNÅS M, PALMING J, SJÖHOLM K, JENNISCHE E, SVENSSON PA, GABRIELSSON BG, et al. Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression. *FASEB J*. 2006;20(9):1540–2.
37. MAURY E, EHALA-ALEKSEJEV K, GUIOT Y, DETRY R, VANDENHOOFT A, BRICHARD SM. Adipokines oversecreted by omental adipose tissue in human obesity. *Am J Physiol*. 2007;293(3):E656–65.
38. SKURK T, ALBERTI-HUBER C, HERDEER C, HAUNER H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(3):1023–33.
39. CANCELLO R, TORDJMAN J, POITOU C, GUILHEM G, BOUILLOT JL, HUGOL D, et al. Increased infiltration of macrophages in omental adipose tissue is associated with marked hepatic lesions in morbid human obesity. *Diabetes*. 2006;55(6):1554–61.
40. HARMAN-BOEHM I, BLÜHER M, REDEL H, SION-VARDY N, OVADIA S, AVINOACH E, et al. Macrophage Infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(6):2240–7.
41. SENGENÈS C, MIRANVILLE A, LOLMÈDE K, CURAT CA, BOULOUMIÉ A. The role of endothelial cells in inflamed adipose tissue. *J Intern Med*. 2007;262(4):415–21.
42. WEISBERG SP, MCCANN D, DESAI M, ROSENBAUM M, LEIBEL RL, FERRANTE AWJ. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796–808.
43. MATSUZAWA Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. *FEBS Lett*. 2006;580:2917–21.
44. SENEFF S, WAINWRIGHT G, MASCITELLI L. Is the metabolic syndrome caused by a high fructose, and relatively low fat, low cholesterol diet? *Arch Med Sci*. 2011;7:8–20.
45. STĘPIEŃ M, WLAZEŁ RN, PARADOWSKI M, BANACH M, RYSZ M, MISZTAL M, et al. Serum concentrations of adiponectin, leptin, resistin, ghrelin and insulin and their association with obesity indices in obese normo- and hypertensive patients – pilot study. *Arch Med Sci*. 2012;8(3):431–6.
46. ITOH M, SUGANAMI T, HACHIYA R, OGAWA Y. Adipose tissue remodeling as homeostatic inflammation. *Int J Inflam*. 2011;2011:8p.
47. STEPIEN M, ROSNIAK-BAK K, PARADOWSKI M, MISZTAL M, KUJAWSKI K, BANACH M, et al. Waist circumference, ghrelin and selected adipose tissue-derived adipokines as predictors of insulin resistance in obese patients: preliminary results. *Med Sci Monit*. 2011;17(11):13–8.
48. PASQUALI R. Obesity, fat distribution and infertility. *Maturitas*. 2006;54(4):363–71.
49. IBÁÑEZ L, POTAU N, FRANCOIS I, ZEGHER F. Precocious Pubarche, Hyperinsulinism, and Ovarian Hyperandrogenism in Girls: Relation to Reduced Fetal Growth. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(10):3558–62.
50. FRISCH RE, HEGSTED DM, YOSHINAGA K. Body weight and food intake at

- early estrus of rats on a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(10):4172–6.
51. MIRCEA CN, LUJAN ME, PIERSON RA. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obs Gynaecol Can*. 2007;29:887–902.
 52. PALIN MF, BORDIGNON V, MURPHY BD. Adiponectin and the control of female reproductive functions. *Vitamines Horm*. 2012;90:239–87.
 53. CAMPOS DB, PALIN MF, BORDIGNON V, MURPHY BD. The beneficial adipokines in reproduction and fertility. *Int J Obes*. 2008;32:223–31.
 54. ELIA EM, BAZZANO M V, QUINTANA R, PAZ DA. Reproductive disorders in obesity. *Integr Obes Diabetes*. 2015;1(1):20–5.
 55. LACERDA-MIRANDA G, SOARES VM, VIEIRA AKG, LESSA JG, RODRIGUES-CUNHA ACS, CORTEZ E, et al. Ghrelin signaling in heart remodeling of adult obese mice. *Peptides*. 2012;35(1):65–73.
 56. PASQUALI R, GAMBINERI A, PAGOTTO U. The impact of obesity on reproduction in women with polycystic ovary syndrome. *BJOG*. 2006;113:1148–59.
 57. GAMBINERI A, PELUSI C, VICENNATI V, PAGOTTO U, PASQUALI R. Obesity and the Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Obes*. 2002;26(7):883–96.
 58. HILL JA, HAIMOVICI D, POLITICH JA, ANDERSON DJ. Effects of soluble products of activated lymphocytes on macrophages (lymphokines and monokines) on human sperm motion parameters. *Fertil Steril*. 1987;47(3):460–5.
 59. FRIEDMAN JM, HALAAS JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*. 1998;395:763–70.
 60. HARRIS RBS. Leptin- much more than a satiety signal. *Annu Rev Nutr*. 2000;20:45–75.
 61. HOUSEKNECHT K, BAILE C, MATTERI R, SPURLOCK M. The Biology of Leptin: A Review Karen. *J Anim Sci*. 1998;76(5):1405–20.
 62. CARO JF, SINHA MK, KOLACZYNSKI JW, ZHANG PL, CONSIDINE R V. Leptin: The tale of an obesity gene. *Diabetes*. 1996;45(11):1455–62.
 63. MAFFEI M, HALAAS J, RAVUSSIN E, PRATLEY RE, LEE GH, ZHANG Y, et al. Leptin levels in human and rodent: Measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med*. 1995;1(11):1155–61.
 64. ADAMI GF, CIVALLERI D, CELLA F, MARINARI G, CAMERINI G, PAPADIA F, et al. Relationships of serum leptin to clinical and anthropometric findings in obese patients. *Obes Surg*. 2002;12(5):623–7.
 65. ZAMORANO PL, MAHESH VB, DE SEVILLA LM, CHORICH LP, BHAT GK, BRANN DW. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. *Neuroendocrinology*. 1997;65(3):223–8.
 66. ODLE AK, AKHTER N, SYED MM, ALLENSWORTH-JAMES ML, BENES H, MELGAS CASTILLO AI, et al. Leptin Regulation of Gonadotrope Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors As a Metabolic Checkpoint and Gateway to Reproductive Competence. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:367p.

67. KITAWAKI J, KOSHIBA H, ISHIHARA H, KUSUKI I, TSUKAMOTO K, HONJO H. Expression of leptin receptor in human endometrium and fluctuation during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(5):1946–50.
68. DONATO JJ, CRAVO RM, FRAZAO R, GAUTRON L, SCOTT MM, LACHEY J, et al. Leptin's effect on puberty in mice is relayed by the ventral premammillary nucleus and does not require signaling in Kiss1 neurons. *J Clin Invest.* 2011;121(1):355–68.
69. MOSCHOS S, CHAN JL, MANTZOROS CS. Leptin and reproduction: a review. *Fertil Steril.* 2002;77:433–44.
70. SAYED-AHMED A, ABD-ELMAKSoud A, ELNASHARTY M, EL-MAGD MA. In situ hybridization and immunohistochemical localization of leptin hormone and leptin receptor in the seminal vesicle and prostate gland of adult rat. *Acta Histochem.* 2012;114(3):185–91.
71. ISHIKAWA N, TAJIMA G, HYODO S, TAKAHASHI Y, KOBAYASHI M. Detection of autoantibodies against NMDA-type glutamate receptor in a patient with recurrent optic neuritis and transient cerebral lesions. *Neuropediatrics.* 2007;38(5):257–60.
72. SAGAWA N, YURA S, ITOH H, KAKUI K, TAKEMURA M, NUAMAH MA, et al. Possible role of placental leptin in pregnancy: a review. *Endocrine.* 2002;19(1):65–71.
73. SAVINO F, LIGUORI SA. Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. *Clin Nutr.* 2008;27(1):42–7.
74. SHEKHAWAT PS, GARLAND JS, SHIVPURI C, MICK GJ, SASIDHARAN P, PELZ CJ, et al. Neonatal cord blood leptin: its relationship to birth weight, body mass index, maternal diabetes, and steroids. *Pediatr Res.* 1998;43(3):338–43.
75. SMITH-KIRWIN SM, O'CONNOR DM, DE JOHNSTON J, LANCEY ED, HASSINK SG, FUNANAGE VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(5):1810–3.
76. CASABIELL X, PINEIRO V, TOME MA, PEINO R, DIEGUEZ C, CASANUEVA f f. Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4270–3.
77. UYSAL FK, ONAL EE, ARAL YZ, ADAM B, DILMEN U, ARDICOLU Y. Breast milk leptin: its relationship to maternal and infant adiposity. *Clin Nutr.* 2002;21(2):157–60.
78. SANCHEZ J, OLIVER P, MIRALLES O, CERESI E, PICO C, PALOU A. Leptin orally supplied to neonate rats is directly uptaken by the immature stomach and may regulate short-term feeding. *Endocrinology.* 2005;146(6):2575–82.
79. SCHERER PE, WILLIAMS S, FOGLIANO M, BALDINI G, LODISH HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem.* 1995;270(45):26746–9.
80. HU E, LIANG P, SPIEGELMAN BM. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem.* 1996;271(18):10697–703.
81. MICHALAKIS KG, SEGARS JH. The role of adiponectin in reproduction: from

- polycystic ovary syndrome to assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2010;94(6):1949–57.
82. GAVRILA A, PENG CK, CHAN JL, MIETUS JE, GOLDBERGER AL, MANTZOROS CS. Diurnal and ultradian dynamics of serum adiponectin in healthy men: comparison with leptin, circulating soluble leptin receptor, and cortisol patterns. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(6):2838–43.
 83. LU M, TANG Q, OLEFSKY JM, MELLON PL, WEBSTER NJ. Adiponectin activates adenosine monophosphate-activated protein kinase and decreases luteinizing hormone secretion in LbT2 gonadotropes. *Mol Endocrinol*. 2008;22(3):760–71.
 84. WEN JP, LV WS, YANG J, NIE AF, CHENG XB, YANG Y, et al. Globular adiponectin inhibits GnRH secretion from GT1–7 hypothalamic GnRH neurons by induction of hyperpolarization of membrane potential. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;371(4):756–61.
 85. PSILOPANAGIOTI A, PAPADAKI H, KRANIOTI EF, ALEXANDRIDES TK, VARAKIS JN. Expression of adiponectin and adiponectin receptors in human pituitary gland and brain. *Neuroendocrinology*. 2009;89(1):38–47.
 86. ESCOBAR-MORREALE HF, INSENSER M, CORTON M, MILLAN JL, PERAL B. Proteomics and genomics: a hypothesis-free approach to the study of the role of visceral adiposity in the pathogenesis of the polycystic ovary syndrome. *Proteomics Clin Appl*. 2008;2(3):444–55.
 87. XU A, CHAN K, HOO R, WANG Y, TAN K, ZHANG J. Testosterone selectively reduces the high molecular weight form of adiponectin by inhibiting its secretion from adipocytes. *J Biol Chem*. 2005;280(18):18073–80.
 88. O'CONNOR A, PHELAN N, TUN TK, BORAN G, GIBNEY J, ROCHE HM. Highmolecular- weight adiponectin is selectively reduced in women with polycystic ovary syndrome independent of body mass index and severity of insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1378–85.
 89. MARTIN LJ, WOO JG, GERAGHTY SR, ALTAYE M, DAVIDSON BS, BANACH W, et al. Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(5):1106–11.
 90. BRONSKY J, KARPISEK M, BRONSKA E, PECHOVA M, JANCIKOVA B, KOTOLOVA H, et al. Adiponectin, adipocyte fatty acid binding protein, and epidermal fatty acid binding protein: proteins newly identified in human breast milk. *Clin Chem*. 2006;52(9):1763–70.
 91. WANG YY, ZHANG ZJ, YAO W, MORROW A, PENG YM. Variation of maternal milk adiponectin and its correlation with infant growth. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 2011;49(5):338–43.
 92. NEWBURG DS, WOO JG, MORROW AL. Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J Pediatr*. 2010;156(2):41–6.
 93. STEPPAN CM, BAILEY ST, BHAT S, BROWN EJ, BANERJEE RR, WRIGHT CM, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*. 2001;409(6818):307–12.
 94. BANERJEE RR, RANGWALA SM, SHAPIRO JS, RICH AS, RHOADES B, QI Y, et al. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*.

- 2004;303(5661):1195–8.
95. SEOW KM, JUAN CC, WU LY, HSU YP, YANG WM, TSAI YL, et al. Serum and adipocyte resistin in polycystic ovary syndrome with insulin resistance. *Hum Reprod.* 2004;19(1):48–53.
 96. ZHANG J, ZHOU L, TANG L, XU L. The plasma level and gene expression of resistin in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol.* 2011;27(12):982–7.
 97. MUNIR I, YEN HW, BARUTH T, TARKOWSKI R, AZZIZ R, MAGOFFIN DA, et al. Resistin stimulation of 17 α -hydroxylase activity in ovarian theca cells in vitro: relevance to polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(8):4852–7.
 98. KRATZSCH J, PAASCH U, GRUNEWALD S, MUELLER MA, THIERY J, GLANDER HJ. Resistin correlates with elastase and interleukin-6 in human seminal plasma. *Reprod Biomed Online.* 2008;16(2):283–8.
 99. CORTELAZZI D, CORBETTA S, RONZONI S, PELLE F, MARCONI A, COZZI V, et al. Maternal and foetal resistin and adiponectin concentrations in normal and complicated pregnancies. *Clin Endocrinol.* 2007;66(3):447–53.
 100. PALIK E, BARANYI E, MELCZER Z, AUDIKOVSKY M, SZÖCS A, WINKLER G, et al. Elevated serum acylated (biologically active) ghrelin and resistin levels associate with pregnancy-induced weight gain and insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pr.* 2007;76(3):351–7.
 101. ZHOU Y, ZHANG M, GUO W, YU M, XUE K, HUANG S, et al. Expression of resistin protein in normal human subcutaneous adipose tissue and pregnant women subcutaneous adipose tissue and placenta. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci.* 2006;26(3):288–91.
 102. SAVINO F, LIGUORI SA, FISSORE MF, OGGERO R. Breast milk hormones and their protective effect on obesity. *Int J Pediatr Endocrinol.* 2009;2009:327505.
 103. SAMAL B, SUN Y, STEARNS G, XIE C, SUGGS S, MCNIECE I. Cloning and characterization of the cDNA encoding a novel human pre-B-cell colony enhancing factor. *Mol Cell Biol.* 1994;14(2):1431–7.
 104. CHANG YC, CHANG TJ, LEE WJ, CHUANG LM. The relationship of visfatin/pre-B-cell colony-enhancing factor/nicotinamide phosphoribosyltransferase in adipose tissue with inflammation, insulin resistance, and plasma lipids. *Metabolism.* 2010;59(1):93–9.
 105. CURAT CA, WEGNER V, SENGÈS C, MIRANVILLE A, TONUS C, BUSSE R, et al. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia.* 2006;49(4):744–7.
 106. SKOP V, KONTROVÁ K, ZÍDEK V, PRAVENEC M, KAZDOVÁ L, MIKULIK K, et al. Autocrine effects of visfatin on hepatocyte sensitivity to insulin action. *Physiol Res.* 2010;59(4):615–8.
 107. REVOLLO JR, KÖRNER A, MILLS KF, SATOH A, WANG T, GARTEN A, et al. Nampt/PBEF/Visfatin Regulates Insulin Secretion in β Cells as a Systemic NAD Biosynthetic Enzyme. *Cell Metab.* 2007;6(5):363–75.
 108. YOSHINO J, MILLS KF, YOON MJ, IMAI SI. Nicotinamide Mononucleotide, a

- Key NAD⁺ Intermediate, Treats the Pathophysiology of Diet- and Age-Induced Diabetes in Mice. *Cell Metab.* 2011;14(4):528–36.
109. STASTNY J, BIENERTOVA-VASKU J, VASKU A. Visfatin and its role in obesity development. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev.* 2012;6(2):120–4.
 110. LIANG Z, WU Y, XU J, FANG Q, CHEN D. Correlations of serum visfatin and metabolisms of glucose and lipid in women with gestational diabetes mellitus. *J Diabetes Investig.* 2016;7(2):247–52.
 111. ADEGHATE E. Visfatin: structure, function and relation to diabetes mellitus and other dysfunctions. *Curr Med Chem.* 2008;15(18):1851–62.
 112. NOURBAKHS M, NOURBAKHS M, GHOLINEJAD Z, RAZZAGHY-AZAR M. Visfatin in obese children and adolescents and its association with insulin resistance and metabolic syndrome. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015;75(2):183–8.
 113. SHEN CJ, TSAI EM, LEE JN, CHEN YL, LEE CH, CHAN TF. The concentrations of visfatin in the follicular fluids of women undergoing controlled ovarian stimulation are correlated to the number of oocytes retrieved. *Fertil Steril.* 2010;93(6):1844–50.
 114. REVERCHON M, CORNUAU M, CLOIX L, RAME C, GUERIF F, ROYERE D, et al. Visfatin is expressed in human granulosa cells: regulation by metformin through AMPK/SIRT1 pathways and its role in steroidogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2013;19(5):313–26.
 115. ARNER P. Human fat cell lipolysis: biochemistry, regulation and clinical role. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab.* 2005;19(4):471–82.
 116. HOTAMISLIGIL GS, MURRAY DL, CHOY LN, SPIEGELMAN BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(11):4854–8.
 117. XU H, SETHI JK, HOTAMISLIGIL GS. Transmembrane tumor necrosis factor (TNF)-alpha inhibits adipocyte differentiation by selectively activating TNF receptor 1. *J Biol Chem.* 1999;274(37):26287–95.
 118. TRUJILLO ME, SCHERER PE. Adipose tissue–derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev.* 2006;27(7):762–78.
 119. PRINS JB. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pr Res Clin Endocrinol Metab.* 2002;16(4):639–51.
 120. RYDÉN M, JOCKEN J, VAN HARMELEN V, DICKER A, HOFFSTEDT J, WIRÉN M, et al. Comparative studies of the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2007;292(6):E1847–55.
 121. FRIED SK, BUNKIN DA, GREENBERG AS. Omental and subcutaneous adipose tissues of obese subjects release interleukin-6: depot difference and regulation by glucocorticoid. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(3):847–50.
 122. FERNANDEZ-REAL JM, RICART W. Insulin resistance and chronic cardiovascular inflammatory syndrome. *Endocr Rev.* 2003;24(3):278–301.
 123. HOTAMISLIGIL GS, SHARGILL NS, SPIEGELMAN BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin. *Science.*

- 1993;259(5091):87–91.
124. GARG A. Regional adiposity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(9):426–4210.
 125. BISMAR H, DIEHL I, ZIEGLER R, PFEILSCHIFTER J. Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement. *J Clin Endocrinol Metab.* 1995;80(11):3351–5.
 126. WATANOBE H, HAYAKAWA Y. Hypothalamic interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppression of the reproductive axis in rats. *Endocrinology.* 2003;144(11):4868–75.
 127. KERSHAW EE, FLIER JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(6):2548–56.
 128. FAIN JN, MADAN AK, HILER ML, CHEEMA P, BAHOUTH SW. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology.* 2004;145(5):2273–82.
 129. BOULANGER MJ, CHOW DC, BREVNOVA EE, GARCIA KC. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science.* 2003;300(5628):2101–4.
 130. FERNANDEZ-REAL JM, BROCH M, VENDRELL J, RICART W. Insulin resistance, inflammation, and serum fatty acid composition. *Diabetes Care.* 2003;26(5):1362–8.
 131. BERGMAN RN, ADER M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2000;11(9):351–6.
 132. TSIGOS C, PAPANICOLAOU DA, KYROU I, DEFENSOR R, MITSIADIS CS, CHROUSOS GP. Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on glucose regulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(12):4167–70.
 133. DEURA I, HARADA T, TANIGUCHI F, IWABE T, IZAWA M, TERAOKA N. Reduction of estrogen production by interleukin-6 in a human granulosa tumor cell line may have implications for endometriosis-associated infertility. *Fertil Steril.* 2005;83(1):1086–92.
 134. YOSHIDA S, HARADA T, IWABE T, TANIGUCHI F, MITSUNARI M, YAMAUCHI N, et al. A combination of interleukin-6 and its soluble receptor impairs sperm motility: implications in infertility associated with endometriosis. *Hum Reprod.* 2004;19(8):1821–5.
 135. TSUDO T, HARADA T, IWABE T, TANIKAWA M, NAGANO Y, ITO M, et al. Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil Steril.* 2000;73(2):205–11.
 136. SPRENGERS ED, KLUFT C. Plasminogen activator inhibitors. *Blood.* 1987;69(2):381–7.
 137. WAJCHENBERG BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev.* 2000;21(6):697–738.
 138. PRAUS M, WAUTERICKX K, COLLEN D, GERARD RD. Reduction of tumor cell migration and metastasis by adenoviral gene transfer of plasminogen activator

- inhibitors. *Gene Ther.* 1999;6(2):227–36.
139. ASO Y. Plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 in vascular inflammation and thrombosis. *Front Biosci.* 2007;12:2957–66.
 140. ALESSI MC, POGGI M, JUHAN-VAGUE I. Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol.* 2007;18(3):240–5.
 141. EBISCH IM, THOMAS CM, WETZELS AM, WILLEMSSEN WN, SWEEP FC, STEEGERS-THEUNISSEN RP. Review of the role of the plasminogen activator system and vascular endothelial growth factor in subfertility. *Fertil Steril.* 2008;90(6):2340–50.
 142. GLUECK CJ, WANG P, KOBAYASHI S, PHILLIPS H, SIEVE-SMITH L. Metformin therapy throughout pregnancy reduces the development of gestational diabetes in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2002;77(3):520–5.
 143. HAQUE WA, GARG A. Adipocyte biology and adipocytokines. *Clin Lab Med.* 2004;24(1):217–34.
 144. TARKUN I, CANTURK Z, ARSLAN BC, TUREMEN E, TARKUN P. The plasminogen activator system in young and lean women with polycystic ovary syndrome. *Endocr J.* 2004;51(5):467–72.
 145. CHAPPELL LC, SEED PT, BRILEY A, KELLY FJ, HUNT BJ, CHARNOCK-JONES DS, et al. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obs Gynecol.* 2002;187(1):127–36.
 146. FERNANDEZ-FERNANDEZ R, MARTINI AC, NAVARRO VM, CASTELLANO JM, DIEGUEZ C, AGUILAR E, et al. Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. *Mol Cell Endocrinol.* 2006;254–255:127–32.
 147. CROWN A, CLIFTON DK, STEINER RA. Neuropeptide signaling in the integration of metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology.* 2007;86(3):175–82.
 148. HELLMAN B. The frequency distribution of the number and volume of the islets Langerhans in man. I. Studies on non-diabetic adults. *Acta Soc Med Ups.* 1959;64:432–460.
 149. PLANT TM, ZELENK AJ, MCARDLE CA, ROBERSON MS. Gonadotropes and Gonadotropin-Releasing Hormone Signaling. In: Knobil Neill's *Physiol Reprod.* Elsevier Inc. 2015;335–97.
 150. PLANT TM, ZELENK AJ, PANGAS SA, RAJKOVIC A. Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. In: Knobil Neill's *Physiol Reprod.* Elsevier Inc. 2015;947–95.
 151. PLANT TM, ZELENKk AJ, RICHARDS JS, LIU Z, SHIMADA M. Ovulation. In: Knobil Neill's *Physiol Reprod.* Elsevier Inc. 2015;997–1021.
 152. PLANT TM, ZELENK AJ, STOUFFER RL, HENNEBOLD JD. Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. In: Knobil Neill's *Physiol Reprod.* Elsevier Inc. 2015;1023–76.
 153. PLANT TM, ZELENK AJ, MAZUR EC, LARGE MJ, DEMAYO FJ. Human Oviduct and Endometrium: Changes over the Menstrual Cycle. In: Knobil Neill's *Physiol Reprod.* Elsevier Inc. 2015;1077–97.

154. RORSMAN P, BRAUN M. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol.* 2013;75:155–79.
155. NEWSHOLME P, KRAUSE M. Nutritional regulation of insulin secretion: Implications for diabetes. *Clin Biochem Rev.* 2012;33(2):35–47.
156. FU Z, GILBERT ER, LIU D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. *Curr Diabetes Rev.* 2013;9(1):25–53.
157. VOLP ACP, REZENDE FAC, ALFENAS RCG. Insulina: mecanismo de ação e a homeostase metabólica. *Rev Bras Nut.* 2008;23(2):158–64.
158. PORETSKY L, CATALDO NA, ROSENWAKS Z, GIUDICE LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev.* 1999;20:535–82.
159. HUNTER SJ, GARVEY WT. Insulin action and insulin resistance: diseases involving defects in insulin receptors, signal transduction, and the glucose transport effector system. *Am J Med.* 1998;105(4):331–45.
160. NEVILLE MC, WEBB P, RAMANATHAN P, MANNINO MP, PECORINI C, MONKS J, et al. The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013;305(9):E1103-14.
161. SIROTKIN A V, MAKAREVICH A V, KWON HB, KOTWICA J, BULLA J, HETÉNYI L. Do GH, IGF-I and oxytocin interact by regulating the secretory activity of porcine ovarian cells? *J Endocrinol.* 2001;171(3):475–80.
162. LOUHIO H, HOVATTA O, SJÖBERG J, TUURI T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. *Mol Hum Reprod.* 2000;6(8):694–8.
163. MYERS MG, BACKER JM, SIDDLE K, WHITE MF. The insulin receptor functions normally in Chinese hamster ovary cells after truncation of the C terminus. *J Biol Chem.* 1991;266(16):10616–23.
164. DUPONT J, SCARAMUZZI RJ. Insulin signalling and glucose transport in the ovary and ovarian function during the ovarian cycle. *Biochem J.* 2016;473(11):1483–501.
165. YASEEN MA, WRENZYCKI C, HERRMANN D, CARNWATH JW, NIEMANN H. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. *Reproduction.* 2001;122(4):601–10.
166. ALMEIDA FRCL, MAO J, NOVACK S, COSGROVE JR, FOXCROFT GR. Effects of different patterns of feed restriction and insulin treatment during the luteal phase on reproductive, metabolic and endocrine parameters in cyclic gilts. *J Anim Sci.* 2001;799(1):200–12.
167. PLANT TM, ZELEZNIK AJ, FRANKS S, HARDY K, CONWAY GS. Pathophysiology of Ovarian Function in the Human Female. In: Knobil Neill's *Physiol Reprod.* Elsevier Inc. 2015;1363–94.
168. DUNAIF A. Insulin action in the polycystic ovary syndrome. *Endocrinol Metab*

- Clin North Am. 1999;28(2):341–59.
169. GILLING-SMITH C, WILLIS DS, BEARD RW, FRANKS S. Hypersecretion of androstenedione by isolated thecal cells from polycystic ovaries. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;79(4):1158–65.
 170. AGARWAL SK, JUDD HL, MAGOFFIN DA. A Mechanism for the Suppression of Estrogen Production in Polycystic Ovary Syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.* 1996;81(10):3686-91.
 171. DIAMANTI-KANDARAKIS E, KANDARALIS H, LEGRO RS. The Role of Genes and Environment in the Etiology of PCOS. *Endocrine.* 2006;30(1):19–26.
 172. SAM S, DUNAIF A. Polycystic ovary syndrome: Syndrome XX? *Trends Endocrinol Metab.* 2003;14(8):365–70.
 173. NANDI A, WANG X, ACCILI D, WOLGEMUTH DJ. The effect of insulin signaling on female reproductive function independent of adiposity and hyperglycemia. *Endocrinology.* 2010;151(4):1863–71.
 174. TAYLOR SI, DONS RF, HERNANDEZ E, ROTH J, GORDEN P. Insulin resistance associated with androgen excess in women with autoantibodies to the insulin receptor. *Ann Int Med.* 1982;97(6):851–5.
 175. CHANG AS, N DA, MOLEY KH. Maternal diabetes adversely affects preovulatory oocyte maturation, development, and granulosa cell apoptosis. *Endocrinology.* 2005;146(5):2445–53.
 176. CARR MC. The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(6):2404–11.
 177. YAŞAR P, AYAZ G, USER SD, GÜPÜR G, MUYAN M. Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reprod Med Biol.* 2016;16(1):4–20.
 178. JAKIMIUK AJ, YEN H-W, WEITSMAN SR, MAGOFFIN DA, BOGUSIEWICZ M. Estrogen Receptor α and β Expression in Theca and Granulosa Cells from Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87(12):5532–8.
 179. FORSUM E, LOF M. Energy metabolism during human pregnancy. *Annu Rev Nutr.* 2007;27:277–92.
 180. DAVIDOWA H, PLAGEMANN A. Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones. *Neurosci Lett.* 2004;371(1):64–8.
 181. RODRIGUES AL, DE SOUZA EPG, DA SILVA S V, RODRIGUES DSB, NASCIMENTO AB, BARJA-FIDALGO C, et al. Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition. *J Endocrinol.* 2007;195(3):485–94.
 182. LINNE Y. Effects of obesity on women's reproduction and complications during pregnancy. *Obes Rev.* 2004;5:137–43.
 183. PARIHAR M. Obesity and infertility. *Rev Gynecol Pract.* 2003;3:120–6.
 184. AUGER AP. Ligand-independent activation of progestin receptors: relevance for female sexual behaviour. *Reproduction.* 2001;122(6):847–55.
 185. FLANAGAN-CATO LM, CALIZO LH, DANIELS D. The synaptic organization of

- VMH neurons that mediate the effects of estrogen on sexual behavior. *Horm Behav.* 2001;40(2):178–82.
186. KIRCHENGAST S, HARTMANN B, GRUBER D, HUBER J. Decreased sexual interest and its relationship to body build in postmenopausal women. *Maturitas.* 1996;23(1):63–71.
 187. ZEMLAN FP, ADLER NT. Hormonal control of female sexual behavior in the rat. *Horm Behav.* 1977;9(3):345–57.
 188. KIM KK, KANG HC, KIM SS, YOUN BB. Influence of weight reduction by sibutramine on female sexual function. *Int J Obes.* 2006;30(5):758–63.
 189. ELLISON PT. Metabolizing for Two. In: *On Fertile Ground: A Natural History of Human Reproduction.* Harvard University Press. 2001;94–7.
 190. DALL SR, BOYD IL. Evolution of mammals: lactation helps mothers to cope with unreliable food supplies. *Proc Biol Sci.* 2004;271(1552):2049–57.
 191. BUTTE NF. Carbohydrate and lipid metabolism in pregnancy: normal compared with gestational diabetes mellitus. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(5):1256S-1261S.
 192. NEWBERN D, FREEMARK M. Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2011;18(6):409–16.
 193. LAIN KY, CATALANO PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obs Gynecol.* 2007;50(4):938–48.
 194. DI CIANNI G, MICCOLI R, VOLPE L, LENCIONI C, DEL PRATO S. Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2003;19(4):259–70.
 195. HADDEN DR, MCLAUGHLIN C. Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009;14(2):66–71.
 196. MOLEY KH, CHI MM, KNUDSON CM, KORSMEYER SJ, MUECKLER MM. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. *Nat Med.* 1998;4(12):1421–4.
 197. DOBLADO M, MOLEY KH. Glucose metabolism in pregnancy and embryogenesis. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007;14(6):488–93.
 198. KWONG WY, WILD AE, ROBERTS P, WILLIS AC, FLEMING TP. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development.* 2000;127(19):4195–202.
 199. FLEMING J V, HAY SM, HARRIES DN, REES WD. Effects of nutrient deprivation and differentiation on the expression of growth-arrest genes (gas and gadd) in F9 embryonal carcinoma cells. *Biochem J.* 1998;330(1):573–9.
 200. LANE M, GARDNER DK. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil.* 1997;109(1):153–64.
 201. HERRERA E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta.* 2002;23:S9–19.
 202. NAPOLI C, D'ARMIENTO FP, MANCINI FP, POSTIGLIONE A, WITZTUM JL, PALUMBO G, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is

- greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1997;100(11):2680–90.
203. HYTTEN FE, LEITCH I. The physiology of human pregnancy. Blackwell Science. 1971;599p.
 204. ALVAREZ JJ, MONTELONGO A, IGLESIAS A, LASUNCIÓN MA, HERRERA E. Longitudinal study on lipoprotein profile, high density lipoprotein subclass, and postheparin lipases during gestation in women. *J Lipid Res.* 1996;37(2):299–308.
 205. PALINSKI W, D'ARMIENTO FP, WITZTUM JL, DE NIGRIS F, CASANADA F, CONDORELLI M, et al. Maternal hypercholesterolemia and treatment during pregnancy influence the long-term progression of atherosclerosis in offspring of rabbits. *Circ Res.* 2001;89(11):991–6.
 206. VILLAR J, COGSWELL M, KESTLER E, CASTILLO P, MENENDEZ R, REPKE JT. Effect of fat and fat-free mass deposition during pregnancy on birth weight. *Am J Obs Gynecol.* 1992;167(5):1344–52.
 207. KNOPP RH, MAGEE MS, WALDEN CE, BONET B, BENEDETTI TJ. Prediction of infant birth weight by GDM screening tests. Importance of plasma triglyceride. *Diabetes Care.* 1992;15(11):1605–13.
 208. MURPHY SP, ABRAMS BF. Changes in energy intakes during pregnancy and lactation in a national sample of US women. *Am J Public Heal.* 1993;83(8):1161–3.
 209. PIERS LS, DIGGAVI SN, THANGAM S, VAN RAAIJ JMA, SHETTY PS, HAUTVAST JGAJ. Changes in energy expenditure, anthropometry, and energy intake during the course of pregnancy and lactation in well-nourished Indian women. *Am J Clin Nutr.* 1995;61(3):501–13.
 210. LEDERMAN SA, ROSSO P. Effects of food restriction on maternal weight and body composition in pregnant and non-pregnant rats. *Growth.* 1980;44:77–88.
 211. MOORE BJ, BRASSEL JA. One cycle of reproduction consisting of pregnancy, lactation, and recovery effects on carcass composition in ad libitum-fed and food-restricted rats. *J Nutr.* 1984;114(9):1548–59.
 212. RAMOS P, HERRERA E. Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. *Am J Physiol.* 1995;269(5):E858–63.
 213. HERRERA E, RAMOS P, MARTÍN A. Control by insulin of adipose tissue lipoprotein lipase activity during late pregnancy in the rat. In: *Frontiers in diabetes research: lessons from animal diabetes III.* 1990;551–64.
 214. BRINTON EA. Oral estrogen replacement therapy in postmenopausal women selectively raises levels and production rates of lipoprotein A-I and lowers hepatic lipase activity without lowering the fractional catabolic rate. *Arter Thromb Vasc Biol.* 1996;16(3):431–40.
 215. PEINADO-ONSURBE J, STAELS B, VANDERSCHUEREN D, BOUILLON R, AUWERX J. Effects of Sex Steroids on Hepatic and Lipoprotein Lipase Activity and mRNA in the Rat. *Horm Res.* 1993;40(5–6):184–8.
 216. HERRERA E, MARTIN A, MONTELONGO A, DOMINGUEZ M, LASUNCION

- MA. Serum lipid profile in diabetic pregnancy. *Av Diabet*. 1992;5(1):73–84.
217. KITAJIMA M, OKA S, YASUHI I, FUKUDA M, RII Y, ISHIMARU T. Maternal serum triglyceride at 24-32 weeks' gestation and newborn weight in nondiabetic women with positive diabetic screens. *Obs Gynecol*. 2001;97(5):776–80.
 218. SKRYTEN A, JOHNSON P, SAMSIOE G, GUSTAFSON A. Studies in diabetic pregnancy: I. Serum lipids. *Acta Obs Gynecol Scand*. 1976;55(3):211–5.
 219. PEDIATRICS AAO. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics*. 2012;129(3):827–41.
 220. JAMES DC, DOBSON B. Position of the American Dietetic Association: Promoting and supporting breastfeeding. *J Am Diet Assoc*. 2005;105(5):810–8.
 221. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global strategy for infant and young child feeding. 2003;30p.
 222. STUEBE AM, RICH-EDWARDS JW. The Reset Hypothesis: lactation and maternal metabolism. *Am J Perinatol*. 2009;26(1):81–8.
 223. BUTTE NF, HOPKINSON JM, MEHTA N, MOON JK, SMITH EO. Adjustments in energy expenditure and substrate utilization during late pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(2):299–307.
 224. NATLAND ST, LUND NILSEN TI, MIDTHJELL K, FROST ANDERSEN L, FORSMO S. Lactation and cardiovascular risk factors in mothers in a population-based study: the HUNT-study. *Int Breastfeed J*. 2012;7(1):8p.
 225. SCHWARZ EB, MCCLURE CK, TEPPER PG, THURSTON R, JANSSEN I, MATTHEWS KA, et al. Lactation and maternal measures of subclinical cardiovascular disease. *Obs Gynecol*. 2010;115(1):41–8.
 226. STUEBE AM, SCHWARZ EB, GREWEN K, RICH-EDWARDS JW, MICHELS KB, FOSTER EM, et al. Duration of lactation and incidence of maternal hypertension: a longitudinal cohort study. *Am J Epidemiol*. 2011;174(10):1147–58.
 227. EBINA S, KASHIWAKURA I. Influence of breastfeeding on maternal blood pressure at one month postpartum. *Int J Womens Heal*. 2012;4:333–9.
 228. STUEBE AM, RICH-EDWARDS JW, WILLETT WC, MANSON JE, MICHELS KB. Duration of Lactation and Incidence of Type 2 Diabetes. *JAMA*. 2005;294(20):2601–10.
 229. IP S, CHUNG M, RAMAN G, TRIKALINOS TA, LAU J. A summary of the Agency for Healthcare Research and Quality's evidence report on breastfeeding in developed countries. *Breastfeed Med*. 2009;4(1):17–30.
 230. GUESNET P, ALESSANDRI JM. Docosahexaenoic acid (DHA) and the developing central nervous system (CNS) - Implications for dietary recommendations. *Biochimie*. 2011;93(1):7–12.
 231. GIOVANNINI M, AGOSTONI C, SALARI PC. The role of lipids in nutrition during the first months of life. *J Int Med Res*. 1991;19(5):351–62.
 232. FLINT DJ, TRAVERS MT, BARBER MC, BINART N, KELLY PA. Diet-induced obesity impairs mammary development and lactogenesis in murine mammary gland. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(6):E1179–87.

233. AOKI N, YAMAGUCHI Y, OHIRA S, MATSUDA T. High fat feeding of lactating mice causing a drastic reduction in fat and energy content in milk without affecting the apparent growth of their pups and the production of major milk fat globule membrane components MFG-E8 and butyrophilin. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1999;63(10):1749–55.
234. ZHAO J, DEL BIGIO MR, WEILER HA. Maternal arachidonic acid supplementation improves neurodevelopment of offspring from healthy and diabetic rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 2009;81(5–6):349–56.
235. KUGYELKA JG, RASMUSSEN KM, FRONGILLO EA. Maternal obesity is negatively associated with breastfeeding success among Hispanic but not Black women. *J Nutr.* 2004;134:1746–53.
236. LIU J, SMITH MG, DOBRE MA, FERGUSON JE. Maternal obesity and breast-feeding practices among white and black women. *Obesity.* 2010;18(1):175–82.
237. TURCK SIN R, BEL S, GALJAARD S, DEVLIEGER R. Maternal obesity and breastfeeding intention, initiation, intensity and duration: A systematic review. *Matern Child Nutr.* 2014;10(2):166–83.
238. LEPE M, BACARDÍ GASCÓN M, CASTAÑEDA-GONZÁLEZ L, PÉREZ MORALES ME, JIMÉNEZ CRUZ A. Effect of maternal obesity on lactation: systematic review. *Nutr Hosp.* 2011;26(6):1266–9.
239. WOJCICKI JM. Maternal Prepregnancy Body Mass Index and Initiation and Duration of Breastfeeding: A Review of the Literature. *J Women's Heal.* 2011;20(3):341–7.
240. JEVITT C, HERNANDEZ I, GROËR M. Lactation Complicated by Overweight and Obesity: Supporting the Mother and Newborn. *J Midwifery Women's Heal.* 2007;52(6):606–13.
241. BUONFIGLIO DC, RAMOS-LOBO AM, FREITAS VM, ZAMPIERI TT, NAGAISHI VS, MAGALHÃES M, et al. Obesity impairs lactation performance in mice by inducing prolactin resistance. *Sci Rep.* 2016;6(22421).
242. GODFREY KM, GLUCKMAN PD, HANSON MA. Developmental origins of metabolic disease: Life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(4):199–205.
243. CALKINS K, DEVASKAR SU. Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2011;41(6):158–76.
244. OLLIKAINEN M, SMITH KR, JOO EJH, NG HK, ANDRONIKOS R, NOVAKOVIC B, et al. DNA methylation analysis of multiple tissues from newborn twins reveals both genetic and intrauterine components to variation in the human neonatal epigenome. *Hum Mol Genet.* 2010;19(21):4176–88.
245. LILLYCROP KA. Effect of maternal diet on the epigenome: Implications for human metabolic disease. *Proc Nutr Soc.* 2011;70(1):64–72.
246. WADDINGTON CH. The epigenotype. *Endeavor.* 1942;1:18–20.
247. VAN DER MAAREL SM. Epigenetic mechanisms in health and disease. *Ann Rheum Dis.* 2008;67(Suppl 3):iii97-100.
248. MURRELL A, HURD PJ, WOOD IC. Epigenetic mechanisms in development and disease. *Biochem Soc Trans.* 2013;41(3):697–9.

249. CHOLEWA-WACLAW J, BIRD A, VON SCHIMMELMANN M, SCHAEFER A, YU H, SONG H, et al. The Role of Epigenetic Mechanisms in the Regulation of Gene Expression in the Nervous System. *J Neurosci*. 2016;36(45):11427 LP – 11434.
250. MOOSAVI A, MOTEVALIZADEH ARDEKANI A. Role of Epigenetics in Biology and Human Diseases. *Iran Biomed J*. 2016;20(5):246–58.
251. BARKER DJ, OSMOND C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986;1:1077–81.
252. BATESON P, BARKER D, CLUTTON-BROCK T, DEB D, D'UDINE B, FOLEY RA, et al. Developmental plasticity and human health. *Nature*. 2004;430:419–21.
253. BARKER DJ, OSMOND C, GOLDING J, KUH D, WADSWORTH ME. Growth in útero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989;298:564–7.
254. WOODS LL, INGELFINGER JR, NYENGAARD JR, RASCH R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res*. 2001;49:460–7.
255. GOMES RM, BUENO FG, SCHAMBER CR, MELLO JCP de, OLIVEIRA JC de, FRANCISCO FA, et al. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. *J Nutr Biochem*. 2018;61:24–32.
256. LANGLEY-EVANS SC, MCMULLEN S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract*. 2010;19(2):87–98.
257. LEWIS RM, DEMMELMAIR H, GAILLARD R, GODFREY KM, HAUGUEL-DE MOUZON S, HUPPERTZ B, et al. The placental exposome: Placental determinants of fetal adiposity and postnatal body composition. *Ann Nutr Metab*. 2013;63(3):208–15.
258. GUARDAMAGNA O, ABELLO F, CAGLIERO P, LUGHETTI L. Impact of nutrition since early life on cardiovascular prevention. *Ital J Pediatr*. 2012;38(1):1–10.
259. LAMB MM, DABELEA D, YIN X, OGDEN LG, KLINGENSMITH GJ, REWERS M, et al. Early-life predictors of higher body mass index in healthy children. *Ann Nutr Metab*. 2010;56(1):16–22.
260. GLUCKMAN PD, HANSON MA, PINAL C. The developmental origins of adult disease. *Matern Child Nutr*. 2005;1:130–41.
261. GLUCKMAN PD, HANSON MA. Developmental plasticity and human disease: Research directions. *J Intern Med*. 2007;261(5):461–71.
262. DURNWALD C, LANDON M. Fetal links to chronic disease: The role of gestational diabetes mellitus. *Am J Perinatol*. 2013;30(5):343–6.
263. TAM WH, MA RC, YANG X, LI AM, KO GT, KONG AP, et al. Glucose Intolerance and Cardiometabolic Risk in Adolescents Exposed to Maternal Gestational Diabetes. *Diabetes Care*. 2010;33(6):1382–4.
264. LEHNEN H, ZECHNER U, HAAF T. Epigenetics of gestational diabetes mellitus and offspring health: The time for action is in early stages of life. *Mol Hum*

- Reprod. 2013;19(7):415–22.
265. TARANTAL AF, BERGLUND L. Obesity and lifespan health-importance of the fetal environment. *Nutrients*. 2014;6(4):1725–36.
 266. DUBÉ E, GRAVEL A, MARTIN C, DESPAROIS G, MOUSSA I, ETHIER-CHIASSON M, et al. Modulation of Fatty Acid Transport and Metabolism by Maternal Obesity in the Human Full-Term Placenta. *Biol Reprod*. 2012;87(1):1–11.
 267. NAIR L, NAIR MK, CHACKO DS. Markers of fetal onset adult diseases. *Indian Pediatr*. 2009;46 Suppl(14):s48-54.
 268. BARKER DJP, HALES CN, FALL CHD, OSMOND C, PHIPPS K, CLARK PMS. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia*. 1993;36(1):62–7.
 269. PEREIRA JA, RONDÓ PHC, LEMOS JO, PACHECO DE SOUZA JM, DIAS RSC. The influence of birthweight on arterial blood pressure of children. *Clin Nutr*. 2010;29(3):337–40.
 270. MEAS T. Fetal origins of insulin resistance and the metabolic syndrome: A key role for adipose tissue? *Diabetes Metab*. 2010;36(1):11–20.
 271. ZHANG J, HIMES JH, GUO Y, JIANG J, YANG L, LU Q, et al. Birth Weight, Growth and Feeding Pattern in Early Infancy Predict Overweight/Obesity Status at Two Years of Age: A Birth Cohort Study of Chinese Infants. *PLoS One*. 2013;8(6):4–11.
 272. CAULFIELD LE, ONIS M DE, BLÖSSNER M, BLACK RE. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated. *Am J Clin Nutr*. 2004;80:193–8.
 273. THOMPSON AL, BENTLEY ME. The critical period of infant feeding for the development of early disparities in obesity. *Soc Sci Med*. 2013;97:288-96.
 274. SILVEIRA MFG. Disfunções tireóideas maternas no período pré-fecundação programam a função tireóidea e o desenvolvimento somatoneural da prole. *UERJ - Inst Biol*. 2004;76p.
 275. DEIRÓ TCBJ, MANHÃES-DE-CASTRO R, CABRAL-FILHO JE, SOUZA SL, FREITAS-SILVA SR, FERREIRA LMP, et al. Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(10):1503–9.
 276. RODRIGUEZ-PEREZ MC, VICENTE-PEREZ F, GARCIA GGJ. Effects of protein malnutrition and the administration of cortisol on the reflexologic development in rats. *Behav Neural Biol*. 58(3):165–70.
 277. FOX WM. Reflex-ontogeny and behavioural development of the mouse. *Anim Behav*. 1965;13(2–3):234–41.
 278. SLOTKIN TA, WRENCH N, RYDE IT, LASSITER TL, LEVIN ED, SEIDLER FJ. Neonatal parathion exposure disrupts serotonin and dopamine synaptic function in rat brain regions: modulation by a high-fat diet in adulthood. *Neurotoxicol Teratol*. 2009;31:390–9.
 279. NICULESCU MD, LUPU DS. High fat diet-induced maternal obesity alters fetal hippocampal development. *Int J Dev Neurosci*. 2009;27:627–33.

280. PELEG-RAIBSTEIN D, LUCA E, WOLFRUM C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. *Behav Brain Res.* 2012;233:398–404.
281. KANASAKI K, KOYA D. Biology of Obesity: Lessons from Animal Models of Obesity. *J Biomed Biotechnol.* 2011;11p.
282. WEI MIN ZHANG, KUCHAR S, MOZEŠ Š. Body fat and RNA content of the VMH cells in rats neonatally treated with monosodium glutamate. *Brain Res Bull.* 1994;35(4):383–5.
283. TANAKA K, SHIMADA M, NAKAO K, KUSUNOKI T. Hypothalamic lesion induced by injection of monosodium glutamate in suckling period and subsequent development of obesity. *Exp Neurol.* 1978;62(1):191–9.
284. SCOMPARI DX, GOMES RM, GRASSIOLLI S, RINALDI W, MARTINS AG, DE OLIVEIRA JC, et al. Autonomic activity and glycemic homeostasis are maintained by precocious and low intensity training exercises in MSG-programmed obese mice. *Endocrine.* 2009;36(3):510–7.
285. REMKE H, WILSDORF A, MÜLLER F. Development of hypothalamic obesity in growing rats. *Exp Pathol.* 1988;33(4):223–32.
286. NEMEROFF CB, LIPTON MA, KIZER JS. Models of Neuroendocrine Regulation: Use of Monosodium Glutamate as an Investigational Tool. *Dev Neurosci.* 1978;1(2):102–9.
287. SCLAFANI A, SPRINGER D. Dietary Obesity in Adult Rats: Similarities to Hypothalamic and Human Obesity Syndromes. *Physiol Behav.* 1976;17:461–71.
288. VANZELA EC, RIBEIRO RA, DE OLIVEIRA CAM, RODRIGUES FB, BONFLEUR ML, CARNEIRO EM, et al. Pregnancy restores insulin secretion from pancreatic islets in cafeteria diet-induced obese rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2010;298(2):R320–8.
289. DESAI M, BABU J, ROSS MG. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007;293(6):R2306–14.
290. KENNEDY GC. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. *J Endocrinol.* 1957;16(1):9–17.
291. HABBOUT A, DELEMASURE S, GOIRAND F, GUILLAND JC, CHABOD F, SEDIKI M, et al. Postnatal overfeeding in rats leads to moderate overweight and to cardiometabolic and oxidative alterations in adulthood. *Biochimie.* 2012;94(1):117–24.
292. MATTHEIJ JA, GRUISEN EF, SWARTS JJ. The suckling-induced rise of plasma prolactin in lactating rats: its dependence on stage of lactation and litter size. *Horm Res Pediatr.* 1979;11(6):325–36.
293. PLAGEMANN A, HARDER T, RAKE A, VOITS M, FINK H, ROHDE W, et al. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res.* 1999;836(1–2):146–55.
294. PLAGEMANN A, HARDER T, RAKE A, JANERT U, MELCHIOR K, ROHDE W, et al. Morphological alterations of hypothalamic nuclei due to intrahypothalamic

- hyperinsulinism in newborn rats. *Int J Dev Neurosci.* 1999;17(1):37–44.
295. ZIKO I, DE LUCA S, DINAN T, BARWOOD JM, SOMINSKY L, CAI G, et al. Neonatal overfeeding alters hypothalamic microglial profiles and central responses to immune challenge long-term. *Brain Behav Immun.* 2014;41(1):32–43.
 296. COLLDEN G, BALLAND E, PARKASH J, CARON E, LANGLET F, PREVOT V, et al. Neonatal overnutrition causes early alterations in the central response to peripheral ghrelin. *Mol Metab.* 2015;4(1):15–24.
 297. ENES-MARQUES S, GIUSTI-PAIVA A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. *J Physiol Sci.* 2018;68(6):789–98.
 298. DESAI M, HAN G, ROSS MG. Programmed hyperphagia in offspring of obese dams: Altered expression of hypothalamic nutrient sensors, neurogenic factors and epigenetic modulators. *Appetite.* 2016;99:193–9.
 299. MARASHI V, RÜLICHE T. The Bruce Effect in Norway Rats. *Biol Reprod.* 2012;86(1):1–5.
 300. BRUCE HM. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. *Nature.* 1959;184(4680):105.
 301. MOORE CL, MORELLI GA. Mother rats interact differently with male and female offspring. *J Comp Physiol Psychol.* 1979;93(4):677–84.
 302. LOHMILLER JJ, SWING SP. Reproduction and Breeding. In: *The Laboratory Rat.* 2006. p. 147–64.
 303. FISCHBECK KL, RASMUSSEN KM. Effect of repeated reproductive cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. *J Nutr.* 1987;117:1967–75.
 304. LONSTEIN JS, GAMMIE SC. Sensory, hormonal, and neural control of maternal aggression in laboratory rodents. *Neurosci Biobehav Rev.* 2002;26(8):869–88.
 305. FOSTER DL, HILEMAN SM. Puberty in the Sheep. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* Elsevier Inc. 2014;1441–85.
 306. ANDERSON CA, DUFFY DL, MARTIN NG, VISSCHER PM. Estimation of variance components for age at menarche in twin families. *Behav Genet.* 2007;37:668–77.
 307. MORRIS DH, JONES ME, SCHOEMAKER MJ, ASHWORTH A, SWERDLOW AJ. Familial concordance for age at menarche: analyses from the Breakthrough Generations Study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2011;25:306–11.
 308. SILVENTOINEN K, HAUKKA J, DUNKEL L, TYNELIUS P, RASMUSSEN F. Genetics of pubertal timing and its associations with relative weight in childhood and adult height: the Swedish Young Male Twins Study. *Pediatrics.* 2008;121:885–891.
 309. HATCH EE, TROISI R, WISE LA, TITUS-ERNSTOFF L, HYER M, PALMER JR, et al. Preterm birth, fetal growth, and age at menarche among women exposed prenatally to diethylstilbestrol (DES). *Reprod Toxicol.* 2011;31(2):151–7.
 310. DEN HOND E, ROELS HA, HOPPENBROUWERS, K NAWROT T, THIJS L,

- VANDERMEULEN C, WINNEKE G, et al. Sexual maturation in relation to polychlorinated aromatic hydrocarbons: Sharpe and Skakkebaek's hypothesis revisited. *Env Heal Perspect*. 2002;110(8):771–6.
311. ANDERSON SE, DALLAL GE, MUST A. Relative weight and race influence average age at menarche: results from two nationally representative surveys of US girls studied 25 years apart. *Pediatrics*. 2003;111:844–50.
 312. FREEDMAN DS, KHAN LK, SERDULA MK, DIETZ WH, SRINIVASAN SR, BERENSON GS, et al. The relation of menarcheal age to obesity in childhood and adulthood: the Bogalusa heart study. *BMC Pediatr*. 2003;3(3).
 313. KAPLOWITZ PB, SLORA EJ, WASSERMAN RC, PEDLOW SE, HERMAN-GIDDENS ME. Earlier onset of puberty in girls: relation to increased body mass index and race. *Pediatrics*. 2001;108(2):347–53.
 314. YALCIN SS, KINIK E. The impact of sexual maturation stage on body mass index in adolescents girls. *Turk J Pediatr*. 1999;41:315–21.
 315. SIERVOGEL RM, DEMERATH EW, SCHUBERT C, REMSBERG KE, CHUMLEA WC, SUN S, et al. Puberty and body composition. *Horm Res*. 2003;60:36–45.
 316. TERASAWA E, FERNANDEZ DL. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. *Endocr Rev*. 2001;22(1):111–51.
 317. OJEDA S, SKINNER MK. Puberty in the rat. In: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*. Elsevier Inc. 2006; 2061–126.
 318. SMITH MS, FREEMAN ME, NEILL JD. The control of progesterone secretion during the estrus cycle and early pseudopregnancy in the rat: gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 1975;96:219–26.
 319. MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian J Biol*. 2002;62(4a):609–14.
 320. SCHWARTZ NB. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *Am J Physiol*. 1964;107:1251–9.
 321. LONG JA, EVANS HM. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. University of California Press. 1922;6: 1–148.
 322. YOUNG WC, BOLING JL, RICHARD JB. The vaginal smear picture, sexual receptivity and the time of ovulation in the albino rat. *Anat Rec*. 1941;80(1):37–45.
 323. BEACH FA. Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Horm Behav*. 1976;7(1):105–38.
 324. BLAUSTEIN JD. Feminine Reproductive Behavior and Physiology in Rodents : Integration of Hormonal, Behavioral, and Environmental Influences. In: *Hormones, brain and behavior*. Elsevier Inc. 2009;67–108.
 325. MCCLINTOCK MK, ADLER NT. The Role of the Female During Copulation in Wild and Domestic Norway Rats (*Rattus Norvegicus*). *Behaviour*. 1978;67(1):67–95.

326. HARDY DF, DEBOLD JF. Effects of coital stimulation upon behavior of the female rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1972;78(3):400–8.
327. SÖDERSTEIN P, HANSEN S. Effects of estradiol and progesterone on the induction and duration of sexual receptivity in cyclic female rats. *J Endocrinol.* 1977;74(3):477–85.
328. LONSTEIN JS, STERN JM. Effects of unilateral suckling on nursing behavior and c-fos activity in the caudal periaqueductal gray in rats. *Dev Psychobiol.* 1999;35(4):264–75.
329. FELICIO LF, MANN PE, BRIDGES RS. Intracerebroventricular cholecystokinin infusions block beta-endorphin-induced disruption of maternal behavior. *Pharmacol Biochem Behav.* 1991;39(1):201–4.
330. MYERS MM, BRUNELLI SA, SHAIR HN, SQUIRE JM, HOFER MA. Relationships between maternal behavior of SHR and WKY dams and adult blood pressures of cross-fostered F1 pups. *Dev Psychobiol.* 1989;22(1):55–67.
331. SÖDERSTEN P, ENEROTH P. Effects of exposure to pups on maternal behaviour , sexual behaviour and serum prolactin concentrations in male rats. *J Endocrinol.* 1984;102:115–9.
332. NUMAN M. Maternal behavior. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier Inc. 2006;1921–1993.
333. CHAMPAGNE FA, FRANCIS DD, MAR A, MEANEY MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiol Behav.* 2003;79(3):359–71.
334. PATEL MS, SRINIVASAN M. Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Trends Endocrinol Metab.* 2011;19(4):146–52.
335. PLAGEMANN A. Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. *Physiol Behav.* 2005;86(5):661–8.
336. FRITZ H, GIESE K. Evaluation of the teratogenic potential of chemicals in the rat. *Pharmacology.* 1990;40(SUPPL. 1):1–28.
337. SUTER MA, AAGAARD KM. Fetal Epigenetic Origins of Disease. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier Inc. 2014;2027–54.
338. ŠEFČÍKOVÁ Z, BUJŇÁKOVÁ D, RAČEK L, KMET V, MOZEŠ Š. Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests. *Physiol Res.* 2011;60(2):337–46.
339. SHANKAR K, HARRELL A, LIU X, GILCHRIST JM, RONIS MJJ, BADGER TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Integr Comp Physiol.* 2008;294(2):R528–38.
340. DAVIDOWA H, LI Y, PLAGEMANN A. Altered responses to orexigenic (AGRP, MCH) and anorexigenic (alpha-MSH, CART) neuropeptides of paraventricular hypothalamic neurons in early postnatally overfed rats. *Eur J Neurosci.* 2003;18(3):613–21.
341. PLAGEMANN A. Perinatal Nutrition and Hormone-Dependent Programming of Food Intake. *Horm Res Paediatr.* 2006;65(3):83–9.
342. WU XQ, LI XF, SIA WT, YE B, O'BYRNE KT. The effects of small litter rearing

- on ovarian function at puberty and adulthood in the rat. *Reprod Biol.* 2016;16(2):130–7.
343. CASTELLANO JM, BENTSEN AH, SÁNCHEZ-GARRIDO MA, RUIZ-PINO F, ROMERO M, GARCIA-GALIANO D, et al. Early Metabolic Programming of Puberty Onset: Impact of Changes in Postnatal Feeding and Rearing Conditions on the Timing of Puberty and Development of the Hypothalamic Kisspeptin System. *Endocrinology.* 2011;152(9):3396–408.
 344. PALMERT MR, BOEPPLE PA. Variation in the timing of puberty: clinical spectrum and genetic investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:2364–8.
 345. TELES MG, BIANCO SC, BRITO VN, TRARBACH EB, KUOHUNG W, XU S, et al. A GPR54-Activating mutation in a patient with central precocious puberty. *N Engl J Med.* 2008;358:709–15.
 346. FRISCH RE. Body fat, menarche, fitness and fertility. *Hum Reprod.* 1987;2:521–33.
 347. ROBKER RL. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. *Pathophysiology.* 2008;15(2):115–21.
 348. FENG LI X, LIN YS, KINSEY-JONES JS, O'BYRNE KT. High-Fat Diet Increases LH Pulse Frequency and Kisspeptin-Neurokinin B Expression in Puberty-Advanced Female Rats. *Endocrinology.* 2012;153(9):4422–31.
 349. BAZZANO M V, TORELLI C, PUSTOVRH MC, PAZ DA, ELIA EM. Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reprod Biomed Online.* 2015;31(5):655–67.
 350. DOMÍNGUEZ-ORDÓÑEZ R, GARCÍA-JUÁREZ M, LIMA-HERNÁNDEZ FJ, GÓMORA-ARRATI P, BLAUSTEIN JD, GONZÁLEZ-FLORES O. Sexual receptivity facilitated by unesterified estradiol: Dependence on estrogen and progestin receptors and priming dose of estradiol benzoate. *Behav Neurosci.* 2015;129(6):777–88.
 351. GARCÍA-JUÁREZ M, BEYER C, SOTO-SÁNCHEZ A, DOMÍNGUEZ-ORDÓÑEZ R, GÓMORA-ARRATI P, LIMA-HERNÁNDEZ FJ, et al. Leptin facilitates lordosis behavior through GnRH-1 and progestin receptors in estrogen-primed rats. *Neuropeptides.* 2011;45(1):63–7.
 352. MESTON CM, MOE I V, GORZALKA BB. Effects of sympathetic inhibition on receptive, proceptive, and rejection behaviors in the female rat. *Physiol Behav.* 1996;59:537–542.
 353. FRANCIS J, MOHANKUMAR, S M MOHANKUMAR PS. Leptin inhibits norepinephrine efflux from the hypothalamus in vitro: role of gamma aminobutyric acid. *Brain Res.* 2004;1021:286–291.
 354. ZATKO T, MATEJOVICOVA B, BOLEDOVICOVA M, VONDRAKOVA M, BEZAKOVA A, SIROTKIN A V. Growth and obesity and its association with plasma level of steroid hormones and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in Slovak female students. *Bratisl Lek Listy.* 2013;114(10):573–80.
 355. REHMAN R, HUSSAIN Z, FARAZ N. Effect of estradiol levels on pregnancy outcome in obese women. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2012;24(3–4):3–5.
 356. ROCHESTER D, JAIN A, POLOTSKY AJ, POLOTSKY H, GIBBS K, ISAAC B,

- et al. Partial recovery of luteal function after bariatric surgery in obese women. *Fertil Steril*. 2009;92(4):1410–5.
357. SANTORO N, LASLEY B, MCCONNELL D, ALLSWORTH J, CRAWFORD S, GOLD EB, et al. Body Size and Ethnicity Are Associated with Menstrual Cycle Alterations in Women in the Early Menopausal Transition: The Study of Women's Health across the Nation (SWAN) Daily Hormone Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004;89(6):2622–31.
 358. DE PERGOLA G, MALDERA S, TARTAGNI M, PANNACCIULLI N, LOVERRO G, GIORGINO R. Inhibitory Effect of Obesity on Gonadotropin, Estradiol, and Inhibin B Levels in Fertile Women. *Obesity*. 2006;14(11):1954–60.
 359. RAO BN, PAL GK, PRAVATI P. Effect of subcutaneous injection of estradiol on feeding and drinking behaviors and body weight in basolateral amygdaloid lesioned rats. *Ann Neurosci*. 2013;20(4):1399–144.
 360. BROWN LM, GENT L, DAVIS K, CLEGG DJ. Metabolic impact of sex hormones on obesity. *Brain Res*. 2010;1350:77–85.
 361. HERTRAMPF T, SEIBEL J, LAUDENBACH U, FRITZEMEIER KH, DIEHL P. Analysis of the effects of oestrogen receptor α (ER α)- and ER β -selective ligands given in combination to ovariectomized rats. *Br J Pharmacol*. 2009;153(7):1432–7.
 362. ZOTH N, WEIGT C, LAUDENBACH-LESCHOWSKI U, DIEHL P. Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;122(1–3):100–5.
 363. ROBKER RL, AKISON LK, BENNETT BD, THRUPP PN, CHURA LR, RUSSELL DL, et al. Obese Women Exhibit Differences in Ovarian Metabolites, Hormones, and Gene Expression Compared with Moderate-Weight Women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94(5):1533–40.
 364. JUNGHEIM ES, SCHOELLER EL, Marquard KL, Loudon ED, SCHAFFER JE, MOLEY KH. Diet-Induced Obesity Model: Abnormal Oocytes and Persistent Growth Abnormalities in the Offspring. *Endocrinology*. 2010;151(8):4039–46.
 365. PURCELL SH, MOLEY KH. The impact of obesity on egg quality. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(6):517–24.
 366. DUMESIC DA, LESNICK TG, ABBOTT DH. Increased Adiposity Enhances Intrafollicular Estradiol Levels in Normoandrogenic Ovulatory Women Receiving Gonadotropin-Releasing Hormone Analog/Recombinant Human Follicle-Stimulating Hormone Therapy for *in Vitro* Fertilization. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007;92(4):1438–41.
 367. LOPEZ D, MCLEAN MP. Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1a Binds to cis Elements in the Promoter of the Rat High Density Lipoprotein Receptor SR-BI Gene. *Endocrinology*. 1999;140(12):5669–81.
 368. PASQUALI R. Obesity and androgens: facts and perspectives. *Fertil Sterility*. 2006;85(5):1319–40.
 369. CARSON RS, FINDLAY JK, CLARKE IJ, BURGER HG. Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biol Reprod*. 1981;24(1):105–13.

370. CHENG G, WEIHUA Z, MÄKELÄ S, MÄKELÄ S, SAJI S, WARNER M, et al. A role for the androgen receptor in follicular atresia of estrogen receptor beta knockout mouse ovary. *Biol Reprod*. 2002;66(1):77–84.
371. BILLIG H, FURUTA I, HSUEH AJ. Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 1993;133(5):2204–12.
372. KHAN I, GLASER LA, GIBORI G. Reactivation of regressing corpora lutea by estradiol in the pregnant rat: dependence on placental lactogen. *Biol Reprod*. 1987;37(5):1083–8.
373. SAR M, WELSCH F. Differential Expression of Estrogen Receptor- and Estrogen Receptor- in the Rat Ovary. *Endocrinology*. 1999;140(2):963–71.
374. JAKIMIUK A, WEITSMAN S, R BRZECHFFA P, MAGOFFIN D. Aromatase mRNA expression in individual follicles from polycystic ovaries. *Mol Hum Reprod*. 1998;4(1):1–8.
375. GOFF AK, ARMSTRONG DT, LEUNG PCK, KENNEDY TG. An Intraovarian Inhibitory Action of Estrogen on Angrogen Production In vivo. *Biol Reprod*. 1978;19(3):641–7.
376. PUJOL P, REY J-M, NIRDE P, ROGER P, GASTALDI M, LAFFARGUE F, et al. Differential Expression of Estrogen Receptor- α Potential Marker of Ovarian Carcinogenesis. *Cancer Res*. 1998;58:5367–74.
377. VAN DER STEEG JW, STEURES P, EIJKEMANS MJC, HABBEMA JDF, HOMPES PGA, BURGGRAAFF JM, et al. Obesity affects spontaneous pregnancy chances in subfertile, ovulatory women. *Hum Reprod*. 2007;23(2):324–8.
378. JENSEN TK, SCHEIKE T, KEIDING N, SCHAUMBURG I, GRANDJEAN P. Fecundability in relation to body mass and menstrual cycle patterns. *Epidemiology*. 1999;10(4):422–8.
379. PASQUALI R, PATTON L, GAMBINERI A. Obesity and infertility. [Review] [57 refs]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007;14(6):482–7.
380. NELSON SM, FLEMING R. Obesity and reproduction : Impact and interventions. *Reprod Endocrinol*. 2007;19:384–9.
381. GESINK LAW DC, MACLEHOSE RF, LONGNECKER MP. Obesity and time to pregnancy. *Hum Reprod*. 2007;22(2):414–20.
382. LOVELAND JB, MCCLAMROCK HD, MALINOW AM, SHARARA FI. Increased body mass index has a deleterious effect on in vitro fertilization outcome. *J Assist Reprod Genet*. 2001;18(7):382–6.
383. KAAKS R, LUKANOVA A, KURZER MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(12):1531–43.
384. CHANG AS, DALE AN, MOLEY KH. Maternal Diabetes Adversely Affects Preovulatory Oocyte Maturation, Development, and Granulosa Cell Apoptosis. *Endocrinology*. 2005;146(5):2445–53.
385. BELLVER J, PELLICER A, GARCÍA-VELASCO JA, BALLESTEROS A, REMOHÍ J, MESEGUER M. Obesity reduces uterine receptivity: clinical experience from 9,587 first cycles of ovum donation with normal weight donors.

- Fertil Steril. 2013;100(4):1050–8.
386. FERENCZY A. Studies on the cytodynamics of human endometrial regeneration. I. Scanning electron microscopy. *Am J Obstet Gynecol*. 1976;124(1):64–74.
 387. NOCI I, BORRI P, COCCIA ME, CRISCUOLI L, SCARSELLI G, MESSERI G, et al. Hormonal patterns, steroid receptors and morphological pictures of endometrium in hyperstimulated IVF cycles. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1997;75(2):215–20.
 388. GROOTHUIS PG, DASSEN HHNM, ROMANO A, PUNYADEERA C. Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update*. 2007;13(4):405–17.
 389. WARNEKE W, KLAUS S, FINK H, LANGLEY-EVANS SC, VOIGT JP. The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague–Dawley rats of different ages. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014;116:45–54.
 390. CONNOR KL, VICKERS MH, BELTRAND J, MEANEY MJ, SLOBODA DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *J Physiol*. 2012;590(9):2167–80.
 391. GARIEPY G, NITKA D, SCHMITZ N. The association between obesity and anxiety disorders in the population: A systematic review and meta-analysis. *Int J Obes*. 2010;34(3):407–19.
 392. FRANCIS D, DIORIO J, LIU D, MEANEY MJ. Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat. *Science*. 1999;286(5442):1155–8.
 393. MEANEY MJ. Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity a cross generations. *Annu Rev Neurosci*. 2001;24:1161–92.
 394. CHAMPAGNE FA. Epigenetic mechanisms and the transgenerational effects of maternal care. *Front Neuroendocrinol*. 2008;29(3):386–97.
 395. OGREN MP, LOMBROSO PJ. Epigenetics: Behavioral influences on gene function, part I. Maternal behavior permanently affects adult behavior in offspring. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 2008;47(3):240–4.
 396. VAN DIJK SJ, MOLLOY PL, VARINLI H, MORRISON JL, MUHLHAUSLER BS, BUCKLEY M. Epigenetics and human obesity. *Int J Obes*. 2015;39(1):85–97.
 397. DESAI M, JELLYMAN JK, HAN G, BEALL M, LANE RH, ROSS MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211(3):237.e1-237.e13.
 398. TROINA AA, FIGUEIREDO MS, MOURA EG, BOAVENTURA GT, SOARES LL, CARDOZO LFMF, et al. Maternal flaxseed diet during lactation alters milk composition and programs the offspring body composition, lipid profile and sexual function. *Food Chem Toxicol*. 2010;48(2):697–703.
 399. HYATT MA, BUDGE H, SYMONDS ME. Early developmental influences on hepatic organogenesis. *Organogenesis*. 2008;4:170–5.
 400. MCCANCE RA. Food, growth, and time. *Lancet*. 1962;2:621–6.

401. BATESON P. Fetal experience and good adult design. *Int J Epidemiol.* 2001;30:928–34.
402. SMITH J, CIANFLONE K, BIRON S, HOULD FS, LEBEL S, MARCEAU S, et al. Effects of maternal surgical weight loss in mothers on intergenerational transmission of obesity. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:4275–83.
403. BARISIONE M, CARLINI F, GRADASCHI R, CAMERINI G, ADAMI GF. Body weight at developmental age in siblings born to mothers before and after surgically induced weight loss. *Surg Obes Relat Dis.* 2012;8:387–91.
404. LOPEZ M, SEOANE LM, TOVAR S, GARCIA MC, NOGUEIRAS R, DIEGUEZ C, et al. A possible role of neuropeptide Y, agouti-related protein and leptin receptor isoforms in hypothalamic programming by perinatal feeding in the rat. *Diabetologia.* 2005;48:140–8.
405. GRAYSON BE, LEVASSEUR PR, WILLIAMS SM, SMITH MS, MARKS DL, GROVE KL. Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. *Endocrinology.* 2010;151:1622–32.
406. SUN B, PURCELL RH, TERRILLION CE, YAN J, MORAN TH, TAMASHIRO KL. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes.* 2012;61:2833–41.
407. CHANG GQ, GAYSINSKAYA V, KARATAYEV O, LEIBOWITZ SF. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci.* 2008;28:12107–19.
408. AOKI N, KAWAMURA M, MATSUDA T. Lactation-dependent down regulation of leptin production in mouse mammary gland. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 1999;1427(2):298–306.
409. HOUSEKNECHT KL, MCGUIRE MK, PORTOCARRERO CP, MCGUIRE MA, BEERMAN K. Leptin is present in human milk and is related to maternal plasma leptin concentration and adiposity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997;240(3):742–7.
410. KAMIKAWA A, ICHII O, YAMAJI D, IMAO T, SUZUKI C, OKAMATSU-OGURA Y, et al. Diet-induced obesity disrupts ductal development in the mammary glands of nonpregnant mice. *Dev Dyn.* 2009;238:1092–9.
411. TUCKER HA. Quantitative estimates of mammary growth during various physiological states: a review. *J Dairy Sci.* 1987;70(9):1958–66.
412. TUCKER HA. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. *J Dairy Sci.* 2000;83(4):874–84.
413. COULDREY C, MOITRA J, VINSON C, ANVER M, NAGASHIMA K, GREEN J. Adipose tissue: A vital in vivo role in mammary gland development but not differentiation. *Dev Dyn.* 2002;223(4):459–68.
414. JIN Z, DU Y, SCHWAID AG, ASTERHOLM IW, SCHERER PE, SAGHATELIAN A, et al. Maternal Adiponectin Controls Milk Composition to Prevent Neonatal Inflammation. *Endocrinology.* 2015;156(4):1504–13.
415. MUST A, PHILLIPS SM, TYBOR DJ, LIVIDINI K, HAYES C. The association

- between childhood obesity and tooth eruption. *Obes (Silver Spring)*. 2012;20(10):2070–4.
416. FRISCH RE. Critical fatness hypothesis. *Am J Physiol*. 1997;273:E231–2.
 417. YANG F, YANG C, LIU Y, PENG S, LIU B, GAO X, et al. Associations between Body Mass Index and Visual Impairment of School Students in Central China. *Int J Env Res Public Heal*. 2016;13(10):1024.
 418. LALWANI AK, KATZ K, LIU YH, KIM S, WEITZMAN M. Obesity is associated with sensorineural hearing loss in adolescents. *Laryngoscope*. 2013;123(12):3178–84.
 419. SOARES JKB, QUEIROGA RDCRDE, BOMFIM MAD, PESSOA DCNDP, BARBOSA EDA, SOUZA DL, et al. Acceleration of reflex maturation and physical development in suckling rats: effects of a maternal diet containing lipids from goat milk. *Nutr Neurosci*. 2014;17(1):1–6.
 420. MENDES-DA-SILVA C, GIRIKO CÁ, MENNITTI L V, HOSOUME LF, SOUTO TS, SILVA A V. Maternal high-fat diet during pregnancy or lactation changes the somatic and neurological development of the offspring. *Arq Neuropsiquiatr*. 2014;72(2):136–44.
 421. BARROS KM, MANHÃES-DE-CASTRO R, LOPES-DE-SOUZA S, MATOS RJ, DEIRÓ TC, CABRAL-FILHO JE, et al. A regional model (Northeastern Brazil) of induced mal-nutrition delays ontogeny of reflexes and locomotor activity in rats. *Nutr Neurosci*. 2006;9(1–2):99–104.
 422. DAVIDOWA H, LI Y. Altered neuronal responses to feeding-relevant peptides as sign of developmental plasticity in the hypothalamic regulatory system of body weight. *Zh Vyssh Nerv Deiat Im IP Pavlova*. 2003;53(5):663–70.
 423. PLAGEMANN A. Breast-feeding and risk for childhood obesity: response to Mayer-Davis et al. *Diabetes Care*. 2007;30(2):451–2.
 424. SANTILLÁN ME, VINCENTI LM, MARTINI AC, FIOL DE CUNEO M, RUIZ RD, MANGEAUD A, et al. Developmental and neurobehavioral effects of perinatal exposure to diets with different ω -6: ω -3 ratios in mice. *Nutrition*. 2010;26(4):423–31.
 425. OROZCO-SOLÍS R, MATOS RJB, GUZMÁN-QUEVEDO O, LOPES DE SOUZA S, BIHOUEE A, HOULGATTE R, et al. Nutritional Programming in the Rat Is Linked to Long-Lasting Changes in Nutrient Sensing and Energy Homeostasis in the Hypothalamus. *PLoS One*. 2010;5(10):e13537.
 426. SALES VM, FERGUSON-SMITH AC, PATTI M-E. Epigenetic Mechanisms of Transmission of Metabolic Disease across Generations. *Cell Metab*. 2017;25(3):559–71.
 427. HOFER MA. Hidden Regulatory Processes in Early Social Relationships. In Bateson PPG, Klopfer PH. *Social Behavior; Perspectives in Ethology*. Springer. 1978;3:135–66.
 428. HOFER MA. Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta Paediatr Suppl*. 1994;397:9–18.
 429. PRYCE CR, RÜEDI-BETTSCHEN D, DETTLING AC, WESTON A, RUSSIG H, FERGER B, et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in

- rodents and primates: Potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev.* 2005;29(4–5):649–74.
430. BREDY TW, GRANT RJ, CHAMPAGNE DL, MEANEY MJ. Maternal care influences neuronal survival in the hippocampus of the rat. *Eur J Neurosci.* 2003;18(10):2903–9.
 431. LIU D, DIORIO J, DAY JC, FRANCIS DD, MEANEY MJ. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. *Nat Neurosci.* 2000;3(8):799–806.
 432. CALDJI C, TANNENBAUM B, SHARMA S, FRANCIS D, PLOTSKY PM, MEANEY MJ. Maternal care during infancy regulates the development of neural systems mediating the expression of fearfulness in the rat. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95(9):5335–40.
 433. CALDJI C, FRANCIS D, SHARMA S, PLOTSKY PM, MEANEY MJ. The Effects of Early Rearing Environment on the Development of GABAA and Central Benzodiazepine Receptor Levels and Novelty-Induced Fearfulness in the Rat. *Neuropsychopharmacology.* 2000;22(3):219–29.
 434. LIU D, DIORIO J, TANNENBAUM B, CALDJI C, FRANCIS D, FREEDMAN A, et al. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997;277(5332):1659–62.
 435. FRANCIS DD, CHAMPAGNE FC, MEANEY MJ. Variations in maternal behaviour are associated with differences in oxytocin receptor levels in the rat. *J Neuroendocrinol.* 2000;12(12):1145–8.
 436. WEAVER ICG, CERVONI N, CHAMPAGNE FA, D’ALESSIO AC, SHARMA S, SECKL JR, et al. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004;7(8):847–54.
 437. MURGATROYD C, PATCHEV A V, WU Y, MICALE V, BOCKMÜHL Y, FISCHER D, et al. Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress. *Nat Neurosci.* 2009;12(12):1559–66.
 438. FRANKLIN TB, RUSSIG H, WEISS IC, GRÄFF J, LINDER N, MICHALON A, et al. Epigenetic Transmission of the Impact of Early Stress Across Generations. *Biol Psychiatry.* 2010;68(5):408–15.
 439. GALARZA RA, RHON CALDERÓN EA, CORTEZ AE, FALETTI AG. Maternal Overweight Disrupts the Sexual Maturation of the Offspring. *Reprod Sci.* 2017;24(9):1284–92.
 440. LAVIOLA G, TERRANOVA ML. The developmental psychobiology of behavioural plasticity in mice: the role of social experiences in the family unit. *Neurosci Biobehav Rev.* 1998;23(2):197–213.
 441. MORGANE PJR, AUSTIN-LAFRANCE R, BRONZINO J, TONKISS J, DÍAZ-CINTRA S, CINTRA L, et al. Prenatal malnutrition and development of the brain. *Neurosci Biobehav Rev.* 1993;17(1):91–128.
 442. THICKBROOM GW, BYRNES ML, ARCHER SA, NAGARAJAN L, MASTAGLIA FL. Differences in sensory and motor cortical organization following brain injury early in life. *Ann Neurol.* 2001;49(3):320–7.